

## Inhaltsverzeichnis

1.	<b>Einleitung</b>	1
1.1.	Erbliche Netzhauterkrankungen	1
1.1.1.	Retinopathia Pigmentosa	3
1.1.1.1.	<i>X-linked retinitis pigmentosa (XLRP)</i>	4
1.1.1.2.	Mausmodell für die XLRP	5
1.2.	Gentherapie in der Ophthalmologie	6
1.2.1.	Genome-Editing	6
1.2.2.	Designer Endonukleasen	8
1.2.2.1.	Zinkfingerendonukleasen (ZFNs)	8
1.2.2.2.	TALE-Nukleasen (TALENs)	9
1.2.2.3.	CRISPR/Cas	10
1.3.	DNA-Doppelstrang-Reparaturmechanismen	12
1.3.1.	<i>Non-homologous end-joining (NHEJ)</i>	14
1.3.1.1.	Das Ku-Protein	16
1.3.2.	<i>Homology-directed repair (HDR)</i>	18
1.3.3.	<i>Microhomology mediated end-joining (MMEJ)</i>	19
1.4.	DSB-Reparatur und Endonuklease vermitteltes Genome Editing	21
1.4.1.	CRISPR/Cas9 in der Gentherapie	22
1.4.1.1.	CRISPR/Cas9 vermittelter Gen Knockout (KO)	22
1.5.	Charakterisierung verwendeter Reparatur-Assays	23
1.5.1.	MMEJ Luziferase-Assay	24
1.5.2.	<i>Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-Assay</i>	26
1.6.	Zielsetzung	28
2.	<b>Material und Methoden</b>	29
2.1.	<b>Material</b>	29
2.1.1.	Geräteliste	29
2.1.2.	Verbrauchsmaterialien	30
2.1.3.	Chemikalien	31
2.1.4.	Software	32
2.1.5.	Enzyme	33
2.1.6.	Antikörper	33

2.1.7.	Plasmide	34
2.1.8.	Kit-Systeme	40
2.1.9.	Organismen	40
2.1.9.1.	Bakterienstämme	40
2.1.9.2.	Zelllinien	40
2.1.10.	Medien für Organismen	41
2.1.10.1.	Medien für Bakterien	41
2.1.10.2.	Medien für Zelllinien	41
2.1.11.	Puffer und Lösungen	42
2.1.12.	Antibiotika	45
2.1.13.	DNA- und Protein-Größenstandards	46
2.2.	<b>Methoden</b>	47
2.2.1.	Restriktionsanalyse	47
2.2.2.	Agarose-Gelelektrophorese	48
2.2.3.	Arbeiten mit Bakterien	49
2.2.3.1.	Herstellung von Glycerolstocks	49
2.2.3.2.	Beimpfen von LB-Flüssigkulturen	49
2.2.3.3.	Isolation von Plasmid-DNA	49
2.2.4.	Photometrische Konzentrationsbestimmung	50
2.2.5.	Arbeiten mit Zellkulturen	51
2.2.5.1.	Kultivierung von HEK293-T und HEK293 <sup>mORF15</sup> Zelllinien	51
2.2.5.2.	Transfektion von Zellkulturen	51
2.2.5.3.	Fluoreszenzmikroskopie	52
2.2.5.4.	Kryokonservierung von Zellen	53
2.2.5.5.	Auszählen von Zellen	53
2.2.6.	Arbeiten mit Proteinen	54
2.2.6.1.	Präparation von Gesamtproteinextrakten	54
2.2.6.2.	Western-Blot	55
2.2.6.3.	Densitometrische Auswertung der Western-Blots	58
2.2.7.	MMEJ Luziferase-Assay	59
2.2.8.	BRET-Assay	61
2.2.9.	Statistische Auswertung	61
3.	<b>Ergebnisse</b>	62
3.1.	Validierung des Cas9-Trägervektors px459 für den Ku70-KO	63

3.1.1.	Kontrollverdau	63
3.1.2.	Kontroll-Transfektion	64
3.2.	Validierung des Protein Ku70-KO in HEK293-T Zellen	66
3.2.1.	Western-Blot	66
3.2.1.1.	Densitometrische Analyse der Western-Blots	68
3.2.2.	BRET-Reporter: BRET-Assay	70
3.2.3.	MMEJ Luziferase Assay	72
4.	<b>Diskussion</b>	77
4.1.	Strategien zur Verbesserung der HDR-Effizienz	77
4.2.	Die Auswirkung eines Ku70-KO auf Reparaturmechanismen	78
4.3.	Die Erzeugung Ku70-defizienter Zellen	80
4.3.1.	Der Ku70 Knockout	80
4.4.	Der Einfluss des Ku70-KO auf den NHEJ-Reparaturweg	82
4.4.1.	Der BRET-Reporter: BRET-Assay	82
4.4.2.	Das MMEJ Luziferase-Assay	85
4.5.	Ausblick: das therapeutische Genome Editing	88
5.	<b>Zusammenfassung</b>	89
6.	<b>Summary</b>	90
7.	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	91
8.	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	97
9.	<b>Tabellenverzeichnis</b>	99
10.	<b>Literaturverzeichnis</b>	100
11.	<b>Erklärung zur Dissertation</b>	107
12.	<b>Danksagung</b>	108