

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

**Haplotyp-spezifische Deletionen am Genort des Morbus Best mittels
CRISPR/Cas9 Genom-Editierung**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Isabell Römer**

2023

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

**Haplotyp-spezifische Deletionen am Genort des Morbus Best mittels
CRISPR/Cas9 Genom-Editierung**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Isabell Römer**

2023

Dekan:

Prof. Dr. med. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber

2. Berichterstatter:

PD Dr. Caroline Brandl

Tag der mündlichen Prüfung:

14.04.2023

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Funktion der RPE- Zellen	3
2.2 Morbus Best.....	4
2.2.1 Molekulargenetische Grundlagen	4
2.2.2 Klinische Erscheinung und Diagnosefindung	5
2.3 Gentherapien hereditärer Augenerkrankungen	8
2.4 CRISPR/Cas9.....	10
2.4.1 Ursprung des CRISPR/Cas9-Systems.....	10
2.4.2 Genomeditierung mittels CRISPR/Cas9	11
2.5 Zielsetzung dieser Arbeit	14
3 Material.....	16
3.1 Zelllinien.....	16
3.2 Bakterienstämme.....	16
3.3 Vektoren	16
3.4 Klonierte Vektorkonstrukte.....	17
3.5 Oligonukleotide	17
3.5.1 Oligonukleotide für die sgRNAs	17
3.5.2 Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung	20
3.6 Enzyme.....	21
3.7 Reaktionssysteme	22
3.8 Chemikalien	22
3.9 Molekularmassenstandard.....	23
3.10 Puffer und Medien	24
3.11 Zellkulturmedien	24
3.12 Geräte.....	25
3.13 Software.....	26

4 Methoden	27
4.1 Klonierung von Konstrukten.....	27
4.1.1 PCR- Amplifizierung der DNA-Fragmente	27
4.1.2 Agarosegelelektrophorese	28
4.1.3 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	29
4.1.4 Ligation in pGem®-T-Vektor	29
4.1.5 Hitzeschock-Transformation in E. coli Bakterien.....	29
4.1.6 Colony-PCR	30
4.1.7 Plasmid Präparation-Mini Pröp	30
4.1.8 Sanger Sequenzierung	31
4.1.9 Restriktionsverdau	32
4.1.10 Ligation in die Expressionsvektoren.....	32
4.1.11 Herstellung von Glycerolstocks.....	35
4.2 Kultivierung der Zelllinien.....	35
4.2.1 Kultivierung HEK 293T- Zellen.....	35
4.2.2 Kultivierung Fibroblasten.....	36
4.3 Transfektionen der Zellen	36
4.3.1 Chemische Reverse Transfektion der HEK 293T- Zellen	36
4.3.2 Transfektion der Fibroblasten-Elektroporationsmethode	37
4.4 Zellsorting mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Durchflusszytometer .	37
4.5 Evaluation der CRISPR/Cas9-Effizienz und Spezifität	37
4.5.1 Isolation und Präparation genomischer DNA aus Fibroblasten	37
4.5.2 PCR-Amplifikation SNP-einschließender DNA-Sequenzen	38
4.5.3 Colony-PCR	39
4.5.4 Sanger-Sequenzierung positiv gecrisperter Klone.....	40
5 Vorarbeiten.....	41
5.1 Bioinformatische Vorarbeiten.....	41
5.2 Experimentelle Vorarbeiten	46
6 Ergebnisse	47

6.1 Bioinformatischer Arbeitsteil	47
6.2 Experimenteller Arbeitsteil	50
6.2.1 Austestung bioinformatisch entworfener sgRNAs in HEK 293T-Zellen	50
6.2.1.1 Transfektionen der 20mer langen sgRNAs.....	51
6.2.1.2 Optimierungsversuche der sgRNAs	53
6.2.2 Transfektion optimierter sgRNAs in primäre Patienten-Fibroblasten.....	64
6.2.2.1 Auswertung der Fibroblasten-Transfektion für SNP 534C	66
6.2.2.2 Transfektions- Auswertung für SNP 429T/C	67
6.2.2.3 Transfektions-Auswertung für SNP 581G und 749A.....	68
6.2.2.4 Transfektions- Auswertung für SNP 756C	70
7.1 Evaluation der sgRNAs einschließlich deren Optimierungsversuche	73
7.2 Evaluation von Fibroblastentransfektionen	76
7.3 Evaluation des Haplotyp- spezifischen Ansatzes	77
7.4 Ausblick und weiterführende Aspekte.....	79
7.4.1 Identifikation von <i>Off- Targets</i>	79
7.4.2 Belieferung der CRISPR/Cas9-Komponenten.....	87
7.4.3 Evaluation immunogener Reaktionen.....	93
8 Abkürzungsverzeichnis	96
9 Abbildungsverzeichnis.....	99
10 Tabellenverzeichnis.....	100
11 Literaturverzeichnis	102
12 Eidesstattliche Erklärung.....	119
13 Danksagung	120

1 Zusammenfassung

Bei der Best'schen vitelliformen Makuladystrophie (BVMD) oder auch Morbus Best (M. Best) handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Makulopathie, von der primär die Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) betroffen sind. Bis heute sind mehr als 200 verschiedene Mutationen im Bestrophin 1 (BEST1) Gen bekannt, welche zu einer Funktionsbeeinträchtigung des BEST1 Proteins als Volumen-gesteuerter Kalzium-abhängiger Chlorid-Kanal in der basolateralen Membran der RPE Zellen führen. BVMD-assoziierte Mutationen üben einen dominant negativen Effekt auf das wildtypische Allel aus. Vermutlich führt schon der Einbau einer einzigen mutierten Proteinuntereinheit in die homo-pentamere BEST1 Kanalstruktur zu einer Beeinträchtigung des Chloridtransports. Der therapeutische Ansatz dieser Arbeit zielt daher auf eine Reduktion mutierter Untereinheiten auf genomischer Ebene ab, welcher als mutationsunabhängiger Ansatz über die CRISPR/Cas9 Methode verfolgt werden soll. Anstatt der jeweils Krankheits-verursachenden Mutation, werden häufig vorkommende Single Nucleotid Polymorphismen (SNPs) am BEST1-Genort targetiert, die sich in cis auf dem Mutations-tragenden DNA-Strang befinden. Dafür wurden zunächst bioinformatisch SNP-spezifische single guide RNAs (sgRNAs) entworfen. Für die Erkennung der DNA durch den CRISPR/Cas-Komplex ist eine kurze Basensequenz in der DNA, die sogenannte Protospacer Adjacent Motiv (PAM) Sequenz notwendig. Indem die sgRNA an die komplementäre Ziel-DNA bindet, wird die Cas9-Endonuklease spezifisch an den mutationstragenden Haplotypen herangeführt, wo dieser Komplex Doppelstrangbrüche (DSB) verursacht. Durch die Fehleranfälligkeit der nicht-homologen Endreparatur (*non-homologous end joining*, NHEJ) entstehen Insertionen und Deletionen, die zu der Entstehung frühzeitiger Stopcodons und zu einem Abbruch der Gentranslation führen. Das Wildtyp-Allel, welches sich an der Position des SNPs von dem mutierten Allel unterscheidet, sollte von der Mutations-abhängigen sgRNA nicht beeinflusst werden. Dadurch sollte weiterhin funktionsfähiges Protein exprimiert werden, wenn auch nur haploinsuffizient. Damit sollte wieder ein funktionsfähiger pentamerer BEST1-Chloridkanal generiert werden.

Für die Allel-spezifische Genomeditierung wurden zunächst Transfektionsexperimente in HEK293T-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die experimentellen Evidenzen nur ungenügend mit den durch die Software errechneten Vorhersagewerten für eine hohe Effizienz und Spezifität der sgRNAs übereinstimmten. Daher wurde die Allelspezifität der sgRNAs mittels Sequenzverkürzungen und dem Austausch einzelner Nukleotide in der sgRNA-Sequenz entgegen zu wirken. Dieser Optimierungsprozess konnte für alle untersuchten sgRNAs eine deutliche Verbesserung der Allelspezifität erreichen. Dabei konnte festgestellt

werden, dass Modifikationen am 5'-Ende der sgRNA deutlich besser toleriert werden als in den zur PAM-Sequenz angrenzenden 8-12 Nukleotiden einer sgRNA, der sogenannten „Seed“-Region. Allerdings gelang es trotz zahlreicher Versuche nicht, allgemein gültige Aussagen über den Erfolg der Optimierungsansätze zu treffen, da abhängig von der Ziel- und sgRNA-Sequenz jeweils unterschiedliche Modifikationen zum optimalen Ergebnis führten. In einem finalen Schritt wurde das Ausmaß der tatsächlich stattgefundenen Haplotypdeletionen in primären Fibroblasten-Zelllinien an definierten Haplotypen von BVMD-Patienten getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die optimierten sgRNAs an den heterozygoten Genloci eine durchweg sehr gute Spezifität für den mutationstragenden DNA-Strang zeigten. Entsprechend wurde das wildtypische Allel in keinem der untersuchten Fälle vom CRISPR/Cas9-System erkannt und modifiziert. Allerdings waren die Effizienzen der sgRNAs, DSBs in der Ziel-DNA zu erzeugen, sehr unterschiedlich und korrelierten selten mit den bioinformatischen Berechnungen oder den Vorexperimenten in den HEK293T-Zellen. Für eine genaue Bestimmung der Effizienzen war daher die jeweilige experimentelle Austestung der einzelnen sgRNAs und/oder deren Kombination in den Patienten-Fibroblasten-Zelllinien erforderlich.

2 Einleitung

2.1 Funktion der RPE- Zellen

Das retinale Pigmentepithel (RPE) ist lokalisiert zwischen der neurosensorischen Retina und der choroidalen Schicht und besteht aus einer einzelnen Schicht postmitotischer Zellen.

Das RPE ist für die Erhaltung eines gesunden, retinalen Milieus und der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität des Zellverbandes essentiell (Singh Grewal et al. 2021). Dies wird gewährleistet durch die Sekretion von Signalmolekülen, Wachstumsfaktoren sowie von neuroprotektiven und immunosuppressiven Faktoren, wie z.B. des Pigment epithelium-derived factors (PEDF) und vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) (Rashid et al. 2016). Durch diese Stoffe wird eine Kommunikation des RPEs mit anderen Geweben gewährleistet. Als Komponente der Blut-Retina-Schranke ist das RPE im transepithelialen Transport von Molekülen zwischen Retina und Choroid und an der Instandhaltung der ionischen Homöostase des subretinalen Gewebes beteiligt. Dies geschieht durch den Transport von Wasser und Metaboliten wie Glucose und Laktat sowie an der Kontrolle des Gewebe pHs (Singh Grewal et al. 2021). Für diesen Zweck ist das RPE mit zahlreichen Pumpen, Transportern und Ionenkanälen ausgestattet. Es versorgt die metabolisch hochaktive Retina u.a. mit Nährstoffen und sorgt für die Entsorgung von Abfallstoffen (Rashid et al. 2016).

Dementsprechend spielen die RPE Zellen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der darüber liegenden Photorezeptorschicht und somit für den Sehvorgang selbst (Singh Grewal et al. 2021).

Degenerative Erkrankungen der Retina und des RPE sind bekannt und zeigen die wichtige Rolle dieser postmitotischen Zellschicht in der retinalen Homöostase auf. RPE-bedingte Retinopathien können sowohl als mono-genetische (z.B. BVMD) als auch als komplexe Ätiologien (Altersbedingte Makuladegeneration, AMD) auftreten (Lim et al. 2012).

2.2 Morbus Best

2.2.1 Molekulargenetische Grundlagen

Das für die Bestrophinopathien verantwortliche Gen BEST1 gehört zu der Gruppe der humanen Bestrophin-Familie von vier paralogen Genen (Stöhr et al. 2002). Das Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 11q13 lokalisiert und besteht aus elf Exonen (Marquardt et al., 1998). Die Expression ist beim Menschen gewebespezifisch hauptsächlich auf das RPE beschränkt. Bis jetzt sind mehr als 250 verschiedene Mutationen im Best1 Gen bekannt (http://www-huge.uniregensburg.de/BEST1_database/home.php). Der überwiegende Anteil (>97%) davon sind Missense Mutationen und beeinträchtigen zum größten Teil den evolutionär hoch konservierten N-terminalen Proteinanteil (Stöhr et al. 2002).

Das integrale Membranprotein BEST1 besteht aus 585 Aminosäuren und bildet einen homopentameren Kalzium-aktivierten-Chlorid-Kanal (Kane Dickson et al. 2014), der an der Volumenregulation der RPE Zellen beteiligt ist (Milenkovic et al., 2015). Mutationen im BEST1-Gen führen zu einer eingeschränkten Chlorid-Leitfähigkeit des Kanals (Sun et al. 2002) in der basolateralen Membran der RPE-Zellen (Marmorstein et al., 2000). Studien konnten zeigen, dass mutiertes BEST1-Protein einen dominant negativen Effekt auf das Wildtyp-Protein ausübt (Milenkovic et al. 2015). Die Tatsache, dass mutierte Untereinheiten ihre Fähigkeit zur Oligomerisierung beibehalten und sich die homo-pentamere Struktur des Chlorid Kanals dementsprechend sowohl aus mutierten als auch aus normalen Bestrophin-Untereinheiten zusammensetzen kann, liefert eine plausible Erklärung für das dominant-negative Verhalten der BEST1 Mutationen (Yang et al. 2014; Johnson et al. 2014).



Abbildung 1: Homopentamere Struktur des Bestrophin-1

Dargestellt ist ein Modell des Kalzium-aktivierten Chloridkanals, der durch Oligomerisierung des Bestrophin-1 aus fünf identischen Untereinheiten gebildet wird.

Abbildung entnommen aus Yang et al., 2014

Mindestens vier verschiedene Retinopathien konnten bisher auf Mutationen im BEST1-Gen zurückgeführt werden. Dazu gehören die drei autosomal dominanten vererbten Formen

- 1) Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (BVMD, Morbus Best) (Petrukhin et al. 1998).
- 2) die adulte vitelliforme Makuladystrophie (AVMD) (Krämer et al. 2000) und
- 3) die Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC) (Yardley et al. 2004) sowie
- 4) die autosomal rezessive Bestrophinopathie (ARB) (Burgess et al. 2008).

Jedoch besteht eine ausgeprägte Variabilität in Penetranz und Expressivität (Petrukhin et al. 1998). Eine Korrelation zwischen den BEST1 Genotypen und den klinischen Phänotypen konnte bisher nur in ersten Ansätzen gezeigt werden (Milenkovic et al. 2018).

2.2.2 Klinische Erscheinung und Diagnosefindung

Mit einer geschätzten Prävalenz von 1:50 000 ist die BVMD die häufigste der Bestrophinopathien (Bitner et al. 2012; Singh Grewal et al. 2021).

Schon bei der erstmaligen Krankheitsdokumentation durch Friedrich Best 1905 wurde die charakteristische Akkumulation von gelblichem Lipofuszin-ähnlichem Material in den RPE-Zellen und subretinal beschrieben (Petrukhin et al. 1998). Studien konnten zeigen, dass die erhöhte Lipofuszin Konzentration nicht ursächlich für die Symptome ist, sondern ein Ausdruck akkumulierter, unverdauter Zellbruchstücke darstellt (Sparrow et al. 2016). Der exakte Pathomechanismus der Lipofuszin-Ansammlungen ist noch nicht ausreichend geklärt. Diskutiert wird eine Beeinträchtigung der lysosomalen Degradationsfunktion, die auf das veränderte Zellvolumen und letztendlich auf einen pathologischen intrazellulären pH zurückzuführen ist (Hosogi et al. 2014).

Die kuppelartigen, an Eidotter (vitelliform) erinnernden Läsionen sind namensgebend für die BVMD (Weingeist et al. 1982, 1982). Mittels der Klassifikation nach Mohler und Fine aus dem Jahre 1981 lässt sich diese anhand des Erscheinungsbildes retinaler Läsionen in sechs Stadien einteilen (Mohler and Fine, 1981) (**Abbildung 2**)

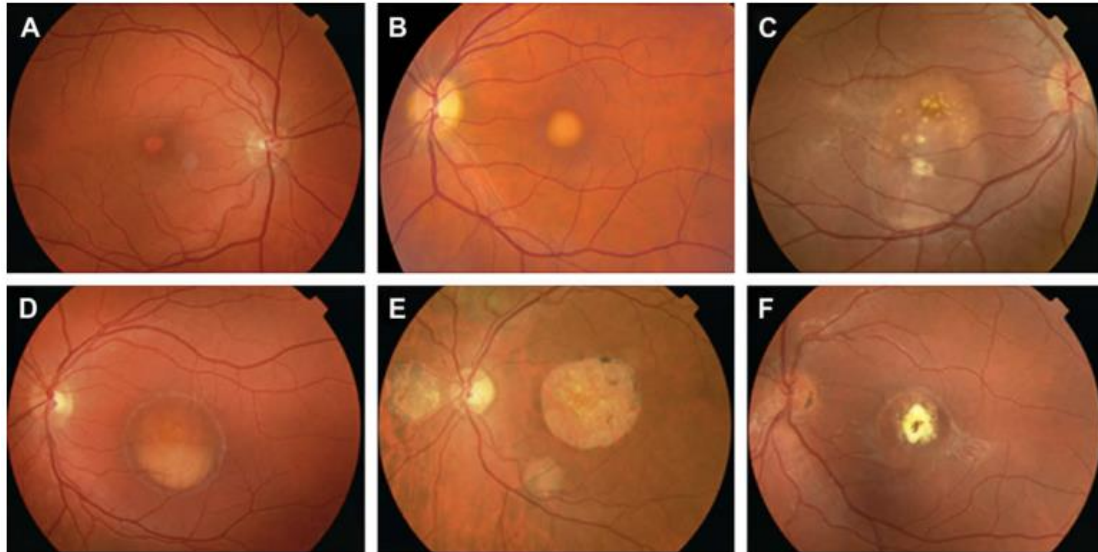


Abbildung 2: Stadieneinteilung der Best'schen vitelliformen Makuladystrophie

(A) previtelliformes Stadium: leichte Veränderungen im RPE (B) vitelliformes Stadium: akkumuliertes Lipofuszin, (C) vitellirruptives Stadium: Aufbrechen der Lipofuszin-Ansammlung, (D) Pseudohypopyon Stadium: Läsion mit angesammeltem gelblichem, vitelliformem Material im unteren Teil und darüber liegender transparenter Flüssigkeit, (E) atrophisches Stadium: mit Atrophie des RPE, (F) Phase der Neovaskularisation: Neovaskularisation und begleitende Narbenbildung; Abbildung entnommen aus Boon et al., 2009

Die Erkrankung ist klinisch durch einen im frühen Lebensalter einsetzenden, progressiven Sehverlust gekennzeichnet.

Das vitelliforme Stadium ist durch seine auffälligen, an Eidotter erinnernden Läsionen in der Macularegion relativ leicht zu identifizieren (Singh Grewal et al. 2021). In der Regel kommt es bei Eintritt ins vitelliforme Stadium zu einer Abnahme der Sehfunktion, welche zu Beginn oft nur mild ausgeprägt ist (Marmorstein et al. 2009). Zusätzlich wird von einigen Patienten in diesem Stadium Photophobien, Metamorphopsien oder Nachtblindheit beschrieben (Singh Grewal et al. 2021). Im Laufe der Zeit können das gelbe Erscheinungsbild und die klare Begrenzung der Läsionen irregulärer werden. Das vitellirruptive Stadium geht mit einem Untergang der vitelliformen Läsionen einher und führt zur Entstehung eines "Rührei-artigen" Erscheinungsbildes mit multiplen, irregulären, gelben Ablagerungen. Eine partielle Resorption der Flüssigkeit der Läsionen kann zur Präsentation des Pseudohypopyons führen. Dabei kommt es häufig zu einer Infiltration der vorderen Augenkammer durch verschiedenste inflammatorische Zellen. Der Progress in das atrophische Stadium resultiert im Untergang und Verlust der Photorezeptorzellen (Singh Grewal et al. 2021). Hyperpigmentiertes, fibröses Narbengewebe in der Macula führt zu ausgeprägter Atrophie. Im Zuge der Atrophie kommt es zu einem progressiven und irreversiblen retinalen Zellverlust (Marmorstein et al. 2009),

welcher in aller Regel mit einem deutlichen Verlust der Sehstärke vergesellschaftet ist (Krämer et al. 2000). Eine Aufhebung der Blut-Retina-Schranke durch den Untergang der RPE Zellen kann zu choroidalen Neovaskularisationen führen (Singh Grewal et al. 2021). Diese neu entstandenen, strukturell schwächeren Blutgefäße sind anfälliger für Rupturen und können dadurch zu Komplikationen wie subretinalen Blutungen, Flüssigkeitsakkumulationen und einer plötzlichen Abnahme der Sehschärfe führen (Chung et al. 2001). Komplikationen in Form von choroidalen Neovaskularisationen wurden bei 2 - 9% der Patienten beschrieben (Boon et al. 2009). M. Best tritt in der Regel bilateral auf, mit häufig relativ symmetrischen Läsionen im Vergleich beider Augenhintergründe. Jedoch wurden auch Fälle eines unilateralen Auftretens beschrieben (Arora et al. 2016).

Die Krankheitsstadien sind zwar klassisch und treten bei vielen Patienten chronologisch nach oben genanntem Muster auf, jedoch gibt es auch Krankheitsverläufe, die keiner festen Abfolge folgen (Singh Grewal et al. 2021).

Klassischerweise nimmt der Visusverlust bei der BVMD mit dem Alter zu, jedoch kann bei einigen Mutations-Trägern eine gute Sehfähigkeit bis in die 5. oder 6. Lebensdekade hinein verzeichnet werden (Fishman et al. 1993). Bei 75% der betroffenen Patienten kann bis zum Erreichen der 5. Lebensdekade eine Sehfähigkeit von 6/12 oder besser auf mindestens einem Auge erhalten werden (Fishman et al. 1993). In den meisten Fällen kommt es zu einem graduellen Verlust der Sehfähigkeit (Wittström et al. 2011). Der Grad und die Progredienz visueller Beeinträchtigungen variiert jedoch sowohl inter- als auch intrafamiliär und erschwert Aussagen zur prognostischen Krankheitsentwicklung (Marmorstein et al. 2009; Nordström und Thorburn 1980). Patienten können sich zusätzlich mit Hyperopie, Astigmatismus und Abnormalitäten des vorderen Augensegments präsentieren, beispielhaft einer flachen vorderen Augenkammer (Wittström et al. 2011). Diese Tatsache erhöht das Risiko betroffener Patienten, vom akuten Engwinkelglaukom betroffen zu sein. Problematisch ist außerdem die erhöhte Anfälligkeit für Ablösungen der Netzhaut bei bereits geringen Traumata (Boon et al. 2009).

Die Diagnose BEST1-assoziiertes Erkranken wird gestellt anhand von Fundus-Untersuchungen, elektrophysiologischer Untersuchungsmethoden wie dem Elektrookulogramm (EOG) und der Erhebung der Familienanamnese (Kellner et al. 2015).

Mittels des EOGs wird die elektrische Spannungsdifferenz, die zwischen der Vorderseite und der Rückseite des RPEs herrscht, gemessen. Dies geschieht einerseits bei Dunkelheit und andererseits bei Exposition gegenüber Licht. Diese Werte dienen dazu, den light peak (LP, Arden Ratio) zu kalkulieren. Das Ausmaß der Spannungsunterschiedes verändert sich bei

Lichteinwirkung und dient als Indikator für dessen Gesundheit und Funktionalität (Singh Grewal et al. 2021). Laut der International Society for Clinical Electrophysiology of Vision befindet sich die physiologische Arden Ratio zwischen 1.7 und 4.3 (Constable et al. 2017).

Ein klinisches Kernmerkmal der BVMD ist der reduzierte bis fehlende Hellanstieg (eine abnormale Arden Ratio $<1,55$) im EOG, was die Vermutung des RPEs als primären Entstehungsort der Pathologie nahelegt (Cross und Bard 1974). Verursacht wird dieses Phänomen vermutlich durch die Beeinträchtigung der Funktion des BEST1-Proteins. Da das EOG bei Mutationsträgern wahrscheinlich schon ab Geburt auffällig ist, ist es für die Diagnostik auch symptomfreier Mutationsträger von Bedeutung (Cross und Bard 1974). Jedoch wurde bei bis zu 8% BVMD erkrankter Individuen ein unauffälliges EOG beobachtet (Pasquay et al. 2015). Da auch bei unauffälligen Ergebnissen eine BEST1-assoziierte Erkrankung nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, kann die zweifelsfreie Diagnosesicherung letztendlich nur über eine Genanalyse erreicht werden (Renner und Kellner 2016).

2.3 Gentherapien hereditärer Augenerkrankungen

Zu den einzigartigen natürlichen Eigenschaften, die das Auge für genetische Therapien sehr geeignet erscheinen lässt, zählen beispielsweise seine gute Zugänglichkeit, die invasive Applikationstechniken verhältnismäßig leicht ermöglicht. Zudem erlaubt die Transparenz der okulären Strukturen eine direkte Beobachtung des Augenhintergrunds. Einfache funktionelle Tests lassen Rückschlüsse auf den Grad der Beeinträchtigung und Wiederherstellung visueller Funktionen zu und ermöglichen dadurch eine direkte und nicht-invasive Beurteilung des Behandlungserfolgs. Darüber hinaus ist das Auge ein immun-privilegiertes Organ (den Hollander et al. 2008). Durch die anatomische Barriere der Blut-Retina-Schranke ist das Auge gegenüber dem restlichen Körper weitestgehend isoliert. Aus diesem Grund wurden bisher kaum systemische oder lokale Immunreaktionen in Form von neutralisierenden Antikörpern oder T-Zell-Antworten beschrieben (Ruan et al. 2017). Schließlich kann das kontralaterale Auge als Negativkontrolle benutzt werden.

Trotz intensiver Forschungen ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch für keine der Bestrophinopathien eine Therapieoption bekannt. Erste wichtige Erfolge konnten für die autosomal rezessive Leber'sche Congenitale Amaurosis vom genetischen Subtyp 2 (LCA 2) erreicht werden, die durch Funktionsverlust-Mutationen im RPE65 Gen verursacht wird (Bainbridge et al. 2008). Bei der LCA handelt es sich um eine schwerwiegende retinale Dystrophie, bei der die Sehfunktion der Betroffenen schon ab Geburt eingeschränkt ist und

meist bis zur dritten Lebensdekade zur vollständigen Erblindung führt (Lorenz et al., 2000). Da die Genmutationen einem rezessiven Erbgang folgen und Patienten folglich homozygote oder „zusammengesetzt heterozygote“ Träger von Mutationen sind, können Betroffene von einer Gensatztherapie profitieren (Russell et al. 2017). In dieser Studie wurde dafür die RPE65-kodierende Sequenz mittels einer einmaligen subretinalen Injektion eines rekombinanten AAV-Vektors verabreicht. Dieses System ist seit Dezember 2017 in den USA als FDA-zugelassenes Medikament Luxturna® auf dem Markt und steht seit November 2018 auch in der Europäischen Union als Therapieoption zur Verfügung.

Nichtsdestotrotz ist diese Form der Gentherapie nicht auf Erkrankungen übertragbar, in denen heterozygot dominante Mutationen mit einem „Funktionsgewinn“ einhergehen oder deren Genprodukt einen dominant-negativen Effekt auf das normale Protein ausübt. Für solche Mutationen stehen nach wie vor keine Therapieoptionen zur Verfügung und werden dementsprechend dringend benötigt.

Eine Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapien sind geeignete Modellsysteme, die imstande sind, die Krankheitspathologie nachzuahmen und somit eine Überprüfung neuer Behandlungsansätze erlauben. Ein solches vielversprechendes System entwickelte sich in den letzten Jahren aus der induzierten pluripotenter Stammzell- (hiPSC) Technologie, durch die es gelang, humane somatische Zellen in nahezu jeden Zelltyp der menschlichen Körpers zu reprogrammieren (Takahashi et al. 2007; Takahashi und Yamanaka 2006). Seit ihrer Entwicklung finden die hiPSCs vielfache Anwendung in der Erforschung von Krankheitsmechanismen und in zell-basierten Transplantationstherapien selektiver humaner degenerativer Erkrankungen (Okano et al. 2013; Egashira et al. 2013).

Einige Methoden zur Differenzierung von hiPSC in RPE Zellen wurden bereits etabliert und machen es möglich, in-vitro Zellen zu generieren, die annähernd die gleichen funktionalen und strukturellen Eigenschaften aufweisen wie native RPE-Zellen (Brandl et al. 2014; Buchholz et al. 2013; Krohne et al. 2012). Aus diesem Grund haben sie sich in den vergangenen Jahren zu einem wertvollen Bestandteil der ophtalmologischen Forschung von Netzhauterkrankungen, insbesondere Erkrankungen des RPE, etabliert.

Die aus hiPSC gewonnenen RPE-Zellen liefern ein Modell, in dem ausgewählte Manipulationen vorgenommen und deren Folgen untersucht werden können. Ein möglicher Therapieansatz für Mutationen, die zu einem Funktionsgewinn oder zu einem dominant-negativen Effekt führen, wäre eine gezielte Unterdrückung der Transkription des jeweils defekten Gens. Als vielversprechende Methode gilt heute die Genomeditierung mittels der CRISPR/Cas9-Technologie (Liu et al., 2016).

2.4 CRISPR/Cas9

2.4.1 Ursprung des CRISPR/Cas9-Systems

Das CRISPR/Cas9-System ist ursprünglich als Teil des prokaryontischen, erworbenen Immunsystems beschrieben worden, durch welches eingedrungene und potentiell bedrohliche Fremd-DNA oder Fremd-RNA in einem mehrstufigen Prozess erkannt und funktionell ausgeschaltet werden kann (Jinek et al. 2012). Der CRISPR-(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) Locus findet sich in den Genomen von etwa 90% der Archäen und 40% der Bakterien und besteht aus repetitiven Strukturen mit kurzen intermittierenden variablen Sequenzen, den sogenannten *spacern* (Horvath und Barrangou 2010). Diese *spacer* entsprechen dabei Fragmenten eingedrungener Fremd-DNA, die als Reaktion auf Virus und Plasmid-Angriffe während der adaptiven Phase in das bakterielle Genom integriert wurden und somit als genetisches „Gedächtnis“ vergangener Invasionen konserviert wurden (Wiedenheft et al. 2012). In der Expressionsphase entstehen durch die Transkription der CRISPR-Sequenzen lange RNA-Stücke (pre-crRNA), die komplementär zu ehemaligen eingedrungenen Fremd-DNAs sind. (Deltcheva et al. 2011). Ihre Funktionsfähigkeit erhält die CRISPR-RNA (crRNA) jedoch erst durch die Hybridisierung mit einer zweiten transaktivierenden CRISPR-RNA (tracrRNA), die für die Prozessierung des langen primären Transkripts und der Aktivierung der dafür notwendigen katalytischen Proteine von Bedeutung ist (Deltcheva et al. 2011). Dadurch entsteht eine Datenbank an kurzen crRNA Stücken, von denen jede bei nochmaliger Infektion mit Fremd-DNA komplementäre Sequenzen spezifisch erkennen und dadurch die Cas9-Endonuklease zum Ort des zu induzierenden DSBs navigieren kann (Wiedenheft et al. 2012). Diese letzte Phase wird auch Interferenzphase genannt. Voraussetzung für die Erkennung und Bindung ist die Anwesenheit einer PAM Sequenz unmittelbar am 3'-Ende der Zielsequenz. Dieses Erkennungsmotiv wird von der Cas9-Nuklease erfasst und findet sich nicht in der bakteriellen DNA, wodurch eine Unterscheidung zwischen Fremd- und Eigen-DNA stattfinden kann.

2.4.2 Genomeditierung mittels CRISPR/Cas9

Obwohl der CRISPR-Locus schon 1987 erstmalig entdeckt wurde (Ishino et al., 1987), kristallisierte sich die Bedeutung, die dieses Systems für die Genomeditierung haben sollte, erst Jahrzehnte später heraus. Heute findet es vielseitigen Einsatz in Landwirtschaft, Biotechnologie, Biologie und Medizin (Hsu et al. 2014).

Seine mehrfache Anwendung verdankt das CRISPR/Cas9-System seiner Variabilität und Einfachheit. Durch die Änderung der sgRNA Nukleotidabfolge im Expressionsvektor ist es theoretisch möglich, jede beliebige genomische Sequenz anzusteuern (Liu et al. 2016). Limitierender Faktor ist lediglich das Vorhandensein eines Erkennungsmotivs in Form der PAM-Sequenz in der Ziel-DNA (Mojica et al. 2009). Deren Abwesenheit resultiert in der Unfähigkeit der Cas9-Endonuklease, die DNA zu schneiden, auch wenn die crRNA und Ziel-Sequenz komplementär zueinander sind (Courtney et al. 2016). Form und Länge der PAM variieren zwischen den CRISPR/Cas9-Varianten unterschiedlicher Bakterienstämme. (Makarova et al. 2011; Mojica et al. 2009).

Zusätzlich können im Vergleich zu anderen Genomeditierungstechnologien wie den Zinkfinger-Nukleasen (ZNFs) oder den *transcription activator–like effector nucleases* (TALENs) durch das CRISPR/Cas-Nuklease-System mit relativ geringem Aufwand spezifisch und effizient mehrere Genorte gleichzeitig editiert werden (Ran et al. 2013b).

Die CRISPR/Cas-Systeme werden aktuell in drei Untergruppen klassifiziert (Makarova et al. 2015). Während die Systeme des Typs I und III nur als Komplex mit mehreren Proteinuntereinheiten funktionsfähig sind, gehört es zu den Vorteilen des Typ II CRISPR Systems, dass nur ein einzelnes Endonuklease Cas9-Protein benötigt wird, um DNA-DSBs zu induzieren (Liu et al. 2016; Chylinski et al. 2014). Aus diesem Grund findet vor allem dieser Untertyp Anwendung in der Genomeditierung.

Es konnte gezeigt werden, dass die *Streptococcus pyogenes* Typ II Cas9 (SpCas9) Endonuklease dazu programmiert werden kann, auch außerhalb ihres nativen Kontexts sequenzspezifische DSBs durchzuführen. Dafür benötigt werden eine synthetische sgRNA, welche durch die Fusion aus crRNA und tracrRNA entsteht (Jinek et al. 2012), (Wang et al. 2013). Dieser chimäre Komplex dirigiert die Cas9-Nuklease zu ihrem Zielort, wo diese DSBs in der Ziel-DNA durchführt. Der zur crRNA komplementäre DNA-Strang wird drei bp stromaufwärts der PAM-Sequenz durch die HNH-Domäne geschnitten, während der nicht-komplementäre DNA Strang innerhalb von drei bis acht Basen stromaufwärts der PAM durch die RuvC-ähnliche Domäne geschnitten wird (Wang et al. 2013). Strukturanalysen zeigten, dass Cas9 eine bilobuläre Architektur aufweist, bestehend aus einer Domäne für die DNA-

Zielerkennung sowie einer Nukleasedomäne. Die DNA-Zielerkennungsdomäne ist essentiell für die Bindung von sgRNA und DNA (Jiang et al. 2016).

Nach Bindung der sgRNA mit der Ziel-DNA findet eine konformative Veränderungen der Struktur statt, welche zu einer Aktivierung der Nukleasedomäne führt und die HNH- und RuvC-Nuklease Domäne in unmittelbare räumliche Nähe zu der zu bearbeitenden DNA bringt (Nishimasu et al. 2014).

Obwohl heute hauptsächlich das CRISPR/Cas9-System des *Streptococcus pyogenes* verwendet wird, werden aktuell auch alternative Typ II Cas-Orthologe wie zum Beispiel das des *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus thermophilus* erforscht (Ran et al. 2015; Kleinstiver et al. 2015).

Die generierten DSBs können in der Zelle durch zwei Mechanismen repariert werden (**Abbildung 3**). Bei der homologen Rekombination (*homology directed repair*, HDR) wird entweder das normale Allel oder eine extern zugefügte DNA als Reparaturvorlage für die Reparatur der entstandenen Schäden verwendet. Dadurch kann eine präzise Genomeditierung gewährleistet werden. Die zweite Möglichkeit ist die Nicht-homologe Reparatur (*non-homologous end-joining*, NHEJ), bei der die beiden Enden der DNA ohne Rücksicht auf Homologien der Nukleotide oft fehlerhaft wieder zusammengeführt werden. Aufgrund der Fehleranfälligkeit dieses Systems entstehen dabei zufällige Deletionen und Insertionen (Indels) unterschiedlicher Größen (Lieber 2008). Finden diese sogenannten Indel-Mutationen in kodierenden Regionen statt, können in durchschnittlich zwei Drittel der Fälle Leseraster-Mutationen generiert werden, die häufig zu einem frühzeitigen Stopcodon führen. Derartige Stopcodons führen zu einem Abbruch der Transkription, wobei die RNA häufig mittels des sogenannten *nonsense-mediated decays* abgebaut wird.

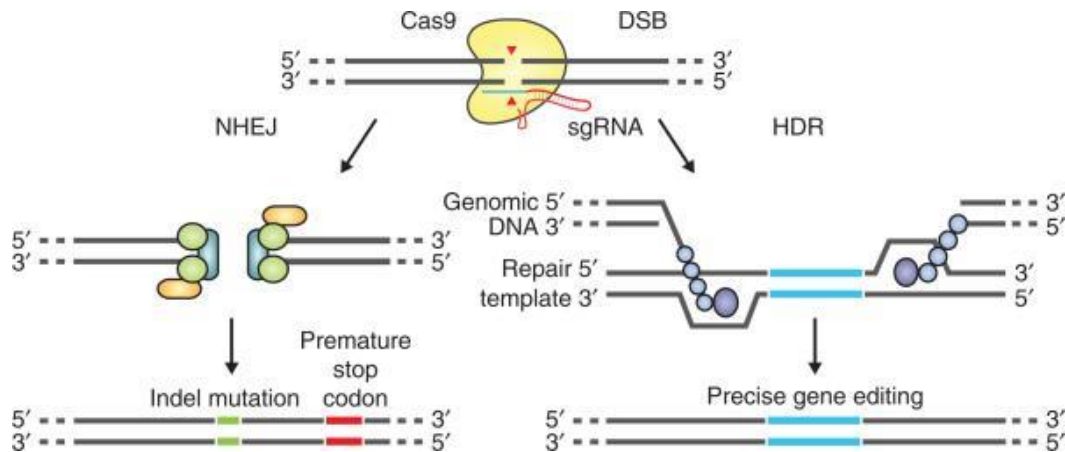


Abbildung 3: Reparaturmechanismen CRISPR/Cas-induzierter DSBs

Die Reparatur der Cas9 Endonuklease induzierten DSBs erfolgt entweder durch den NHEJ oder durch den HDR Mechanismus. Beim NHEJ entstehen Deletionen/Insertionen variabler Größe, die ein vorzeitiges Stop-Codon zur Folge haben können. Das HDR ermöglicht eine präzise Genomeditierung durch die Verwendung einer Reparaturmatrize. Abbildung entnommen aus (Ran et al. 2013b).

Obwohl beide Reparaturmechanismen in der Therapie hereditärer dominanter Erkrankungen angewandt werden können, spielt bisher vor allem die NHEJ-Reparatur aufgrund ihrer höheren Effizienz und Geschwindigkeit eine entscheidendere Rolle (Mao et al. 2008). Da bei heterozygot dominanten Erkrankungen ein intaktes Allel vorhanden ist, und infolgedessen eine Expression des wildtypischen Proteins stattfindet, könnte das Entfernen des mutierten Proteins eine sinnvolle therapeutische Möglichkeit sein.

Diese Methode könnte in Zukunft einen vielversprechenden Ansatz für die Therapie genetischer Erkrankungen mit dominant negativen Mutationen, wie zum Beispiel der BVMD, liefern. Voraussetzung dafür, ist die Fähigkeit eindeutig zwischen mutierter und nicht-mutierter DNA-Sequenz zu unterscheiden, auch wenn diese sich nur in einem einzigen Nukleotid unterscheiden. Durch das spezifische bioinformatische Design der sgRNA, sollte nur dieses von der Cas9-Endonuklease geschnitten werden. Ziel wäre die spezifische Editierung des mutanten BEST1-Transkripts und somit eine Reduktion des dominant-negativen Effekts des mutanten Proteins auf das normale Protein. Das nicht-mutierte Allel sollte bei einer hohen Spezifität von der Mutations-spezifischen sgRNA jedoch nicht beeinflusst werden. Infolgedessen würde weiterhin funktionsfähiges Protein, wenn auch lediglich mit einer Haplosuffizienz, exprimiert werden.

Für eine Allel-spezifische Editierung können prinzipiell zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt werden. Die Tatsache, dass sich mutanter und nicht-mutanter DNA-Strang an der Nukleotidposition der Mutation unterscheiden, kann genutzt werden, um eine sgRNA zu

entwerfen, die in ihrer Sequenz genau diese Position beinhaltet und dadurch nur zum mutierten Allel komplementär ist. Speziell in Fällen, in denen die Mutation in einer neuen PAM-Sequenz resultiert, wie zum Beispiel bei der Meesmann'schen epithelialen Cornea Dystrophie (MECD), konnten bereits erste vielversprechende Ergebnisse in vitro und in vivo erzielt werden (Courtney et al. 2016). Da die Erkennungssequenz zwar auf dem mutierten Allel, aber nicht auf dem nicht-mutierten Allel vorhanden ist, gelang es, eine spezifische und effektive Suppression der Expression des mutierten Proteins zu generieren. Eine zweite potentielle Strategie zielt darauf ab, nicht spezielle Mutationen, sondern mutationstragende Haplotypen zu deletieren. Informationen zu häufigen SNPs können dafür genutzt werden, eine Unterscheidung zwischen mutantem und nicht-mutantem Allel zu ermöglichen, unabhängig von der exakten Mutationslokalisierung. Von diesem therapeutischen Ansatz könnten vor allem Erkrankungen mit sehr variablen Genotypen, wie der BVMD, profitieren.

2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Ausgehend von der homo-pentameren Struktur des Best1-Chloridkanals und der Kenntnis über einen dominant negativen Effekt einer mutierten Untereinheit auf die Kanalfunktion, gehen wir davon aus, dass eine Reduktion defekter BEST1-Proteinuntereinheiten zu einer Erhöhung der Anzahl intakter Chloridkanäle führen sollte. Daher soll durch einen CRISPR/Cas9-Ansatz die Expression des mutierten BEST1-Transkripts auf genomischer Ebene unterdrückt werden. Unter der noch zu beweisenden Annahme, dass durch das nicht-mutierte Allel ausreichend BEST1-Protein produziert wird, sollte somit die Funktion des BEST1-Chloridkanals (zumindest teilweise) wiederhergestellt werden. In diesem Falle würde sich die Anzahl an Kanälen, die sich aus fünf nicht-mutanten BEST1-Untereinheiten zusammensetzen, statistisch erhöhen. Ob dies auch in einer Verbesserung der Kanalfunktionalität und durch eine Normalisierung der Chlorid-Leitungsfähigkeit zu einer Linderung der klinischen Symptome beitragen könnte, ist noch zu untersuchen.

Wichtigste Voraussetzung dafür ist die sichere Unterscheidung der CRISPR/Cas9-Genomeditorung zwischen dem mutierten und dem nicht-mutierten BEST1-Allel. In Anlehnung an die Vorgehensweise von Carroll et al. 2011 sollte dieses Ziel durch eine SNP-vermittelte Ausschaltung des gesamten mutationstragenden Haplotypen unabhängig vom Ort der individuellen Mutation, erreicht werden. Eine alternative Möglichkeit wäre die direkte

Targetierung der Mutation selbst. Besonders insofern, als BVMD mit unzähligen Mutationsvarianten genetisch sehr heterogen ist, wäre diese Methode im Verhältnis zur Erstgenannten kostenintensiv und zeitaufwendig.

Die Deletion des pathologischen BEST1 Transkripts mittels des Haplotyp-Ansatzes nutzt bioinformatisch entworfene SNP-spezifische sgRNAs. Die ausgewählten SNPs sollten sowohl heterozygot in der Patientenkohorte vorliegen, als auch ausreichend repräsentativ in der europäischen Bevölkerung sein, um mit einem möglichst geringen sgRNA Set einen möglichst großen Anteil an Patienten erreichen zu können. Die sgRNAs dirigieren dabei die Cas9-Endonuklease spezifisch zum mutationstragenden Haplotypen, wo diese allelspezifisch DSB induzieren sollte. Da nicht alle ausgewählten SNPs in kodierenden Sequenzen lokalisiert werden konnten, mussten in solchen Fällen sgRNA-Paare parallel transfiziert werden, mit der Intention Exon-überspannende DSB zu generieren. Basierend auf der individuellen Kombination der Haplotypen müssen diese sgRNAs so gewählt werden, dass sie SNPs in cis-Position auf dem mutierten Allel gezielt binden und kodierende Sequenzen umspannen.

Aus diesem Grund war es notwendig für jeweils beide SNP-Varianten sgRNAs zu entwerfen, um je nach betroffenem Haplotypen eine geeignete Kombination auswählen zu können.

In einem ersten Schritt sollten diese sgRNAs auf ihre Editierungseffizienz und ihre Allelspezifität in HEK-Zellen überprüft werden und anschließend in mehreren Optimierungsschritten bezüglich dieser Editierungseigenschaften verbessert werden. Ziel dieses Unterfangens war es, die beste sgRNA für jede gewählte SNP-Variante herauszufinden und diese in einem zweiten Schritt in Fibroblasten-Zelllinien von heterozygoten BVMD-Patienten zu testen.

3 Material

3.1 Zelllinien

Tabelle 1: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Ursprungsgewebe	Referenz
HEK293T	Homo sapiens	embryonale Nierenzelle	ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
Fibroblasten	Homo sapiens	Primäre Zelllinien aus Hautstanzen	Brandl et al., 2014

3.2 Bakterienstämme

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

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

3.3 Vektoren

Tabelle 3: Verwendete Vektoren

Vektorbezeichnung	Verwendung	Referenz
pGem ®-T	PCR-Vektor	Promega Corporation, Madison, WI, USA
pCAG-EGxxFP	Träger der SNP- spezifischen Zielsequenz zwischen EGxxFP Kasette; Leervektor zur Negativkontrolle bei Transfektionen	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK
pCEP4	Positivkontrolle bei Transfektionen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pU6-(BbsI)-Cbh-Cas9-T2A- mCherry	Träger der Cas9- Endonuklease, der SNP-spezifischen sgRNA* und eines rot fluoreszierenden Proteins;	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK

	für die Transfektion der HEK293T und Fibroblasten	
pSpCas9 (BB)-2A-GFP (px 459)	Träger der Cas9-Endonuklease, der SNP-spezifischen sgRNA* und eines grün fluoreszierenden Proteins; für die Transfektion der Fibroblasten	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK

* genaue sgRNA-Bezeichnungen unter **Tabelle 5** aufgeführt

3.4 Klonierte Vektorkonstrukte

Tabelle 4: Durch Klonierung hergestellte Zielkonstrukte

Name des Vektorkonstrukts	Eigenschaft	Verwendung
pCAG EGxxFP- 581T		
pCAG EGxxFP-429C		
pCAG EGxxFP-429T	zwischen die EGFP-Kassette des Zielvektors	Transfektion
pCAG EGxxFP-390C	klonierte SNP-spezifische Sequenz	
pCAG EGxxFP-390T		
pCAG EGxxFP-534C		
pCAG EGxxFP-534A		

3.5 Oligonukleotide

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

3.5.1 Oligonukleotide für die sgRNAs

Tabelle 5: Zum sgRNA- Design verwendete Oligonukleotide

Ziel SNP	sgRNA- Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Hinweis
	sgRNA_390-C_20mer_F	CACCGccacaaaggagtctctgtct	ermittelt, 20mer
	sgRNA_390-C_20mer_R	AAACagacaaggactcctttgtggC	
	sgRNA_390-C_19mer_F	CACCGcacaaggagtctctgtct	verkürzt, 19mer
	sgRNA_390-C_19mer_R	AAACagacaaggactcctttgtgC	

390- C	sgRNA_390-C_18mer_F	CACCGacaaaggagtccttgtct	verkürzt,
	sgRNA_390-C_18mer_R	AAACagacaaggactccttgtC	18mer
	sgRNA_390-C_17mer_F	CACCGcaaaggagtccttgtct	verkürzt,
	sgRNA_390-C_17mer_R	AAACagacaaggactccttggC	17mer
	sgRNA_390-T-20mer-F	CACCGtacaagaagggactaagaca	ermittelt,
	sgRNA_390-T-20mer-R	AAACtgtcttagtccttctgttaC	20mer
	sgRNA_390-T-19mer-F	CACCGacaagaagggactaagaca	verkürzt,
	sgRNA_390-T-19mer-R	AAACtgtcttagtccttctgtC	19mer
390- T	sgRNA_390-T-18mer-F	CACCGcaagaagggactaagaca	verkürzt,
	sgRNA_390-T-18mer-R	AAACtgtcttagtccttctgtC	18mer
	sgRNA_390-T-17mer-F	CACCGaagaagggactaagaca	verkürzt,
	sgRNA_390-T-17mer-R	AAACtgtcttagtccttcttC	17mer
390- T	sgRNA_390-T-18mer-F 18_C_G	CACCGgaagaagggactaagaca	verkürzt
	sgRNA_390-T-18mer-R-18_C_G	AAACtgtcttagtccttcttC	mit Basen-
	sgRNA_390-T-18mer-F 17_A_T	CACCGctagaagggactaagaca	abweich-
	sgRNA_390-T-18mer-R-17_A_T	AAACtgtcttagtccttctagC	ung
	sgRNA_429-C-19mer-F	CACCGgtagcagagcaggaagatt	verkürzt,
	sgRNA_429-C-19mer-R	AAACaatcttctgctctgctacC	19mer
	sgRNA_429-C-18mer-F	CACCGtagcagagcaggaagatt	verkürzt,
	sgRNA_429-C-18mer-R	AAACaatcttctgctctgctacC	18mer
	sgRNA_429-C-17mer-F	CACCGagcagagcaggaagatt	verkürzt,
	sgRNA_429-C-17mer-R	AAACaatcttctgctctgctC	17mer
	sgRNA_429-C-20mer-F_20_A_T	CACCGttagcagagcaggaagatt	Basenab-
	sgRNA_429-C-20mer-R_20_A_T	AAACaatcttctgctctgctacaC	
429- C	sgRNA_429-C-20mer-F_20_A_C	CACCGcgtagcagagcaggaagatt	20mer
	sgRNA_429-C-20mer-R_20_A_C	AAACaatcttctgctctgctacgC	
	sgRNA_429-C-20mer-F_19_G_A	CACCGaatagcagagcaggaagatt	
	sgRNA_429-C-20mer-R_19_G_A	AAACaatcttctgctctgctattC	
	sgRNA_429-C-20mer-F_19_G_T	CACCGattagcagagcaggaagatt	
	sgRNA_429-C-20mer-R_19_G_T	AAACaatcttctgctctgctaC	
	sgRNA_429-C-19mer-F_19_G_A	CACCGaatagcagagcaggaagatt	verkürzt
	sgRNA_429-C-19mer-R_19_G_A	AAACaatcttctgctctgctatC	mit
	sgRNA_429-C-19mer-F_19_G_C	CACCGctagcagagcaggaagatt	Basen-
	sgRNA_429-C-19mer-R_19_G_C	AAACaatcttctgctctgctagC	
	sgRNA_429-C-19mer-F_18_T_C	CACCGgcagcagagcaggaagatt	ungen
	sgRNA_429-C-19mer-R_18_T_C	AAACaatcttctgctctgctgcC	
	sgRNA_429-T-20mer_A-F	CACCGaagattaagaactcgccata	ermittelt,
	sgRNA_429-T-20mer_A-R	AAACtatggcgagttcttaattC	20mer
	sgRNA_429-T-17mer_A-F	CACCGattaagaactcgccata	verkürzt,
	sgRNA_429-T-17mer_A-R	AAACtatggcgagttcttaC	17mer
	sgRNA_429-T-20mer_A_16_A_C-F	CACCGaagcttaagaactcgccata	Basenab-
	sgRNA_429-T-20mer_A_16_A_C-R	AAACtatggcgagttcttaagcttC	
	sgRNA_429-T-19mer_A_16_A_C-F	CACCGagcttaagaactcgccata	20mer

429 T	sgRNA_429-T-19mer_A_16_A_C_R	AAACtatggcgagttcttaagctC	verkürzt
	sgRNA_429-T-18mer_A_16_A_C-F	CACCGgcttaagaactcgccata	mit
	sgRNA_429-T-18mer_A_16_A_C-R	AAACtatggcgagttcttaagcC	Basenab-
	sgRNA_429-T-17mer_A_16_A_C-F	CACCGcttaagaactcgccata	weichung
	sgRNA_429-T-17mer_A_16_A_C-R	AAACtatggcgagttcttaagC	
	sgRNA_429-T-20mer_A_8_T_A-F	CACCGaagattaagaacacgccata	Basenab
	sgRNA_429-T_20mer_A_8_T_A-R	AAACtatggcgtgttcttaattC	weichung,
			20mer
429 T	sgRNA_429-T-19mer_A_8_T_A-F	CACCGagattaagaacacgccata	verkürzt
	sgRNA_429-T-19mer_A_8_T_A-R	AAACtatggcgtgttcttaattC	mit
	sgRNA_429-T-18mer_A_8_T_A-F	CACCGgattaagaacacgccata	Basenab-
	sgRNA_429-T-18mer_A_8_T_A_R	AAACtatggcgtgttcttaattC	weichung
	sgRNA_429-T-17mer_A_8_T_A-F	CACCGattaagaacacgccata	
	sgRNA_429-T-17mer_A_8_T_A-R	AAACtatggcgtgttcttaattC	
	sgRNA_429-T-20mer_B-F	CACCGagtagcagagcaggaagatt	ermittelt,
	sgRNA_429-T-20mer_B-R	AAACaatcttctgctctgctactC	20mer
	sgRNA_429-T_17mer_B-F	CACCGagcagagcaggaagatt	verkürzt
	sgRNA_429-T-17mer_B-R	AAACaatcttctgctctgctC	17mer
	sgRNA_543_A_22mer_F	CACCGgctgtatgtagctgtcgcaata	verlängert,
	sgRNA_543_A_22mer_R	AAACtattgcgacagctacatacagcC	22mer
	sgRNA_543_A_22mer_21_C_A_F	CACCGgatgtatgtagctgtcgcaata	verlängert,
	sgRNA_543_A_22mer_21_C_A_R	AAACtattgcgacagctacatacaticC	mit
			Basenab-
			weichung
	sgRNA_543_A_20mer_F	CACCGtgtattgcgacagctacataA	ermittelt,
	sgRNA_543_A_20mer_R	AAACtatgtagctgtcgcaatacA	20mer
	sgRNA_543_A_20mer_19_G_A_F	CACCGtatatgtagctgtcgcaata	Basenab-
	sgRNA_543_A_20mer_19_G_A_R	AAACtattgcgacagctacataaC	weichung,
			20mer
534 A	sgRNA_543_A_18mer_F	CACCGtattgcgacagctacataA	verkürzt,
	sgRNA_543_A_18mer_R	AAACtatgtagctgtcgcaataC	18mer
	sgRNA_543_A_18mer_17_A_C_F	CACCGtctgtagctgtcgcaata	verkürzt,
	sgRNA_543_A_18mer_17_A_C_R	AAACtattgcgacagctacagaC	mit
			Basenab-
			weichung
	sgRNA_534_A_NAG_20mer_F	CACCGtgtattgcgacagctacataA	ermittelt,
	sgRNA_534_A_NAG_20mer_R	AAACtatgtagctgtcgcaatacA	20mer
	sgRNA_534_A_NAG_18mer_F	CACCGtattgcgacagctacataA	verkürzt
	sgRNA_534_A_NAG_18mer_R	AAACtatgtagctgtcgcaataC	18mer
	sgRNA_534_A_NAG_17mer_F	CACCGattgcgacagctacataA	verkürzt
	sgRNA_534_A_NAG_17mer_R	AAACtatgtagctgtcgcaatC	17mer
	sgRNA_534-C-20mer-F	CACCGcgaaggaaatggggatgagc	ermittelt,
	sgRNA_534-C-20mer-R	AAACgctcatccccattccttcgC	20mer
534	sgRNA_534-C-19mer-F	CACCGgaaggaaatggggatgagc	verkürzt,
	sgRNA_534-C-19mer-R	AAACgctcatccccattccttcgC	19mer

C	sgRNA_534-C-18mer-F	CACCGaaggaaatggggatgagc	verkürzt,
	sgRNA_534-C-18mer-R	AAACgctcatccccatttcctC	18mer
	sgRNA_534-C-17mer-F	CACCGaggaaatggggatgagc	verkürzt,
	sgRNA_534-C-17mer-R	AAACgctcatccccatttcctC	17mer
	sgRNA_581-T-20mer_F	CACCGgatggcttccgagagcctg	ermittelt,
	sgRNA_581-T-20mer_R	AAACcaggctctcgaagaccatcC	20mer
581	sgRNA_581-T-17mer-F	CACCGggtcttccgagagcctg	verkürzt,
	sgRNA_581-T-17mer-R	AAACcaggctctcgaagaccC	17mer
T	sgRNA_581-T-20mer-18T_G_F	CACCGgaggggtcttccgagagcctg	Basenab-
	sgRNA_581-T-20mer-18T_G_R	AAACcaggctctcgaagaccctcC	weichung, 20mer

Basen in Großbuchstaben: Oligonukleotide für die Ligation in den Expressionsvektor,

Basen in Kleinbuchstaben: Oligonukleotide der sgRNA; ermittelt mittels Optimized CRISPR-Design-Tool, verkürzt: im Rahmen der Optimierungsmaßnahmen gekürzte Form der virtuell

designten sgRNA, Basenabweichung:

im Rahmen der Optimierungsmaßnahmen additiv hinzugefügte Nukleotidsubstitutionen in virtuell designten sgRNA (rot markiert)

3.5.2 Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung

Tabelle 6: Für PCR und Sequenzierung verwendete Oligonukleotide

Primerbezeichnung	5'-3' Sequenz	Verwendung
M13-F	cacgacgttgtaaaacgac	Sequenzierung der pGem-T Konstrukte
M13-R	ggataacaatttcacacagg	
LKO1_5_primer	gactatcatatgcttaccg	Sequenzierung der mCherry und GFP- Konstrukte
N11K-F-EcoRI	gaattcatccctacaaacccccaatc	PCR der Zielsequenz SNP 429C/T für pCAG-EGxxFP-Vektor
N11K-R-BamHI	ggatccgtggggccagacaaagcc	
Best1-ex3-F-EcoRI	gaattccagtctcagccatctcctcg	PCR der Zielsequenz SNP 534 für pCAG-EGxxFP-Vektor
Best1-ex3-R-BamHI	ggatcccagctcctcgtgatcctcc	PCR der Zielsequenz SNP 534 für pCAG-EGxxFP-Vektor + Sequenzierung der gecrisperten Fibroblasten-DNA SNP 534
377_390_F-EcoRI	gaattcttccaagcaacaccatcct	PCR der Zielsequenz SNP 390 für pCAG-EGxxFP-Vektor
377_390_R-BamHI	ggatcctccgatgatcccacagaagg	
581_587_F_EcoRI	gaattccctgagggtcttccgagag	PCR der Zielsequenz SNP 581 für pCAG-EGxxFP-Vektor

581_587_R_BamHI	ggatcctctgaacaccacctgcccc	
TU15newF4	catgaccatcacttacacaagc	Sequenzierung der gecrisperten Fibroblasten-DNA SNP 429
TU15newF6	gaagcttaaggctgtggacg	PCR der Zielsequenz SNP 756 für pCAG-EGxxFP-Vektor
dogBest1-R	cagacctgtttccaaggcc	PCR der Zielsequenz SNP 756 und 749 für pCAG-EGxxFP- + Sequenzierung der gecrisperten Fibroblasten-DNA für SNP 756
VMD2ex10II-R3	gttttcctcctcacttgagatac	Sequenzierung der gecrisperten Fibroblasten-DNA für SNP 749
Best1-ex5-F_EcoRI	gaattccaaaggagtgctgaggttcc	PCR der Zielsequenz für SNP 581 nach Fibroblastentransfektion
Best1-ex5-R_BamHI	ggattctgtggattgctgttgaaaa	PCR der Zielsequenz für SNP 581 nach Fibroblastentransfektion
VMD2-A195V-F_Mut-F	acctgtcaatgaagggtgtggcttgaggtcg	Sequenzierung der gecrisperten Fibroblasten-DNA für SNP 581

3.6 Enzyme

Tabelle 7: Verwendete Enzyme

Enzym	Referenz
Alkaline Phosphatase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
BamHI-HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
EcoRI-HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Exonuclease Affymetrix,	USB Products, Santa Clara, CA, USA
FastDigest Bpil	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Quick CIP	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Quick Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GoTaq® DNA Polymerase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Haus-Taq	Institut für Humangenetik, Uniklinikum, Regensburg, DE
Proteinase (DNA- Präparation)	Appllichem, Darmstadt, Deutschland

PstI-HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4 PNK Kinase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Trypsin GE	Healthcare, Galfont St Giles, GB

3.7 Reaktionssysteme

Tabelle 8: Verwendete Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Referenz
BigDye Terminator v1.1, v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GoTaq® Long Expand PCR Master Mix	Promega Corporation, Madison, WI, USA
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, GE
NucleoSpin® Plasmid	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, GE
NucleoBond® XtraMidi	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, GE
pGEM®-T Vector	Promega Corporation, Madison, WI, USA
PureLink®Expi Endotoxin- Free Maxi Plasmid Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TransIT® -LTI Transfectionreagent	Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA

3.8 Chemikalien

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Referenz
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Agarose (Biozym LE)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Ampicillin Natriumsalz $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Bromphenolblau Natriumsalz, $C_{19}H_9Br_4O_5SNa$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Chloroquin, $C_{18}H_{26}ClN_3$	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, DE
dNTPs	Genaxxon Bioscience, Ulm, DE
Ethanol C_2H_6O	Chemikalienlager der Universität Regensburg, DE
Ethidiumbromidlosung, $C_{21}H_{20}BrN_3$ in H_2O	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, DE
Gel Loading Dye Purple (6x)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Glycerol 87%, $C_3H_8O_3$	Chemikalienlager der Universität Regensburg, DE
HiDi™ Formamid, CH_3NO	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isopropanol, C_3H_8O	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, DE
Penicillin/ Streptomycin (Pen/Strep)	GE Healthcare, Galfont St Giles, GB
Poly-L-Lysin Hydrobromid (0.1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sodium dodecyl sulfate $\geq 99\%$, $C_{12}H_{25}NaO_4S$ (SDS)	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Germany
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, $NH_2C(CH_2OH)_3$ (Tris)	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA

3.9 Molekularmassenstandard

Tabelle 10: Verwendeter Molekularmassenstandard

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

3.10 Puffer und Medien

Tabelle 11: Verwendete Puffer und Medien

Puffer und Medien	Zusammensetzung/ Referenz
5x TBE	Borsäure 0,5 M EDTA 10mM H ₂ O dest. Tris 0,5 M
ATP- Stock	ATP 300mM H ₂ O dest.
Bromphenolblau Ladepuffer	Bromphenolblue 0.01 % (w/v) Glycerol 87% 40 % (v/v) H ₂ O dest.
House Taq DNA Polymerase 10 x Puffer	KCl 500 mM Tris, pH 9.0 100 mM MgCl ₂ 15 mM Triton X 1 % (v/v)
LAIRDS	NaCl 200 mM Tris-HCl 100 mM EDTA 5 mM
LB-Medium	Hefeextrakt 0,5% w/v (5g) H ₂ O dest. 1L NaCl 1% w/v (10g) Trypton 1% w/v (10g)
LB-Platten	Bacto-Agar 15% w/v (15g) Hefeextrakt 0,5% W/V (5g) H ₂ O dest. 1L NaCl 1% w/v (10g) Trypton 1% w/v (10g)
SDS Puffer, pH 8.6	Tris-HCl 0.25 mM Glycin 0.2 M SDS 1 % (w/v) H ₂ O dest.

3.11 Zellkulturmedien

Tabelle 12: Verwendete Zellkulturmedien

Komponente	Referenz
DMEM High Glucose Medium(4,5 g/L)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dulbecco 's PBS (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Fetal Bovine Serum Gold (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
OptiMEM™ Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin (10.000 Units)/Streptomycin (10 mg/ml), (Pen/Strep)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Poly-L-Lysin Hydrobromid (0.1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RPMI Medium 1640	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3.12 Geräte

Tabelle 13: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Accu-Jet Pipittiergerät	Brand, Wertheim, Deutschland
Autoklav V-150	Systec GmbH, Wetzlar, Germany
BlueMarine 200 Gelkammer	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
BluePower Plus Netzgerät	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Bunsen Brenner Gasprofil	WLD Tec, Göttingen, DE
Brutschrank 37°C Bakterien	Memmert GmbH, Schwabach, DE
CASY TT Cell Counter	Innovatis Roche AG, Bielefeld, DE
Ceromat R Schüttelinkubator	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, DE
Eismaschine AF 100	Scotsman, VerNicht Hills, IL, USA
Amaxa Nucleofector	Lonza Bioscience AG, Basel, Schweiz
FACSCanto-II Durchflusszytometer	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH, Ortenberg, DE
Inkubator Zellen 37 °C	Kendro Lab Products, Langenselbold, DE
Mikrowelle KOR-6D07	Daewoo, Seoul, Korea
Milli-Q-Synthesis Wasser Purifikations System	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Germany
NanoDrop ND1000 Spektrophotometer	NanoDrop, Wilmington, DE, USA
Nikon Eclipse TE2000-S Mikroskop	Nikon Instruments Europe BV, NE
pH Meter Lab 850	SI Analytics GmbH, Mainz, Germany
Sterilbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Thermocycler T Gradient	Biometra GmbH, Göttingen, DE

Thermocycler T3	Biometra GmbH, Gottingen, DE
Thermomixer compact Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Transferpipette ® 10 µl	Brand, Wertheim, DE
Transferpipette ® 100 µl	Brand, Wertheim, DE
Transferpipette ® 1000 µl	Brand, Wertheim, DE
Transilluminator UST-30M-8R	BioView Ltd., Billerica, MA, USA
Vacuumpumpe MZ 2 C	Vacuubrand GmbH, Wertheim, DE
Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Vortex Microspin FV-2400	Biosan, Riga, Latvia
Waage	SCALTEC Instruments GmbH, Heiligenstadt, DE
Wasserbad W12	Labortechnik Medingen, Arnsdorf, DE
Zentrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE

3.13 Software

Tabelle 14: Verwendete Software

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

4 Methoden

4.1 Klonierung von Konstrukten

Die Intention des Klonierungsvorganges war es zum einen, die jeweiligen Ziel-DNAs, die die ausgewählten SNPs in ihrer Sequenz beinhalteten, herzustellen und in die Zielvektoren zu ligieren. Im Falle der HEK293T Transfektionen handelte es sich dabei um den pCAG EGxxFP-Vektor. Die Zielsequenz wurde dabei zwischen die beiden EGxxFP-Expressionskassetten kloniert.

Darüber hinaus wurden auf diesem Wege Vektoren hergestellt, die sowohl kodierende Sequenzen für die Cas9-Endonuklease, die SNP-spezifischen sgRNAs, als auch für die fluoreszierenden Proteine enthielten. Der Ablauf der Klonierung der entsprechenden sgRNA-Sequenzen in den px330-mCherry und den px459-GFP-Vektor wird unter 4.1.10.2 beschrieben.

Die exakten Vektorbezeichnungen sind in **Tabelle 3** aufgeführt.

4.1.1 PCR- Amplifizierung der DNA-Fragmente

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden die für die Klonierung notwendigen DNA-Fragmente zunächst amplifiziert. Um die anschließende Ligation in die Zielvektoren möglich zu machen, wurden die Amplikons zusätzlich mit Restriktionsschnittstellen versehen. Die dafür verwendeten Primer sind in **Tabelle 6** aufgelistet.

Es wurde folgender PCR-Reaktionsansatz herangezogen:

Tabelle 15: Verwendeter PCR-Ansatz

Komponente	Menge
DNA- Template (50-100 ng/ μ l)	2 μ l
Forward- Primer (10 μ M)	1 μ l
Reverse- Primer (10 μ M)	1 μ l
dNTP (5mM)	2 μ l
5x Go-Taq-Puffer	5 μ l
Go-Taq-Polymerase	0,1 μ l
H ₂ O (Millipore)	13,9 μ l

Die sich anschließende PCR im Thermocycler erfolgte mit den Einstellungen:

Tabelle 16: PCR-Einstellung des Thermocyclers

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95°C	2min
2. Denaturierung	94°C	30s
3. Annealing	59°C	30s
4. Elongation	72°C	variabel *
5. Finale Elongation	72°C	5min
6. Pause	15°C	∞

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

4.1.2 Agarosegelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wurden die amplifizierten PCR Produkte anschließend auf ihre korrekte Größe beurteilt.

Das Gemisch aus 1 % (w/v) Agarose und TBE Puffer wurde zunächst erhitzt, bis die Agarose komplett geschmolzen war und dann auf eine Temperatur von <45°C gekühlt. Es wurde 1 Tropfen einer 0.07 % Ethidiumbromidlösung zugefügt. Die Zusammensetzung des Gels ist in **Tabelle 17** aufgeführt.

Nach Aushärtung des Gels wurde den DNA Proben Bromphenolblau Ladepuffer (5x Lösung) zugesetzt, bevor diese auf das Gel geladen wurden. 3 µl GeneRuler™ DNA Ladder Mix wurden als Molekularmassenstandard eingesetzt.

Tabelle 17: Zusammensetzung 1% Agarose Gels

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

Die Elektrophorese erfolgte mit 200 Volt (V) und einer Dauer von circa 20 Minuten. Abhängig von ihrem Molekulargewicht trennten sich die einzelnen Fragmente auf und konnten anschließend unter UV-Licht beurteilt werden.

4.1.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR- Fragmente wurden unter UV-Durchleuchtung unter Zuhilfenahme eines Skalpells aus dem Gel extrahiert und mittels des *NucleoSpin® Gel* und *PCR Clean-Up-Kits* nach Herstellerangaben aufgereinigt, in 35µl destilliertem Wasser (A.d.) eluiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

4.1.4 Ligation in pGem®-T-Vektor

Erfolgreich amplifizierte und aufgereinigte PCR-Produkte wurden mittels des pGEM®-T vector kits in den pGEM®-T Vektor ligiert, anhand des Ligationsprotokolls in **Tabelle 18**. Es folgte eine Inkubation des Ansatzes bei 14°C über Nacht. Durch die Go-Taq Polymerase wurde während der PCR ein Adenosinüberhang des PCR-Produkts generiert. Dieser ermöglichte durch eine Interaktion mit dem Thyminüberhang des Vektors die Ligation. Für diesen Vorgang wurden folgende Komponenten benötigt:

Tabelle 18: Ligationsansatz pGem®-T-Vektor

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

4.1.5 Hitzeschock-Transformation in E. coli Bakterien

Für die Transformation in die E. coli Bakterien wurde zunächst ein 100µl-Aliquot kompetenter Bakterien des DH5α Stammes schonend auf Eis aufgetaut. Die Hälfte des obigen Ligationsansatzes wurde zugegeben und anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Als Transformationsmethode wurde in diesem Fall auf das Hitzeschockverfahren zurückgegriffen bei dem das Reaktionsgemisch aus Bakterienkultur und Ligationsansatz für 40 Sekunden bei 42° Celsius in den Heizblock und anschließend wieder auf Eis gestellt wurde. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurde 900µl SOC-Medium hinzugegeben und der Ansatz für eine Dauer von ungefähr einer Stunde im Schüttelinkubator bei 37° belassen. 200µl davon wurden

im Anschluss daran auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht im Bakterienbrutschrank inkubiert.

Eine Auswahl der entstandenen Bakterienkolonien wurde am nächsten Tag von der Platte isoliert und je in mit Ampicillin (100µM Endverdünnung) versetzten LB-Medium nochmalig über Nacht in den Schüttelinkubator gestellt.

4.1.6 Colony-PCR

Der Erfolg der Ligation wurde anschließend mittels Colony-PCR (C-PCR) der Bakterienkolonien eruiert. Die dafür eingesetzten Primer sind **Tabelle 6** zu entnehmen.

Folgender Reaktionsansatz wurde dafür verwendet:

Tabelle 19: Reaktionsansatz Colony-PCR

Komponente	Menge
Plasmid Template (~20 ng/µl)	2 µl
Forward-Primer (10 µM)	1µl
Reverse-Primer (10µM)	1 µl
dNTP's (5 mM)	2µl
10x Haus-Taq-Puffer (15 mM MgCl ₂)	2,5µl
Haus-Taq-Polymerase	0,5µl
H ₂ O (Millipore)	16µl

Die Beurteilung erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung anhand der Größe der beobachteten Fragmente unter UV-Durchleuchtung wie unter Punkt 4.1.2 beschrieben. Bakterienkolonien, die Träger der korrekten Insertsequenz waren, wurden ausgewählt und in mit 5µl Ampicillin und 100mM Stocksolution versetztem LB-Medium in 5ml-Kulturen über Nacht bei 37° angesetzt.

4.1.7 Plasmid Präparation-Mini Präp

Die Plasmidpräparation der Übernachtskulturen wurde mithilfe des NucleoSpin® Plasmid-Kits nach Anleitung des Herstellers am nächsten Tag durchgeführt. Die Elution der isolierten DNA erfolgte in 35µl A.d. Mittels *NanoDrop® Spectrophotometer* wurde die Plasmid Konzentration vermessen und für die Sequenzierung anschließend auf 50ng/µl verdünnt.

4.1.8 Sanger Sequenzierung

Um herauszufinden, in welchen Ausprägungen die SNPs in den isolierten Plasmiden vorhanden waren, wurden die Sequenzen anschließend einer Sanger Sequenzierung unterzogen. Der Reaktionsansatz der *Cycle Sequencing*-Reaktion ist in **Tabelle 20** dargestellt. Die Reaktionskomponenten wurden dem *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1, v3.1* entnommen.

Tabelle 20: Reaktionsansatz Cycle Sequencing

Komponente	Menge
Plasmid-Verdünnung (50ng)	2µl
F-oder R-Primer (10µM)	1µl
5x BigDyeR Terminator Puffer	2µl
BigDyeR Terminator Reaktionsmix	0,3µl
H ₂ O (Millipore)	4,7µl

Die nachfolgende **Tabelle 20** zeigt die Einstellungen des *Cycle Sequencing*-Programms des *Thermocyclers*

Tabelle 21: Sequenzereinstellung am Thermocycler

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

26-fache Wiederholung der Schritte 2-5

Dem *Cycle Sequencing* schloss sich die Fällung der DNA mit EDTA an. 4µl EDTA (125mM Stocklösung) und 50µl 100%-Ethanol wurden dem Reaktionsansatz aus **Tabelle 21** zugefügt, gevortext und 10min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 4000 Umdrehungen und 4°C. Der Überstand wurde verworfen. Mit der Absicht eventuelle Restflüssigkeiten vollständig zu entfernen, wurde das Behältnis mit dem

Pellet kurz kopfüber zentrifugiert. Nach Zugabe von 70µl 70%-Ethanol zum Pellet schloss sich eine erneute 30-minütige Zentrifugation an. Der Überstand wurde abgekippt und das Behältnis inklusive Pellet erneut über Kopf zentrifugiert. Zur Resuspension des Pellets wurden 15µl HiDi-Formamid hinzugegeben. Die darauffolgende Sequenzierung lief im *Abi3130x1 Genetic Analyser* ab. Für die Auswertung der Sequenzen wurden die Programme *Chromas* und *SnapGene* verwendet.

4.1.9 Restriktionsverdau

Nach Bestätigung der korrekten Sequenz wurde anschließend für jede der beiden SNP-Allelvarianten ein positiver Klon ausgewählt. Mittels der Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI wurden die Inserts aus dem pGEM®-T-Vektor exzisiert. Der Restriktionsverdau erfolgte anhand der Komponenten in **Tabelle 22**.

Tabelle 22: Reaktionsansatz Restriktionsverdau

Komponente	Menge
Unverdünntes Plasmid	15µl
EcoRI	0,5µl
BamHI	0,5µl
10xPuffer (Cutsmart)	3µl
H ₂ O (Millipore)	11µl

Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C über Nacht inkubiert und anschließend mittels Gelelektrophorese untersucht. Die erfolgreiche Restriktion war zu erkennen an einer kleineren Bande um 500 Basen, die die Zielsequenz repräsentierte und zeitgleich zu der größeren Bande um 3kb des pGem®-T-Vektors existierte. Die Extraktion und Präparation der Erstgenannte erfolgte nach bereits beschriebenem Protokoll mit dem *NucleoSpin® Gel* und *PCR Clean-Up-Kit*.

4.1.10 Ligation in die Expressionsvektoren

4.1.10.1 Ligation der Zielsequenz in den Expressionsvektor pCAG-EGxxFP

Ebenso wie die Zielsequenz wurde auch der Zielvektor pCAG-EGxxFP mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI über Nacht verdaut und nach Gelelektrophorese analog zu bereits beschriebener Methodik aus dem Gel extrahiert. In **Tabelle 22** ist der Reaktionsansatz des Verdauens der Zielvektoren aufgeführt:

Tabelle 23: Ansatz Zielvektorverdau

Komponenten	Menge
pCAG-EGxxFP (1 µg/µl)	0,5 µl
EcoRI	0,5 µl
BamHI	0,5 µl
10xPuffer (Cutsmart)	3 µl
H ₂ O (Millipore)	25,5 µl

Durch die Verwendung der gleichen Restriktionsenzyme besaßen sowohl Zielsequenz als auch –vektor identische Schnittstellen. Diese Tatsache ermöglichte die Ligation in den Expressionsvektor pCAG-EGxxFP.

Die Mengenverhältnisse für den Ligationsansatz lassen sich **Tabelle 24** entnehmen.

Tabelle 24: Reaktionsansatz der Ligation der Zielsequenz in den Zielvektor

Komponente	Menge
Verdauter pCAG-EGxxFP Vektor (~25ng/µl)	2 µl
Insert (Zielsequenz)	8 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
10xT4-Ligationspuffer	2 µl
H ₂ O (Millipore)	7 µl

4.1.10.2 Ligation der sgRNA in den px330- mCherry-Vektor

Für die Klonierung der sgRNAs in die Ziel- Expressionsvektoren wurde zunächst ein bei 37° ein 30 minütiger Verdau der Plasmide mit BbsI durchgeführt (**Tabelle 25**):

Tabelle 25: BbsI-Verdau der Expressionsvektoren px330-mCherry und px459-GFP

Komponente	Menge
Plasmid	1 µg
Fast Digest BbsI	1 µl
FastAP	1 µl
10x FastDigest Puffer	2 µl
H ₂ O (Millipore)	15 µl

Die verdauten Plasmide wurden anschließend mittels einer Gelelektrophorese aufgereinigt und in 50 µl A.d. eluiert.

Für die Phosphorylierung und das Annealing der Oligonukleotidpaare (aus **Tabelle 5**) wurden folgende Komponenten benötigt (**Tabelle 26**).

Tabelle 26: Phosphorylierung und Annealing der Oligonukleotide

Komponente	Menge
Oligonukleotid 1 (100µM)	1 µl
Oligonukleotid 2 (100µM)	1 µl
10×T4 Ligationspuffer	1 µl
T4 PNK	0,5 µl
ATP (10 mM)	1 µl
H ₂ O (Millipore)	5,5 µl

Das Annealen der Oligonukleotide erfolgte im RAMP- Programm des Thermocyclers. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit bei 37°C wurde zunächst die Temperatur für 5 Minuten auf 95°C angehoben. In einem nächsten Schritt wurde alle 5 Minuten die Temperatur um 5°C bis zu einer Zieltemperatur von 25°C gesenkt.

Der Reaktionsansatz für die letztendliche Ligation der sgRNAs in die Zielvektoren px330-mCherry bzw. px459-GFP ist in folgender Tabelle dargestellt:

Der Ligationsreaktionsansatz wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 27: Ligation der sgRNAs in die Zielvektoren px330-mCherry bzw. px459-GFP

Komponente	Menge
BbsI verdautes Plasmid (50ng)	X µl
Oligonukleotid- Duplex (1:200 Verdünnung)	1 µl
2× Quickligation Puffer	5 µl
Quick Ligase (T4-DNA-Ligase)	1 µl
H ₂ O (Millipore)	X µl
Gesamt	11 µl

Nach erfolgreicher Ligation wurden die Konstrukte in DH5α-Zellen transformiert und auf LB-Platten ausplattiert. Der Ablauf vollzog sich analog zu 4.1.5.

Von einer Auswahl an Klonen wurde am nächsten Tag eine 5 ml Übernachtskultur angelegt. In einem letzten Schritt erfolgte eine Kontrolle, ob die Ligation erfolgreich war und somit ein Insert im Vektor vorhanden war und, ob die Plasmide Träger der korrekten sgRNA Sequenz waren. Dafür wurde von einer Mini-Präp der Übernachtskultur eine Sequenzierung der aufgereinigten Plasmid-DNA durchgeführt.

Die Kulturen, die die korrekte sgRNA-Sequenz trugen, wurden in eine 100ml-Übernachtskultur überführt und die Plasmid-DNA mittels des *NucleoBond® XtraMidi Kits* präpariert. Zugunsten einer einfacheren Handhabung wurden die Plasmidkonzentrationen auf ca. 1000ng/µl verdünnt.

4.1.11 Herstellung von Glycerolstocks

Um bei Bedarf neue Plasmidpräparationen durchführen zu können, wurden jeweils Glycerolstocks der Konstrukt- tragenden E. coli-Klone angelegt. Dafür wurden 830µl einer frischen Übernachts-Bakterienkultur 170µl 100%-Glycerol zugefügt. Diese dienen der Langzeitaufbewahrung bei -80°C.

4.2 Kultivierung der Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem Hera Cell 150 Inkubator bei einer konstanten Temperatur von 37°C und einem CO₂ Gehalt von 5% aufbewahrt. Eine Kultivierung der Zellen erfolgte in Kompletmedium. Die Zellkulturmedien wurden bei 4°C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Der Konfluenz und Zustand der Zellen wurde vor der Verwendung in den Experimenten oder vor der Passagierung der Zellen unter dem Mikroskop evaluiert.

4.2.1 Kultivierung HEK 293T- Zellen

Bei den für die Transfektion verwendeten Zelllinien handelt es sich zum einen um eukaryotische HEK293T-Zellen. Abhängig von Konfluenz und Wachstum der Zellen wurden diese mehrmals die Woche gesplittet und auf neue 10 cm Schalen ausgesät. Für diesen Vorgang wurde das alte Medium zunächst abgesaugt, die Zellen mithilfe von frischem Kompletmedium von der Platte abgelöst und anschließend herunter zentrifugiert. Der dabei

entstandene Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in frischem Medium gelöst. Das Zellsuspensat wurde je nach gewünschtem Konfluenzgrad und Teilungsverhältnis auf eine wechselnde Anzahl neuer Platten verteilt und durch das Hinzufügen neuen Mediums auf ein Gesamtvolumen von 10ml gebracht. 24 Stunden vor der Transfektion wurden die HEK 293T-Zellen nochmals gesplittet, so, dass die Zellen am nächsten Tag eine Konfluenz von 70-80% aufwiesen.

4.2.2 Kultivierung Fibroblasten

Bei der zweiten verwendeten Zelllinie handelt es sich um humane Fibroblasten zweier BVMD Patienten. Im Unterschied zu den letztgenannten musste für das Splitten und Ernten der Zellen zunächst eine mehrminütige Inkubation mit Trypsin erfolgen, bevor diese mit Komplettmedium von der Unterfläche gelöst werden konnten. Der restliche Vorgang verlief analog zur Kultivierung der HEK293T-Zellen.

4.3 Transfektionen der Zellen

4.3.1 Chemische Reverse Transfektion der HEK 293T- Zellen

Für die Transfektion der HEK 293T Zellen wurde zunächst auf Raumtemperatur gebrachtes Opti-MEM®-Medium in eine 96-Well-Platte vorgelegt und 0,188µg der EGxxFP-Vektorkonstrukte zusammen mit 0,188µg der sgRNAs und dem *TransIT*®-2020 Transfektionsreagenz hinzugefügt und für 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die HEK 293T-Zellen geerntet und nach der Inkubationszeit auf die 96-Well-Platte überführt. Für die Transfektion wurde pro Platte eine Zellzahl zwischen $2-6 \times 10^6$ benötigt. 24 Stunden später musste neues Medium zugeführt werden.

Nach 48 Stunden wurden die transfizierten Zellen für die Messungen auf Polylysin-beschichtete schwarze 96-Well-Platten übertragen. Zu diesem Zweck mussten die Zellen zunächst von der ursprünglichen Platte abgelöst werden. Dies geschah durch eine 8-minütige Inkubation in DPBS mit zugefügtem 1%-EDTA und anschließender Mobilisation der Zellen durch Komplettmedium. Mikroskopische Fluoreszenz Aufnahmen gaben Aufschluss über den Transfektionserfolg 72 Stunden nach Transfektion. Vor der Erhebung quantifizierbarer Daten am *FluoSTAR OPTIMA Platten-Reader* wurde mittels DAPI eine Färbung der Zellkerne durchgeführt. Dies diente dem Zweck der Normalisierung der Messwerte zur Zellzahl. Dafür

wurden die Zellen 15 Minuten in einer 1:2000 DAPI:DPBS-Mischung inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensitäten am Plattenreader vermessen.

4.3.2 Transfektion der Fibroblasten-Elektroporationsmethode

Die Transfektion der Fibroblasten erfolgte nach dem Elektroporationsverfahren. 24 Stunden vorher wurden die Zellen gesplittet, so, dass sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Am Tag der Transfektion wurden diese zunächst geerntet, pelletiert und die Zellen in 100µl des Transfektionspuffers des Nucleofector™ Kits nach Herstellerangaben resuspendiert. Es wurden 1.0×10^6 Fibroblasten pro Transfektion und Well eingesetzt. Diese wurden vorher mittels des CASY TT gezählt. Nach Zugabe von 3µg der sgRNAs zu der Suspension wurden die Zellen anschließend in eine sterile 3mm Amaxa Nukleofektions- Kuvette transferiert und mit dem auf Fibroblasten zugeschnittenen Nukleofektionsprogramm U-23 elektroporiert. Zur Regeneration wurden die Zellen in 300µl Gibco® RPMI 1640 Medium 10 Minuten bei 37° inkubiert und anschließend auf 6-Well-Platten mit vorgelegtem und vorgewärmtem DMEM- Kulturmedium überführt.

4.4 Zellsorting mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Durchflusszytometer

Positiv transfizierte Fibroblasten wurden 72 Stunden nach Transfektion anhand des roten bzw. grünen Fluoreszenzsignals mittels FACS-Sorting aussortiert, gesammelt und anschließend erneut kultiviert. Ziel dieses Unterfangens war es, die Zellen anschließend auf entstandene Insertionen/Deletionen und somit den Erfolg des CRISPR/Cas9-Systems zu untersuchen.

4.5 Evaluation der CRISPR/Cas9-Effizienz und Spezifität

4.5.1 Isolation und Präparation genomischer DNA aus Fibroblasten

Um die CRISPR/Cas9-Effizienz evaluieren zu können wurde die DNA der positiv transfizierten Fibroblasten zunächst präpariert. Für diesen Zweck wurden die Zellen analog zu Punkt 4.2.2 geerntet und pelletiert und anschließend in 500µl LAIRDS-Puffer, 50µl Proteinase und 50µl 20% SDS resuspendiert. Die Mischung wurde zum Verdau bei 52° über Nacht im Thermomixer

belassen. Am nächsten Tag erfolgte die Fällung der DNA. Dafür wurde das Suspensat 15 Minuten bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert und der Überstand in ein neues 2ml Behältnis überführt. Nach Zugabe von 500µl N-Propanol zur Flüssigkeit, schloss sich erneut eine 15-minütige Zentrifugation an. Der Überstand wurde verworfen und es folgte ein Waschschrift mit 500µl 70%-Propanol und 15-minütiger Zentrifugation. Die überstehende Flüssigkeit wurde nochmalig abgekippt und das Zellpellet am Boden des Behältnisses über einen Zeitraum von ungefähr 10 Minuten getrocknet. Die fertig präparierte DNA wurde in 400µl destilliertem Wasser gelöst.

4.5.2 PCR-Amplifikation SNP-einschließender DNA-Sequenzen

Anschließend erfolgte eine PCR- Amplifikation der genomischen DNA. Die beiden Primer wurden dabei so gewählt, dass sie jeweils SNPs und die mutmaßlich gecrisperte DNA in ihrer Sequenz einschließen. Die Mengenverhältnisse des PCR-Ansatzes lassen sich **Tabelle 28** entnehmen.

Tabelle 28: Reaktionsansatz PCR-Amplifikation SNP-einschließender DNA-Sequenzen

Komponente	Menge
präparierte DNA (~10ng/µl)	5µl
Forward-Primer (10µM)	1 µl
Reverse-Primer (10µM)	1 µl
dNTP (5mM)	2 µl
5x Go-Taq-Puffer	5 µl
Go-Taq-Polymerase	0,1 µl
H ₂ O (Millipore)	10,9 µl

Die verwendeten Primer lassen sich **Tabelle 6** entnehmen.

Die Einstellungen des Thermocyclers für die PCR sind in **Tabelle 16** dargestellt.

Analog zu 4.1.2 erfolgte die Evaluation der PCR nach elektrophoretischer Auftrennung anhand der Größe der beobachteten Fragmente unter UV-Durchleuchtung wie unter Punkt 4.1.2 beschrieben. Die korrekten Banden wurden zur Elution extrahiert und anschließend in den pGem®-T-Vektor Vektor kloniert (s. 4.1.4). Die Konstrukte wurden am Folgetag in DH5α-Zellen transformiert und auf LB-Platten ausplattiert (analog zu Punkt 4.1.5).

4.5.3 Colony-PCR

Die Colony-PCR diente dem Zweck, positiv gecrisperte Klone identifizieren und ausselektieren zu können. Um ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis generieren zu können, wurde am darauf folgenden Tag so viele Bakterienklone wie möglich von der bewachsenen LB- Platte isoliert und je in mit 100µg/ml Ampicillin versetztem 20µl LB-Medium bei 37°C für 3 Stunden inkubiert. Diese Kultur wurde als template für die nachfolgende PCR-Reaktion eingesetzt. Die in **Tabelle 6** dargestellten Primer wurden für die Amplifikation der Insertfragmente verwendet. Der Reaktionsansatz der Colony-PCR war wie folgt:

Tabelle 29: PCR-Ansatz Colony-PCR zur Identifikation gecrispeter Klone

Komponente	Menge
E.coli-Kultur	2 µl
Forward-Primer (10µM)	1 µl
Reverse-Primer (10µM)	1µl
dNTP (5mM)	2µl
5x Go-Taq-Puffer	5µl
Go-Taq-Polymerase	0,1µl
H ₂ O (Millipore)	13,9µl

Die Einstellungen des Thermocyclers lassen sich **Tabelle 26** entnehmen:

Tabelle 30: PCR-Einstellung des Thermocyclers Colony-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95°C	2min
2. Denaturierung	94°C	30s
3. Annealing	58°C	30s
4. Elongation	72°C	variabel *
5. Finale Elongation	72°C	5min
6. Pause	15°C	∞

*Dauer abhängig von PCR-Größe: 1min/ 1kb; 29-fache Wiederholung der Schritte 2-5

Der PCR wurde anschließend auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Positiv gecrisperte Klone konnten anhand der Fragmentgröße identifiziert werden.

4.5.4 Sanger-Sequenzierung positiv gecrisperter Klone

Diejenigen Kulturen, die im Rahmen der Colony-PCR gecrisperte DNA aufwiesen, wurden anschließend einer Sanger-Sequenzierung unterzogen, um die Effizienz und Spezifität der sgRNAs evaluieren zu können.

5 Vorarbeiten

Um den Haplotyp-spezifischen Ansatz verfolgen zu können, war eine umfangreiche SNP-Analyse am BEST1-Locus erforderlich. Diese Daten wurden auf Basis des 1000 Genom Projekts gewonnen, welches die Genome von 2.504 Individuen aus 26 Populationen auf genetische Variationen untersuchte (Auton et al. 2015).

Hierzu wurden am Institut für Humangenetik in Regensburg bereits wichtige Vorarbeiten geleistet, die an dieser Stelle erwähnt werden sollen.

5.1 Bioinformatische Vorarbeiten

Im Rahmen des 1000 Genom Projekts konnten insgesamt 84,7 Millionen SNPs identifiziert werden. Von diesen befinden sich 1.191 SNPs in der BEST1-Genregion.

Um möglichst viele Haplotypen der Allgemeinbevölkerung am M. Best Genort mit möglichst wenigen sgRNAs adressieren zu können, wurden SNPs mit einer Häufigkeit von >5% in der europäischen Bevölkerung in die Folgeanalysen einbezogen. Aufgrund dieses Kriteriums reduzierte sich die Anzahl der SNPs im M. Best Genort auf 69.

Die sgRNAs wurden bioinformatisch über die Software CRISPR-Design-Tool und Benchling entworfen. Die Kriterien für die Auswahl waren:

1. Ein möglichst hoher *on-target score* bei einem möglichst niedrigen *off-target score*. Mithilfe des *Optimized CRISPR Design-Tools* konnten Vorhersagewerte über die mutmaßlichen Effizienzen der sgRNAs generiert werden, die an eine ausgewählte Zielsequenz mit hoher Spezifität binden sollten (*on-target score*). Darüber hinaus lieferte das Programm Auskunft darüber, inwiefern weitere Sequenzen aufgrund von Ähnlichkeiten zur Zielsequenz potentiell durch das CRISPR/Cas9-System beeinträchtigt werden könnten (*off-target score*). Als ausreichend effizient wurden sgRNAs mit einem *on-target* Wert von >50% erachtet. Die Scores wurden berechnet für sgRNAs mit einer Länge von 20 bp. Für sgRNAs abweichender Länge oder modifizierter Basenabfolge bestand keine Möglichkeit einer bioinformatischen Vorhersage.

2. Das Vorkommen einer PAM-Sequenz, die eine Entfernung von mehr als 10 bp zum Ziel-SNP nicht überschreitet. Begründet wird dies durch die Theorie, dass die Erkennung der Zielsequenz besonders durch die ersten Nukleotide in unmittelbarer Nähe zur PAM gewährleistet wird, die sogenannte „Seed“ Region. Mit zunehmender Entfernung von dieser Erkennungssequenz nimmt die Effizienz der Bindung zwischen Zielsequenz und sgRNA ab (Le Cong et al. 2013).
3. Die Position des SNP und die der N-Stelle der NGG-PAM dürfen nicht übereinstimmen. Da diese Position variabel durch alle Nukleotide besetzt werden kann, würden sowohl die Ziel- als auch die Nicht-Zielsequenz eine PAM ausbilden. Da sich die beiden Sequenzen nur an einer Nukleotidposition unterscheiden und somit die restliche Nukleotidabfolge vollständig übereinstimmen würde, wäre in diesem Fall eine Unterscheidung zwischen mutantern und nicht-mutantern Allelen nicht möglich.
4. Die Lokalisation der SNPs außerhalb repetitiver Sequenzen

Diese Auswahlkriterien reduzierten die Anzahl möglicher SNPs am M. Best Genort auf 22, die durch das CRISPR/Cas9-System sinnvoll angesteuert werden können. Deren Lokalisation in der BEST1-Region ist in nachfolgender Abbildung dargestellt:

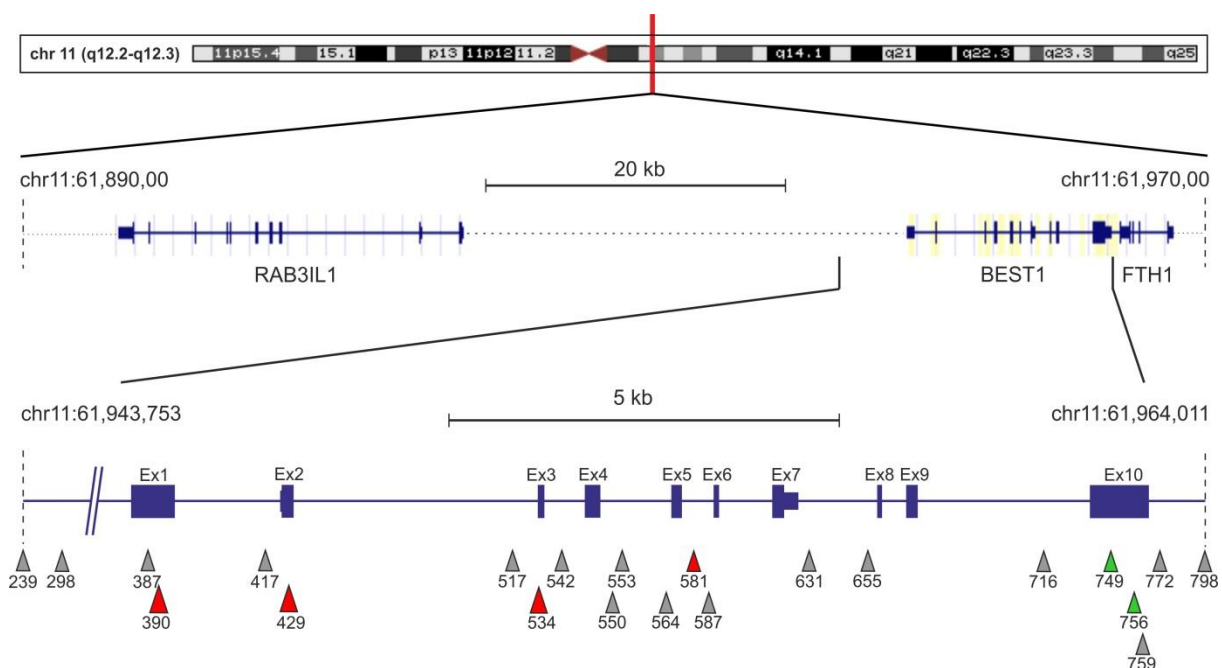


Abbildung 4: Analytierte BEST1- Genregion und Lokalisation der 22 finalen SNPs

Oberster Graph: Lokalisation des BEST1- Genabschnitts auf dem langen Arm von Chromosom 11q12.2-q12.3.

Erster Ausschnitt: BEST1-Genregion zeigt die relative Position der angrenzenden Gene RAB3IL1 und FTH1;
 Zweiter Ausschnitt: Lokalisation der Kriterien-gefilterten 22 SNPs im und in unmittelbarer Nähe des BEST1-Genlocus;
 Abkürzungen: Ex: Exon; grüne Dreiecke: Position der bereits in früheren Projekten bearbeiteten SNPs; rote Dreiecke: in dieser Arbeit analysierte SNPs (Abbildung wurde der Promotionsarbeit von Diana Eisner entnommen und leicht verändert)

Abbildung 4 zeigt den genomischen BEST1-Lokus auf drei gezoomten Ebenen. Die Positionen der 22 ausgewählten SNPs, die oben genannte Kriterien erfüllen, lassen sich der zweiten bzw. letzten Vergrößerungsebene entnehmen. Einige SNPs wurden im Rahmen vorheriger Arbeiten bereits analysiert und geeignete sgRNAs entworfen und optimiert. Die in **Abbildung 4** durch rote Dreiecke markierten SNPs 390, 429, 534 und 581 sollen in dieser Arbeit näher untersucht werden. Die ersten fünf SNPs 239, 298, 387, 390 und 417 befinden sich noch vor dem Startcodon im Exon 2 und sind somit in nicht kodierenden Sequenzen lokalisiert. Zudem erwähnenswert sind die SNPs in exonischen Abschnitten: SNP 429 in Exon 2, SNP 534 in Exon 3, sowie den SNPs 749, 756 und 759 in Exon 10. Auf die Bedeutung der Positionen soll später näher eingegangen werden.

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

Abbildung 5: Europäische Haplotypenverteilung und -frequenz auf Basis von 22 SNPs im BEST1 Locus

Dargestellt sind die in HaploView ermittelten Haplotypen und deren relativen Häufigkeit basierend auf 22 SNPs im BEST1-Lokus. Jede Zeile entspricht einem Haplotypen. Die farbige Markierung korreliert mit der nachstehenden Abbildung 10 und weist auf vorhandene Haplotypen in der Patientenkohorte hin
Abbildung entnommen aus Promotionsarbeit Diana Eisner

Mithilfe der HaploView-Software, welche als Datengrundlage die Informationen aus dem 1000 Genomes Project heranzog, wurden alle verschiedenen Haplotypen der europäischen Gesamtbevölkerung mit Angabe ihrer Häufigkeitsverteilung in der Population ermittelt.

Insgesamt wurden durch die HaploView-Software 30 verschiedene Haplotypen erfasst, welche in der obenstehenden **Abbildung 5** in der Spalte ganz rechts aufgelistet sind. In der Spalte links davon sind die jeweiligen Frequenzen der Haplotypen dargestellt, mit welchen sie in der europäischen Bevölkerung auftreten. Die ersten 14 davon weisen eine Häufigkeit von mindestens 1% auf.

Die erste Zeile bildet die 22 ausgewählten SNPs ab. Im Rahmen von Vorarbeiten wurden am Institut für Humangenetik eine Patientenkohorte über 14 Studienteilnehmern rekrutiert, davon 12 M. Best Patienten und 2 gesunde Kontrollpersonen. Die 14 DNA-Proben wurden an der Lokalisation der SNPs im BEST1-Gen sequenziert. Durch den Abgleich der Ergebnisse der Sangersequenzierungen mit den Sequenzen der europäischen Haplotypen konnten der Patientenkohorte jeweils eine bestimmte Haplotypenkombination zugeordnet werden. Der nachfolgenden **Abbildung 6** lässt sich dementsprechend die Verteilung innerhalb der eigenen Patientenkohorte entnehmen.

Patient	Interne SNP-Bezeichnung																						Frequenz	Haplotyp	Mutation
	239	298	387	390	417	429	517	534	542	550	553	564	581	587	631	655	716	749	756	759	772	798			
HK				T		T				A	C	G							T	C	C	(0.202)	H2		
				C		C				T	T	T							C	T	T	(0.063)	H4	A243V	
SK		A	C					C														(0.063)	H4		
		G	T					A														(0.026)	H8	A243V	
MD						A		A	G				G	G	G	T	T	G				(0.176)	H3	I295del	
Mutter						C		T	A				T	T	T	G	C	A				(0.057)	H5		
LD					A		A	G				G	G	G	T	T	*					(0.239)	H1		
					C		T	A				T	T	T	G	C	*					(0.057)	H5	S108R	
LD					A		A	G				G	G	G	T	T	G	T	C	C		(0.202)	H2		
Mutter					C		T	A				T	T	T	G	C	A	C	T	T		(0.057)	H5	S108R	
AP					A		A	G				G	G	G	T	T						(0.176)	H3	I295del	
					C		T	A				T	T	T	G	C						(0.013)	H12		
DK					C		T	A				T	T	T	G	C				T		(0.013)	H12	Q238R	
					A		A	G				G	G	G	T	T				C		(0.003)	H24		
JS			T	G	T		C	A		A	C	G					A		T		C	(0.239)	H1	V86M	
			C	A	C		A	T		T	T	T				G		C		A		?	?		
JS																	*					(0.239)	H1	V86M	
Mutter																*						(0.239)	H1		
CH																						(0.176)	H3	I295del	
																						(0.176)	H3		
DH		A	C																			(0.063)	H4		
		G	T																			(0.011)	H14		
MD																		A				(0.239)	H1		
																		G				(0.176)	H3	I295del	
MHW								T	A				T	T	T	G	C	A	C	T	T	(0.057)	H5	N11K	
								A	G				G	G	G	T	T	G	T	C	C		H31		
MOCK																							H3	R218C	
																							H3		

Abbildung 6: Haplotypenverteilung und Mutationslokalisationen innerhalb der Patientenkohorte

Dargestellt sind die Haplotypen der rekrutierten Patientenkohorte, die Bezeichnung der Mutationen im BEST1- Gen und deren Lokalisation auf einem der beiden individuellen Haplotypen. Die Frequenz der Haplotypen innerhalb der europäischen Bevölkerung ist gegeben. Homozygote SNPs sind ausgespart. Abbildung entnommen aus Promotionsarbeit Diana Eisner

Die erste Zeile zeigt die ausgewählten 22 SNPs. Die Haplotypen und deren Frequenz in der europäischen Bevölkerung, sowie der Mutationsbezeichnung sind in den letzten drei Spalten abgebildet. In der ersten Spalte sind die Patienten IDs verzeichnet. Im Falle des JS und MHW konnte die Identifikation lediglich einer der beiden Haplotypen erfolgen, da nur häufige europäische Haplotypen durch das Programm erfasst werden können.

Der Haplotyp- spezifische Ansatz erfordert eine Unterscheidung zwischen nicht-mutiertem und mutiertem Haplotyp. Da für die Differenzierung der beiden individuellen Haplotypen somit lediglich heterozygote SNPs von Nutzen sind, sind homozygote auftretende SNPs in der Abbildung ausgespart. Anhand dieser Ergebnisse erfolgte später die Auswahl spezifischer SNPs bzw. SNP- Kombinationen, die für den CRISPR/Cas-Ansatz eingesetzt werden sollen.

5.2 Experimentelle Vorarbeiten

Wie erwähnt, wurden für die drei SNPs 581, 756 und 749 in jeweils beiden Allelausprägungen sgRNAs entworfen und diese in HEK293T-Zellen getestet. Durch schrittweise Verkürzung der Basensequenz der sgRNAs am 5'-Ende, sowie das Einführen einzelner Punktmutationen wurde versucht, die ausgewählten sgRNAs in ihrer Editierungseffizienz und Allelspezifität zu verbessern. Die jeweils beste sgRNA für jede SNP Variante sollte im Rahmen dieser Arbeit in primäre Patienten Fibroblasten transfiziert werden, um deren Funktionalität in primären Zellen auszutesten.

Die Fibroblasten stammen von BVMD-Patienten, die am Institut für Humangenetik Hautstanzen zu Forschungszwecken zur Verfügung stellten. Aus diesen wurden Fibroblasten-Zelllinien hergestellt und diese für spätere Experimente nach einem festgelegten Protokoll in induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) für spätere Experimente umprogrammiert.

6 Ergebnisse

6.1 Bioinformatischer Arbeitsteil

Analog zu den Methoden vorheriger Arbeiten wurden die SNPs 390, 429, 534 und 581 zunächst bioinformatisch untersucht.

Die sgRNAs wurden so entworfen, dass sie zu einer DNA-Sequenz, die den SNP beinhaltet, komplementär waren. Für die beiden Allelausprägungen der SNPs wurde eine separate sgRNA entworfen. Das Design und die Auswahl einer geeigneten sgRNA mittels der Web-basierten Software CRISPR-Design Tools soll beispielhaft anhand der sgRNA für den SNP 534 mit der Allelausprägung C (sgRNA 534-C) demonstriert werden.

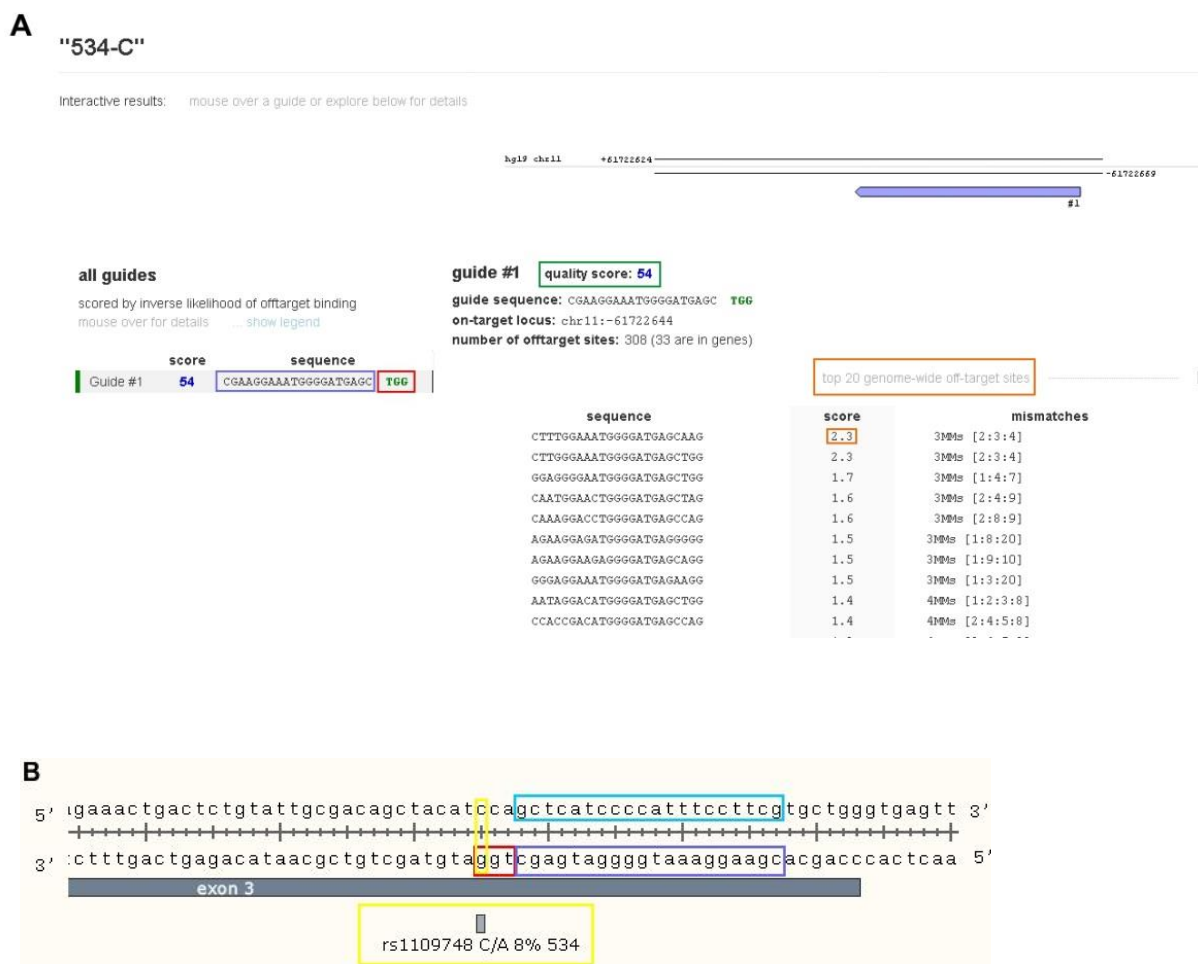


Abbildung 7: Exemplarische sgRNA- Generierung für SNP 534C

Farbige Markierungen in A und B: dunkelblau: sgRNA Sequenz; hellblau: zur Guide komplementäre Sequenz; rot: PAM; grün: On-Target-Score; orange: Off-Target-Scores; gelb: Position des SNP 534-C und dessen Häufigkeit in der europäischen Bevölkerung

A. Optimized CRISPR-Design-Layout

Anhand einer ausgewählten Sequenz innerhalb von 45 bp um den gewünschten SNP-534-C herum werden unter „all guides“ alle potentiellen sgRNAs aufgelistet. Der blaue Balken oben rechts zeigt die Ausrichtung der sgRNA an.

B. Snap-Gene Design

Dargestellt ist die Position der sgRNA in der genomischen Zielsequenz.

Die SNPs 429 und 534 haben den Vorteil, in exonischen BEST1-Regionen lokalisiert zu sein. Durch die Cas9-Endonuklease-Aktivität entstehen in diesen Fällen DSB in kodierenden Sequenzen, die direkt zu vorzeitigen Stoppcodons führen können. Daraus resultiert, dass bereits die Transfektion der Cas9 Endonuklease mit jeweils einer einzelnen sgRNA ausreichend ist, um die Beendigung der Transkription herbeizuführen. Im Gegensatz dazu müssen die in einer intronischen Sequenz liegenden SNPs 390 und 581 immer in Kombination mit einer zweiten sgRNA für einen zweiten SNP angewendet werden, um mittels zweier DSB ein Exon-überspannendes DNA-Stück herauszuschneiden. Je nach heterozygotem SNP-Set ergeben sich dafür individuell unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten.

Darüber hinaus wurde im Falle der SNPs 390-C, 429-C und 534-C durch jeweils einen Basenaustausch eine neue PAM-Sequenz generiert. Da sich das Erkennungsmotiv für die Erkennung und Bindung der sgRNA folglich nur auf einer der beiden Allel-Ausprägungen vorhanden ist, lässt dies eine theoretisch höhere Spezifität für das Zielallel erwarten.

interne SNP-Nr.	rs- Nummer	relative Häufigkeit	Allel	On-Target Score (%)	Position zu PAM
390	rs972353	0,289	T	59	7
			C	70	PAM (<u>NGG</u>)
429	rs1800007	0,289	T	*	*
			C	47	PAM (<u>NGG</u>)
534	rs1109748	0,082	C	54	PAM (<u>NGG</u>)
			A	*	*
581	rs195161	0,324	T	60	2

Tabelle 31: Übersicht über die untersuchten SNPs und ausgewählte Merkmale

Aus der Tabelle ersichtlich werden die interne SNP-Bezeichnung, ihre zugehörigen rs-Nummern, und die relative Häufigkeit in der europäischen Bevölkerung. Für beide Allelausprägungen wurde die sgRNA ausgewählt, die die festgelegten Kriterien am besten erfüllt. Der On-Target Score (in %) wurde generiert durch die verwendete Software (*Optimized CRISPR-Design*). Die letzte Spalte zeigt die Position der ausgewählten sgRNA zur PAM an. Unterstrichen ist die Lokalisation des SNPs innerhalb der PAM-Sequenz.

* für den SNP 429-T und den SNP 534-A wurde die alternative Software *Benchling* verwendet. Diese liefert keine Informationen zu on-target scores oder Lokalisation im Bezug zur PAM. Daher waren diese Werte bioinformatisch nicht bestimmbar und mussten experimentell ermittelt werden

Bioinformatisches Design von sgRNAs mit alternativen PAM- Sequenzen

Für die SNP-Varianten 429T und 534A konnte keine NGG-PAM-Sequenz für die vorgegebenen Kriterien ermittelt werden. Studien haben jedoch gezeigt, dass die SpCas9 neben der optimalen und am häufigsten verwendeten NGG-PAM auch alternativ eine NAG-PAM toleriert. Die Cas9-Aktivität wird durch diesen Basenaustausch zwar auf durchschnittlich ein Fünftel ihrer ursprünglichen Effektivität reduziert (Hsu et al. 2013; Zhang et al. 2015), allerdings wird dieser SpCas9 Varianten in manchen Studien eine höhere Spezifität zugesprochen (Kleinstiver et al. 2015). Die SpCas9 NGG-PAM-Sequenz findet sich im menschlichen Genom durchschnittlich alle 8 bp (Le Cong et al. 2013). Durch die Möglichkeit, auf eine NAG-PAM auszuweichen, wird die Anzahl möglicher Targets für die SpCas9 im menschlichen Genom auf durchschnittlich alle 4 bp erhöht (Hsu et al. 2013). Alternativ dazu, können kürzere Cas9 Orthologe, wie zum Beispiel die des *Staphylococcus aureus* (SaCas9) mit der PAM-Erkennungssequenz NNGRR(T) verwendet werden.

Um die Effizienz und Spezifität zwischen der SpCas9 Varianten mit NAG-PAM und der SaCas9 vergleichen zu können, wurden diese beiden Ansätze parallel für den SNP 534-A, sowie den SNP 429-T verfolgt.

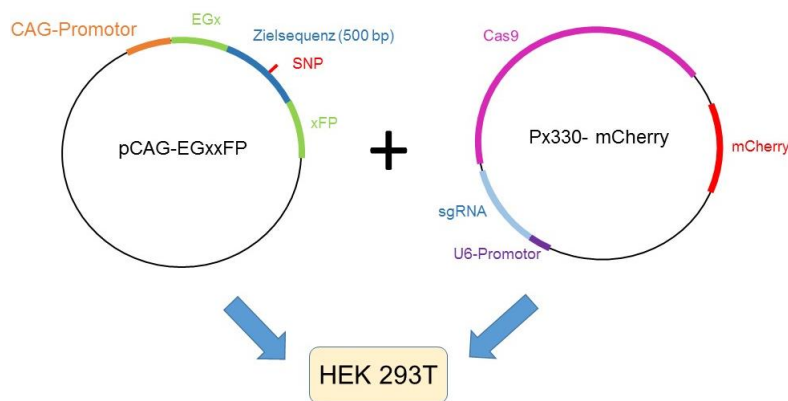
Da die *Optimized CRISPR-Design Software* nur imstande ist, sgRNAs mit der PAM NGG zu generieren, musste in den Fällen, in denen diese PAM-Sequenz nicht vorhanden war, auf eine alternative Möglichkeit zurückgegriffen werden. Dafür wurde das Web- basierte Programm *Benchling-Tools* verwendet. Die zur Zielsequenz komplementären sgRNAs wurden bioinformatisch entworfen und anschließend im experimentellen Teil dieser Arbeit analog zu den anderen sgRNAs in vitro ausgetestet.

6.2 Experimenteller Arbeitsteil

6.2.1 Austestung bioinformatisch entworfener sgRNAs in HEK 293T-Zellen

Die acht bioinformatisch entworfene sgRNAs sollten nun experimentell auf ihre Editingeffizienz und Allelspezifität *in vitro* untersucht und anschließend optimiert werden.

A



B

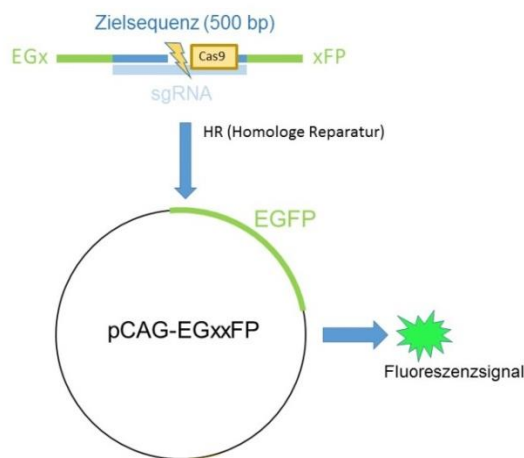


Abbildung 8: Transfektionsstrategie in HEK 293T-Zellen

A. Verwendete Expressionsvektoren

Links dargestellt: pCAG EGxxFP-Vektor mit der 500 bp großen Zielsequenz (in blau), den SNP in ihrer Sequenz einschließlich (in rot), die beiden Fragmente der EGxxFP-Kassette (in grün) und der CAG-Promotor (in orange)

Rechts dargestellt: px330-mCherry-Vektor mit kodierenden Sequenzen für sgRNA (in hellblau), U6-Promotor (in violett), Cas9 (in pink), mCherry-Protein (in rot)

B. Ablauf des homologen Reparaturvorgangs der EGFP-Kassette

Bindung der Zielsequenz (dunkelblau) durch die sgRNA (hellblau). Induktion eines DSB durch die Cas9 (in gelb). Grünes Fluoreszenzsignal durch Homologe Reparatur der EGxxFP-Kassette.

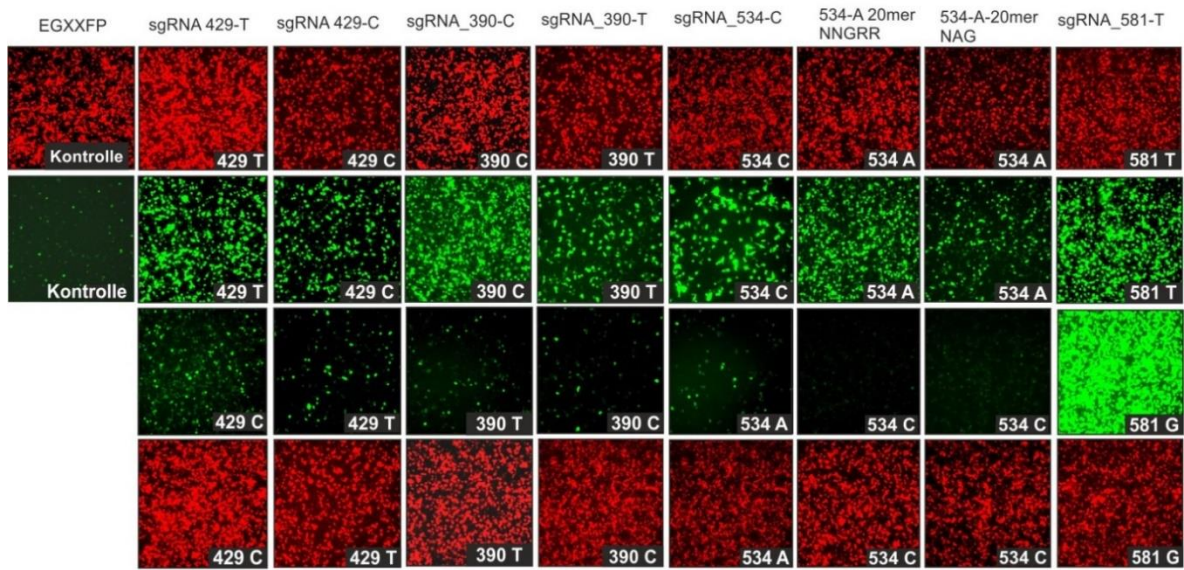
Um die CRISPR/Cas-Effizienzen validieren zu können, wurden zwei Expressionsvektoren verwendet (**Abbildung 8A**). Zum einen wurden die zu testenden sgRNAs in den px330-mCherry-Vektor kloniert, der auch die kodierende Sequenz für das Cas9-Protein enthielt. Bei erfolgreicher Transfektion in die Zelle erzeugt die Expression des mCherry-Proteins ein rotes Fluoreszenzsignal und dient somit als Kontrolle der Transfektionseffizienz. Zum anderen wurden jeweils PCR-Produkte ~500 bp langer DNA-Fragmente, die in ihrer Sequenz den zu targetierenden SNP beinhalten, in den pCAG-EGFP-Vektor kloniert. Die HEK293 Zellen wurden mit beiden Konstrukten co-transfiziert und nach 72h analysiert. Konnte die Gensequenz durch den sgRNA/Cas9-Komplex erkannt und geschnitten werden, fand ein homologer Reparaturvorgang der EGFP-Kassette statt und erzeugte ein grünes Fluoreszenzsignal (**Abbildung 8B**).

6.2.1.1 Transfektionen der 20mer langen sgRNAs

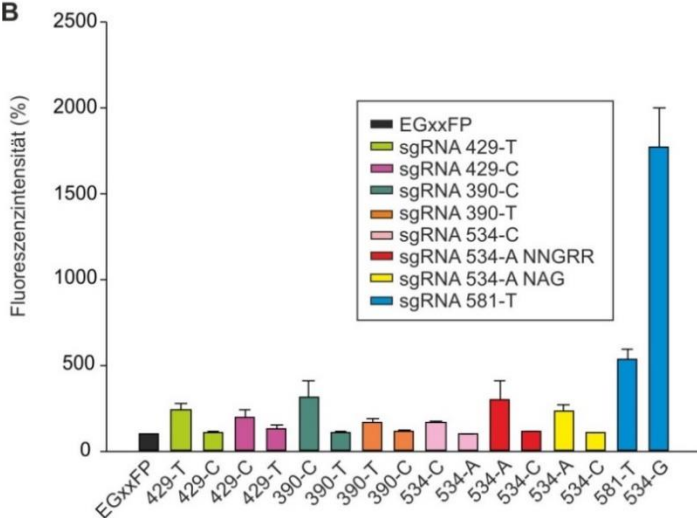
Analog zu der in **Abbildung 8** vorgestellten Strategie erfolgte in einem weiteren Schritt die experimentelle Austestung in HEK293-T-Zellen. Durch die verwendeten Softwaresysteme konnten lediglich sgRNAs einer Länge von 20 bp erzeugt werden. Da die Web-basiert generierten *off-* und *on-target* Werte somit nur für die Vorhersage der Editierungseigenschaften der 20mer langen sgRNAs herangezogen werden konnten, wurden die HEK293T-Zellen zunächst mit diesen sgRNA-Varianten transfiziert. Ziel dessen war es, die bioinformatischen Vorhersagewerte mit den tatsächlichen in vitro-Ergebnissen vergleichen zu können.

Die Resultate sind in der folgenden **Abbildung 9** dargestellt.

A



B



A) Mikroskopische Immunfluoreszenz-Aufnahme
72h nach Transfektion

Zweite Reihe: Zielallele; Dritte Reihe: Nicht- Zielallele
Erste Reihe Transfektionseffizienz Zielallele
Vierte Reihe: Transfektionseffizienz Nicht-Zielallele

B) Quantifizierung der Immunfluoreszenz

72h nach Transfektion

Fluoreszenzintensitäten der sgRNAs am Zielallele
und Nicht-Zielallele relativ zu pCAG EGxxFP;
gemessen am Plattenreader

Abbildung 9: Transfektionsergebnisse der 20mer langen sgRNAs

Abbildung 9A zeigt die mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen der transfizierten HEK293T-Zellen 72h nach Transfektion mit den 20mer langen sgRNA Varianten. Wie in **Abbildung 8** beschrieben, wird die erfolgreiche Transfektion in die Zelle durch ein rotes Fluoreszenzsignal repräsentiert, welches durch die Expression des mCherry-Proteins verursacht wird. Das rote Fluoreszenzsignal diente somit einer optischen Kontrolle, ob der Transfektionsvorgang in die Zellen erfolgreich und die Zelle Träger des CRISPR/Cas-Komplexes war. Die erste Reihe der **Abbildung 9A** zeigt diesen Effekt für die Transfektion der acht Zielallele-tragenden HEK293T-Zellen an, während das Fluoreszenzsignal der vierten Reihe die Transfektionseffizienz an dem

zur sgRNA nicht komplementären Nicht-Zielallel darstellt. Um die HEK293-T Transfektionen eines Allelpaars vergleichbar zu machen, sollten die roten Fluoreszenzsignale einer Spalte eine vergleichbare Intensität aufweisen. Dies beruht auf der Tatsache, dass ein Allelpaar jeweils mit der gleichen sgRNA transfiziert wurde und anschließend verglichen wurde. Beispielsweise wurden sowohl HEK293-T-Zellen, die die DNA mit dem SNP 429-T, als auch Zellen, die die DNA mit dem SNP 429-C trugen, mit der sgRNA 429-T-20mer transfiziert. Die zweite Bilderreihe zeigt die CRISPR-Aktivität am zur sgRNA komplementären Zielallel und lässt Rückschlüsse auf die Bindungsspezifität der sgRNA zu. Analog dazu zeigt die dritte Bilderreihe die Erkennung des Nicht-Zielallels an und visualisiert die off-target Kapazität, wobei hier eine Fluoreszenzintensität auf Niveau der Grundfluoreszenz wünschenswert wäre. Als Vergleichswert sind daher in der ersten Spalte links die Fluoreszenzaufnahmen der EGxxFP- und mCherry-Kontrollvektoren ohne Konstrukte ebenfalls dargestellt. 72h nach Transfektion wurden die Fluoreszenzintensitäten mittels eines Plattenreaders gemessen (**Abbildung 9B**), die Werte zur Zellzahl normalisiert und relativ zum EGxxFP-Grundfluoreszenzsignal berechnet. Letztgenanntes wird in **Abbildung 9B** durch den schwarzen Balken visualisiert. Die beiden Allelausprägungen eines jeden SNPs, welche im Diagramm durch die Verwendung einer Balkenfarbe veranschaulicht wird, wurden jeweils mit der gleichen sgRNA (in der **Abbildung 9B** dem Kästchen zu entnehmen) transfiziert. Die erste Allelvariante stellt das Zielallel dar, das zweite das Nicht- Zielallel. Für DNA-Sequenz und transfizierte sgRNA wurde die gleiche Abbildungsfarbe verwendet. Mit Ausnahme der sgRNA 581-T, bei welcher eine deutlich höhere Aktivität am Nicht-Zielallel zu verzeichnen war, wiesen alle sgRNAs eine zufriedenstellende Ziel-Affinität auf. Jedoch lassen alle sgRNAs aber besonders die sgRNAs 390-T und 429-C aufgrund ihrer niedrigen Spezifität Raum für Optimierungen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass von den bioinformatisch vorhergesagten Scores nur bedingt auf die tatsächliche in vitro Effizienz und Spezifität geschlossen werden konnte und diese Vorhersagen somit nur einen geringen prognostischen Parameter darstellen.

6.2.1.2 Optimierungsversuche der sgRNAs

Die Ergebnisse der ersten Austestungsrunde sollten nun in einem nächsten Schritt, falls erforderlich, optimiert werden. Ziel war vor allem eine Verbesserung der Spezifität. Dabei wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt:

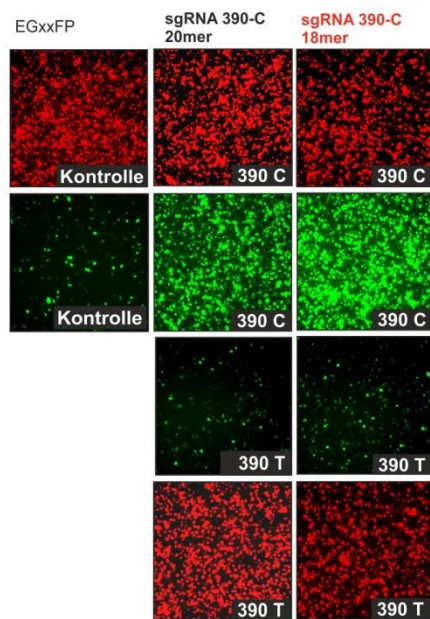
- 1) Trunkierung: Die 20 Basen langen Ausgangsguides wurden am 5'-Ende schrittweise von 20mer auf bis zu 17mer verkürzt. Dadurch sollte die Bindungsspezifität am Zielallel gesteigert werden. Dies geschah unter der Annahme, dass unstimmmige Basen im Vergleich zur Nicht-Zielsequenz in einer kürzeren sgRNA einen gravierenderen Effekt hervorrufen sollten als in der unveränderten 20 bp langen RNA-Sequenz. Das erwünschte Resultat daraus wäre eine reduzierte Bindung der sgRNAs an DNA-Sequenzen, die nicht der Ziel-DNA entsprechen (Fu et al. 2014; Hsu et al. 2014).
- 2) Basensubstitutionen: Durch das Austauschen einzelner Basen in der sgRNA entstand sowohl gegenüber der Zielsequenz als auch gegenüber der Nicht-Zielsequenz eine zusätzliche Basenabweichung. Indem das Nicht-Zielallel durch den Ziel-SNP bereits eine nicht-komplementäre Base aufwies, sollte die Affinität gegenüber der sgRNA gegenüber der Nicht- Zielsequenz reduziert werden.

Die beiden Ansätze wurden zusätzlich in Kombination verfolgt, um zu untersuchen, inwiefern sich die Effekte der beiden Methoden verstärken und eventuell gegenseitig beeinflussen. Die Position der Mutationen, sowie die ausgetauschten Nukleotide wurden variiert, um etwaige Tendenzen ermitteln zu können.

Die Modifikationen an den sgRNAs sind in den nachfolgenden Graphen (**Abbildungen 9-15**) detailliert aufgeführt. Es wurden Optimierungsversuche für die SNP-Allele 429T und 429C, 390C und 390T, 534C und 534A sowie für SNP 581T vorgenommen. Die Evaluation erfolgte anhand der ausgelesenen Daten, die durch den Plattenreader generiert wurden. Diese sind in **Abbildung 9-14** jeweils rechts dargestellt. Die Fluoreszenzaufnahmen dienen lediglich der Visualisierung der Ergebnisse.

Optimierung sgRNA für SNP 390-C (rs972353)

A



B

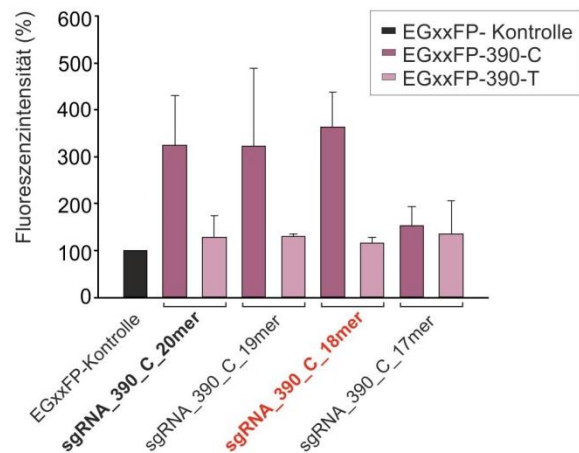


Abbildung 10: Transfektionsergebnisse der Optimierungsversuche für SNP 390-C

A) Mikroskopische Immunfluoreszenzaufnahme 72h nach Transfektion

Zweite Reihe: Zielallel 390-C; Dritte Reihe: Nicht- Zielallel 390-T;

Erste Reihe Transfektionseffizienz Zielallel; Vierte Reihe: Transfektionseffizienz Nicht-Zielallel

B) Quantifizierung der Immunfluoreszenz relativ zum Leervektor EGxgFP 72 h nach Transfektion

Fluoreszenzintensitäten (%) der sgRNAs am Zielallel 390-C entspricht der Effizienz.

Fluoreszenzaktivität (%) am Nicht-Zielallel 390-T entspricht der Spezifität.

vermessen am Plattenreader, n=4;

Farbschema: rot hinterlegte sgRNA: Modifikation mit den besten Ergebnissen

Obwohl die Ausgangsspezifität der sgRNA_390-C kaum einer Verbesserung bedurfte, wurde zunächst versucht dieses Ergebnis durch eine schrittweise Verkürzung zu optimieren. Dies diente dem Ziel, die Anzahl potentieller *off-targets* im Genom zu reduzieren (Fu et al. 2014; Zhang et al. 2015). Die Beurteilung der Effektivität der Modifikationen erfolgte anhand der quantifizierbaren Daten, die mittels Plattenreader erhoben wurden (**Abbildung 10B**). Während die sgRNA 390-C-19mer der ursprünglichen 20mer Varianten in ihren Editingeneigenschaften noch sehr ähnlich war, zeigte die sgRNA 390-C-18mer die besten Ergebnisse. Sowohl die Effizienz als auch die Spezifität konnten leicht verbessert werden. Bei der sgRNA 390-C-17mer kam es im Vergleich zu den längeren sgRNAs zu einem deutlichen Einbruch der Effizienz. Aufgrund der guten Ergebnisse der sgRNA 390-C-18mer wurde hier auf weitere Modifikationen verzichtet.

Wie schon erwähnt wurde durch den SNP eine neue PAM-Sequenz generiert. Dadurch findet sich die Erkennungssequenz nur auf einem der beiden Allele, was eine höhere Allelspezifität erwarten lässt. Untermuert wird diese Hypothese durch die durchweg sehr guten Spezifitätsergebnisse der sgRNA 390-C in den in vitro Experimenten. Die mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen aus **Abbildung 10A** dienen der Visualisierung der Transfektionsergebnisse der besten sgRNA 390-C-18mer im Vergleich zu der ursprünglichen 20mer langen sgRNA_390-C-20mer und dem Leervektor EGxxFP ohne Konstrukt.

Optimierung sgRNA für SNP 390-T (rs972353)

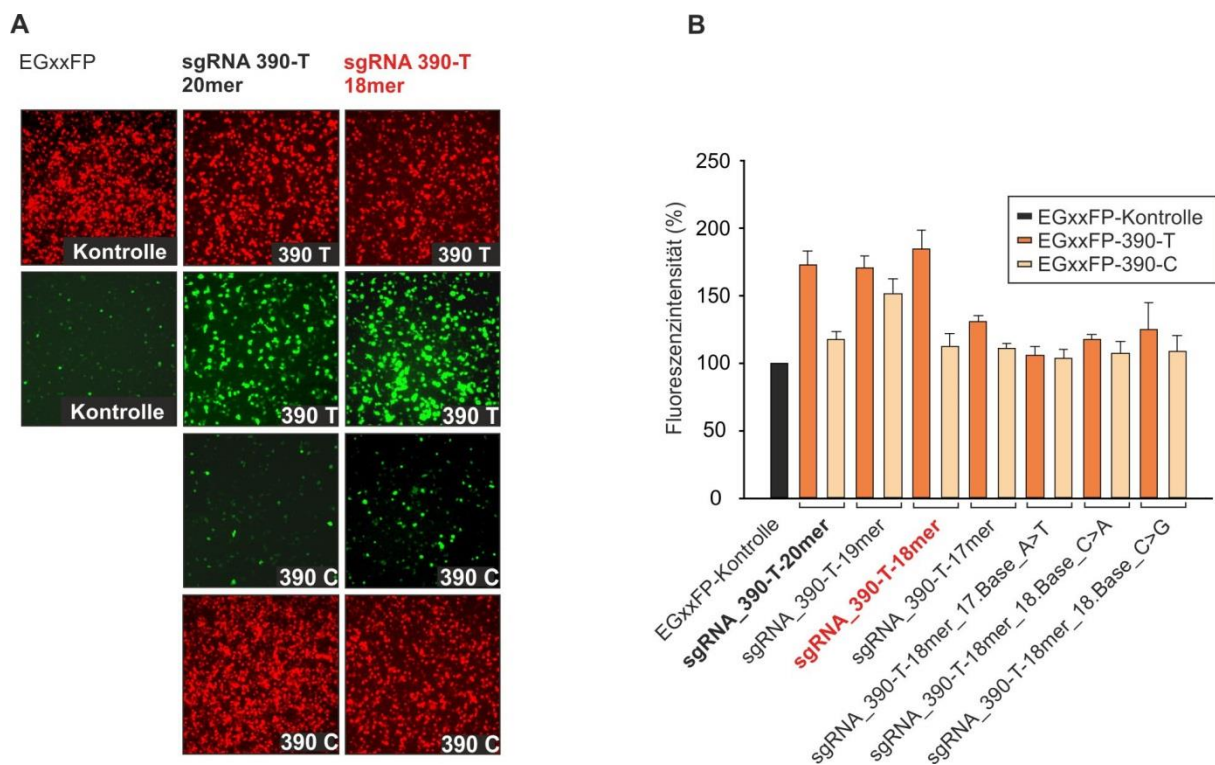


Abbildung 11: Transfektionsergebnisse der Optimierungsversuche für SNP 390-T

A) Mikroskopische Immunfluoreszenzaufnahme 72h nach Transfektion

Zweite Reihe: Zielallel 390-T; Dritte Reihe: Nicht-Zielallel 390-C;

Erste Reihe Transfektionseffizienz Zielallel; Vierte Reihe: Transfektionseffizienz Nicht-Zielallel

B) Quantifizierung der Immunfluoreszenz relativ zum Leervektor EGxxFP 72 h nach Transfektion

Fluoreszenzintensitäten (%) der sgRNAs am Zielallel 390-T entspricht der Effizienz.

Fluoreszenzaktivität (%) am Nicht-Zielallel 390-C entspricht der Spezifität.

vermessen am Plattenreader; n=4;

Farbschema: rot hinterlegte sgRNA: Modifikation mit den besten Ergebnissen

Da die Ausgangsguide vor allem bezüglich ihrer Spezifität Optimierungsbedarf aufwies, sollte im nächsten Versuch überprüft werden, ob die Verkürzung der sgRNA auch hier einen positiven Effekt hervorrufen könnte (**Abbildung 11B**). Während die 19mer-Variante zunächst zu einer Verschlechterung des ursprünglichen Ergebnisses führte, resultierte die nochmalige Verkürzung auf 18mer in einer erhöhten Spezifität gegenüber dem Zielallel. Die Effektivität konnte ebenso leicht verbessert werden. Ähnlich wie beim 390-C Allel kam es bei der sgRNA 390-T-17mer zu einem rapiden Absinken der Effizienz. Mit der Intention, das Ergebnis der sgRNA 390-C-18-mer noch weiter auszubauen, wurden an der 17. und 18. Position Basensubstitutionen eingeführt. Jedoch entsprach die Effizienz aller drei Varianten nicht annähernd dem Ergebnis der ursprünglichen sgRNA_390-T-18mer. Somit wurde diese als beste sgRNA für diese Allelvariante festgelegt. Die mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen **Abbildung 11A** zeigen die Transfektionsergebnisse der besten sgRNA 390-T-18mer im Vergleich zur Ausgangsguide und dem Leervektor EGxxFP.

Optimierung sgRNA für SNP 429-T (rs1800007)

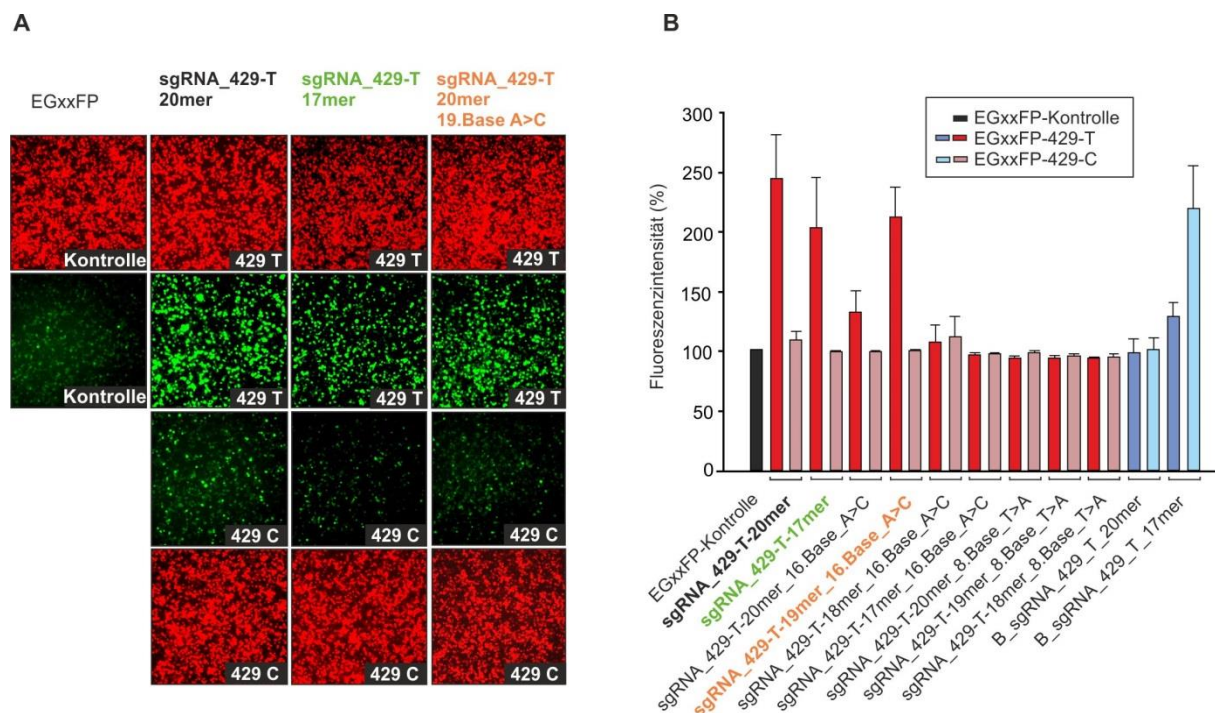


Abbildung 12: Transfektionsergebnisse der Optimierungsversuche für SNP 429-T

A) Mikroskopische Immunfluoreszenzaufnahme 72h nach Transfektion

Zweite Reihe: Zielallel 429-T; Dritte Reihe: Nicht-Zielallel 429-C;

Erste Reihe Transfektionseffizienz Zielallel; Vierte Reihe: Transfektionseffizienz Nicht-Zielallel

B) Quantifizierung der Immunfluoreszenz relativ zum Leervektor EGxxFP 72 h nach Transfektion

Fluoreszenzintensitäten (%) der sgRNAs am Zielallel 429-T entspricht der Effizienz.
Fluoreszenzaktivität (%) am Nicht-Zielallel 429-C entspricht der Spezifität.
vermessen am Plattenreader; n=4,
Farbschema: In grün bzw. orange hinterlegte sgRNAs: Modifikationen mit den besten Ergebnissen

Analog zu den vorausgehenden Optimierungen wurde zunächst mit einer schrittweisen Verkürzung der sgRNA Sequenz begonnen. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 12 A und B** dargestellt. Die verkürzte Variante sgRNA 429-T-17mer zeigte eine Verbesserung der Spezifität, allerdings zu Ungunsten der Effektivität. Das anschließende Einführen von Punktmutationen führte abhängig von deren Lokalisation zu unterschiedlichen Ergebnissen. Vor allem bei der sgRNA 429-T-19mer resultierte der Basenaustausch von A nach C an der 16. Base in einer Verbesserung der Effektivität im Vergleich zu sgRNA 429-T-17mer. Da eine Optimierung der Spezifität vorrangiges Ziel der Modifikationsversuche war, wurde der Effizienzverlust im Vergleich zur 20mer- Variante aufgrund der Verbesserung der Spezifität in Kauf genommen. Die Fluoreszenzintensitäten der Transfektionen am Nicht-Zielallel lagen in beiden modifizierten sgRNAs beinahe auf dem Niveau der EGxxFP-Kontrolle, was eine hohe Spezifität widerspiegelt. Von den beiden besten Guides sgRNA_429-T-17mer und 429-T-19mer_16.Base_A<C wurden jeweils mikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenz erstellt (**Abbildung 12A**). Wie in den vorangegangenen Abbildungen sind die Transfektionsergebnisse der ursprünglichen 20 bp langen sgRNA_429-C-20mer und der EGxxFP-Leerkontrolle zusätzlich als Referenzwerte mit dargestellt.

Mutationen weiter proximal zur PAM an der 8. Base führten indessen zu einem völligen Funktionsverlust der sgRNAs. Auffällig waren zudem die Ergebnisse der alternativen sgRNA_B_sgRNA_429-T-17mer. Aus unbekanntem Gründen war die Fluoreszenzintensität am Nicht-Zielallel deutlich stärker als am Zielallel. Da bereits zwei sgRNAs mit guten Editierungseigenschaften zur Verfügung standen, wurde auf eine weitere Ursachenforschung verzichtet.

Optimierung sgRNA 429-C (rs1800007)

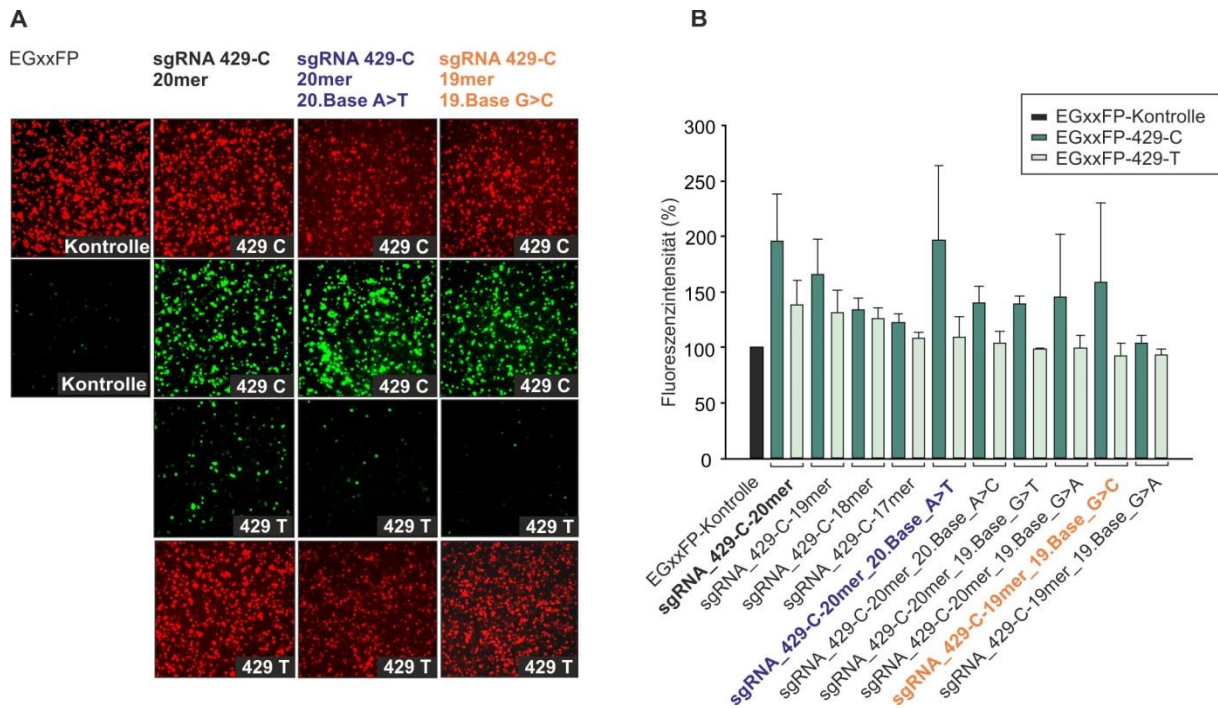


Abbildung 13: Transfektionsergebnisse der Optimierungsversuche für SNP 429-C

A) Mikroskopische Immunfluoreszenzaufnahme 72h nach Transfektion

Zweite Reihe: Zielallele 429-C; Dritte Reihe: Nicht- Zielallele 429-T;

Erste Reihe Transfektionseffizienz Zielallele; Vierte Reihe: Transfektionseffizienz Nicht-Zielallele

B) Quantifizierung der Immunfluoreszenz relativ zum Leervektor EGxxFP 72 h nach Transfektion

Fluoreszenzintensitäten (%) der sgRNAs am Zielallele 429-C entspricht der Effizienz.

Fluoreszenzaktivität (%) am Nicht-Zielallele 429-T entspricht der Spezifität.

vermessen am Plattenreader; n=4,

Farbschema: blau und orange hinterlege sgRNAs: Modifikationen mit den besten Ergebnissen

Analog zu den Optimierungsschritten der vorherigen sgRNAs wurden auch hier Sequenzmodifikationen durchgeführt. Obwohl durch den SNP Austausch von T nach C eine PAM generiert wurde, wies die sgRNA 429-C-20mer eine niedrige Spezifität auf. Ähnlich wie bei der 429-T Varianten konnte die Spezifität durch die schrittweise Reduktion der Nukleotidanzahl der sgRNA von 20mer auf 19, 18 und 17mer zwar gesteigert werden, allerdings sank die Effizienz am Zielallele in gleichem Maße. Auch an dieser Stelle wurden die Auswirkungen verschiedener Basensubstitutionen in der Sequenz untersucht. Aufgrund der Erkenntnisse aus der Optimierung der sgRNAs für den SNP 429-T wurden die Sequenzvariationen dieses Mal auf PAM-distale Basenpositionen am 3'-Ende der sgRNA beschränkt. Die 20mer lange sgRNA wurde in vier Varianten untersucht. Zwei sgRNAs wurden an der 20. Base und zwei sgRNAs an der 19. Stelle modifiziert. In allen Fällen konnte die Spezifität gegenüber dem Ziel-Allel deutlich gesteigert werden. Die besten Ergebnisse wurden

bei der modifizierten 429-C-20mer Varianten erzielt, bei der an der 20. Base ein Austausch von A nach T erfolgt war (sgRNA_429-C-20mer_20.Base_A>T). Bei verbesserten Spezifitätsresultaten war es hier möglich, die Effizienz auf dem Niveau der unveränderten 20mer-Ausgangsguide zu erreichen.

Bei den anderen drei Sequenzvariationen (sgRNA_429-C-20mer_20.Base_A>C, sgRNA_429-C-20mer_19.Base_G>T, sgRNA_429-C-20mer_19.Base_G>A) kam es zu einem deutlichen Abfall der Effizienz.

Anschließend wurden Modifikationen der um eine Base verkürzten sgRNA_429-C-19mer durchgeführt. An Position 19 wurde der Effekt einer Basensubstitution von G nach C zum einen, und von G nach A zum anderen untersucht. Während die Effizienz bei letztgenannter Variante deutlich absank, konnten für sgRNA_429-C-19mer_19.Base_G>C zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden. Auch wenn die Effizienz dieser sgRNA im Vergleich zur sgRNA_429-C-20mer_20.Base_A>T reduziert war, konnte diese Variante aufgrund der guten Spezifitätsergebnisse überzeugen. In **Abbildung 13A** sind die mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen dieser beiden sgRNAs zur Visualisierung der Transfektionsergebnisse, inklusive der Fluoreszenzintensität der Ausgangsguide und des Leervektors EGxxFP dargestellt.

Optimierung der sgRNA für SNP 534-C (rs1109748)

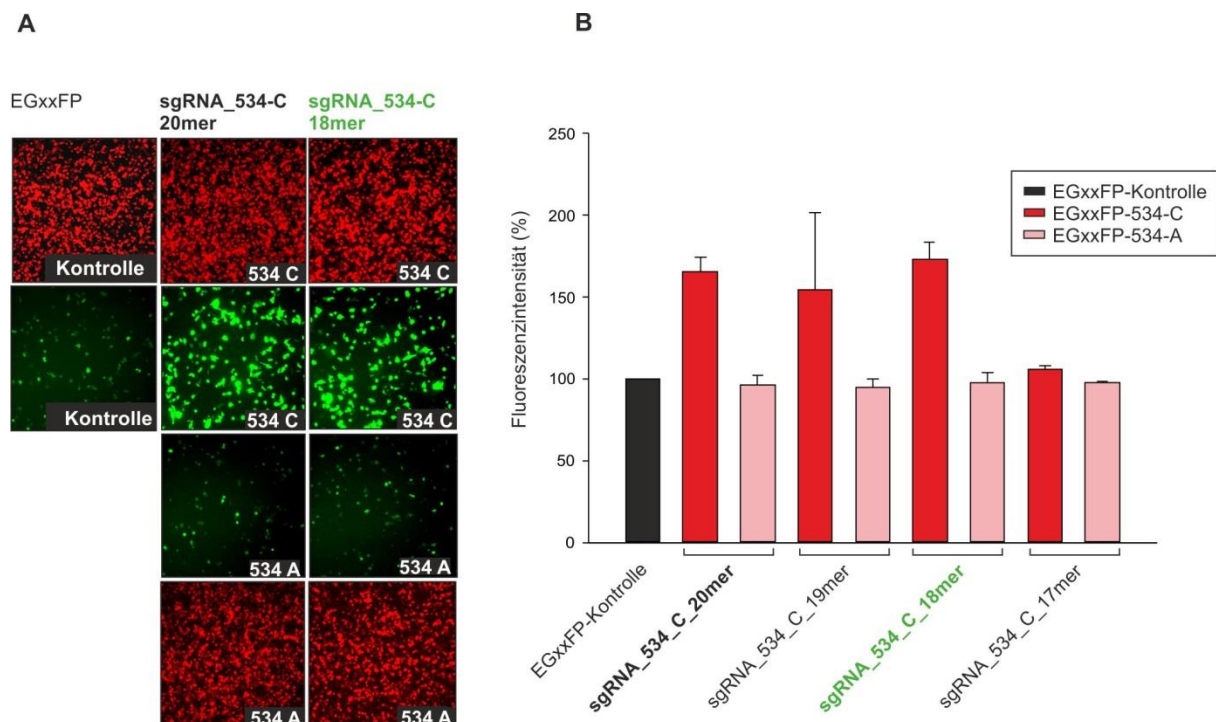


Abbildung 14: Transfektionsergebnisse der Optimierungsversuche für SNP 534-C

A) Mikroskopische Immunfluoreszenzaufnahme 72h nach Transfektion

Zweite Reihe: Zielallele 534-C; Dritte Reihe: Nicht- Zielallele 534-A;

Erste Reihe: Transfektionseffizienz Zielallele; Vierte Reihe: Transfektionseffizienz Nicht-Zielallele

B) Quantifizierung der Immunfluoreszenz relativ zum Leervektor EGxxFP 72 h nach Transfektion

Fluoreszenzintensitäten (%) der sgRNAs am Zielallele 534-C entspricht der Effizienz.

Fluoreszenzaktivität (%) am Nicht-Zielallele 534-A entspricht der Spezifität.

vermessen am Plattenreader; n=4,

Farbschema: grün hinterlegte sgRNA: Modifikation mit den besten Ergebnissen

Obwohl die sgRNA 534-C-20mer auch ohne Optimierungsversuche eine gute Spezifität aufwies, wurde zunächst untersucht, inwiefern eine Verkürzung einen positiven Effekt auf die Editierungseigenschaften haben würde. Ziel war es, das Risiko der Entstehung von off-targets im Genom zu minimieren (Zhang et al. 2015; Fu et al. 2014). Da im Falle der sgRNA 534-C-18mer die Effektivität am Zielallele 534-C um eine Nuance gesteigert werden konnte, wurde diese als beste sgRNA erachtet. Analog zum SNP 390-C ist die gute Spezifität möglicherweise auf das Generieren einer PAM durch die SNP 534-C Variante zurückzuführen. Auf weitere Modifikationen wurde verzichtet.

Optimierung sgRNA für SNP 534-A (rs1109748)

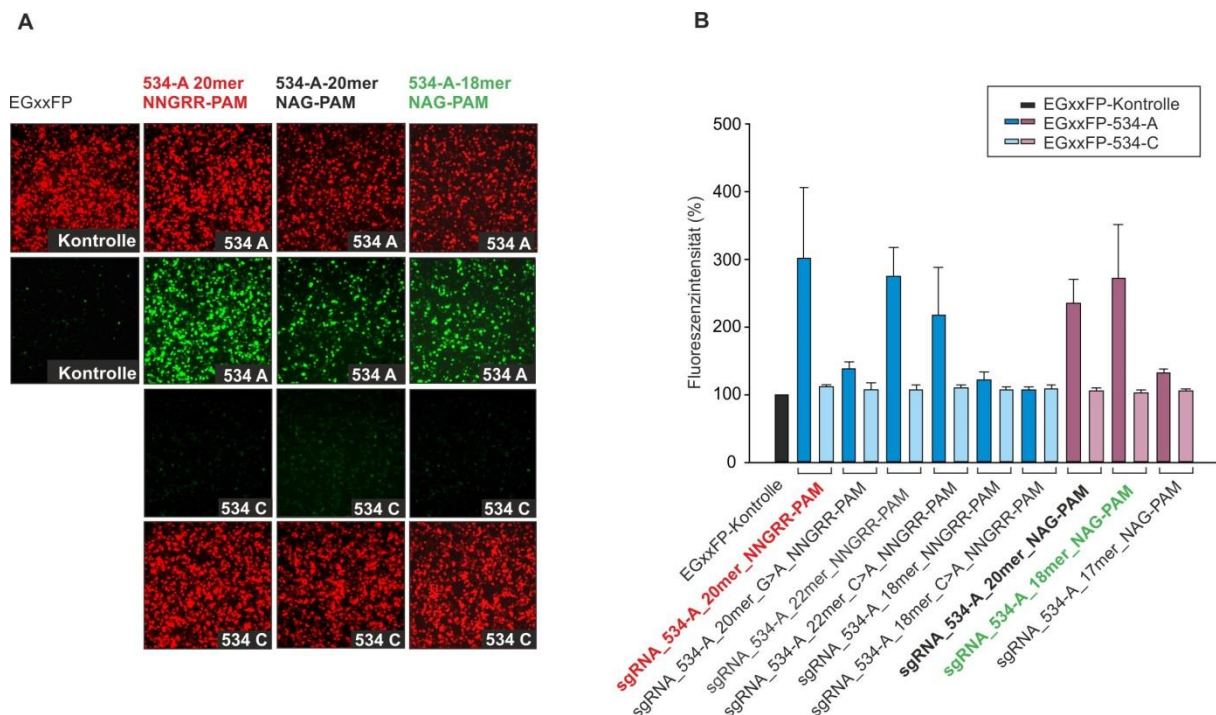


Abbildung 15: Transfektionsergebnisse der Optimierungsversuche für SNP 534-A

A) Mikroskopische Immunfluoreszenzaufnahme 72h nach Transfektion

Zweite Reihe: Zielallele 534-A; Dritte Reihe: Nicht- Zielallele 534-C;

Erste Reihe: Transfektionseffizienz Zielallele; Vierte Reihe: Transfektionseffizienz Nicht-Zielallele

B) Quantifizierung der Immunfluoreszenz relativ zum Leervektor EGxxFP 72 h nach Transfektion

Fluoreszenzintensitäten (%) der sgRNAs am Zielallele 534-A entspricht der Effizienz.

Fluoreszenzaktivität (%) am Nicht-Zielallele 534-C entspricht der Spezifität.

vermessen am Plattenreader; n=4,

Farbschema: rot und grün hinterlegte sgRNAs: Modifikationen mit den besten Ergebnissen

Für den SNP 534-A wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Wie schon beschrieben wurde zum einen eine sgRNA mit NNGRR-PAM generiert (in **Abbildung 15B** in blauen Balken dargestellt). Diese PAM wird durch die Cas9 des Staphylokokkus aureus erkannt. Zum Vergleich dazu wurde die ursprüngliche Staphylokokkus pyogenes Cas9 verwendet. Aus Ermangelung einer geeigneten NGG-PAM wurde auf die alternative NAG-PAM zurückgegriffen (in **Abbildung 15B** in lila Balken). Auffällig an dieser Versuchsreihe war die durchgängig sehr gute Spezifität, die keiner Verbesserung bedurfte.

Um die Auswirkungen der sgRNA Länge bei der SaCas9 zu untersuchen, wurde die ursprüngliche 20 bp lange sgRNA sowohl um zwei Nukleotide verkürzt als auch um zwei Nukleotide verlängert. Zusätzlich erfolgte auch hier das Einführen von Basensubstitutionen. In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass sgRNAs der Länge 21-23 bp die höchste Effizienz aufweisen (Ran et al. 2015). Dementsprechend wurden für die 22mer Variante die besten Ergebnisse vermutet. Entgegen dieser Erwartungen fiel die Effizienz bei gleichbleibender Spezifität gegenüber der sgRNA 534-A-20mer leicht ab. Durch den Basenaustausch von C nach A (sgRNA_534-A-22mer_C>A) reduzierte sich die Effizienz nochmals im Vergleich zum nicht mutierten 534-A-22mer. Auch bei der sgRNA 534-A-20mer konnte durch das Einführen einer Mutation (sgRNA_534-A-20mer_G>A) kein verbessertes Ergebnis erzielt werden. Dagegen hatte eine nochmalige Verkürzung sowohl bei der nicht mutierten (sgRNA_534-A-18mer) als auch bei der mutierten Version (sgRNA_534-A-18mer_C>A) einen Funktionsverlust der beiden sgRNAs zur Folge. Trotz ähnlicher Spezifitätsergebnisse der sgRNA_534-A-20mer und der sgRNA_534-A-22mer wurde erstgenannte als beste sgRNA ausgewählt. Aufgrund der reduzierten Länge wird für die kürzere sgRNA eine geringere off-target- Aktivität erwartet.

Bezüglich der Spezifität wiesen die sgRNAs mit NAG-PAM vergleichbar gute Resultate auf. Im Gegensatz zur SaCas9- Variante konnte die Effizienz am Zielallele durch eine Verkürzung auf 18 Basen gesteigert werden. Das Effizienz-Niveauder 534-A-20mer NNGRR konnte nicht vollständig erreicht werden. In **Abbildung 15A** sind die Transfektionsergebnisse der beiden besten sgRNAs visualisiert. Als Referenzwerte sind das Fluoreszenzsignal des EGxxFP-Leervektors links und der Ausgangsguide 534-A-20mer mit NAG- PAM nochmals dargestellt.

6.2.1.2.7 Optimierung sgRNA für SNP 581-T (rs195161)

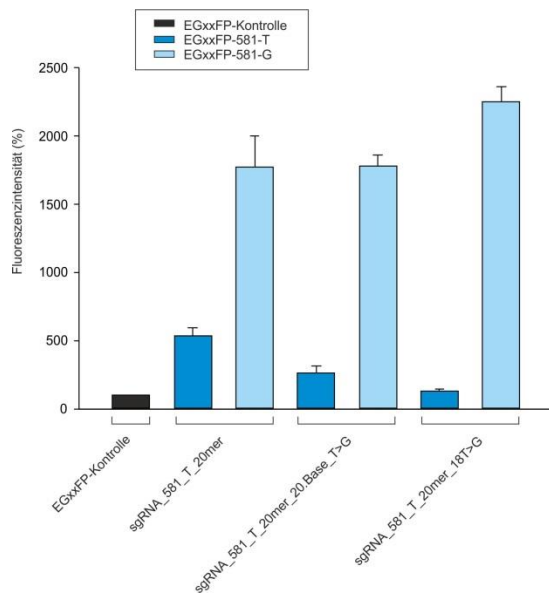


Abbildung 16: Transfektionsergebnisse der Optimierungsversuche für SNP 581-T

Quantifizierung der Immunfluoreszenz relativ zum Leervektor EGxxFP 72 h nach Transfektion

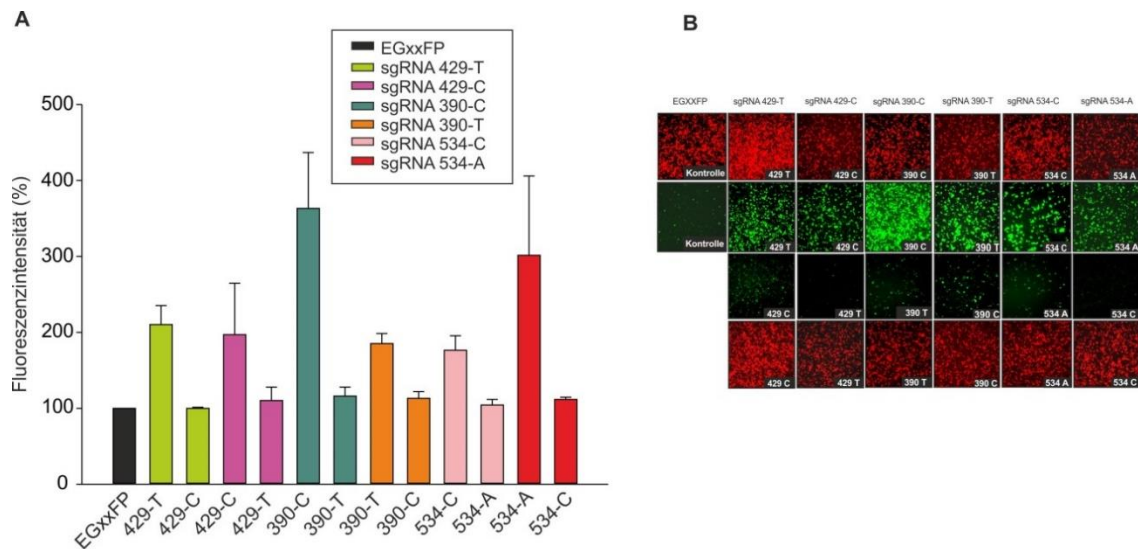
Fluoreszenzintensitäten (%) der sgRNAs am Zielallel 581-T entspricht der Effizienz.

Fluoreszenzaktivität (%) am Nicht-Zielallel 581-G entspricht der Spezifität.

vermessen am Plattenreader; n=4,

Schon die Ausgangsguide sgRNA_581-T-20mer wies eine deutlich stärkere Affinität gegenüber dem Nicht-Zielallel 581-G auf. Dieses Verhalten ließ sich auch durch Verkürzung oder das Einfügen von Punktmutationen nicht verbessern. Im Gegenteil verstärkte sich der Effekt durch die Sequenzmodifikationen. Experimentelle Fehler konnten ausgeschlossen werden. Aufgrund dessen muss in folgenden Arbeiten für diesen SNP bioinformatisch eine alternative sgRNA gesucht werden.

In der folgenden Abbildung sind die besten sgRNAs für jeden SNP nochmals zusammengefasst:



A) Quantifizierung der Immunofluoreszenz relativ zum Leervektor EGxxFP 72h nach Transfektion
 Fluoreszenzintensitäten der sgRNAs am Zielallel (erster Balken einer Farbgruppe) und Nicht-Zielallel (zweiter Balken einer Farbgruppe) gemessen am Plattenreader; n=4

B) Mikroskopische Immunofluoreszenz-Aufnahme 72h nach Transfektion
 Zweite Reihe: Zielallel; Dritte Reihe: Nicht- Zielallel
 Erste Reihe: Transfektionseffizienz Zielallel
 Vierte Reihe: Transfektionseffizienz Nicht-Zielallel

Abbildung 17: Transfektionsergebnisse der ausgewählten sgRNAs nach Optimierung

6.2.2 Transfektion optimierter sgRNAs in primäre Patienten-Fibroblasten

Ziel der vorangegangenen Optimierungen in HEK293-Zellen war es, für jeden SNP eine sgRNA mit höchster Effizienz und Spezifität zu etablieren. Diese sgRNAs sollte nun in einem weiteren Schritt in Fibroblasten-Zelllinien von BVMD Patienten untersucht werden. Ziel war es zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse in HEK293T-Zellen auf Transfektionen primärer Zellen übertragen lassen. Im HEK293T-System wurden die Editierungseigenschaften nicht an einem heterozygoten genomischen Locus untersucht, sondern lediglich an einem Plasmid, welches die 500 bp lange Sequenz eines der Allele beinhaltet. Die Auswirkung potentieller genomweiter off-targets auf die Editierungseigenschaften konnte dabei nicht eruiert werden. Käme es zum Beispiel zu einem Verbrauch des sgRNA/CRISPR/Cas-Komplexes an off-target Stellen, stünde dieser an der eigentlichen Zielsequenz nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung. Infolgedessen käme es möglicherweise zu einer Veränderung der Editierungseffizienz oder der Allelspezifität. Für diese Experimente wurden zum einen einige in dieser Arbeit untersuchte sgRNAs verwendet und zum anderen bereits in vorherigen Arbeiten optimierte sgRNAs hinzugezogen.

Die finale Auswahl der jeweiligen SNPs und deren ausgewählte sgRNAs sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

interne SNP- Nr.	rs- Nr.	Allel	sgRNA
429	rs1800007	T	429-T-19mer_16.Base_A>C
		C	429-C-19mer_19.Base_G>C
534	rs1109748	C	534-C-18mer
581	rs195161	G	581-G-17mer
749	rs149698	A	749-A-17mer
756	rs1800008	C	756-C-17mer

Tabelle 32: sgRNA Auswahl für Fibroblasten- Transfektionen

Farbige Markierung: blau: in vorherigen Arbeiten optimierte sgRNAs; orange: optimierte sgRNAs dieser Arbeit

Die Entscheidung, welche sgRNA in welche Fibroblastenlinie transfiziert werden sollte, wurde anhand der SNP Konstellation der Patienten getroffen. Voraussetzung war zum einen die Heterozygotie am betreffenden SNP, um zwischen mutantem und nicht-mutantem Allel unterscheiden zu können. Zum anderen musste das mutationstragende Allel bekannt sein.

Die optimierten sgRNAs wurden wahlweise entweder in den px459-GFP oder den px330-mCherry Vektor kloniert, die die kodierenden Sequenzen der Cas9-Endonuklease, sowie eines fluoreszierenden Proteins enthielten. Beide Fluoreszenzsignale dienten im Gegensatz zu den HEK293T-Transfektionen hier nicht der Evaluation des CRISPR-Erfolgs sondern nur als Transfektionsnachweis. Nach 72 Stunden wurde mit Hilfe des FACs-Sorters aus den Fluoreszenz-positiven Fibroblasten genomische DNA isoliert und mittels PCR und „Sanger“-Sequenzierung die CRISPR-Effizienz untersucht.

6.2.2.1 Auswertung der Fibroblasten-Transfektion für SNP 534C



Abbildung 18: Auswertung der Sequenzierergebnisse am Beispiel des SNPs 534-C

Farbige Markierungen: gelb: SNP 534, rot: PAM- Sequenz, blau: sgRNA 534-C-18mer, grün: entstandene Deletionen

Die Auswertung der Sequenzierergebnisse mithilfe der Software „Snapgene“ soll durch die obenstehende **Abbildung 18** beispielhaft anhand des SNPs 534-C demonstriert werden. Ganz oben dargestellt ist die Original-Sequenz im Exon 3 inklusive der sgRNA 534-C-18mer in blauer und der zugehörigen PAM-Sequenz in roter Umrandung. Der SNP 534 ist gelb markiert. Eine zufällige Auswahl der insgesamt 72 analysierten Klone ist in der Abbildung ganz links aufgelistet. Deren Sequenzen wurden zunächst auf ihre Allelausprägung am SNP untersucht. Dabei wiesen 46% das Zielallel 534-C auf, 54% das nicht-mutierte A- Allel, welches idealerweise die sgRNA nicht erkennt und daher von der Cas9-Endonuklease nicht geschnitten werden sollte. In diesem Beispiel wurde das 534-A-Allel in keinem der 39 Fälle beeinträchtigt, was auf eine hohe Allelspezifität der sgRNA schließen lässt.

Von den 33 C-Allel-Varianten konnten bei 91% die gewünschten Insertionen/Deletionen generiert werden. In statistisch zwei Drittel davon werden durch die Insertion oder Deletion von Basen Leseraster-Mutationen hervorgerufen. Dabei entsteht in der Regel ein Stop-Codon, das die Transskription des Gens vorzeitig beendet. Bei dem restlichen Drittel führt der Reparaturvorgang des DSB lediglich zu einer in-frame Mutation bei der die Insertion oder Deletion von drei oder eines Vielfachen von drei Aminosäuren das ursprüngliche Leseraster nicht beeinträchtigt. Wie in **Abbildung 18** zu erkennen ist, war in vereinzelt Fällen die Position des SNPs von größeren Deletionen (in der Abbildung: 23 bp) betroffen. Da die SNP

Zuordnung infolgedessen nicht erfolgen konnte, wurden diese Klone von der Auswertung ausgeschlossen.

Klonanzahl	Allelausprägung	Allelverteilung	Insertionen/Deletionen
72	A	39 (54%)	-
	C	33 (46%)	30 (91%)

Tabelle 33: Sequenzierungsauswertung für sgRNA 534C-18mer

Farbige Hinterlegung: rot: Nicht-Zielallel; grün: Zielallel;

Dargestellt in absoluten Zahlen und in () als prozentualer Anteil

6.2.2.2 Transfektions- Auswertung für SNP 429T/C

Als weniger erfolgreich erwies sich die Transfektion für den SNP 429. Sowohl für die T- als auch für die C-Ausprägung konnten nur sehr geringe CRISPR-Effizienzen generiert werden. Im Falle der sgRNA 429-T_19mer_16.Base_A>C wurde die Zielsequenz mit dem T- Allel lediglich in 12% erkannt und geschnitten (**Tabelle 16**). Am nicht-mutierten Allel wurde jedoch keine CRISPR-Aktivität verzeichnet. Dies lässt Rückschlüsse auf eine hohe Allelspezifität zu.

Klonanzahl	Allelausprägung	Allelverteilung	Insertion/ Deletion
96	T	34 (35%)	4 (12%)
	C	62 (65%)	-

Tabelle 34: Sequenzierungsauswertung für sgRNA 429-T_19mer_16.Base_A>C

Farbige Hinterlegung: grün: Zielallel; rot: Nicht-Zielallel;

Dargestellt in absoluten Zahlen und in () als prozentualer Anteil

Ein ähnliches Ergebnis wies die alternative Allelausprägung 429-C auf. Die Zielsequenz wurde lediglich in 8% der Fälle erkannt. Jedoch wurde das Nicht-Zielallel 429-T durch den CRISPR/Cas-Komplex nicht beeinträchtigt und spiegelt dadurch die hohe Spezifität der sgRNA 429-C-19mer_16.Base_G>C wider (**Tabelle 35**).

Klonanzahl	Allelausprägung	Allelverteilung	Insertion/Deletion
100	C	75 (75%)	6 (8%)
	T	25 (25%)	0

Tabelle 35: Sequenzierungsauswertung für sgRNA_429-C-19mer_16.Base_G>C

Farbige Hinterlegung: grün: Zielallel; rot: Nicht-Zielallel;

Dargestellt in absoluten Zahlen und in () als prozentualer Anteil

6.2.2.3 Transfektions-Auswertung für SNP 581G und 749A

Da sich der SNP 581 in einer nicht- kodierenden Sequenz befand, musste dafür zeitgleich eine zweite sgRNA in einem separaten Vektor mittransfiziert werden. Ziel war es, durch zwei isolierte DNA-Brüche Exon- übergreifende Deletionen zu generieren. Ein einzelner DSB in einer intronischen Sequenz käme einer einfachen Punktmutation ohne relevante Auswirkung auf das mutierte BEST1-Gen gleich. Da hierbei zwei unterschiedliche Vektorkonstrukte parallel transfiziert wurden, musste aufgrund der beschränkten Aufnahmekapazität der Zellen die transfizierte Gesamt-Plasmidmenge im Vergleich zu einer Einzeltransfektion unverändert bleiben. In der Konsequenz konnte somit pro Vektor jeweils nur 50% der sonst verwendeten Menge eingesetzt werden. Um die Auswirkungen einer solchen Reduktion zu bewerten, wurden die beiden sgRNAs zunächst einzeln in separate Fibroblasten transfiziert. Für den SNP 581-G konnten sehr gute Transfektionsergebnisse erzielt werden. 71% der Zielallele wurden erfolgreich editiert bei erhaltener Spezifität von 100% (**Tabelle 36**).

Dass die sgRNA 581-G-17mer eine vergleichbar hohe Effizienz erreichen konnte trotz der im Vergleich zu den restlichen Fibroblastentransfektionen geringeren Konstruktmenge, ist möglicherweise auf die hohe Ursprungseffizienz zurückzuführen, welche schon in der HEK-Transfektionsreihe zu beobachten war. Die sgRNA band in den HEK- Testtransfektionen bereits um ein 10faches stärker an ihr Zielallel als alle sonstigen sgRNAs der verbliebenen SNPs.

Klonanzahl	Allelausprägung	Allelverteilung	Insertionen/Deletionen
62	G	24 (39%)	17 (71%)
	T	38 (61%)	0

Tabelle 36: Sequenzierungsauswertung für sgRNA 581G- 17mer

Farbige Hinterlegung: rot: Nicht-Zielallel; grün: Zielallel;

Dargestellt in absoluten Zahlen und in () als prozentualer Anteil

Kombiniert werden sollte die sgRNA 581G mit einer sgRNA für den SNP 749A. In Analogie zum SNP 581G wurde auch hier lediglich 1,5µg Konstruktmenge eingesetzt. Dabei erkannten zwar nur 29% der sgRNAs ihre zugehörige Ziel-DNA, jedoch wurde auch hier die DNA des Nicht-Zielallels mit dem SNP 749G bei keinem der 34 Klone, durch CRISPR-induzierte Mutationen beeinträchtigt (**Tabelle 37**).

Klonanzahl	Allelausprägung	Allelverteilung	Insertionen/Deletionen
58	A	24 (41%)	7 (29%)
	G	34 (59%)	0

Tabelle 37: Sequenzierungsauswertung für sgRNA_749-A-17mer

Farbige Hinterlegung: rot: Nicht-Zielallel; grün: Zielallel;

Dargestellt in absoluten Zahlen und in () als prozentualer Anteil

Wie oben beschrieben wurden in einem nächsten Schritt die beiden sgRNAs gleichzeitig transfiziert, um durch zwei unabhängige DNA-Brüche Exon-überspannende Deletionen zu erzeugen. Für diesen Zweck wurde zunächst die sgRNA 581G-17mer für den SNP 581-G in den mCherry-Vektor kloniert. Kombiniert wurde diese mit einer sgRNA, die den SNP 749-A targetieren sollte. Letztgenannte wurde in den GFP-Vektor kloniert. Anschließend sollten nur Fibroblasten, die sowohl ein grünes als auch rotes Fluoreszenzsignal aufwiesen, also folglich beide Konstrukte trugen, identifiziert und mittels FACS sortiert werden.

Die erfolgreiche Editierung führte zu der Exzision des circa 7 kb großen DNA-Stücks zwischen den beiden SNPs. Die beiden Enden wurden anschließend analog zu der Transfektion einer einzelnen sgRNA durch die Reparaturmechanismen wieder zusammengefügt. Durch die Verwendung von PCR-Primern, die die beiden SNPs zwischen sich einschlossen, war die erfolgreiche DNA- Editierung an einer 560 bp großen Bande auf dem Elektrophoresegel nachweisbar. Durch die immensen Größendifferenzen zwischen der bearbeiteten und der ungeschnittenen DNA-Sequenz war eine Quantifizierung der CRISPR-Effizienz nach dem bisher verwendeten Modell jedoch nicht durchführbar.

6.2.2.4 Transfektions- Auswertung für SNP 756C

Im Vergleich zu den sgRNAs für den SNP 429 konnten für die sgRNA 756-C-17mer deutlich höhere Effizienzen verzeichnet werden. Zu 58% erkannte die sgRNA die zugehörige DNA-Sequenz mit dem SNP 756-C. Ebenso wie bei den vorangegangenen Testreihen betrug auch hier die Spezifität 100% (**Tabelle 38**).

Klonanzahl	Allelausprägung	Allelverteilung	Insertionen/Deletionen
81	C	33 (41%)	19 (58%)
	T	48 (59%)	0

Tabelle 38: Sequenzierungsauswertung für sgRNA_756-C-17mer

Farbige Hinterlegung: rot: Nicht-Zielallel; grün: Zielallel;

Dargestellt in absoluten Zahlen und in () als prozentualer Anteil

7 Diskussion

Für die Allel-spezifische Genomeditierung wurden zunächst Transfektionsexperimente in HEK293T-Zellen durchgeführt. Da die experimentellen Evidenzen nur ungenügend mit den durch die Software errechneten Vorhersagewerten für eine hohe Effizienz und Spezifität der sgRNAs übereinstimmten, wurde ausgetestet, inwiefern sich die Allelspezifität der sgRNAs mittels Sequenzverkürzungen und dem Austausch einzelner Nukleotide in der sgRNA-Sequenz verbessern ließe. Durch diesen Optimierungsprozess konnte für alle untersuchten sgRNAs eine deutliche Verbesserung der Allelspezifität erreicht werden. Modifikationen am 5'-Ende der sgRNA wurden dabei deutlich besser toleriert, als in der zur PAM-Sequenz angrenzenden „Seed“-Region. Allgemein gültige Aussagen über den Erfolg der Optimierungsansätze konnten jedoch nicht getroffen werden, da abhängig von der Ziel- und sgRNA-Sequenz jeweils unterschiedliche Veränderungen zum besten Ergebnis führten, so dass auch die sgRNAs zukünftiger Experimente lediglich mittels systematischer Modifikationen optimiert werden können.

Das Ausmaß der tatsächlich stattgefundenen Haplotypendeletionen in primären Fibroblasten-Zelllinien wurde anschließend an definierten Haplotypen der BVMD-Patientenkohorte ausgetestet.

Die Effizienzen, mit denen DSBs in der Ziel-DNA der Fibroblasten erzeugt wurden, variierten und korrelierten ebenfalls selten mit den bioinformatischen Berechnungen oder den Vorexperimenten in den HEK293T-Zellen. Für eine genaue Bestimmung der Effizienzen war daher die jeweilige experimentelle Austestung der einzelnen sgRNAs und/oder deren Kombination in den Patienten-Fibroblasten-Zelllinien erforderlich. Dabei wurde in keinem der untersuchten Fälle das wildtypische Allel vom CRISPR/Cas9-System erkannt und modifiziert, was für eine sehr gute Spezifität der optimierten sgRNAs für den mutationstragenden DNA-Strang spricht. Diese hohe Spezifität der sgRNAs stellt eine elementare Grundvoraussetzung für den möglichen zukünftigen Einsatz als Genomeditierungswerkzeug dar, da bisher noch nicht abschließend geklärt werden konnte, ob und in welchem Ausmaß das CRISPR/Cas-System auch an anderen Stellen im Genom, den sogenannten *off-targets*, eine Wirkung entfaltet. Die Möglichkeit, dass die sgRNAs nicht nur an ihre komplementäre Ziel-DNA, sondern auch anderen Stellen im Genom binden und dort ihre Aktivität entfalten können, muss deshalb in weiteren Arbeiten gründlich untersucht werden. Besonders in Hinblick auf potentiell fatale Konsequenzen müssen die *off-target*-Aktivitäten mit höchster Sensitivität identifiziert

und nach Möglichkeit reduziert werden (Dai et al. 2016). Auf die Möglichkeiten und Methoden der Detektierung solcher Stellen im Genom wird in nachfolgenden Abschnitten näher eingegangen.

Ob sich die bisher gewonnenen Ergebnisse aus HEK Zellen und Fibroblasten auf die iPSC und RPE-Zellen von Patienten übertragen lassen und ob diese synthetisch produzierten Zellen mit den tatsächlichen Eigenschaften der lebenden in situ Zellen übereinstimmen, muss in zukünftigen Projekten weiterverfolgt werden.

Der Vorteil des Haplotyp-spezifischen Ansatzes ist die Unabhängigkeit von der eigentlichen krankheitsursächlichen Mutation, so, dass nur eine überschaubare Anzahl an SNP-spezifischen sgRNAs generiert werden muss. Die kostspielige und sehr zeitaufwendige Adressierung der einzelnen Mutationen kann dadurch umgangen werden. Jedoch ist die Zahl der bisher untersuchten SNPs noch nicht ausreichend, um alle möglichen Haplotypkombinationen der BVMD-Patienten umfassen und behandeln zu können. In weiteren Schritten muss deshalb das bisher erarbeitete sgRNA-Set um weitere SNPs erweitert werden, und diese anschließend analog zur Vorgehensweise dieser Arbeit bezüglich ihrer Editingeffizienz und Allelspezifität verbessert werden.

Weiterhin zu klären, bleibt die Wahl eines adäquaten Transportvehikels für die Belieferung der Komponenten in die RPE-Zellen. Die AAV-vermittelte Belieferung gilt momentan aufgrund ihres geringen immunogenen Potentials und des reduzierten onkogenen Risikos der Genomintegration als Goldstandard in der therapeutischen Gentherapie (Samulski und Muzyczka 2014). Besonders im Hinblick auf die limitierte Transportkapazität der AAV-Vektoren von wenigen kb stellt die Belieferung der bereits an sich relativ großen spCas9 eine Herausforderung dar. In dieser Arbeit wurde versucht das Problem der limitierten Kapazität zu umgehen, indem auf die Verwendung von Cas9 Orthologen mit kleinerer Genomgröße ausgewichen wurde (Ran et al. 2015). Die Untersuchung alternativer Transportvehikel könnte als zusätzlicher Nebeneffekt der Reduktion immunogener Reaktionen dienen.

Da es sich beim CRISPR/Cas-System um Komponenten bakteriellen Ursprungs handelt, sind potentielle Immunreaktionen nicht auszuschließen (Dai et al. 2016). In Studien konnten bereits alternative Transportmittel gefunden werden, die möglicherweise ein vorteilhafteres Sicherheitsprofil aufweisen und zusätzlich die Möglichkeit bieten, die limitierte Packungskapazität von AAV-Vektoren zu umgehen (Zuris et al. 2015; Yin et al. 2016). Besonders im Hinblick auf die potentielle Anwendung in der Genomeditierung gilt es das Risiko potentieller Nebenwirkungen einer Therapie möglichst gering zu halten. Daher müssen die Vor- und Nachteile der verschiedenen Belieferungssysteme und Komponenten in folgenden

Arbeiten evaluiert werden, um das System mit bestem Sicherheitsprofil für die Patienten herauszufinden zu können. Einige dieser möglichen Alternativen, sowie die Möglichkeiten und Herausforderungen, die diese in Zukunft mit sich bringen könnten, sollen in folgenden Abschnitten vorgestellt werden.

7.1 Evaluation der sgRNAs einschließlich deren Optimierungsversuche

Für die erste Transfektionsrunde wurden für jede SNP Ausprägung sgRNAs ausgewählt, die bezüglich ihrer bioinformatisch vorhergesagten *Score-Werte* das bestmögliche Ergebnis erwarten ließen.

Es ließ sich feststellen, dass die vorhergesagte sgRNA-Qualität nur bedingt mit den experimentell ermittelten Transfektionsergebnissen korrelierte. Der größte Teil der sgRNAs wies einen deutlichen Optimierungsbedarf bezüglich ihrer Effizienz und Spezifität *in vitro* auf, trotz ursprünglich vielsprechender Vorhersagewerte der Software. SgRNAs mit vergleichbaren *on-target* Werten, wie beispielsweise der sgRNA 390-T-20mer (*on-target*-Wert 59%) und der sgRNA 581-T-20mer (60%), erreichten oft sehr unterschiedliche Ergebnisse bezüglich ihrer Effizienzen. Wies die sgRNA 390-T-20mer eine Fluoreszenzintensität von ungefähr 170% am Zielallel auf, betrug der Wert für die sgRNA 581-T-20mer 500%. in der Erkennung des Ziel-Allels. Zusätzlich bestand eine erkennbare Affinität gegenüber der Nicht-Ziel-DNA. Als Beispiele sind hier die sgRNA 581-T-20mer oder die sgRNA 429-C zu nennen.

Dementsprechend scheinen noch weitere, bisher nicht definierte Faktoren die Eigenschaften der Genomeditierung der sgRNAs zu determinieren, die von den bioinformatischen Algorithmen der verwendeten Softwares bisher nicht vollständig erfasst werden können. Möglicherweise hängt die Fähigkeit der sgRNA, DSB in der Zielsequenz zu induzieren, von der Nukleotidabfolge der DNA oder der Struktur der sgRNA Sequenzen ab (Le Cong et al., 2013). Untermuert wird diese Hypothese auch in dieser Arbeit, die erfolgreich zeigen konnte, dass durch Variationen der Nukleotidabfolge und -länge eine Änderung der sgRNA Eigenschaften herbeigeführt werden. Dies geschah im Falle aller hier untersuchten sgRNAs.

Eine Strategie, die für die Optimierung insbesondere der Spezifität angewendet wurde, war das Einführen zusätzlicher Basenabweichungen zwischen der sgRNA und der DNA-Sequenz. Naturgemäß ergab sich durch das Design der SNP-spezifischen sgRNA bereits eine Basenabweichung zum Nicht-Zielallel, da diese die alternative SNP-Variante beinhaltete.

Die Anzahl der *Mismatches* zwischen der sgRNA und dem Nicht-Zielallel wurde erhöht, indem an einigen Positionen der RNA Nukleotide der ursprünglichen Sequenz durch variable Basen ersetzt wurden. Die Intention hinter dieser Strategie war es, dadurch die Affinität der sgRNA gegenüber dem Nicht-Zielallel zu reduzieren. Basenvariationen zwischen der sgRNA und der DNA können je nach Position unterschiedliche Auswirkungen haben (Zhang et al. 2015). Im Laufe der Optimierungsrunden konnte festgestellt werden, dass künstlich eingeführte Nukleotidabweichungen am 5'-Ende der sgRNA deutlich besser toleriert wurden als am 3'-Ende. Einige Studien demonstrierten bereits, dass die PAM-proximalen Sequenzabschnitte elementar für die Bindung und Erkennung der Zielsequenz sind und somit determinierend auf die Cas-Effektivität wirken. Die genaue Lokalisation und Entfernung dieser sogenannten *Seed Region* von der PAM variiert zwischen 10- 12 Nukleotiden (Fu et al. 2013), bzw. 8-11 Nukleotiden (Jiang et al. 2013). Basenabweichungen in dieser Region haben negative Auswirkungen auf die Cas9- Aktivität und somit der Effizienz der sgRNA.

Am Beispiel der sgRNA 429-T wird dieser Effekt deutlich (**Abbildung 11**). Ein Basenaustausch in PAM-Nähe, hier an der 8. Position (sgRNA 429-T-20mer_ 8.Base_T>A; sgRNA 429-T-19mer_8.Base_T>A; sgRNA 429-T-18mer_8.Base_T>A), führten in allen Fällen zu einem vollständigen Funktionsverlust der sgRNA. Abweichungen an PAM-distalen Sequenzabschnitten hatten dahingegen weniger schwere Auswirkungen. Neben der Position der eingeführten Basenveränderung schien zusätzlich auch die Länge der modifizierten sgRNA eine Rolle zu spielen. Bei einem Austausch von A>C an 16. Stelle konnte lediglich in der 19 Nukleotid langen Version ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden, während die sgRNA mit identischer Sequenzabfolge aber einer zusätzlichen Base in ihrer Effizienz deutlich reduziert war. Noch klarere Resultate lieferte die modifizierten 18mer und 17mer sgRNAs, deren Aktivität am Zielallel beinahe auf das Niveau des Leervektors absank. Zusätzlich verschlechterte sich die Spezifität der sgRNA_429-T-18mer_16.Base_A>C gegenüber der ursprünglichen Ausgangsguide sgRNA_429-T-20mer. Umgekehrt konnten im Falle der sgRNAs für den SNP 390-T durch eine Basensubstitutionen keine Optimierung der Editierungseigenschaften erzielt werden.

Eine weitere Variable bei der Optimierung der sgRNAs stellte die Chemie der substituierten Base dar. Bei der sgRNA_429-C-20mer erzielte der Ersatz des Adenins an Position 20 durch ein Thymin eine Verbesserung der Effizienz. Zum Vergleich wurde in der gleichen sgRNA die Pyrimidinbase Adenin durch die Purinbase Cytosin substituiert. Obwohl die Affinität für das Nicht-Zielallel in beiden Fällen reduziert werden konnte, kam es bei der zweiten sgRNA 429-C-20mer_20.Base_A>C zu einem deutlichen Abfall der Effizienz. Ähnlich verhielt es sich mit der sgRNA_429-C-19mer. Wurde das Guanin an der 19. Base durch ein alternatives Purin ersetzt (sgRNA_429-C-19mer_19.Base_G>C) blieb die Effizienz am Zielallel weitestgehend

erhalten, wohingegen die Substitution mit einer Pyrimidinbase (sgRNA_429-C-19mer_19.Base_G>A) eine kaum noch messbare Affinität am Zielallel zur Folge hatte. Um die Auswirkungen der Chemie der substituierten Basen genauer zu untersuchen und zu validieren sind jedoch höhere Fallzahlen und weitere Sequenzmodifikationen nötig.

Eine weitere potentielle Möglichkeit, die Spezifität der sgRNAs zu verbessern, ist die Trunkierung der 20 Nukleotide langen Ausgangsguide um zwei bis maximal drei Basen. Ziel hier ist es, die Sensitivität der sgRNAs gegenüber Basenabweichungen zu erhöhen und dadurch die Spezifität am Zielallel zu verbessern. Aufgrund der reduzierten Gesamt-Nukleotidanzahl in der verkürzten RNA, sollten Abweichungen zur Zielsequenz eine größere Bedeutung bekommen und die sgRNA dadurch vermindert am Nicht-Zielallel binden (Fu et al. 2014; Hsu et al. 2014). Als positiver Nebeneffekt sollte die *off-target*-Bindung im restlichen Genom durch die Verkürzung ebenfalls verringert werden (Zhang et al. 2015; Fu et al. 2014). Die Effizienz an der Zielsequenz sollte dadurch nicht negativ beeinflusst werden (Fu et al. 2014).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Basenreduktionen führten abhängig von Sequenz und Länge zu unterschiedlichen Ergebnissen. Im Falle der sgRNA_429-T und der 429-C konnten beispielsweise die verkürzten Varianten zwar verbesserte Spezifitätsergebnisse aufweisen, jedoch in allen Fällen auf Kosten der Effizienzen. Im Gegensatz dazu verschlechterte sich bei der um eine Base reduzierten sgRNA_390-T-19mer die Allel- Spezifität entgegen der Erwartungen zunächst. Erst für die sgRNA_390-T-18mer konnten bessere Resultate bezüglich der Editierungseigenschaften gewonnen werden. Auffällig waren die Ergebnisse für die sgRNA_581-T. Schon die ursprüngliche 20mer Variante wies eine starke Affinität gegenüber dem Nicht-Zielallel auf. Die Verkürzung auf die sgRNA_581-T-17mer hatte eine nochmalige Verschlechterung der Ergebnisse zur Folge. Die Effizienz fiel im Vergleich zum 20mer ab, während die Cas9-Aktivität am Nicht-Zielallel zunahm.

Interessanterweise fielen die Editierungseffizienzen der 17 Nukleotide langen Versionen im Vergleich zu den 20-18mer langen Varianten auffällig häufig stark ab. Sowohl bei der sgRNA_534-C-17mer, sgRNA_390-T-17mer, sgRNA_390-C-17mer als auch bei der sgRNA_429-C-17mer wurde ein fast vollständiger Funktionsverlust beobachtet werden. War es Fu et al. 2014 möglich, für die 17mer langen sgRNAs noch ausreichende Effizienzen an der Zielsequenz zu registrieren, konnten die von Fu et al. generierten Ergebnisse in dieser Arbeit experimentell nicht reproduziert werden. Trotz des möglicherweise niedrigeren *off-target* Risikos der verkürzten Varianten, sollte daher in zukünftigen Arbeiten die Beschränkung auf sgRNAs einer Länge von maximal 18mer in Erwägung gezogen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die erfolgreichen Optimierungsmaßnahmen der sgRNAs keinem generellen Muster folgten. Von einer allgemeinen Tendenz, wie der Rolle der Nukleotidposition innerhalb der sgRNA, abgesehen, bedurfte jede sgRNA einer systematischen schrittweisen Modifikation zur Optimierung. In der Regel konnte durch Nukleotiksubstitutionen in PAM fernen Abschnitten der sgRNA eine Steigerung der Spezifität erzielt werden, während Änderungen in PAM nahen Regionen zu einem Funktionalitätsverlust führten. Um die Effizienz möglichst wenig zu beeinträchtigen, erwies es sich als sinnvoll, lediglich Nukleotide ähnlicher chemischer Struktur gegeneinander auszutauschen und nicht Pyrimidinbasen mit Purinbasen zu substituieren oder umgekehrt. Die Verkürzungen der sgRNAs führten in den meisten Fällen ebenfalls zu einer Verbesserung der Spezifität, wenn auch in geringerem Ausmaß als bei den Nukleotidsubstitutionen. Im Gegensatz zu letztgenanntem blieb die Effizienz jedoch meist erhalten. Jedoch gelang dies häufig nur bis zu einer Länge von 18 Nukleotiden, während weitere Verkürzungen zu einem Funktionsverlust führten. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Spaltungsaktivität des Cas-Proteins in der Realität nicht nur von der Sequenzlänge und der individuellen Nukleotidabfolge beeinflusst wird, sondern auch von Chromatin-, DNA- Methylierungs- und RNA-Strukturen sowie möglicher weiterer Faktoren, was die Vorhersage der Editingigenschaften der einzelnen sgRNAs erschwert (Le Cong et al. 2013).

Konnte keine der analysierten sgRNA experimentell eine gute Allelspezifität aufweisen, wie zum Beispiel im Falle der sgRNA 581-T, kann zusätzlich auf alternative bioinformatisch konzipierte sgRNAs zurückgegriffen werden, da in der überwiegenden Anzahl der Fälle mehrere potentielle sgRNAs durch die die Algorithmen vorgeschlagen werden. Ergänzend dazu besteht die Möglichkeit, andere PAMs zu verwenden, um das Feld möglicher sgRNAs zu erweitern.

7.2 Evaluation von Fibroblastentransfektionen

Für die zweite Transfektionsrunde wurden sgRNAs herangezogen, die in der vorherigen HEK-Transfektionsreihe die vielversprechendsten Ergebnisse lieferten. Diese waren die sgRNA 429-T-19mer_16.Base_A>C und sgRNA 429-C-19mer_19.Base_G>C für den SNP 429, sgRNA 534-C-18mer für den SNP 534-C, sgRNA 581-G-17mer für den SNP 581G, sgRNA 749-A-17mer für den SNP 749-A, sowie sgRNA 756-C-17mer für den SNP 756-C. Die ausgewählten sgRNAs sollten nun in einem anschließenden Schritt in Fibroblasten-Zelllinien von BVMD-Patienten transfiziert werden. Eine Evaluation erfolgte anhand der Untersuchung

der Genome positiv transfizierter und somit CRISPR und sgRNA tragender M. Best Patienten Fibroblasten. Vorhandensein und Lokalisation von Insertionen/Deletionen ließen Rückschlüsse auf Effizienz und Spezifität des CRISPR/Cas9-Systems zu.

Als positiv bewertet werden kann die über alle Transfektionen hinweg sehr gute Allelspezifität der getesteten sgRNAs. Bei keinem der Wildtyp-Allele konnte bei der Auswertung CRISPR/Cas9-induzierte Indel-Mutationen beobachtet werden. Besonders im Hinblick auf eine mögliche zukünftige Anwendung des CRISPR/Cas-Systems als Genomeditierungstool, ist diese Erkenntnis eine elementare Grundvoraussetzung und daher mit größter Sorgfalt zu testen.

Ähnlich wie bei ersten Versuchsreihen mit HEK293T-Zellen war es jedoch auch bei den Fibroblasten nur schwer möglich, allgemeingültige Muster auszumachen, die eine verlässliche Prädiktion der Editierungseffizienz gewährleisten würden. Die Ergebnisse der HEK-Transfektionen erwiesen sich als prognostisch nur sehr unzuverlässiger Parameter für die Vorhersage der Resultate der Fibroblastentransfektionen, da sie nur in geringem Maße mit den tatsächlichen in vitro Effizienzen korrelierten. Waren sich die optimierten sgRNAs für die SNPs 429-T, 429-C und die des SNPs 534-C in ihren Editingseigenschaften in HEK-Zellen beispielsweise noch sehr ähnlich, kam es bei der Transfektion in Fibroblastenzellen im Falle der sgRNAs für den SNP 429 jedoch zu einer deutlichen Reduktion der Effizienz auf 8% im Falle der sgRNA 429-C 19mer_16.Base_G>C bzw. 12% bei der sgRNA 429-T_19mer_16.Base_A>C. Währenddessen lieferte die Transfektion der sgRNA 534-C-17mer in Fibroblasten vergleichbar hohe Effizienzwerte von knapp 91%. Somit sind für die nur schlecht vorhersehbaren Ergebnisse zusätzlich zu den in 7.1 aufgeführten Punkten möglicherweise noch weitere, bisher unbekannte Faktoren ursächlich. Dazu gehört möglicherweise die Art des Gewebes, aus dem die editierten Zellen stammen, die mit unterschiedlichen Zellreparaturkapazitäten einhergehen könnten, sowie dem Stadium, in dem sich die Zelle in der Zellteilung befindet (Mout et al., 2017).

7.3 Evaluation des Haplotyp- spezifischen Ansatzes

Bis heute sind mehr als 250 verschiedene pathologische Mutationen im BEST1-Gen bekannt. Verfolgte man den Ansatz, diese einzeln mittels CRISPR/Cas9 zu adressieren, so wäre dies sowohl eine kostspielige, aber auch sehr zeitaufwendige Herangehensweise. Angesichts dessen scheint die hier verwendete Haplotypen-Targetierung eine sinnvolle therapeutische Alternative. Diese Möglichkeit ist unabhängig von der eigentlichen krankheitsursächlichen Mutation und bringt den Vorteil mit sich, nur eine überschaubare Anzahl an SNP-spezifischen

sgRNAs generieren zu müssen. Mithilfe der 22 in dieser Arbeit ausgewählten SNPs, die eine Frequenz von >5% in der europäischen Bevölkerung aufweisen, ist es theoretisch möglich, bereits 9 der 13 Patienten aus der gewählten Patientenkohorte zu behandeln. Auf die in Europa lebende Anzahl an M. Best Erkrankter übertragen, könnte man auf diesem Wege statistisch bereits etwa 70% der Patienten eine Behandlungsoption anbieten.

So sinnvoll dieser Ansatz erscheint, so wird er doch durch einige Faktoren limitiert. Voraussetzung für den Haplotyp-spezifischen Ansatz ist die zweifelsfreie Identifikation des Mutations-tragenden Haplotypen. Dafür wurden in vorherigen Arbeiten DNA Fragmente kloniert und sequenziert, welche sowohl den Mutationsort als auch einen nächstgelegenen SNP beinhalten müssen. In Fällen, in denen kein der Mutation angrenzender SNP vorhanden ist, wäre diese Methode der Bestimmung keine Option und es bleibt nur der Rückschluss über eine Sequenzierung Verwandter ersten Grades. Besonders bei Erkrankungen, die sich erst im hohen Lebensalter manifestieren und die Eltern Betroffener bereits verstorben sind, kann dies ein Problem darstellen.

Eine alternative Möglichkeit bestünde zusätzlich durch die Sequenzierung großer zusammenhängender DNA-Sequenzen einer Länge von etwa 10-15 kb, evtl. mittels BioPAC, um den Haplotyp direkt in der Patienten-DNA zu bestimmen.

Zusätzlich besteht bei Patienten mit seltenen Varianten die Problematik der Identifikation der Haplotypen, da aufgrund bisher nicht ausreichender Fallzahlen des 1000 Genom Projekts, verwendete Softwares lediglich eine Zuordnung zu den häufigen europäischen Varianten gewährleisten können. Diese Zuordnung ist jedoch die Voraussetzung für die Auswahl geeigneter SNPs, die der Adressierung durch den CRISPR/Cas-Komplex dienen.

Bei einigen Patienten, die Träger homozygoter Haplotypenkonstellationen sind, besteht selbst nach erfolgter Identifikation von Haplotyp- und Mutationslokalisierung die Schwierigkeit der Unterscheidung zwischen dem mutanten und nicht-mutanten Allel. Bei einem homozygoten Haplotypen sind die SNPs auf beiden Strängen identisch und eine Differenzierung über spezielle sgRNAs kann nicht erfolgen. Ein Knockout des mutationsassoziierten Haplotypen kann in solchen Fällen dementsprechend nicht stattfinden. Davon betroffen sind beispielsweise die Mutter des Patienten JS (zweimal Haplotyp H1) und des Patienten CH (zweimal Haplotyp H3) (siehe auch **Abbildung 5**).

Für die M. Best Genregion konnten 22 SNPs identifiziert werden, die für den Haplotyp-spezifischen-Ansatz als geeignet schienen. Von diesen wurden im Laufe dieser und vorheriger Arbeiten bereits sechs SNPs analysiert und sgRNAs für jeweils beide Allelausprägungen konzipiert und optimiert. Jedoch ist diese Anzahl noch nicht ausreichend, um alle möglichen

Haplotypkombinationen bei den M. Best Patienten umfassen zu können. Zu diesem Zweck muss das bisher erarbeitete sgRNA Set um zusätzliche SNPs erweitert werden, und diese anschließend hinsichtlich ihrer Editingeffizienz und Allelspezifität verbessert werden.

Die Transfektion in Patienten-Fibroblasten stellt einen wichtigen Schritt für weitere in vivo Experimente dar. Jedoch konnten aufgrund des zeitlich begrenzten Rahmens nicht alle optimierten sgRNAs in primären Patienten-Zellen ausgetestet werden. Die Fortführung der Experimente, sowie die Ermittlung potentieller genomweiter Off- Targets sind für die weitere Beurteilung der Effektivität des Haplotyp- spezifischen Ansatzes von Bedeutung.

7.4 Ausblick und weiterführende Aspekte

7.4.1 Identifikation von *Off- Targets*

Trotz der Erfolge in der Entwicklung der CRISPR/Cas-Technologie, müssen noch einige Herausforderungen bis zur klinischen Anwendung in der Gentherapie überwunden werden. Dazu gehören unter anderem die Ermittlung potentieller, genomweiter *off-target* Effekte. Als *off-target* Effekte werden die Erkennung und Bindung sowie die Editierung von Sequenzen im Genom bezeichnet, die nicht der Zielsequenz entsprechen (Dai et al. 2016). Die Detektion solcher Stellen muss mit höchster Sensitivität erfolgen, um unkontrollierbare und unvorhersehbare Konsequenzen, wie maligne Transformationen, beispielsweise durch Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen, zu verhindern (Dai et al. 2016). In Anbetracht dessen, dass die sgRNAs bis zu fünf Nukleotidabweichungen zur Ursprungssequenz tolerieren können (Fu et al. 2013), erscheint diese Maßnahme sinnvoll. Dafür muss ein Vergleich zwischen der Anzahl an DSB in den behandelten sowie in den unbehandelten Zellen stattfinden. Wie bereits an anderer Stelle in dieser Arbeit beschrieben, hängt die Frequenz von *off-target* Mutationen maßgeblich davon ab, inwieweit sich die Ziel-Sequenz von anderen Sequenzen im Genom unterscheidet. Je größer der Unterschied zwischen der gewählten Ziel-Sequenz und restlichen Genomsequenzen ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit ungewünschter Mutationen (Tsai et al. 2015; Kim und Kim 2018; Kim et al. 2019).

Bioinformatische Vorhersagemodelle basieren auf Sequenzhomologien zwischen der verwendeten sgRNA und potentiellen *off-targets*. Mittlerweile existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Vorhersagetools zur in silico Prädiktion der Spezifität. Tsai et al. und Cameron et al. demonstrierten, dass die Voraussagealgorithmen wie beispielsweise die E-

CRISP Software (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>), CCTop (<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>) und Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/casoffinder/>) nur in einem kleinen Teil der Fälle valide Vorhersagen über im Nachhinein experimentell entstandene *off-target* Mutationen treffen konnten (Tsai et al. 2015). Diese Studien heben die Herausforderungen hervor, die bis zur Entwicklung eines effizienten *in silico* Vorhersagealgorithmus überwunden werden müssen.

Die Methoden einer genomweiten Identifikation potentieller *off-targets* können in drei Kategorien eingeteilt werden: *in vitro* (Kim und Kim 2018; Kim et al. 2015; Tsai et al. 2017; Lazzarotto et al. 2020), eines auf Zellkulturen beruhenden *in cellulo* Systems (Tsai et al. 2015) sowie einer *in vivo* Detektierung.

In vitro Methoden basieren auf einer Bearbeitung der aus Patienten isolierten genomischer DNA und Inkubation mit der entsprechenden Nuklease. Der Nachweis einer DNA-Bearbeitung findet in der Regel mittels Next-Generation-Sequencing (NGS) statt. Die *in vitro* Ansätze liefern sehr sensitive Ergebnisse und bieten zusätzlich die Möglichkeit, den Einfluss des Patientenspezifischen Genotypen miteinzubeziehen. Nichtsdestotrotz fehlt ihnen häufig der zelluläre und gewebespezifische Kontext, in dem sich die Zelle befindet, wie beispielsweise der Zustand im Zellzyklus und der Chromatinstatus (Liang et al. 2022). Insbesondere letztgenannter gilt als wichtiger Einflussfaktor auf die Cas9-Aktivität. Eine Genomregion mit einer offenen-Chromatinstruktur ist mit höherer Wahrscheinlichkeit einer Mutation durch die Cas9 Nuklease ausgesetzt, als die gleiche Sequenz mit einer geschlossenen Chromatinstruktur (Singh et al. 2015). Der Effekt der DNA-Zugänglichkeit macht sich dabei weniger an der Zielsequenz und mehr an *off-targets* bemerkbar (Kim und Kim 2018).

Da der Chromatinstatus sowohl Gewebe-, als auch Zelltyp abhängig ist, wird vermutet, dass die *off-target* Aktivität einer Nuklease kontextabhängig ist (Kim et al. 2019). Eine Berücksichtigung dieser Information könnte in Zukunft eine Verbesserung der bioinformatischen Vorhersagegenauigkeit bewirken (Singh et al. 2015).

Diese Limitierungen adressierend, findet bei den *in cellulo* Methoden eine direkte Untersuchung der genomischen Information in den Zellen statt, welche durch eine Nuklease bearbeitet wurden (Liang et al. 2022).

Die genaueste Untersuchungsmethode würde eine Sequenzierung des gesamten Genoms darstellen. Für eine hohe Zahl an untersuchten Genomen stellt dies jedoch eine sehr kostspielige und aufwendige Option dar und ist somit nicht geeignet, um die Mutageneseraten in allen Zelltypen und Geweben zu evaluieren (Kim et al. 2019). Für diesen Zweck könnte die 2015 von Tsai et al. entwickelte GUIDE-seq-Methode herangezogen werden. Diese Technologie stellt aktuell die am häufigsten eingesetzte *in cellulo* Methode dar, um die *off-*

target Aktivität vorherzusagen (Kim et al. 2019; Tsai et al. 2015). Im Vergleich zu vorherigen Methoden der in *cellulo* off-target Erkennung, wie der Chromatin Immunoprecipitations Sequenzierung (ChIP-seq) oder Computer gestützten Prädiktionsprogrammen, liefert die GUIDE-seq Methode deutlich sensitivere Ergebnisse (Tsai et al. 2015). In einem ersten Schritt werden dabei DSB durch eine Integration von doppelsträngigen Oligo-Deoxyribonukleinsäuren (dsODN) gekennzeichnet. Durch Amplifikation dieser dsODN und Next-Generation- Sequencing (NGS) können die Sequenzabschnitte durch das GUIDE-seq Data Analyse Programm (<https://github.com/aryeelab/guideseq>) analysiert und ausgewertet werden. Auf diesem Weg können *off-target* Mutagenesen bis zu einer Frequenz von 0,12% detektiert werden (Zhang et al. 2015).

In vivo Untersuchungen basierten bisher meist auf einer indirekten Identifikation potentieller *off-target* Stellen in zwei separaten Einzelschritten. In einem ersten Schritt können durch eine in vitro Methode wie beispielsweise das CIRCLE-seq Verfahren (Tsai et al. 2017) potentielle *off-target* Sequenzen ausgemacht und im Anschluss in einem zweiten Schritt per Amplicon Deep Sequencing auf InDel Mutationen untersucht werden (Verifizierung von in vivo-targets, VIVO) (Akcakaya et al. 2018).

Die Möglichkeit einer direkten Detektion einer Nuklease-DNA Interaktion in nur einem Schritt, besteht in der erst kürzlich entwickelten Methode des DISCOVER-seq (Discovery of in situ Cas *off-targets* and verification by sequencing) (Wienert et al. 2019). Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Messung von DNA-Reparaturfaktoren, welche induziert durch den DSB zur defekten DNA dirigiert werden. Durch eine Chromatin Immunoprecipitation (ChIP-seq basiert) können die Reparaturfaktoren ausgemacht und im Anschluss mittels NGS untersucht werden. Auf diesem Weg konnten InDels an *off-targets* mit einer Frequenz von 0,3% detektiert werden (Wienert et al. 2019).

In vitro Verfahren wie das CIRCLE-seq (Tsai et al. 2017) oder GUIDE-seq (Tsai et al. 2015) gelten zum jetzigen Stand zwar als sensitivste Identifikationsmethode und können somit seltenere *off-target* Mutagenesen ausmachen. Dies geschieht jedoch auf häufig auf Kosten der Spezifität mit tausenden falsch-positiven Ergebnissen (Liang et al. 2022). Die Methode des DISCOVER-seq vereint eine hohe Sensitivität, wie bei in vitro und in *cellulo* Strategien, mit einer hohen Spezifität.

Zu den Herausforderungen des CRISPR/Cas-Systems gehört neben der beschriebenen zuverlässigen Identifikation von *off-targets*, die effiziente Reduktion der Anzahl derartiger unerwünschter Mutationsereignisse im Genom.

Mittlerweile existiert eine Vielzahl potentieller Strategien zur Erhöhung der Spezifität, wie beispielsweise die Verwendung von Cas9-Nickase Varianten (Ran et al. 2013a; Shen et al. 2014; Trevino und Zhang 2014).

Durch eine gezielte Veränderung der katalytisch aktiven Nukleasedomäne der SpCas9 verursachen die Nickasen SSB (single stranded breaks, Einzelstrangbrüche) statt DSB (Shen et al. 2014). Dadurch sind sie von der Co-Lokalisation einer zweiten Nickase am gegensätzlichen Strang abhängig. Durch die Induktion zweier separater SSB können die beiden Nickasen einen DSB verursachen (Ran et al. 2013a). Die Voraussetzungen, die ein Genomabschnitt für die Bindung der beiden Nickasen an die Ziel-DNA erfüllen muss, sind dadurch deutlich höher als beim Einsatz der monomeren sgRNA, was in einer Erhöhung der Spezifität resultiert (Tsai et al. 2014).

Ein Problem bei dieser Methode stellte bisher jedoch einerseits die geringe Editierungseffizienz dar. Durch die Lokalisation des SNPs ist das Design der Nickasen an eine feste Sequenz gebunden und dadurch in vielen Fällen nicht möglich.

Andererseits besteht ein Nachteil dadurch, dass die beiden Nickasen auch als Monomere enzymatisch aktiv sind und somit die Gefahr mutagener Veränderungen an *off-targets* im Genom besteht (Wyvekens et al. 2015). Es wurde beschrieben, dass eine Genomeditierung sogar dann resultieren kann, auch wenn sich die beiden Komponenten bis zu 100 bp entfernt voneinander befinden. Die statistische Wahrscheinlichkeit potentieller *off-targets* ist daher nicht zu vernachlässigen (Guilinger et al. 2014).

Basierend auf dieser Überlegung entwickelten einige Studiengruppen (Guilinger et al. 2014; Tsai et al. 2014) einen Ansatz, der auf einer Dimerisation und nicht auf einer co-Lokalisation beruht. Sie nutzten eine dimerische RNA-vermittelte FokI Nuklease (RFN). Im Gegensatz zur Wildtyp Cas9 und den Nickasen ist die dCas9 im monomeren Zustand katalytisch inaktiv und entfaltet ihre katalytische Aktivität erst im dimeren Zustand als Komplex mit einem zweiten RFN-Komplex. Dieser muss dafür in genau definiertem Abstand voneinander und Orientierung zueinander an die Ziel-DNA binden.

Analog zum klassischen CRISPR/Cas9 Modell kann dieser Ansatz ebenfalls kombiniert werden mit einer Trunkierung der gRNAs zur weiteren Erhöhung der Spezifität (Wyvekens et al. 2015).

Mit einer erhöhten Konzentration der Komponenten des CRISPR/Cas9-Komplexes ist eine vermehrte Bindung sowohl an Ziel-Sequenzen, als auch an *off-targets* beschrieben. Eine weitere Möglichkeit, das Risiko unerwünschter DNA-Brüche zu senken, stellt daher die Überlegung dar, die Konzentration der sgRNAs und der Cas9 zu reduzieren (Hsu et al. 2013;

Zetsche et al. 2015b). Allerdings erfolgt die Reduktion von *off-targets* meist deutlich auf Kosten der Effizienz an der Zielsequenz (Fu et al. 2013; Zhang et al. 2015).

Ein Schwachpunkt der CRISPR/Cas-Technologie zum jetzigen Zeitpunkt besteht darin, dass regulative Elemente, welche die CRISPR/Cas9-Aktivität nach erfolgter Belieferung in die Zellen steuern können, kaum erforscht sind. Es wird angenommen, dass mit zunehmender Expositionsdauer der DNA mit dem CRISPR/Cas9-sgRNA Komplex die Wahrscheinlichkeit einer Mutagenese auch an *off-target*-Sequenzen zunimmt. Ein Ansatz stellt daher eine lediglich vorübergehende Belieferung der CRISPR/Cas9-Komponenten dar.

Eine nachweisliche Verbesserung der Spezifität brachten in Studien unter anderem eine Limitierung der Nuklease-Aktivität und -Expression z.B. durch die Einführung zusätzlicher Regulationsdomänen, mutierter hochspezifische Cas9-Varianten oder der Verwendung eines Ribonucleoprotein (RNP) Komplexes als Transportmedium (Kleinstiver et al. 2016). Letztgenannter weist im Vergleich z.B. mit der Plasmid-vermittelten Belieferung eine geringere Stabilität auf und verbleibt daher für einen kürzeren Zeitraum in den Zellen (Marino et al. 2020). Obwohl die genannten Strategien eine nachweisliche Verbesserung der Spezifität zeigten, sind diese durch entscheidende Limitationen gekennzeichnet: Regulatorische Domänen und häufig zusätzliche benötigte Liganden können die Größe der Cas9 signifikant erhöhen und damit die Transportmöglichkeiten weiter einschränken (Naeem et al. 2020). Hochspezifische Cas9 Varianten präsentierten in vielen Studien erfolgversprechende Ergebnisse. Jedoch ist die Produktion und das Design für die einzelnen Cas Orthologe sehr zeit- und arbeitsintensiv und für eine Produktion in großem Maße nur bedingt geeignet.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Entwicklung einer photoinduzierbaren Aktivität der Cas9. Über den Einsatz von Licht kann die Aktivität der Nuklease dabei gezielt optogenetisch induziert und gesteuert werden (Nihongaki et al. 2015).

Eine relativ neue Entdeckung stellen sogenannte anti-CRISPR Proteine dar. Diese sind ursprünglich Teil des natürlichen Abwehrsystems der Phagen zur Inaktivierung des CRISPR/Cas-Systems und könnten in Zukunft als nützliches Genomeditierungstool dienen. Im Sinne eines Ausschaltknopfes könnte eine zeitliche Limitierung der CRISPR/Cas9-Aktivität nach erfolgter Bearbeitung der Ziel-DNA gewährleistet werden und somit die ungewollte Bearbeitung der DNA an *off-targets* reduzieren (Maxwell 2017). Ziel aktueller Forschung stellt daher die Kontrolle der anti-CRISPR Proteine für einen Einsatz in der therapeutischen Gentherapie dar. Durch chemische Modulation könnte beispielsweise die Aktivität der anti-CRISPR Proteine gezielt gesteuert werden (Song et al. 2022; Shin et al. 2017). Bei allen o.g. Entwicklungen handelt es sich jedoch um erst kürzlich entdeckte und entwickelte Systeme.

Somit sind weitere Studien nötig, um die Wirksamkeit für eine Anwendung *in situ* in unterschiedlichen Zellarten und Tiermodellen belegen zu können.

Der in dieser Arbeit verwendete Ansatz basiert auf der Induktion von DSB. Vor allem diese sind eine Schwachstelle bei der Entstehung unerwünschter Nebenwirkungen, da mit der Reparatur der DSB Translokationen oder Mutagenesen einhergehen können. Diese können eine Aktivierung des p53-Systems oder eine Induktion der Zellapoptose hervorrufen (Haapaniemi et al. 2018). Ein Forschungsschwerpunkt stellt daher die Entwicklung alternativer Systeme dar, welche von DNA-Reparaturwegen unabhängig sind wie beispielsweise die neue Genbearbeitungstechnologie des *base editings*. Bei dieser Methode werden Cas9-Nickasen verwendet, welche an Deaminasen gekoppelt werden. Diese können in der Ziel-DNA gezielte Basenkonversionen von Adenin zu Guanin sowie Cytosin zu Thymin und umgekehrt durchführen (Komor et al. 2016). Speziell im Vergleich zur HDR Methode konnte eine Genomeditierung mit hoher Effizienz durchgeführt werden (Naeem et al. 2020). Diese Technologie konnte v.a. der Bearbeitung sich nicht-teilender Zellen, eine signifikante Steigerung der Effizienz im Vergleich zu herkömmlichen Cas-Nukleasen bringen. Die Wirksamkeit bisher verwendeter Cas9-Nukleasen beruht auf endogenen DNA-Reparaturmechanismen, welche in postmitotischen Zellen in nur geringem Ausmaß vonstattengehen (Naeem et al. 2020).

BEAM-101, ein im November 2021 durch die FDA zugelassenes Gentherapeutikum für die Behandlung der Sichelzellerkrankung, basiert auf einer base editing vermittelten Reaktivierung der Expression fetalen Hämoglobins (HbF). Über eine Erhöhung funktionalen HbFs soll die Auswirkung des defekten β -Hämoglobins kompensiert werden und Symptome der Sichelzellerkrankung abgemildert werden.

Für die definitive Korrektur der für die Sichelzellerkrankung ursächlichen Mutation im HBB-Gen, welche in den meisten Fällen durch eine Punktmutation von Thymin zu Adenin verursacht wird, kann diese Methode jedoch beispielsweise nicht verwendet werden (Anzalone et al. 2019).

Eine weitere Alternative stellt daher das prime editing dar (Anzalone et al. 2019). Bei dieser Methode können mit hoher Präzision gezielt Insertionen, Deletionen sowie Basenkonversionen durchgeführt werden. Ebenso wie beim base editing müssen dafür weder DSB durchgeführt werden noch externe DNA-Vorlagen für den HDR in die Zellen eingeführt werden. Im Vergleich zum base editing können bei dieser Methode alle 12 Basenkonversionen durchgeführt werden.

Das prime editing macht sich eine deaktivierte Cas9 (dCas9) zu Nutze, welche mittels einer RNA einen spezifischen DNA-Abschnitt zwar binden aber nicht schneiden kann. Die dCas9 wird als Fusionsprotein in Kombination mit einer Reversen Transkriptase verwendet. Als dritte Komponente wird eine pegRNA (prime editing guide RNA) benötigt. Diese enthält zum einen eine RNA-Sequenz, ähnlich eines Primers, welche als Vorlage zur gewünschten Veränderung der DNA-Sequenz dient. Zum anderen enthält sie die crRNA-repeat-Sequenz, welche die Bindung der Cas9 an die Ziel-DNA bindende RNA-Sequenz vermittelt (Anzalone et al. 2019). Diese Methode wurde in Studien erfolgreich eingesetzt, um in menschlichen Zellen die genetische Ursache der Tay-Sachs Erkrankung (durch eine Deletion der für die Erkrankung ursächlichen Basenduplikatur im HEXA Gen) sowie der genetischen Korrektur der zystischen Fibrose (durch eine gezielte Insertion von drei fehlenden Basen im CFTR(Δ F508) Gen) zu korrigieren (Anzalone et al. 2019). Ebenfalls positive Ergebnisse zeigte das prime editing bei einem Therapieansatz der Alzheimer Erkrankung sowie der DMD (Rousseau et al. 2020). Das Risikoprofil bezüglich der Entstehung von off-target Mutationen sowie der Frequenz von InDel Mutationen, welche durch den Genknockout entstehen, ist dabei im Vergleich zu bisherigen Methoden deutlich verbessert. Die Effizienz wird dabei im Vergleich zum base editing als vergleichbar bis höherer beschrieben (Anzalone et al. 2019).

Einen Vorteil, den sich das base editing sowie das prime editing zu Nutze machen, ist die Möglichkeit, an gewünschten DNA-Sequenzen Stopcodons zu generieren und dadurch ein gezieltes Genknockout entstehen zu lassen (Billon et al. 2017).

Eine bereits beschriebene Limitation der CRISPR/Cas9-Editierung stellt die Abhängigkeit von einer PAM-Sequenz dar. Ein Lösungsansatz dieses Problems könnte in Zukunft das *prime editing* darstellen. Falls kein passendes PAM-Motiv vorhanden ist, könnte durch einen gezielten Basenaustausch eine Wunsch-Sequenz, z.B. eine PAM-Sequenz generiert werden und dadurch eine Genomeditierung möglich machen (Rousseau et al. 2020). Studien konnten bereits eine grundsätzliche Umsetzbarkeit der neuen Editierungswerkzeuge zeigen.

Nennenswert in diesem Zusammenhang sind jedoch die oft nur geringen und wechselnden Editierungseffizienzen (Geurts et al. 2020; Rousseau et al. 2020). Um einen ausreichenden therapeutischen Effekt in situ erwarten zu können, sind nach bisherigem Wissensstand deutlich höhere Effizienzen nötig. Die Einflussfaktoren auf die Effizienzen ist aufgrund der erst kürzlichen Entdeckung der Technologien bis zum heutigen Zeitpunkt weitestgehend unbekannt. Analog zu den Optimierungsversuchen der sgRNAs bei der klassischen CRISPR/Cas9-Methode müssen daher auch beim *prime editing* und beim *base editing* weitere Testungen zur Verbesserung der Effizienz und Spezifität stattfinden (Rousseau et al. 2020; Li et al. 2018b; Kim et al. 2017). Daher werden weitere Studien in vitro und in vivo benötigt, um

das Potential in verschiedenen Zellarten und Tiermodellen vor einer Anwendung als mögliches Therapeutikum einschätzen zu können (Wang et al. 2022).

Eine weitere Methode der Optimierung stellt die Verwendung alternativer Cas Varianten dar. Als geeignete Werkzeuge der humanen Genomeditierung stellten sich neben den bereits beschriebenen Varianten v.a. CRISPR/Cas-Systeme des Typs V, beispielsweise die Cas12a (Cfp1) (Zetsche et al. 2015a) oder der Cas12b (Strecker et al. 2019) heraus. Studien zeigten, dass diese in in vitro Experimenten eine deutlich höhere Spezifität im Vergleich zu den herkömmlichen Cas9 Varianten aufweisen (Strecker et al. 2019). Als Nebeneffekt können diese, im Vergleich zu der am häufigsten verwendeten Cas9, ihre eigene RNA prozessieren und benötigen daher keine tracrRNA. Dies sorgt für eine kleinere und unkomplizierter zu transportierenden Gengröße. Die Cas12b aus *Bacillus hisashii*, eines Cas-Proteins der Typ V CRISPR-Effektoren, ist beispielsweise mit 1108 Aminosäuren deutlich kleiner als die SpCas9 (1368 Aminosäuren) und kann dadurch besonders in viralen Vektoren, wie den AAV, besser transportiert werden. V.a. bei der Multiplex Genomeditierung stellt dies einen zusätzlichen Nutzen dar, da ein Vektor mehrere crRNAs transportieren könnte (Yan et al. 2019). Diese Orthologe könnten daher in Zukunft das Spektrum geeigneter Cas Varianten zusätzlich erweitern.

Der Effekt der kristallinen Struktur der Cas9 auf die Spezifität ist noch weitestgehend unerforscht. Slaymaker et al. konnten demonstrieren, dass sich zwischen der HNH, der RuvC und der mit der PAM interagierenden Domäne der SpCas9 eine positiv geladene Furche befindet. Von dieser wird vermutet, dass sie eine Rolle in der Stabilisierung der Strangteilung durch die Helikase spielt (Slaymaker et al. 2016). Es gelang ihnen durch eine Neutralisierung dieser positiven Ladung, eine instabilere Bindung zwischen sgRNA und DNA an off-targets herbeizuführen. Da die Watson-Crick Basenpaarungen zwischen der sgRNA und dem Ziel DNA-Strang eine höhere Komplementarität aufweisen, soll die Nuklease Aktivität nur an off-target Sequenzen reduziert werden, die on-target Aktivität jedoch unbeeinträchtigt bleiben (Slaymaker et al. 2016). Diese Strategie könnte in zukünftigen Studien auch auf andere Cas9 Orthologe wie z.B. *Staphylokokkus aureus* angewendet werden.

7.4.2 Belieferung der CRISPR/Cas9-Komponenten

Trotz des enormen Potentials der CRISPR/Cas9-Editierung bleibt eine der größten Hürden einer therapeutischen Anwendung die erfolgreiche und gefahrlose Belieferung der Technologie in die Ziel-Zellen.

Generell kann die Cas9 sowohl ex vivo als auch in vivo in Form dreier Applikationsformen eingesetzt werden: als DNA, mRNA oder als Protein (Yip 2020). Alle Belieferungsstrategien weisen Vorteile und Nachteile bezüglich Effektivität der Belieferung und Nebenwirkungsprofil auf. Die einfachste Möglichkeit besteht im direkten Einsatz des nativen Cas9-Proteins zusammen mit der sgRNA, als sogenannter RNP (Ribonukleoprotein)-Komplex (Yip 2020). Vorteilhaft bei dieser Methode ist die Tatsache, dass keine Transkription oder Translation in der Zelle stattfinden muss. Studien konnten ein vermindertes Auftreten von off-target Effekten sowie eine verminderte Toxizität nachweisen. Dies beruht u.a. auf der kurzen Persistenz des Komplexes in den Zellen und dadurch eines relativ kurzen Zeitfensters der Genomedition (Bykonya et al. 2022). Einer Studiengruppe gelang es, über eine RNP-vermittelte Belieferung des saCas9-Komplexes eine erfolgreiche Korrektur der pathogenen RS1 Mutation der X-linked Juvenile Retinoschisis ohne detektierbare off-target Effekte durchzuführen (Wang et al. 2019b). Eine alternative Option stellt die Verwendung von Cas9 mRNA zusammen mit der sgRNA dar. Da bei der Cas9 mRNA keine nukleare Transkription stattfinden muss, kommt es zu einem unmittelbaren Wirkungseintritt, analog zu der Verwendung der RNPs (Yip 2020). Die Expression des Cas9 Proteins findet aufgrund der instabilen Cas9-mRNA und ihrer Anfälligkeit für RNAasen nur vorübergehend statt. In der Theorie soll dies mit einer reduzierten Anzahl an off-target Mutationen einhergehen (Li et al. 2018a). Andererseits kann eine kurze Expression auch zu erniedrigten Effizienzen führen und die strukturelle Instabilität der mRNA Schwierigkeiten bei der Belieferung hervorrufen (Liang et al. 2015). Aktuell wird diese Belieferungsstrategie daher v.a. bei der Bearbeitung von Zellen in vitro angewendet.

Die dritte Option der Cas9 Belieferung stellt der Plasmid-basierte Transport dar. Vorteilhaft hierbei sind v.a. die einfache Synthese sowie die verhältnismäßig geringen Produktionskosten (Yip 2020). Sowohl Cas9 als auch die sgRNA Kasette, können gegebenenfalls zusammen mit der HDR-Vorlage im selben Plasmid verpackt werden. Plasmide weisen eine höhere Stabilität als das native Protein und die mRNA auf. Die große genetische Größe der Cas9 (mit ~ 4.5 kb) und die totalen Plasmidgröße von >7kb erschweren jedoch die Belieferung und die

Expression. Für die Transkription der DNA ist zusätzlich ein Transport in den Nukleus nötig, was partiell die Genomeditierungseffizienz reduzieren kann und im Vergleich zur direkten Belieferung der mRNA oder des Proteins zu einem zeitlich verzögerten Wirkungseintritt führt (Yip 2020). Durch die lang andauernde Expression des Cas9-Proteins besteht die Gefahr vermehrter off-target Effekte sowie der Entwicklung von unerwünschten Immunreaktionen (Liang et al. 2015). Ein nicht zu vernachlässigender Punkt stellt zusätzlich das Risiko einer potentiellen Genomintegration des Plasmids in die Ziel-DNA dar (Hughes et al. 2009; Li et al. 2018a).

Generell kann der Transport in die Zellen als ex vivo oder in vivo Applikation stattfinden. Aufgrund der einfacheren Handhabung und der Möglichkeit einer Vorselektion erfolgreich bearbeiteter Zellen, wurde in der Vergangenheit häufig eine ex vivo Genomeditierung durchgeführt (Yip 2020).

Beliebte und häufig eingesetzte Methoden beruhen bisher meist auf einer physikalischen oder viralen Belieferung des CRISPR/Cas9-Systems. Physikalische Methoden wie Elektroporation oder Mikroinjektion wurden bereits erfolgreich in der Genomeditierung eingesetzt (Wang et al. 2017). Eine Reduktion der Zellviabilität sowie Schwierigkeiten, diese in vivo anzuwenden, stellten bisher limitierende Faktoren dar (Wang et al. 2017; Wells 2004; Ul Ain et al. 2015). Prädisponierend für eine ex vivo Bearbeitung sind Erkrankungen, welche eine einfache Entnahme der betroffenen Zellen ermöglichen. Zu nennen sind beispielsweise Erkrankungen der Blutzellen bei der transfusionsabhängigen β -Thalassämie (transfusion-dependent- β -Thalassemia, TDT) oder der Sichelzellerkrankung (sickle cell disease, SCD). Dabei handelt es sich um zwei der häufigsten monogenetischen Erkrankungen, bei welchen es zu einer gestörten Produktion des β -Globins, eine Komponente des Hämoglobins, kommt. Bisher etablierte klinische Therapieansätze basieren v.a. auf Knochenmarkstransplantationen, durch die eine Heilung beider Krankheiten möglich ist. Limitierender Faktor ist häufig das Fehlen geeigneter Stammzellspender, was die Erforschung alternativer Therapien nötig macht. Ein Ansatz beruht auf der Behebung der ursächlichen Mutation auf Genomebene beispielsweise durch das CRISPR/Cas9-System. Ziel dessen ist eine Erhöhung des fetalen Hämoglobins, welches physiologisch lediglich im fetalen Zustand produziert und bald nach Geburt durch das adulte Hämoglobin ersetzt wird. Durch die Reinduktion des fetalen Hämoglobins, soll das im Falle der SCD und TDT die Konzentration funktionsfähigen β -Globins erhöht werden (Ledford 2020).

Es gelang der Arbeitsgruppe um Frangoul et al. durch eine CRISPR/Cas9 induzierte Targetierung CD34+ hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen den für die SCD ursächlichen BCL11A erythroid-spezifischen Enhancer zu modifizieren (Frangoul et al. 2021).

Dafür wurden die zu bearbeitenden Zellen zunächst entnommen und anschließend das CRISPR/Cas9-System durch Elektroporation in die Stammzellen appliziert. Nach erfolgter Myeloablation wurden den Patienten die ex vivo bearbeiteten CD34+ Zellen durch autologe Transfusion reinfundiert. In Folgeuntersuchungen zeigten sich auch mehr als ein Jahr später vielversprechende Ergebnisse mit deutlichem Anstieg des fetalen Hämoglobins.

Eine aktuelle klinische Studie zu Entwicklung einer neuen gentherapeutischen Behandlungsmethode wird aktuell in einer Phase 1 Studie am Erkrankungsbild des fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms erforscht ([ClinicalTrials.gov: NCT02793856](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02793856)). Die Inhibition des Membranproteins PD-1 (programmed cell death Protein-1) fand bisher auf medikamentösem Weg mittels des humanisierten, monoklonalen Antikörpers Pembrolizumab statt. Dieser bindet als Checkpoint-Inhibitor an den PD-1 Rezeptor und stimuliert dadurch eine Aktivierung des Immunsystems gegen den Tumor. Eine ähnliche Wirkung erhofft man sich von einem gezielten, genetischen Genknockdown des Membranproteins PD-1. Entnommene T-Zellen werden dabei ex vivo über Elektroporation mit dem CRISPR/Cas9-Komplex sowie der sgRNA transfiziert und im Anschluss intravenös reinfundiert (Lu et al. 2020). Die in dieser Studie erwähnte kurze Lebensdauer der transfizierten Zellen geht mit einer geringen Wahrscheinlichkeit dauerhafter genotoxischer Effekte einher.

Virale Vektoren wie Lentiviren (LV) (Chakraborty et al. 2014), Adenoviren (AV) (Ding et al. 2014) und Adenoassoziierte Viren (AAV) sind alternative Belieferungssysteme, welche das CRISPR/Cas9-Systeme effizient in die zu bearbeitenden Zellen liefern können (Wang et al. 2017). Bedenken gegenüber den viralen Systemen entstehen durch die potenzielle Gefahr insertionaler Mutagenese, Karzinogenese und der Auslösung von Immunreaktionen.

Die AAV-vermittelte Belieferung gilt momentan als Goldstandard in der therapeutischen Gentherapie. Aufgrund ihres geringeren immunogenen Potentials und reduziertem onkogenen Risikos der Genomintegration, im Vergleich zu anderen Belieferungssystemen, sind sie ein häufig verwendetes Transportvehikel in der Gentherapie (Samulski und Muzyczka 2014). Bei der viralen in vivo Belieferung findet zunächst eine Bindung an die Zelloberfläche der zu bearbeitenden Zellen statt. Die Viren inklusive des CRISPR-Cas Komplexes werden im Anschluss endozytotisch in die Zellen aufgenommen.

Die in dieser Arbeit größtenteils verwendete Cas9 von *Streptococcus pyogenes* weist bereits ohne die Sequenzen für sgRNA eine Gengröße von >4 kb auf. Da AAV-Vektoren lediglich eine Transport-(Packaging) Kapazität von 4,7 kb aufnehmen können, stellt die Transduktion mittels eines einzelnen Vektors in diesem Fall keine Option dar (Hsu et al. 2014). Obwohl die

SpCas9 immer noch das verbreitetste Cas9-System in der Forschung darstellt, gewinnen alternative Orthologe immer mehr an Bedeutung (Ran et al. 2015; Hou et al. 2013). Im Rahmen dieser Studie wurde ein Cas9- Ortholog des Staphylokokkus aureus verwendet. Diese Cas9-Varianten bringen den Vorteil mit sich, aufgrund der potenziell reduzierten Gengröße durch einen einzelnen AAV-Vektor transportiert werden zu können (Ran et al. 2015). Als zusätzlicher positiver Nebeneffekt können Cas9-Varianten unterschiedliche PAM-Sequenzen erkennen und erweitern dadurch das Spektrum möglicher Zielsequenzen.

Um die Restriktion durch die limitierte Packungskapazität der AAV-Vektoren zu umgehen, besteht die Möglichkeit, die SpCas9 und zugehörige sgRNAs in separaten Vektoren in die Zelle zu bringen. Dieser Ansatz wurde bereits erfolgreich in vivo in einem Mausmodell der Duchenne'schen Muskeldystrophie (DSM) verfolgt (Nelson et al. 2016). Durch die CRISPR/Cas9-vermittelte Deletion des ursächlichen Exons konnte die Expression eines modifizierten Dystrophin Gens wiederhergestellt werden. Infolgedessen kam es zu einer partiellen Regeneration des funktionalen Dystrophin Proteins in der Skelett- und Herzmuskulatur und einer signifikanten Verbesserung der Muskelkraft.

Erst kürzlich konnten in der Therapieentwicklung für LCA (Subtyp 10) (Ruan et al. 2017) und der autosomal dominanten Retinitis Pigmentosa (RP) (Bakondi et al. 2016) erste Erfolge durch eine AAV-vermittelte virale Administration von CRISPR/Cas9-Komponenten verzeichnet werden. Im November 2018 wurde dem Unternehmen Editas medicine die FDA-Zulassung für die klinische Testung des IND (Investigational New Drug) EDIT-101 erteilt. Entwickelt wurde EDIT-101 für die Therapie der LCA Typ10, welche eine häufige Ursache vererbter kindlicher Blindheit beim Typus Retinitis pigmentosa darstellt. CRISPR/Cas9-vermittelt soll die Punktmutation IVS26 im CEP290-Gen, welche zu einem fehlerhaften Splicing des Transkripts und dadurch zu einem nicht funktionsfähigen CEP290 Protein führt, korrigiert werden (Sheridan 2018). EDIT-101 soll über AAV 5-Vektoren, welche einen intrinsischen Tropismus für Photorezeptorzellen aufweisen, beliefert und über eine einmalige subretinale Injektionen ins Auge appliziert werden (Maeder et al. 2019). Es handelt sich dabei um die erstmalige Applikation von CRISPR/Cas9 in vivo in den menschlichen Körper. Die häufige Verwendung der viralen Transportmedien in den letzten Jahren beruht insbesondere auf ihrer hohen Belieferungseffizienz und der stabilen und dauerhaften Genexpression. Insbesondere die unterschiedlichen AAV-Serotypen können durch ihre unterschiedlichen Affinitäten für bestimmte Gewebetypen gezielt eingesetzt werden, um spezifische Zielorgane und Gewebe targetieren zu können (Zincarelli et al. 2008). Analog zur Verwendung des AAV-5 bei der LCA gelang es Yang et al. durch die Verwendung von AAV-8 aufgrund des hohen Leber-Tropismus dieses Serotypen, gezielt Hepatozyten mit dem CRISPR/Cas-Komplex zu beliefern. Ziel dessen war die Korrektur einer Punktmutation in der Leber Neugeborener (Yang et al. 2016).

Ein nicht zu vernachlässigendes Risiko bei der AAV-vermittelten Belieferung besteht in einer AAV-Vektorintegration in DSB, welche durch das CRISPR/Cas9 System in therapeutisch relevanten Genen verursacht werden können (Hanlon et al. 2019). Abhängig von Zell- und Gewebetypen variiert das Integrationsausmaß und die Integrationslokalisation. Ob und in welcher Ausdehnung solche Effekte bei der Transfektion von RPE-Zellen zu erwarten sind, muss in weiteren Studien noch evaluiert werden.

Eine weitere Möglichkeit viraler Belieferung stellen Lentiviren (LVs) dar. Ein großer Vorteil der lentiviralen Belieferungsmethode ist, dass sowohl teilende als auch nicht-teilende Zellen suffizient bearbeitet werden können und die LVs eine vorteilhafte Packungskapazität aufweisen (Dong und Kantor 2021). In aktuell laufenden Phase 1/2 Studien zur Therapie Typ 1 Diabetes (T1D) mittels VCTX210 gelang es ex vivo Stammzellen durch eine lentivirale Transfektion mit dem CRISPR/Cas9-Komplex zu beliefern, um diese im Anschluss als allogene Transplantation pankreatischer insulinproduzierender Zellen zu reimplantieren (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04678557). Diese Zellen sind durch die CRISPR/Cas9-Editierung imstande, der krankheitsursächlichen autoimmunen Reaktion des Körpers entgehen zu können. LVs gehören zu den Retroviren. Diese entfalten ihre Wirkung zunächst im Zytosol der Zelle, wo eine reverse Transkription der RNA in die komplementäre doppelsträngige DNA stattfindet. Die DNA wird im Anschluss in den Nukleus transportiert, wo eine virale Integrase sie in das Genom der Zelle integriert und somit die Proteinsynthese ermöglicht (Behr et al. 2021). Dadurch besteht ebenso wie bei den AAV-Viren die Gefahr einer insertionalen Mutagenese und somit eines onkogenen Potentials. V.a. die dauerhafte Expression der therapeutischen Transgene wird als substantieller Nachteil interpretiert, da hierdurch die Möglichkeit besteht, dass ungewollte und gefährliche off-target Effekte hervorgerufen werden (Dong und Kantor 2021). Studien untersuchten daher die Erforschung nicht-integraler Lentiviren, welche anstatt des großen und platzeinnehmenden Cas9 Gens, das Cas9 Protein verwendeten. Diese weisen aufgrund der reduzierten Lebensdauer des Cas9 Proteins ein vorteilhaftes Sicherheitsprofil auf und können zusätzlich im Falle eines gewünschten HDRs die Donor-DNA im selben Medium transportieren (Uchida et al. 2021).

Aktuell im Zentrum der Forschung sind nicht-virale Belieferungssysteme. Im Vergleich zur viralen Belieferung weisen diese in Studien ein verbessertes Sicherheitsprofil mit reduzierter Genotoxizität, reduziertem Risiko einer Genomintegration und weniger onkogenen Effekten auf. Eine erst kürzlich in den Fokus gerückte Möglichkeit der Belieferung, stellt der Transport der Komponenten mittels Lipidnanopartikeln (LNP) dar. In aktuell laufender Phase 1 Studie

zur Behandlung der autosomal dominant vererbten Transthyretin-Amyloidose (ATTR-Amyloidose) wurde diese Methode erfolgreich in vivo angewandt (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04601051). Bei der ATTR Amyloidose handelt es sich um eine lebensbedrohliche Erkrankung, welche mit einer Akkumulation fehlgefalteten Transthyretins (TTR) in Herz und Nerven einhergeht. Das erst kürzlich durch die FDA zugelassene Agent NTLA-2001 zur Gentherapie der Erkrankung zielt auf die Reduktion von fehlgefaltetem Protein im Serum ab. Nach systemischer, intravenöser Applikation via LNP Belieferung, wird das Agent endozytotisch in die hepatischen Zellen als Ort der Proteinsynthese eingeschleust. Dort war es erfolgreich imstande einen Genknockout des TTRs durchzuführen und die Konzentration von defekten Proteinen signifikant zu senken (Gillmore et al. 2021).

Solche vielversprechenden Ergebnisse lassen auf die Möglichkeit der Anwendung der CRISPR/Cas9-Technologie auch bei M. Best hoffen. Es wurde beschrieben, dass LPN eine erhöhte intrinsische Affinität gegenüber hepatischen Zellen aufweisen (Gillmore et al. 2021). Dies vereinfacht die Belieferung der Lipidnanopartikel in die Hepatozyten als primären Syntheseort des fehlerhaften Proteins. Ob die endozytotische Aufnahme der LPN in andere Zellen, wie beispielsweise dem RPE ähnlich erfolgsversprechend ist, bleibt dabei noch zu klären. Erste Erfolge konnten in der Therapie des humanen Immundefizienzvirus-1 (HIV-1) verzeichnet werden. Der Arbeitsgruppe um Herskovitz et al. gelang es, mittels LNP vermittelter Belieferung des CRISPR/Cas9 Komplexes, provirale DNA in infizierten CD4+ Leukozyten zu eliminieren ohne detektierbare *off-target* Effekte zu verursachen (Herskovitz et al. 2021).

Mittlerweile existiert eine Vielzahl an nicht-viralen Belieferungsmöglichkeiten der CRISPR/Cas9-Komponenten wie beispielsweise kationische Liposomen (Zhen und Li 2020), kationische Polymere (O'Keeffe Ahern et al. 2022), Nanovesikel sowie Goldnanopartikel (Mout et al. 2017), polymerische Mikrocarrier wie Polysaccharide und Polypeptide (Timin et al. 2018) oder extrazelluläre Vesikel wie Exosomen (Chen et al. 2019; Wang et al. 2019a).

Viele dieser Transportvesikel sind recht neu und benötigen weitere Untersuchungen vor einem potentiellen Einsatz als mögliches Therapeutikum.

Nachteilig bei der in vivo Applikation stellt die fehlende Möglichkeit einer Vorselektion ausreichend bearbeiteter Zellen, sowie der Möglichkeit der Überprüfung des CRISPR-Erfolgs dar. Voraussetzung für die in vivo Applikation ist daher die genaue Kenntnis über Wirkungsprofil der verabreichten Substanzen (Maeder et al. 2019).

7.4.3 Evaluation immunogener Reaktionen

Aufgrund des bakteriellen Ursprungs des Cas9 Proteins sind potentielle Immunreaktionen auf die CRISPR/Cas9-Komponenten (Dai et al. 2016) oder das Transportvehikel selbst (Bessis et al. 2004) nicht auszuschließen. Die bisher am häufigsten verwendeten Cas9-Orthologe sind die des *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes*. Diese beiden Bakterienspezies besiedeln und infizieren die menschliche Population mit hohen Frequenzen. Daher ist es von Bedeutung zu klären, inwiefern im Rahmen einer präexistierenden, adaptiven Immunantwort eine Reaktion auf die Cas9-Orthologe vorhanden ist. Einige Studien detektierten in diesem Zusammenhang spezifische Antikörper sowie T-Zell Antworten gegen SpCas9 und SaCas9 in vergleichsweise hohen Frequenzen. Diese Daten demonstrieren, dass sowohl humorale wie auch zellulär-vermittelte adaptive Immunantworten durch den CRISPR/Cas9-Komplex ausgelöst werden können (Charlesworth et al. 2019; Li et al. 2020).

Des Weiteren wurden kürzlich durch Moreno et al die Entwicklung einer immunologischen Gedächtnisreaktion auf AAV und auf Cas9 beschrieben. Besonders im Hinblick auf die Notwendigkeit wiederholter Applikationen kann dies eine entscheidende Barriere darstellen (Moreno et al. 2019).

Durch die Verwendung alternativer Cas9- und AAV-Orthologe konnte dieses Problem teilweise umgangen werden und eine schädliche Immunreaktion bei sequenzieller Applikation vermieden werden (Moreno et al. 2019). Das genaue Wirkungsprofil der einzelnen CRISPR/Cas-Komponenten sowie der einzelnen Belieferungssysteme in den unterschiedlichen Zielgeweben muss vor der Applikation in therapeutischer Intention genauestens untersucht werden.

Eine Möglichkeit die immunogene Potenz des Cas9 Proteins zu minimieren wäre eine Humanisierung des Cas9 Proteins (Dai et al. 2016). Alternative Transportmittel ergeben sich durch die Verwendung von nicht-viralen Vehikeln, wie zum Beispiel auf Nanopartikeln oder Lipiden basierenden Vektoren (Zuris et al. 2015; Yin et al. 2016). Diese sind leichter zu synthetisieren, haben ein vorteilhaftes Sicherheitsprofil und bieten die Möglichkeit, die limitierte Packungskapazität von AAV-Vektoren zu umgehen.

Für die in vivo Therapie ergäbe sich durch die Verwendung von Cas9-Protein anstatt des Cas9-Gens oder einer nicht-viralen Belieferung mit Cas9 mRNA der Vorteil, dass das Risiko einer Genomintegration minimiert würde (Kim et al. 2014). Die Anwesenheit und Wirkung der

Cas9 wäre durch eine schnelle Degradation zudem zeitlich deutlich limitiert. Aufgrund der beiden letztgenannten Effekte könnten *off-target* Effekte reduziert werden (Dai et al. 2016; Kim et al. 2014). Nichtsdestotrotz sind die Transfektionseffizienzen bei alternativen Vehikeln oft signifikant niedriger als solche mit viralen Ansätzen. Ineffiziente Aufnahmemechanismen in die Zellen, eingeschränkter Transport in den Nukleus und Einschluss in endosomale Vesikel sind limitierende Faktoren. Mehrere unabhängige Forschungsgruppen schafften es neuerdings größtenteils zelluläre Einschlussmechanismen zu umgehen und *in vitro* sowie *in vivo* den erfolgreichen nicht-viralen Cas9/ sgRNA-Transport in den Zellkern zu demonstrieren (Mout et al. 2017; Yin et al. 2016). Diese neusten Ergebnisse lassen hoffen, dass sich das Feld alternativer Belieferungssysteme der CRISPR/Cas9-Komponenten in die lebende Zelle in Zukunft erweitern wird.

Da bei allen bisher genannten Strategien eine Bearbeitung der Zellen *in situ* erfolgt, ist die genaue Kenntnis über das Wirkungsprofil der verabreichten Komponenten unabdingbar, um unvorhersehbare Nebenwirkungen zu vermeiden. Die Wirksamkeit des CRISPR/Cas-Systems ist neben der Effektivität der sgRNAs ebenso von der untersuchten Zellart abhängig. Daher bleibt zu klären, ob sich die bisher gewonnenen Ergebnisse aus HEK Zellen und Fibroblasten auf die iPSC und RPE-Zellen von Patienten übertragen lassen, und ob diese synthetisch produzierten Zellen mit den tatsächlichen Eigenschaften der lebenden *in situ* Zellen übereinstimmen.

Eine erfolgreiche Genomeditierung durch das CRISPR/Cas-System basiert auf der Fähigkeit der Zellen, DNA-Schäden zu reparieren. Abhängig von der Art des Gewebes und dem Stadium, in dem sich die Zelle in der Zellteilung befindet, variieren diese Eigenschaften zwischen unterschiedlichen Zellpopulationen. Die Effektivität gentherapeutischer Maßnahmen, die auf zellulären Reparatursystemen beruhen, könnte durch geringe Reparaturkapazitäten der Zellen deutlich herabgesetzt werden. Ausgehend von der Annahme, dass die Korrektur und Erkennung von DSB vor allem während der mitotischen Zellteilung stattfinden (Yanik et al. 2017), ist die Effizienz der Reparaturmechanismen im postmitotischen RPE in weiteren Experimenten zu evaluieren. Nähere Erkenntnisse könnte die Analyse CRISPR/Cas-transfizierter iPSC bringen.

Positiv gecrisperte Zellklone sollen dementsprechend in nachfolgenden Schritten selektiert und weiter zu RPE-Zellen differenziert werden. Da bisher noch nicht bekannt ist, ob durch die Deletion des verantwortlichen BEST1-Gens auch in der Praxis ein funktioneller Zugewinn zu erwarten ist, sollen die bearbeiteten RPE Zellen in anschließenden Schritten hinsichtlich ihrer Kanalfunktion untersucht werden.

8 Abkürzungsverzeichnis

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

EOG	Elektrookulogramm
et al.	et aliter
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
G	Guanin
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
gRNA	Guide RNA
h	Stunde
HDR	Homology-Directed Repair
HEK	Human Embryonic Kidney
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzellen
Indel	Insertionen und Deletionen
Kb	Kilobasen
l	Liter
IND	Investigational New Drug
LB	Liquid broth
LCA	Lebersche kongenitale Amaurosis
LV	Lentivirus
m	milli
M. Best	Morbus Best
M	Molar (mol/l)
MECD	Meesmann'sche epitheliale Cornea- Dystrophie
min	Minute
N	Nano
NGS	Next Generation Sequencing
NHEJ	Non-Homologous End Joining
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphat Buffered Saline
RFN	RNA-vermittelte FokI Nuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Retinitis pigmentosa

RPE	retinales Pigmentepithel
SaCas9	Staphylococcus Aureus Cas-Nuklease
sgRNA	sgRNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOC	super optimal broth with catabolite repression
SSB	Single stranded break, Einzelstrangbruch
SpCas9	Streptococcus Pyogenes Cas-Nuklease
T	Thymin
TALENs	transcription activator–like effector nucleases
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris Borat EDTA
tracrRNA	trans-aktivierende CRISPR-RNA
TTR	Transthyretin
u.a.	unter anderem
V	Volt
VIVO	Verifizierung von in vivo-targets
ZFN	Zink- Finger- Nuklease

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Homopentamere Struktur des Bestrophin-1.....	4
Abbildung 2: Stadieneinteilung der Best`schen vitelliformen Makuladystrophie	6
Abbildung 3: Reparaturmechanismen CRISPR/Cas-induzierter DSBs	13
Abbildung 4: Analytierte BEST1- Genregion und Lokalisation der 22 finalen SNPs.....	42
Abbildung 5: Europäische Haplotypenverteilung und -frequenz auf Basis von 22 SNPs im BEST1 Locus	43
Abbildung 6: Haplotypenverteilung und Mutationslokalisationen innerhalb der Patientenkohorte.....	45
Abbildung 7: Exemplarische sgRNA- Generierung für SNP 534C	47
Abbildung 8: Transfektionsstrategie in HEK 293T-Zellen	50
Abbildung 9: Transfektionsergebnisse der 20mer langen sgRNAs	52
Abbildung 10: Transfektionsergebnisse der Optimierungsversuche für SNP 390-C	55
Abbildung 11: Transfektionsergebnisse der Optimierungsversuche für SNP 390-T	56
Abbildung 12: Transfektionsergebnisse der Optimierungsversuche für SNP 429-T	57
Abbildung 13: Transfektionsergebnisse der Optimierungsversuche für SNP 429-C	59
Abbildung 14: Transfektionsergebnisse der Optimierungsversuche für SNP 534-C	60
Abbildung 15: Transfektionsergebnisse der Optimierungsversuche für SNP 534-A	61
Abbildung 16: Transfektionsergebnisse der Optimierungsversuche für SNP 581-T	63
Abbildung 17: Transfektionsergebnisse der ausgewählten sgRNAs nach Optimierung	64
Abbildung 18: Auswertung der Sequenzierergebnisse am Beispiel des SNPs 534-C	66

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Zelllinien.....	16
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme	16
Tabelle 3: Verwendete Vektoren.....	16
Tabelle 4: Durch Klonierung hergestellte Zielkonstrukte.....	17
Tabelle 5: Zum sgRNA- Design verwendete Oligonukleotide	17
Tabelle 6: Für PCR und Sequenzierung verwendete Oligonukleotide.....	20
Tabelle 7: Verwendete Enzyme	21
Tabelle 8: Verwendete Reaktionssysteme	22
Tabelle 9: Verwendete Chemikalien.....	22
Tabelle 10: Verwendeter Molekularmassenstandard.....	23
Tabelle 11: Verwendete Puffer und Medien	24
Tabelle 12: Verwendete Zellkulturmedien	24
Tabelle 13: Verwendete Geräte	25
Tabelle 14: Verwendete Software.....	26
Tabelle 15: Verwendeter PCR- Ansatz	27
Tabelle 16: PCR-Einstellung des Thermocyclers.....	28
Tabelle 17: Zusammensetzung 1% Agarose Gels.....	28
Tabelle 18: Ligationsansatz pGem®-T-Vektor.....	29
Tabelle 19: Reaktionsansatz Colony- PCR	30
Tabelle 20: Reaktionsansatz Cycle Sequencing	31
Tabelle 21: Sequenzierereinstellung am Thermocycler.....	31
Tabelle 22: Reaktionsansatz Restriktionsverdau	32
Tabelle 23: Ansatz Zielvektorverdau	33
Tabelle 24: Reaktionsansatz der Ligation der Zielsequenz in den Zielvektor.....	33
Tabelle 25: BbsI -Verdau der Expressionsvektoren px330- mCherry und px459- GFP.....	33
Tabelle 26: Phosphorylierung und Annealing der Oligonukleotide	34
Tabelle 27: Ligation der sgRNAs in die Zielvektoren px330- mCherry bzw. px459- GFP	34
Tabelle 28: Reaktionsansatz PCR- Amplifikation SNP- einschließender DNA- Sequenzen..	38
Tabelle 29: PCR- Ansatz Colony-PCR zur Identifikation gecrisperter Klone	39
Tabelle 30: PCR-Einstellung des Thermocyclers Colony- PCR.....	39
Tabelle 31: Übersicht über die untersuchten SNPs und ausgewählte Merkmale	48

Tabelle 32: sgRNA Auswahl für Fibroblasten- Transfektionen.....	65
Tabelle 33: Sequenzierungsauswertung für sgRNA 534C-18mer	67
Tabelle 34: Sequenzierungsauswertung für sgRNA 429-T_19mer_16.Base_A>C	67
Tabelle 35: Sequenzierungsauswertung für sgRNA_429-C-19mer_16.Base_G>C	68
Tabelle 36: Sequenzierungsauswertung für sgRNA 581G- 17mer	68
Tabelle 37:Sequenzierungsauswertung für sgRNA_749-A-17mer	69
Tabelle 38: Sequenzierungsauswertung für sgRNA_756-C-17mer	70

11 Literaturverzeichnis

Akcakaya, Pinar; Bobbin, Maggie L.; Guo, Jimmy A.; Malagon-Lopez, Jose; Clement, Kendall; Garcia, Sara P. et al. (2018): In vivo CRISPR editing with no detectable genome-wide off-target mutations. In: *Nature* 561 (7723), S. 416–419. DOI: 10.1038/s41586-018-0500-9.

Anzalone, Andrew V.; Randolph, Peyton B.; Davis, Jessie R.; Sousa, Alexander A.; Koblan, Luke W.; Levy, Jonathan M. et al. (2019): Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. In: *Nature* 576 (7785), S. 149–157. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4.

Arora, Rashi; Khan, Kamron; Kasilian, Melissa L.; Strauss, Rupert W.; Holder, Graham E.; Robson, Anthony G. et al. (2016): Unilateral BEST1-Associated Retinopathy. In: *American journal of ophthalmology* 169, S. 24–32. DOI: 10.1016/j.ajo.2016.05.024.

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.

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.

Bakondi, Benjamin; Lv, Wenjian; Lu, Bin; Jones, Melissa K.; Tsai, Yuchun; Kim, Kevin J. et al. (2016): In Vivo CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 24 (3), S. 556–563. DOI: 10.1038/mt.2015.220.

Behr, Matthew; Zhou, Jing; Xu, Bing; Zhang, Hongwei (2021): In vivo delivery of CRISPR-Cas9 therapeutics: Progress and challenges. In: *Acta pharmaceutica Sinica. B* 11 (8), S. 2150–2171. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.05.020.

Bessis, N.; GarciaCozar, F. J.; Boissier, M-C (2004): Immune responses to gene therapy vectors. Influence on vector function and effector mechanisms. In: *Gene therapy* 11 Suppl 1, S10-7. DOI: 10.1038/sj.gt.3302364.

Billon, Pierre; Bryant, Eric E.; Joseph, Sarah A.; Nambiar, Tarun S.; Hayward, Samuel B.; Rothstein, Rodney; Ciccia, Alberto (2017): CRISPR-Mediated Base Editing Enables Efficient Disruption of Eukaryotic Genes through Induction of STOP Codons. In: *Molecular cell* 67 (6), 1068-1079.e4. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.08.008.

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.; den Hollander, Anneke I. (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.

Boulton, M.; Dayhaw-Barker, P. (2001): The role of the retinal pigment epithelium. Topographical variation and ageing changes. In: *Eye (London, England)* 15 (Pt 3), S. 384–389. DOI: 10.1038/eye.2001.141.

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: *Neuromolecular medicine* 16 (3), S. 551–564. DOI: 10.1007/s12017-014-8308-8.

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.

Bykonya, Alesya G.; Lavrov, Alexander V.; Smirnikhina, Svetlana A. (2022): Methods for CRISPR-Cas as Ribonucleoprotein Complex Delivery In Vivo. In: *Molecular biotechnology*. DOI: 10.1007/s12033-022-00479-z.

Chakraborty, Syandan; Ji, HaYeun; Kabadi, Ami M.; Gersbach, Charles A.; Christoforou, Nicolas; Leong, Kam W. (2014): A CRISPR/Cas9-based system for reprogramming cell lineage specification. In: *Stem cell reports* 3 (6), S. 940–947. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.09.013.

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: *Nature medicine* 25 (2), S. 249–254. DOI: 10.1038/s41591-018-0326-x.

Chen, Ran; Huang, Hongxin; Liu, Hui; Xi, Jingyuan; Ning, Jing; Zeng, Wanxia et al. (2019): Friend or Foe? Evidence Indicates Endogenous Exosomes Can Deliver Functional gRNA and Cas9 Protein. In: *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 15 (38), e1902686. DOI: 10.1002/smll.201902686.

Chung, M. M.; Oh, K. T.; Streb, L. M.; Kimura, A. E.; Stone, E. M. (2001): Visual outcome following subretinal hemorrhage in Best disease. In: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 21 (6), S. 575–580. DOI: 10.1097/00006982-200112000-00003.

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

Constable, Paul A.; Bach, Michael; Frishman, Laura J.; Jeffrey, Brett G.; Robson, Anthony G. (2017): ISCEV Standard for clinical electro-oculography (2017 update). In: *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology* 134 (1), S. 1–9. DOI: 10.1007/s10633-017-9573-2.

Courtney, D. G.; Moore, J. E.; Atkinson, S. D.; Maurizi, E.; Allen, E. H. A.; Pedrioli, D. M. L. et al. (2016): CRISPR/Cas9 DNA cleavage at SNP-derived PAM enables both in vitro and in vivo KRT12 mutation-specific targeting. In: *Gene therapy* 23 (1), S. 108–112. DOI: 10.1038/gt.2015.82.

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.

Dai, Wei-Jing; Zhu, Li-Yao; Yan, Zhong-Yi; Xu, Yong; Wang, Qi-Long; Lu, Xiao-Jie (2016): CRISPR-Cas9 for in vivo Gene Therapy. Promise and Hurdles. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 5, e349. DOI: 10.1038/mtna.2016.58.

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.

den Hollander, Anneke I.; 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.

Ding, Qiurong; Strong, Alanna; Patel, Kevin M.; Ng, Sze-Ling; Gosis, Bridget S.; Regan, Stephanie N. et al. (2014): Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. In: *Circulation research* 115 (5), S. 488–492. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304351.

Dong, Wendy; Kantor, Boris (2021): Lentiviral Vectors for Delivery of Gene-Editing Systems Based on CRISPR/Cas: Current State and Perspectives. In: *Viruses* 13 (7). DOI: 10.3390/v13071288.

Egashira, Toru; Yuasa, Shinsuke; Fukuda, Keiichi (2013): Novel Insights into Disease Modeling Using Induced Pluripotent Stem Cells. In: *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 36 (2), S. 182–188. DOI: 10.1248/bpb.b12-00960.

Fishman, Gerald A.; Baca, Wendy; Alexander, Kenneth R.; Derlacki, Deborah J.; Glenn, Andrew M.; Viana, Marlos (1993): Visual Acuity in Patients with Best Vitelliform Macular Dystrophy. In: *Ophthalmology* 100 (11), S. 1665–1670. DOI: 10.1016/S0161-6420(93)31420-X.

Frangoul, Haydar; Altshuler, David; Cappellini, M. Domenica; Chen, Yi-Shan; Domm, Jennifer; Eustace, Brenda K. et al. (2021): CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. In: *The New England journal of medicine* 384 (3), S. 252–260. DOI: 10.1056/NEJMoa2031054.

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

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

Geurts, Maarten H.; Poel, Eyleen de; Pleguezuelos-Manzano, Cayetano; Carrillo, Léo; Andersson-Rolf, Amanda; Boretto, Matteo et al. (2020): Evaluating CRISPR-based Prime Editing for cancer modeling and CFTR repair in intestinal organoids (26).

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.

Guillinger, John P.; Thompson, David B.; Liu, David R. (2014): Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. In: *Nature biotechnology* 32 (6), S. 577–582. DOI: 10.1038/nbt.2909.

Haapaniemi, Emma; Botla, Sandeep; Persson, Jenna; Schmierer, Bernhard; Taipale, Jussi (2018): CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. In: *Nature medicine* 24 (7), S. 927–930. DOI: 10.1038/s41591-018-0049-z.

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: *Nature communications* 10 (1), S. 4439. DOI: 10.1038/s41467-019-12449-2.

Herskovitz, Jonathan; Hasan, Mahmudul; Patel, Milankumar; Blomberg, Wilson R.; Cohen, Jacob D.; Machhi, Jatin et al. (2021): CRISPR-Cas9 Mediated Exonic Disruption for HIV-1 Elimination. In: *EBioMedicine* 73, S. 103678. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103678.

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.

Hosogi, Shigekuni; Kusuzaki, Katsuyuki; Inui, Toshio; Wang, Xiangdong; Marunaka, Yoshinori (2014): Cytosolic chloride ion is a key factor in lysosomal acidification and function of autophagy in human gastric cancer cell. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 18 (6), S. 1124–1133. DOI: 10.1111/jcmm.12257.

Hou, Zhonggang; Zhang, Yan; Propson, Nicholas E.; Howden, Sara E.; Chu, Li-Fang; Sontheimer, Erik J.; Thomson, James A. (2013): Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (39), S. 15644–15649. DOI: 10.1073/pnas.1313587110.

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.

Hughes, Travis S.; Langer, Stephen J.; Virtanen, Salla I.; Chavez, Raymond A.; Watkins, Linda R.; Milligan, Erin D.; Leinwand, Leslie A. (2009): Immunogenicity of intrathecal plasmid

gene delivery: cytokine release and effects on transgene expression. In: *The journal of gene medicine* 11 (9), S. 782–790. DOI: 10.1002/jgm.1364.

Jiang, Fuguo; Taylor, David W.; Chen, Janice S.; Kornfeld, Jack E.; Zhou, Kaihong; Thompson, Aubri J. et al. (2016): Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6275), S. 867–871. DOI: 10.1126/science.aad8282.

Jiang, Wenyan; Bikard, David; Cox, David; Zhang, Feng; Marraffini, Luciano A. (2013): RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. In: *Nature biotechnology* 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.; 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.

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.

Kim, Daesik; Bae, Sangsu; Park, Jeongbin; Kim, Eunji; Kim, Seokjoong; Yu, Hye Ryeong et al. (2015): Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. In: *Nature methods* 12 (3), 237-43, 1 p following 243. DOI: 10.1038/nmeth.3284.

Kim, Daesik; Kim, Jin-Soo (2018): DIG-seq: a genome-wide CRISPR off-target profiling method using chromatin DNA. In: *Genome research* 28 (12), S. 1894–1900. DOI: 10.1101/gr.236620.118.

Kim, Daesik; Luk, Kevin; Wolfe, Scot A.; Kim, Jin-Soo (2019): Evaluating and Enhancing Target Specificity of Gene-Editing Nucleases and Deaminases. In: *Annual review of biochemistry* 88, S. 191–220. DOI: 10.1146/annurev-biochem-013118-111730.

Kim, Sojung; Kim, Daesik; Cho, Seung Woo; Kim, Jungeun; Kim, Jin-Soo (2014): Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9

ribonucleoproteins. In: *Genome research* 24 (6), S. 1012–1019. DOI: 10.1101/gr.171322.113.

Kim, Y. Bill; Komor, Alexis C.; Levy, Jonathan M.; Packer, Michael S.; Zhao, Kevin T.; Liu, David R. (2017): Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. In: *Nature biotechnology* 35 (4), S. 371–376. DOI: 10.1038/nbt.3803.

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

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.

Komor, Alexis C.; Kim, Yongjoo B.; Packer, Michael S.; Zuris, John A.; Liu, David R. (2016): Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. In: *Nature* 533 (7603), S. 420–424. DOI: 10.1038/nature17946.

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: *European journal of human genetics : EJHG* 8 (4), S. 286–292. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200447.

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.

Lazzarotto, Cicera R.; Malinin, Nikolay L.; Li, Yichao; Zhang, Ruochi; Yang, Yang; Lee, GaHyun et al. (2020): CHANGE-seq reveals genetic and epigenetic effects on CRISPR-Cas9 genome-wide activity. In: *Nature biotechnology* 38 (11), S. 1317–1327. DOI: 10.1038/s41587-020-0555-7.

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.

- Ledford, Heidi (2020): CRISPR gene therapy shows promise against blood diseases. In: *Nature* 588 (7838), S. 383. DOI: 10.1038/d41586-020-03476-x.
- Li, Ang; Tanner, Mark R.; Lee, Ciaran M.; Hurley, Ayrea E.; Giorgi, Marco de; Jarrett, Kelsey E. et al. (2020): AAV-CRISPR Gene Editing Is Negated by Pre-existing Immunity to Cas9. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 28 (6), S. 1432–1441. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.04.017.
- Li, Ling; Hu, Shuo; Chen, Xiaoyuan (2018a): Non-viral delivery systems for CRISPR/Cas9-based genome editing: Challenges and opportunities. In: *Biomaterials* 171, S. 207–218. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.031.
- Li, Xiaosa; Wang, Ying; Liu, Yajing; Yang, Bei; Wang, Xiao; Wei, Jia et al. (2018b): Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. In: *Nature biotechnology* 36 (4), S. 324–327. DOI: 10.1038/nbt.4102.
- Liang, Shun-Qing; Liu, Pengpeng; Smith, Jordan L.; Mintzer, Esther; Maitland, Stacy; Dong, Xiaolong et al. (2022): Genome-wide detection of CRISPR editing in vivo using GUIDE-tag. In: *Nature communications* 13 (1), S. 437. DOI: 10.1038/s41467-022-28135-9.
- Liang, Xiquan; Potter, Jason; Kumar, Shantanu; Zou, Yanfei; Quintanilla, Rene; Sridharan, Mahalakshmi et al. (2015): Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. In: *Journal of biotechnology* 208, S. 44–53. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.04.024.
- 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.
- Lim, Laurence S.; Mitchell, Paul; Seddon, Johanna M.; Holz, Frank G.; Wong, Tien Y. (2012): Age-related macular degeneration. In: *The Lancet* 379 (9827), S. 1728–1738. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60282-7.
- 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: *Scientific reports* 6, S. 19675. DOI: 10.1038/srep19675.
- Lu, You; Xue, Jianxin; Deng, Tao; Zhou, Xiaojuan; Yu, Kun; Deng, Lei et al. (2020): Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. In: *Nature medicine* 26 (5), S. 732–740. DOI: 10.1038/s41591-020-0840-5.
- Maeder, Morgan L.; Stefanidakis, Michael; Wilson, Christopher J.; Baral, Reshica; Barrera, Luis Alberto; Bounoutas, George S. et al. (2019): Development of a gene-editing approach to

restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. In: *Nature medicine* 25 (2), S. 229–233. DOI: 10.1038/s41591-018-0327-9.

Makarova, Kira S.; Haft, Daniel H.; Barrangou, Rodolphe; Brouns, Stan J. J.; Charpentier, Emmanuelle; Horvath, Philippe et al. (2011): Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. In: *Nature reviews. Microbiology* 9 (6), S. 467–477. DOI: 10.1038/nrmicro2577.

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

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.

Marino, Nicole D.; Pinilla-Redondo, Rafael; Csörgő, Bálint; Bondy-Denomy, Joseph (2020): Anti-CRISPR protein applications: natural brakes for CRISPR-Cas technologies. In: *Nature methods* 17 (5), S. 471–479. DOI: 10.1038/s41592-020-0771-6.

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.

Maxwell, Karen L. (2017): The Anti-CRISPR Story: A Battle for Survival. In: *Molecular cell* 68 (1), S. 8–14. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.09.002.

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: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 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 (BD) and autosomal recessive bestrophinopathy (ARB) accounting for the distinct retinal phenotypes. In: *Human Molecular Genetics*. DOI: 10.1093/hmg/ddy070.

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.

Moreno, Ana M.; Palmer, Nathan; Alemán, Fernando; Chen, Genghao; Pla, Andrew; Jiang, Ning et al. (2019): Immune-orthogonal orthologues of AAV capsids and of Cas9 circumvent the immune response to the administration of gene therapy. In: *Nature biomedical engineering* 3 (10), S. 806–816. DOI: 10.1038/s41551-019-0431-2.

Morgens, David W.; Wainberg, Michael; Boyle, Evan A.; Ursu, Oana; Araya, Carlos L.; Tsui, C. Kimberly et al. (2017): Genome-scale measurement of off-target activity using Cas9 toxicity in high-throughput screens. In: *Nature communications* 8, S. 15178. DOI: 10.1038/ncomms15178.

Mout, Rubul; Ray, Moumita; Yesilbag Tonga, Gulen; Lee, Yi-Wei; Tay, Tristan; Sasaki, Kanae; Rotello, Vincent M. (2017): Direct Cytosolic Delivery of CRISPR/Cas9-Ribonucleoprotein for Efficient Gene Editing. In: *ACS nano* 11 (3), S. 2452–2458. DOI: 10.1021/acsnano.6b07600.

Naeem, Muhammad; Majeed, Saman; Hoque, Mubasher Zahir; Ahmad, Irshad (2020): Latest Developed Strategies to Minimize the Off-Target Effects in CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing. In: *Cells* 9 (7), S. 1608. DOI: 10.3390/cells9071608.

Nelson, Christopher E.; Hakim, Chady H.; Ousterout, David G.; Thakore, Pratiksha I.; Moreb, Eirik A.; Castellanos Rivera, Ruth M. et al. (2016): In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6271), S. 403–407. DOI: 10.1126/science.aad5143.

Nihongaki, Yuta; Kawano, Fuun; Nakajima, Takahiro; Sato, Moritoshi (2015): Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. In: *Nature biotechnology* 33 (7), S. 755–760. DOI: 10.1038/nbt.3245.

Nishimasu, Hiroshi; Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Konermann, Silvana; Shehata, Soraya I.; Dohmae, Naoshi et al. (2014): Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. In: *Cell* 156 (5), S. 935–949. DOI: 10.1016/j.cell.2014.02.001.

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.

Okano, Hideyuki; Nakamura, Masaya; Yoshida, Kenji; Okada, Yohei; Tsuji, Osahiko; Nori, Satoshi et al. (2013): Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. In: *Circulation research* 112 (3), S. 523–533. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.256149.

O'Keeffe Ahern, Jonathan; Lara-Sáez, Irene; Zhou, Dezhong; Murillas, Rodolfo; Bonafont, Jose; Mencía, Ángeles et al. (2022): Non-viral delivery of CRISPR-Cas9 complexes for

targeted gene editing via a polymer delivery system. In: *Gene therapy* 29 (3-4), S. 157–170. DOI: 10.1038/s41434-021-00282-6.

Pasquay, Caroline; Wang, Lu Fei; Lorenz, Birgit; Preising, Markus N. (2015): Bestrophin 1--Phenotypes and Functional Aspects in Bestrophinopathies. In: *Ophthalmic genetics* 36 (3), S. 193–212. DOI: 10.3109/13816810.2013.863945.

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: *Nature genetics* 19 (3), S. 241–247. DOI: 10.1038/915.

Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Lin, Chie-Yu; Gootenberg, Jonathan S.; Konermann, Silvana; Trevino, Alexandro E. et al. (2013a): Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. In: *Cell* 154 (6), S. 1380–1389. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.021.

Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Wright, Jason; Agarwala, Vineeta; Scott, David A.; Zhang, Feng (2013b): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. In: *Nature protocols* 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.

Rashid, Alia; Bhatia, Shagun K.; Mazzitello, Karina I.; Chrenek, Micah A.; Zhang, Qing; Boatright, Jeffrey H. et al. (2016): RPE Cell and Sheet Properties in Normal and Diseased Eyes. In: *Advances in experimental medicine and biology* 854, S. 757–763. DOI: 10.1007/978-3-319-17121-0_101.

Renner, A. B.; Kellner, U. (2016): Hereditäre Makuladystrophien. In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 233 (10), S. 1124–1141. DOI: 10.1055/s-0042-100474.

Rousseau, Joël; Mbakam, Cédric Happi; Guyon, Antoine; Tremblay, Guillaume; Begin, Francis Gabriel; Tremblay, Jacques P. (2020): Specific mutations in genes responsible for Alzheimer and for Duchenne Muscular Dystrophy introduced by Base editing and PRIME editing.

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.

Russell, Stephen; Bennett, Jean; Wellman, Jennifer A.; Chung, Daniel C.; Yu, Zi-Fan; Tillman, Amy et al. (2017): Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65 -mediated inherited retinal dystrophy. A randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. In: *The Lancet* 390 (10097), S. 849–860. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31868-8.

Ryan, Daniel E.; Taussig, David; Steinfeld, Israel; Phadnis, Smruti M.; Lunstad, Benjamin D.; Singh, Madhurima et al. (2018): Improving CRISPR-Cas specificity with chemical modifications in single-guide RNAs. In: *Nucleic acids research* 46 (2), S. 792–803. DOI: 10.1093/nar/gkx1199.

Samulski, R. Jude; Muzyczka, Nicholas (2014): AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. In: *Annual review of virology* 1 (1), S. 427–451. DOI: 10.1146/annurev-virology-031413-085355.

Shen, Bin; Zhang, Wensheng; Zhang, Jun; Zhou, Jiankui; Wang, Jianying; Chen, Li et al. (2014): Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. In: *Nature methods* 11 (4), S. 399–402. DOI: 10.1038/nmeth.2857.

Sheridan, Cormac (2018): Go-ahead for first in-body CRISPR medicine testing. In: *Nat Biotechnol.* DOI: 10.1038/d41587-018-00003-2.

Shin, Jiyung; Jiang, Fuguo; Liu, Jun-Jie; Bray, Nicolas L.; Rauch, Benjamin J.; Baik, Seung Hyun et al. (2017): Disabling Cas9 by an anti-CRISPR DNA mimic. In: *Science advances* 3 (7), e1701620. DOI: 10.1126/sciadv.1701620.

Singh, Ritambhara; Kuscu, Cem; Quinlan, Aaron; Qi, Yanjun; Adli, Mazhar (2015): Cas9-chromatin binding information enables more accurate CRISPR off-target prediction. In: *Nucleic acids research* 43 (18), e118. DOI: 10.1093/nar/gkv575.

Singh Grewal, Simranjeet; Smith, Joseph J.; Carr, Amanda-Jayne F. (2021): Bestrophinopathies: perspectives on clinical disease, Bestrophin-1 function and developing therapies. In: *Therapeutic advances in ophthalmology* 13, 2515841421997191. DOI: 10.1177/2515841421997191.

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.

Song, Guoxu; Zhang, Fei; Tian, Chunhong; Gao, Xing; Zhu, Xiaoxiao; Fan, Dongdong; Tian, Yong (2022): Discovery of potent and versatile CRISPR-Cas9 inhibitors engineered for

chemically controllable genome editing. In: *Nucleic acids research* 50 (5), S. 2836–2853. DOI: 10.1093/nar/gkac099.

Sparrow, Janet R.; Duncker, Tobias; Woods, Russell; Delori, François C. (2016): Quantitative Fundus Autofluorescence in Best Vitelliform Macular Dystrophy. RPE Lipofuscin is not Increased in Non-Lesion Areas of Retina. In: *Advances in experimental medicine and biology* 854, S. 285–290. DOI: 10.1007/978-3-319-17121-0_38.

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: *European journal of human genetics : EJHG* 10 (4), S. 281–284. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200796.

Strecker, Jonathan; Jones, Sara; Koopal, Balwina; Schmid-Burgk, Jonathan; Zetsche, Bernd; Gao, Linyi et al. (2019): Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. In: *Nature communications* 10 (1), S. 212. DOI: 10.1038/s41467-018-08224-4.

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.

Takahashi, Kazutoshi; Tanabe, Koji; Ohnuki, Mari; Narita, Megumi; Ichisaka, Tomoko; Tomoda, Kiichiro; Yamanaka, Shinya (2007): Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. In: *Cell* 131 (5), S. 861–872. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.

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.

Timin, Alexander S.; Muslimov, Albert R.; Lepik, Kirill V.; Epifanovskaya, Olga S.; Shakirova, Alena I.; Mock, Ulrike et al. (2018): Efficient gene editing via non-viral delivery of CRISPR-Cas9 system using polymeric and hybrid microcarriers. In: *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 14 (1), S. 97–108. DOI: 10.1016/j.nano.2017.09.001.

Trevino, Alexandro E.; Zhang, Feng (2014): Genome editing using Cas9 nickases. In: *Methods in enzymology* 546, S. 161–174. DOI: 10.1016/B978-0-12-801185-0.00008-8.

Tsai, Shengdar Q.; Nguyen, Nhu T.; Malagon-Lopez, Jose; Topkar, Ved V.; Aryee, Martin J.; Jung, J. Keith (2017): CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide

CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. In: *Nature methods* 14 (6), S. 607–614. DOI: 10.1038/nmeth.4278.

Tsai, Shengdar Q.; Wyvekens, Nicolas; Khayter, Cyd; Foden, Jennifer A.; Thapar, Vishal; Reyon, Deepak et al. (2014): Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. In: *Nature biotechnology* 32 (6), S. 569–576. DOI: 10.1038/nbt.2908.

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.

Uchida, Naoya; Drysdale, Claire M.; Nassehi, Tina; Gamer, Jackson; Yapundich, Morgan; DiNicola, Julia et al. (2021): Cas9 protein delivery non-integrating lentiviral vectors for gene correction in sickle cell disease. In: *Molecular therapy. Methods & clinical development* 21, S. 121–132. DOI: 10.1016/j.omtm.2021.02.022.

Ul Ain, Qurrat; Chung, Jee Young; Kim, Yong-Hee (2015): Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 205, S. 120–127. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.12.036.

Wang, Haoyi; Yang, Hui; Shivalila, Chikdu S.; Dawlaty, Meelad M.; Cheng, Albert W.; Zhang, Feng; Jaenisch, Rudolf (2013): One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. In: *Cell* 153 (4), S. 910–918. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.025.

Wang, Hong-Xia; Li, Mingqiang; Lee, Ciaran M.; Chakraborty, Syandan; Kim, Hae-Won; Bao, Gang; Leong, Kam W. (2017): CRISPR/Cas9-Based Genome Editing for Disease Modeling and Therapy: Challenges and Opportunities for Nonviral Delivery. In: *Chemical reviews* 117 (15), S. 9874–9906. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00799.

Wang, J.; Chen, R.; Lu, F. M. (2019a): Exosome-mediated CRISPR/Cas9 system targets to cut the intercellular transmission function of hepatitis B virus genome. In: *Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology* 27 (8), S. 610–614. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2019.08.005.

Wang, Si-Wei; Gao, Chao; Zheng, Yi-Min; Yi, Li; Lu, Jia-Cheng; Huang, Xiao-Yong et al. (2022): Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer. In: *Molecular cancer* 21 (1), S. 57. DOI: 10.1186/s12943-022-01518-8.

Wang, Yufei; Wang, Bang; Xie, Haihua; Ren, Qianwen; Liu, Xiexie; Li, Fanfan et al. (2019b): Efficient Human Genome Editing Using SaCas9 Ribonucleoprotein Complexes. In: *Biotechnology journal* 14 (7), e1800689. DOI: 10.1002/biot.201800689.

Weingeist, T. A.; Kobrin, J. L.; Watzke, R. C. (1982): Histopathology of Best's Macular Dystrophy. In: *Archives of Ophthalmology* 100 (7), S. 1108–1114. DOI: 10.1001/archopht.1982.01030040086016.

Wells, D. J. (2004): Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. In: *Gene therapy* 11 (18), S. 1363–1369. DOI: 10.1038/sj.gt.3302337.

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.

Wienert, Beeke; Wyman, Stacia K.; Richardson, Christopher D.; Yeh, Charles D.; Akcakaya, Pinar; Porritt, Michelle J. et al. (2019): Unbiased detection of CRISPR off-targets in vivo using DISCOVER-Seq. In: *Science (New York, N.Y.)* 364 (6437), S. 286–289. DOI: 10.1126/science.aav9023.

Wittström, Elisabeth; Ekvall, Sara; Schatz, Patrik; Bondeson, Marie-Louise; Ponjavic, Vesna; Andréasson, Sten (2011): Morphological and functional changes in multifocal vitelliform retinopathy and biallelic mutations in BEST1. In: *Ophthalmic genetics* 32 (2), S. 83–96. DOI: 10.3109/13816810.2010.535890.

Wyvekens, Nicolas; Topkar, Ved V.; Khayter, Cyd; Joung, J. Keith; Tsai, Shengdar Q. (2015): Dimeric CRISPR RNA-Guided FokI-dCas9 Nucleases Directed by Truncated gRNAs for Highly Specific Genome Editing. In: *Human gene therapy* 26 (7), S. 425–431. DOI: 10.1089/hum.2015.084.

Yan, Fancheng; Wang, William; Zhang, Jiaqiang (2019): CRISPR-Cas12 and Cas13: the lesser known siblings of CRISPR-Cas9. In: *Cell biology and toxicology* 35 (6), S. 489–492. DOI: 10.1007/s10565-019-09489-1.

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.

Yang, Yang; Wang, Lili; Bell, Peter; McMenamin, Deirdre; He, Zhenning; White, John et al. (2016): A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. In: *Nature biotechnology* 34 (3), S. 334–338. DOI: 10.1038/nbt.3469.

Yanik, Mert; Müller, Brigitte; Song, Fei; Gall, Jacqueline; Wagner, Franziska; Wende, Wolfgang et al. (2017): In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies. In: *Progress in retinal and eye research* 56, S. 1–18. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2016.09.001.

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 vitreoretinopathopathy (ADVIRC). In: *Investigative ophthalmology & visual science* 45 (10), S. 3683–3689. DOI: 10.1167/iovs.04-0550.

Yin, Hao; Song, Chun-Qing; Dorkin, Joseph R.; Zhu, Lihua J.; Li, Yingxiang; Wu, Qiongqiong et al. (2016): Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. In: *Nature biotechnology* 34 (3), S. 328–333. DOI: 10.1038/nbt.3471.

Yip, Bon Ham (2020): Recent Advances in CRISPR/Cas9 Delivery Strategies. In: *Biomolecules* 10 (6). DOI: 10.3390/biom10060839.

Zetsche, Bernd; Gootenberg, Jonathan S.; Abudayyeh, Omar O.; Slaymaker, Ian M.; Makarova, Kira S.; Essletzbichler, Patrick et al. (2015a): Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. In: *Cell* 163 (3), S. 759–771. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038.

Zetsche, Bernd; Volz, Sara E.; Zhang, Feng (2015b): A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. In: *Nature biotechnology* 33 (2), S. 139–142. DOI: 10.1038/nbt.3149.

Zhang, Xiao-Hui; Tee, Louis Y.; Wang, Xiao-Gang; Huang, Qun-Shan; Yang, Shi-Hua (2015): Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 4, e264. DOI: 10.1038/mtna.2015.37.

Zhen, Shuai; Li, Xu (2020): Liposomal delivery of CRISPR/Cas9. In: *Cancer gene therapy* 27 (7-8), S. 515–527. DOI: 10.1038/s41417-019-0141-7.

Zincarelli, Carmela; Soltys, Stephen; Rengo, Giuseppe; Rabinowitz, Joseph E. (2008): Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (6), S. 1073–1080. DOI: 10.1038/mt.2008.76.

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: *Nature biotechnology* 33 (1), S. 73–80. DOI: 10.1038/nbt.3081.

12 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 27.11.2022

Isabell Römer

13 Danksagung

Ich bedanke mich herzlichst bei Prof. Dr. Bernhard Weber, Leiter des Instituts für Humangenetik, der es mir ermöglichte, die Dissertation unter seiner Leitung durchzuführen.

In besonderer Weise danke ich Andrea Milenkovic für die kompetente fachliche Betreuung meiner Arbeit. Durch ihre stetige Bereitschaft, ihr umfassendes Wissen mit mir zu teilen, hat sie einen massgebenden Beitrag am Gelingen dieser Arbeit.

Dem Team des Instituts der Humangenetik danke ich von Herzen für den Erfahrungsaustausch und die hilfsbereite Zusammenarbeit.

Meiner Familie danke ich für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.