



(10) **DE 20 2013 012 597 U1** 2017.12.28

(12) **Gebrauchsmusterschrift**

(21) Aktenzeichen: **20 2013 012 597.7**  
 (22) Anmeldetag: **23.10.2013**  
 (67) aus Patentanmeldung: **EP 13 84 9670.8**  
 (47) Eintragungstag: **21.11.2017**  
 (45) Bekanntmachungstag im Patentblatt: **28.12.2017**

(51) Int Cl.: **C12N 15/31 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:  
**61/717,324**      **23.10.2012**    **US**  
**61/803,599**      **20.03.2013**    **US**  
**61/837,481**      **20.06.2013**    **US**

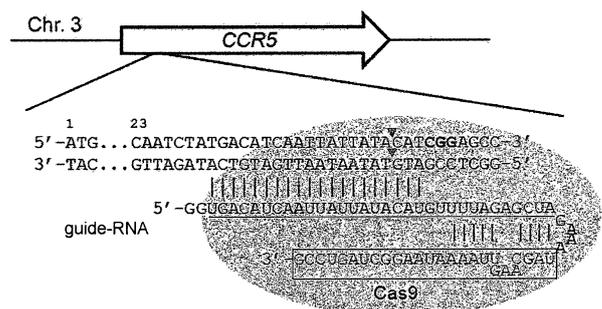
(74) Name und Wohnsitz des Vertreters:  
**Jones Day Rechtsanwälte Patentanwälte, 80538 München, DE**

(73) Name und Wohnsitz des Inhabers:  
**Toolgen, Inc., Seoul, KR**

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.**

(54) Bezeichnung: **Zusammensetzung zum Spalten einer Ziel-DNA, umfassend eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein, sowie deren Verwendung**

(57) Hauptanspruch: Typ-II-CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9(CRISPR-Associated Protein 9)-Zusammensetzung zum Spalten einer Zielnukleinsäure in einer Säugerzelle, wobei die Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung Folgendes umfasst:  
 a. das Cas9-Polypeptid oder eine ein Cas9-Polypeptid codierende Nukleinsäure; und  
 b. eine chimäre guide-RNA, die einen crRNA(CRISPR RNA)-Teil fusioniert an einen tracrRNA(trans Activating crRNA)-Teil umfasst.



**Beschreibung**

## Technisches Gebiet

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft das gezielte Genom-Editing in eukaryotischen Zellen oder Organismen. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung zum Spalten einer Ziel-DNA in eukaryotischen Zellen oder Organismen, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst, sowie deren Verwendung.

## Stand der Technik

**[0002]** CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) sind viele kurze, direkte Wiederholungen enthaltende Loci, die sich in den Genomen von rund 40% der sequenzierten Bakterien und 90% der sequenzierten Archaeen finden. CRISPR wirkt als ein prokaryotisches Immunsystem, insofern es Resistenz gegenüber exogenen genetischen Elementen wie etwa Plasmiden und Phagen verleiht. Das CRISPR-System bietet eine Form von erworbener Immunität. Kurze Segmente von Fremd-DNA, die Spacer genannt werden, werden zwischen CRISPR-Repeats in das Genom eingebaut und dienen als Erinnerung für frühere Expositionen. CRISPR-Spacer werden dann verwendet, um exogene genetische Elemente auf analoge Weise zu RNAi in eukaryotischen Organismen zu erkennen und stillzulegen.

**[0003]** Cas9, eine essenzielle Proteinkomponente im Typ-II-CRISPR/Cas-System, bildet bei Komplexbildung mit zwei RNAs, die als CRISPR-RNA (crRNA) und trans-aktivierende crRNA (tracrRNA) bezeichnet werden, eine aktive Endonuklease, wodurch fremde genetische Elemente in invadierenden Phagen oder Plasmiden zum Schutz der Wirtszellen gespalten werden. crRNA wird im Wirtsgenom, das früher von solch einem fremden Invasor eingenommen wurde, aus dem CRISPR-Element transkribiert. Kürzlich zeigten Jinek et al. (1), dass eine einkettige chimäre RNA, die durch Fusion eines essenziellen Teils von crRNA und tracrRNA erzeugt wurde, die zwei RNAs im Cas9/RNA-Komplex ersetzen konnten, um eine funktionierende Endonuklease zu bilden.

**[0004]** CRISPR/Cas-Systeme bieten gegenüber Zinkfinger- und transkriptionsaktivatorähnlichen Effektor-DNA-bindenden Proteinen einen Vorteil, da die Ortsspezifität bei nukleotidbindenden CRISPR/Cas-Proteinen, anstelle des DNA-bindenden Proteins, dessen Entwurf und Synthese eine größere Herausforderung darstellen kann, durch eine RNA gesteuert wird.

**[0005]** Bisher wurde jedoch noch kein Genom-Editing-Verfahren entwickelt, bei dem die auf dem CRISPR/Cas-System basierende RNA-gesteuerte Endonuklease (RGEN) verwendet wurde.

**[0006]** Einstweilen stellt der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) eines der ältesten, bequemsten und preiswertesten Verfahren zur Genotypisierung dar, das in der Molekularbiologie und Genetik noch immer weithin genutzt wird, das jedoch oft durch das Fehlen von geeigneten, durch Restriktionsendonukleasen erkannten Orten beschränkt wird.

**[0007]** Synthetisch hergestellte, nukleaseinduzierte Mutationen werden durch verschiedene Verfahren nachgewiesen, die fehlpaarungssensitive T7-Endonuklease-I(T7E1)- oder Surveyor-Nuklease-Assays, RFLP, Kapillarelektrophorese fluoreszierender PCR-Produkte, Dideoxysequenzierung und Tiefensequenzierung umfassen. Die T7E1- und Surveyor-Assays werden weithin eingesetzt, sind aber mühsam. Darüber hinaus neigen diese Enzyme dazu, Mutationshäufigkeiten zu unterschätzen, da mutierte Sequenzen Homoduplexe miteinander bilden können und homozygote bialele Mutantenklone nicht von Wildtypzellen unterscheiden können. RFLP ist von diesen Einschränkungen frei und daher eine Methode der Wahl. Tatsächlich war RFLP eines der ersten Verfahren, um synthetisch hergestellte nukleasevermittelte Mutationen bei Zellen und Tieren nachzuweisen. Unglücklicherweise ist die RFLP jedoch durch die Verfügbarkeit von geeigneten Restriktionsorten beschränkt. Es ist möglich, dass am interessierenden Zielort keine Restriktionsorte verfügbar sind.

## Beschreibung der Erfindung

## Technische Aufgabe

**[0008]** Bisher wurde noch kein Genom-Editing- und Genotypisierungsverfahren entwickelt, bei dem die auf dem CRISPR/Cas-System basierende RNA-gesteuerte Endonuklease (RGEN) verwendet wurde.

**[0009]** Unter diesen Umständen haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung viele Bemühungen unternommen, um ein auf dem CRISPR/Cas-System basierendes Genom-Editing-Verfahren zu entwickeln, und haben schließlich eine programmierbare RNA-gesteuerte Endonuklease eingeführt, die DNA in eukaryotischen Zellen und Organismen auf eine gezielte Weise spaltet.

**[0010]** Außerdem haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung viele Bemühungen unternommen, um ein neues Verfahren unter Verwendung von RNA-gesteuerten Endonukleasen (RGEN) in der RFLP-Analyse zu entwickeln. Sie haben RGEN verwendet, um bei Krebs zu findende wiederkehrende Mutationen und durch synthetisch hergestellte Nukleasen einschließlich RGEN selbst in Zellen und Organismen induzierte Mutationen zu genotypisieren, und haben dadurch die vorliegende Erfindung vollendet.

#### Lösung der Aufgabe

**[0011]** Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer Zusammensetzung zum Spalten einer Ziel-DNA in eukaryotischen Zellen oder Organismen, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine die guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0012]** Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer Zusammensetzung zum Induzieren einer gezielten Mutagenese in eukaryotischen Zellen oder Organismen, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine die guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0013]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Kits zum Spalten einer Ziel-DNA in eukaryotischen Zellen oder Organismen, das eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0014]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Kits zum Induzieren einer gezielten Mutagenese in eukaryotischen Zellen oder Organismen, das eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0015]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung einer eukaryotischen Zelle oder eines Organismus, die/der ein Cas-Protein und eine guide-RNA umfasst, wobei das Verfahren einen Schritt der Co-Transfektion oder aufeinanderfolgenden Transfektion der eukaryotischen Zelle oder des Organismus mit einer Cas-Protein-codierenden Nukleinsäure oder einem Cas-Protein und einer guide-RNA oder diese guide-RNA codierende DNA umfasst.

**[0016]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer eukaryotischen Zelle oder eines eukaryotischen Organismus, die/der eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0017]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zum Spalten einer Ziel-DNA in eukaryotischen Zellen oder Organismen, das einen Schritt des Transfizierens der eukaryotischen Zellen oder Organismen, die eine Ziel-DNA umfassen, mit einer Zusammensetzung umfasst, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0018]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zum Induzieren einer gezielten Mutagenese in eukaryotischen Zellen oder Organismen, das einen Schritt des Behandeln einer eukaryotischen Zelle oder eines eukaryotischen Organismus mit einer Zusammensetzung umfasst, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0019]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Embryos, eines genommodifizierten Tieres oder einer genommodifizierten Pflanze, umfassend ein Genom, das durch eine Zusammensetzung editiert wurde, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0020]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung eines genommodifizierten Tieres, das einen Schritt des Einführens der Zusammensetzung, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst, in einen Embryo eines Tieres und einen Schritt des Überführens des Embryos in einen Eileiter einer pseudoschwangeren Amme zur Erzeugung eines genommodifizierten Tieres umfasst.

**[0021]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer Zusammensetzung zur Genotypisierung von Mutationen oder Variationen in einer isolierten biologischen Probe, umfassend eine für das Ziel-DNA-Sequenz spezifische guide-RNA und ein Cas-Protein.

**[0022]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zum Verwenden einer RNA-gesteuerten Endonuklease (RGEN), um durch synthetisch hergestellte Nukleasen in Zellen induzierte Mutationen oder natürlich auftretende Mutationen oder Variationen zu genotypisieren, wobei die RGEN eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA und ein Cas-Protein umfasst.

**[0023]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Kits zum Genotypisieren von durch synthetisch hergestellte Nukleasen in Zellen induzierten Mutationen oder natürlich auftretenden Mutationen oder Variationen, umfassend eine RNA-gesteuerte Endonuklease (RGEN), wobei die RGEN eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA und ein Cas-Protein umfasst.

**[0024]** Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer Zusammensetzung zum Spalten einer Ziel-DNA in eukaryotischen Zellen oder Organismen, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0025]** Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer Zusammensetzung zum Induzieren einer gezielten Mutagenese in eukaryotischen Zellen oder Organismen, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0026]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Kits zum Spalten einer Ziel-DNA in eukaryotischen Zellen oder Organismen, das eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0027]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Kits zum Induzieren einer gezielten Mutagenese in eukaryotischen Zellen oder Organismen, das eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0028]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung einer eukaryotischen Zelle oder eines Organismus, die/der ein Cas-Protein und eine guide-RNA umfasst, wobei das Verfahren einen Schritt der Co-Transfektion oder aufeinanderfolgenden Transfektion der eukaryotischen Zelle oder des Organismus mit einer Cas-Protein-codierenden Nukleinsäure oder einem Cas-Protein und einer guide-RNA oder diese guide-RNA codierende DNA umfasst.

**[0029]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer eukaryotischen Zelle oder eines eukaryotischen Organismus, die/der eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0030]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zum Spalten einer Ziel-DNA in eukaryotischen Zellen oder Organismen, das einen Schritt des Transfizierens der eukaryotischen Zellen oder Organismen, die eine Ziel-DNA umfassen, mit einer Zusammensetzung umfasst, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0031]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zum Induzieren einer gezielten Mutagenese in eukaryotischen Zellen oder Organismen, das einen Schritt des Be-

handelns einer eukaryotischen Zelle oder eines eukaryotischen Organismus mit einer Zusammensetzung umfasst, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0032]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Embryos, eines genommodifizierten Tieres oder einer genommodifizierten Pflanze, umfassend ein Genom, das durch eine Zusammensetzung editiert wurde, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0033]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung eines genommodifizierten Tieres, das einen Schritt des Einführens der Zusammensetzung, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst, in einen Embryo eines Tieres und einen Schritt des Überführens des Embryos in einen Eileiter einer pseudoschwangeren Amme zur Erzeugung eines genommodifizierten Tieres umfasst.

**[0034]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer Zusammensetzung zur Genotypisierung von Mutationen oder Variationen in einer isolierten biologischen Probe, die eine für das Ziel-DNA-Sequenz spezifische guide-RNA und ein Cas-Protein umfasst.

**[0035]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer Zusammensetzung zur Genotypisierung von Nukleinsäuresequenzen in pathogenen Mikroorganismen in einer isolierten biologischen Probe, die eine für die Ziel-DNA-Sequenz spezifische guide-RNA und ein Cas-Protein umfasst.

**[0036]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Kits zum Genotypisieren von Mutationen oder Variationen in einer isolierten biologischen Probe, das die Zusammensetzung umfasst, die insbesondere eine RNA-gesteuerter Endonuklease (RGEN) umfasst, wobei die RGEN eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA und ein Cas-Protein umfasst.

**[0037]** Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zum Genotypisieren von Mutationen oder Variationen in einer isolierten biologischen Probe unter Verwendung der Zusammensetzung, die insbesondere eine RNA-gesteuerter Endonuklease (RGEN) umfasst, wobei die RGEN eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA und ein Cas-Protein umfasst.

#### Vorteilhafte Wirkungen der Erfindung

**[0038]** Die vorliegende Zusammensetzung zum Spalten einer Ziel-DNA oder zum Induzieren einer gezielten Mutagenese in eukaryotischen Zellen oder Organismen, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst, das die Zusammensetzung enthaltende Kit und das Verfahren zum Induzieren einer gezielten Mutagenese bieten neue bequeme Genom-Editing-Werkzeuge. Da auch maßgeschneiderte RGEN zum Anvisieren jeglicher DNA-Sequenz entworfen werden können, lassen sich annähernd jeglicher Einzelnukleotidpolymorphismus oder jegliche kleine Insertionen/Deletionen (Indels) mittels einer RGEN-vermittelten RFLP analysieren, wodurch die erfindungsgemäße Zusammensetzung und das erfindungsgemäße Verfahren zum Nachweis und zum Spalten von natürlich auftretenden Variationen und Mutationen verwendet werden können.

#### Kurze Beschreibung der Abbildungen

**[0039]** Fig. 1 zeigt eine Cas9-katalysierte Spaltung von Plasmid-DNA in vitro. (a) Schematische Darstellung der Ziel-DNA und der chimären RNA-Sequenzen. Rote Dreiecke geben die Spaltungsorte an. Die durch Cas9 erkannte PAM-Sequenz ist fett gedruckt. Die Sequenzen in der guide-RNA, die von crRNA und tracrRNA stammen, sind eingekästelt bzw. unterstrichen. (b) In-vitro-Spaltung von Plasmid-DNA durch Cas9. Ein intaktes zirkuläres Plasmid oder ApaLI-verdautes Plasmid wurde mit Cas9 und guide-RNA inkubiert.

**[0040]** Fig. 2 zeigt eine Cas9-induzierte Mutagenese an einem Episom-Zielort. (a) Schematische Übersicht der zellbasierten Assays unter Verwendung eines RFP-GFP-Reporters. GFP wird von diesem Reporter nicht exprimiert, da die GFP-Sequenz out-of-frame mit der RFP-Sequenz fusioniert ist. Das RFP-GFP-Fusionsprotein wird nur exprimiert, wenn der Zielort zwischen den beiden Sequenzen durch eine ortsspezifische Nuklease gespalten wird. (b) Durchflusszytometrie von mit Cas9 transfizierten Zellen. Angegeben ist der prozentuelle Anteil von Zellen, die das RFP-GFP-Fusionsprotein exprimieren.

**[0041] Fig. 3** zeigt RGEN-getriebene Mutationen an endogenen Chromosomenorten. (a) CCR5-Locus. (b) C46PB-Locus. (Oben) Zum Nachweis der RGEN-getriebenen Mutationen wurde das T7E1-Assay verwendet. Pfeile geben die erwartete Position von Banden der durch T7E1 gespaltenen DNA an. Mutationshäufigkeiten (Indels (%)) wurden durch Messen der Bandenintensitäten berechnet. (Unten) DNA-Sequenzen der CCR5- und C4BPB-Wildtyp(WT)- und mutierten Klone. Die zur guide-RNA komplementäre Region der Zielsequenz ist eingekästelt gezeigt. Die PAM-Sequenz ist fett gedruckt. Dreiecke zeigen den Spaltungsort. Mikrohomologien entsprechende Basen sind unterstrichen. Die Spalte rechts gibt die Anzahl der insertierten oder deletierten Basen an.

**[0042] Fig. 4** zeigt, dass RGEN-getriebene Off-Target-Mutationen nicht nachweisbar sind. (a) On-Target- und potenzielle Off-Target-Sequenzen. Das humane Genom wurde *in silico* auf potenzielle Off-Target-Orte untersucht. Es wurden vier Orte identifiziert, von denen jeder 3 Basenfehlpaarungen mit dem CCR5-On-Target-Ort aufwies. Fehlgepaarte Basen sind unterstrichen. (b) Um zu untersuchen, ob diese Orte in mit dem Cas9/RNA-Komplex transfizierten Zellen mutiert waren, wurde das T7E1-Assay verwendet. An diesen Orten wurden keine Mutationen nachgewiesen. N/A (nicht anwendbar), ein Ort zwischen Genen. (c) Cas9 induzierte keine Chromosomendeletionen an Off-Targets. Die CCR5-spezifische RGEN und ZEN wurden in humanen Zellen exprimiert. Zum Nachweis der Induktion der 15-kb-Chromosomendeletionen in diesen Zellen wurde PCR verwendet.

**[0043] Fig. 5** zeigt ein RGEN-induziertes Foxn1-Gen-Targeting in Mäusen. (a) Schema, das eine für das Exon2 des Maus-Foxn1-Gens spezifische sgRNA zeigt. Das PAM in Exon2 ist in Rot dargestellt und die Sequenz in der sgRNA, die zu Exon2 komplementär ist, ist unterstrichen. Dreiecke geben die Spaltungsorte an. (b) Repräsentative T7E1-Assays, die Gen-Targeting-Wirksamkeit der Cas9-mRNA plus Foxn1-spezifischen sgRNA zeigen, die über intrazytoplasmatische Injektion in Mausembryonen im Ein-Zell-Stadium gegeben wurden. Zahlen geben die unabhängigen Gründertier-Mäuse an, die aus der höchsten Dosis erzeugt wurden. Pfeile geben die durch T7E1 gespaltenen Banden an. (c) DNA-Sequenzen von mutierten Allelen, die in drei in b identifizierten Foxn1-mutierten Gründertieren beobachtet wurden. Die Anzahl der Ereignisse ist in Klammern angegeben. (d) PCR-Genotypisierung der F1-Abkömmlinge, die durch Kreuzen von Foxn1-Gründertier Nr. 108 und Wildtyp-FVB/NTac gewonnen wurden. Zu beachten ist die Segregation der im Foxn1-Gründertier Nr. 108 gefundenen mutierten Allele in den Abkömmlingen.

**[0044] Fig. 6** zeigt das Foxn1-Gen-Targeting in Mausembryonen durch intrazytoplasmatische Injektion von Cas9-mRNA und Foxn1-sgRNA. (a) Repräsentatives Ergebnis einer T7E1-Assay-Überwachung der Mutationsrate nach Injektion der höchsten Dosis. Pfeile zeigen durch T7E1 gespaltenen Banden. (b) Zusammenfassung der T7E1-Assayergebnisse. Angegeben sind Mutantenanteile bei *in vitro* kultivierten Embryonen, die nach intrazytoplasmatischer Injektion der angegebenen RGEN-Dosen erhalten wurden. (c) DNA-Sequenzen von mutierten Foxn1-Allelen, die aus einer Untergruppe von T7E1-positiven Mutantenembryonen identifiziert wurden. Die Zielsequenz des Wildtyp-Allels ist eingekästelt.

**[0045] Fig. 7** zeigt Foxn1-Gen-Targeting bei Mausembryonen unter Verwendung des rekombinanten Cas9-Protein:Foxn1-sgRNA-Komplexes. (a) und (b) sind repräsentative T7E1-Assayergebnisse und deren Zusammenfassungen. Die Embryonen wurden *in vitro* kultiviert, nachdem sie einer pronukleären (a) oder intrazytoplasmatischen Injektion (b) unterzogen wurden. Zahlen in Rot geben T7E1-positiv mutierte Gründertier-Mäuse an. (c) DNA-Sequenzen von mutierten Foxn1-Allelen, die aus den *in vitro* kultivierten Embryonen identifiziert wurden, die durch eine pronukleäre Injektion von rekombinantem Cas9-Protein:Foxn1-sgRNA-Komplex bei der höchsten Dosis erhalten wurden. Die Zielsequenz des Wildtyp-Allels ist eingekästelt.

**[0046] Fig. 8** zeigt die Keimbahn-Übertragung der im Foxn1-mutierten Gründertier Nr. 12 gefundenen mutierten Allele. (a) fPCR-Analyse. (b) PCR-Genotypisierung von Wildtyp-FVB/NTac, der Gründertier-Maus und deren F1-Abkömmlingen.

**[0047] Fig. 9** zeigt Genotypen von Embryonen, die durch Kreuzen von Prkdc-mutierten Gründertieren erzeugt wurden. ♂25 und ♀15 Prkdc-mutierte Gründertiere wurden gekreuzt und E13.5-Embryonen wurden isoliert. (a) fPCR-Analyse der Wildtyp-, ♂25 Gründertiere und ♀15 Gründertiere. Zu beachten ist, dass aufgrund der technischen Beschränkungen der fPCR-Analyse diese Ergebnisse geringfügige Abweichungen von den präzisen Sequenzen der mutierten Allele zeigten; z. B. wurde aus der Sequenzanalyse  $\Delta 269/\Delta 61/\text{WT}$  und  $\Delta 5+1/+7/+12/\text{WT}$  in ♂25 bzw. ♀15 Gründertieren identifiziert. (b) Genotypen der erzeugten Embryonen.

**[0048] Fig. 10** zeigt eine durch den Cas9-Protein/sgrNA-Komplex induzierte gezielte Mutation.

- [0049]** Fig. 11 zeigt durch rekombinantes Cas9-Protein induzierte Mutationen in Arabidopsis-Protoplasten.
- [0050]** Fig. 12 zeigt durch rekombinantes Cas9-Protein induzierte mutierte Sequenzen im Arabidopsis-BR11-Gen.
- [0051]** Fig. 13 zeigt ein T7E1-Assay, das eine endogene CCR5-Gen-Unterbrechung in 293-Zellen durch Behandlung mit einem Cas9-mal-9R4L- und sgRNA/C9R4LC-Komplex zeigt.
- [0052]** Fig. 14 (a, b) zeigt die Mutationshäufigkeiten an On-Target- und Off-Target-Orten von RGEN, die von Fu et al. (2013) berichtet wurden. T7E1-Assays, die genomische DNA aus K562-Zellen analysierten, die (R) nacheinander mit 20 µg für Cas9 codierendem Plasmid und mit 60 µg bzw. 120 µg von in vitro transkribierter GX<sub>19</sub>-crRNA bzw. tracrRNA transfiziert wurden (1 × 10<sup>6</sup> Zellen) oder (D) mit 1 µg für Cas9 codierendem Plasmid und 1 µg GX<sub>19</sub>-sgRNA-Expressionsplasmid co-transfiziert wurden (2 × 10<sup>5</sup> Zellen).
- [0053]** Fig. 15 (a, b) zeigt einen Vergleich der guide-RNA-Struktur. Mutationshäufigkeiten der von Fu et al. (2013) berichteten RGEN wurden unter Verwendung des T7E1-Assays an On-Target- und Off-Target-Orten gemessen. K562-Zellen wurden mit dem für Cas9 codierenden Plasmid und dem für GX<sub>19</sub>-sgRNA oder GGX<sub>20</sub>-sgRNA codierendem Plasmid co-transfiziert. Off-Target-Orte (OT1–3 usw.) werden wie bei Fu et al. (2013) markiert.
- [0054]** Fig. 16 zeigt die In-vitro-DNA-Spaltung durch Cas9-Nickasen. (a) Schematische Übersicht der Cas9-Nuklease und der gepaarten Cas9-Nickase. Die PAM-Sequenzen und Spaltungsorte sind eingekästelt. (b) Zielorte im humanen AAVS1-Locus. Die Position von jedem Zielort ist durch ein Dreieck angegeben. (c) Schematische Übersicht der DNA-Spaltungsreaktionen. FAM-Farbstoffe (eingekästelt) wurden an beide 5'-Enden des DNA-Substrats geknüpft. (d) DSB und ESB wurden unter Verwendung von Fluoreszenz-Kapillarelektrophorese analysiert. Fluoreszierend markierte DNA-Substrate wurden vor der Elektrophorese mit Cas9-Nukleasen oder Nickasen inkubiert.
- [0055]** Fig. 17 zeigt einen Vergleich des Verhaltens der Cas9-Nuklease und der Nickase. (a) On-Target-Mutationshäufigkeiten bei Cas9-Nukleasen (WT), Nickasen (D10A) und gepaarten Nickasen. Gepaarte Nickasen, die 5'-Überhänge oder 3'-Überhänge erzeugen würden, sind angegeben. (b) Analyse von Off-Target-Wirkungen von Cas9-Nukleasen und gepaarten Nickasen. Insgesamt wurden sieben potenzielle Off-Target-Orte für drei sgRNA analysiert.
- [0056]** Fig. 18 zeigt gepaarte Cas9-Nickasen, die an anderen endogenen humanen Loci getestet wurden. (a, c) Die sgRNA-Zielorte an den humanen CCR5- und BRCA2-Loci. PAM-Sequenzen sind in Rot angegeben. (b, d) Genom-Editing-Aktivitäten an jedem Zielort wurden mithilfe des T7E1-Assays nachgewiesen. Die Reparatur zweier Einzelstrangbrüche, die 5'-Überhänge erzeugen würden, führte viel häufiger zur Bildung von Indels als solche, die 3'-Überhänge erzeugen.
- [0057]** Fig. 19 zeigt, dass gepaarte Cas9-Nickasen eine homologe Rekombination vermitteln. (a) Strategie zum Nachweis einer homologen Rekombination. Donor-DNA umfasste einen XbaI-Restriktionsenzymort zwischen zwei Homologiearmen, während dem endogenen Zielort dieser Ort fehlte. Zum Nachweis von Sequenzen, die eine homologe Rekombination durchlaufen hatten, wurde ein PCR-Assay verwendet. Um eine Amplifizierung von kontaminierender Donor-DNA zu verhindern, wurden für die genomische DNA spezifische Primer verwendet. (b) Effizienz der homologen Rekombination. Mit XbaI konnten nur Amplifikate einer Region verdaut werden, in der die homologe Rekombination aufgetreten war; die Intensitäten der Spaltungsbanden wurden verwendet, um die Effizienz dieses Verfahrens zu messen.
- [0058]** Fig. 20 zeigt das durch gepaarte Cas9-Nickasen induzierte Spleißen von DNA. (a) Die Zielorte der gepaarten Nickasen im humanen AAVS1-Locus. Die Entfernungen zwischen dem AS2-Ort und jedem der anderen Orte sind angegeben. Pfeile markieren die PCR-Primer. (b) Genomische Deletionen, die unter Verwendung von PCR nachgewiesen wurden. Sterne markieren deletionsspezifische PCR-Produkte. (c) DNA-Sequenzen von deletionsspezifischen PCR-Produkten, die unter Verwendung von AS2- und L1-sgRNAs erhalten wurden. Zielort-PAM-Sequenzen sind eingekästelt und zur sgRNA passende Sequenzen sind in Großbuchstaben angegeben. Intakte, zur sgRNA passende Sequenzen sind unterstrichen. (d) Schematisches Modell von chromosomalen, durch Cas9-Nickase vermittelten Deletionen. Neu synthetisierte DNA-Stränge sind eingekästelt.
- [0059]** Fig. 21 zeigt, dass gepaarte Cas9-Nickasen keine Translokationen induzieren. (a) Schematische Übersicht von chromosomalen Translokationen zwischen den On-Target- und Off-Target-Orten. (b) PCR-Amplif-

zierung zum Nachweis von chromosomalen Translokationen. (c) Durch Cas9-Nukleasen, aber nicht durch das Nickase-Paar induzierte Translokationen.

**[0060] Fig. 22** zeigt ein konzeptionelles Diagramm des T7E1- und RFLP-Assays. (a) Vergleich von Assay-Spaltungsreaktionen in vier möglichen Szenarien nach Behandlung einer diploiden Zelle mit einer synthetisch hergestellten Nuklease: (A) Wildtyp, (B) Monoallel-Mutation, (C) unterschiedliche Biallel-Mutationen (hetero) und (D) identische Biallel-Mutationen (homo). Schwarze Linien stellen die von jedem Allel abstammenden PCR-Produkte dar; gestrichelte und gepunktete Umrahmungen geben durch NHEJ erzeugte Insertions-/Deletionsmutationen an. (b) Erwartete Ergebnisse des T7E1- und RGEN-Verdaus, getrennt mittels Elektrophorese.

**[0061] Fig. 23** zeigt das In-vitro-Spaltungsassay eines linearisierten Plasmids, das den Indels tragenden C4BPB-Zielort enthält. DNA-Sequenzen von einzelnen Plasmidsubstraten (obere Tafel). Die PAM-Sequenz ist unterstrichen. Insertierte Basen sind eingekästelt. Pfeile (untere Tafel) geben die erwarteten Positionen von Banden einer durch wildtypspezifische RGEN gespaltene DNA nach Elektrophorese an.

**[0062] Fig. 24** zeigt die Genotypisierung von durch synthetisch hergestellte Nukleasen in Zellen induzierten Mutationen über RGEN-vermittelte RFLP. (a) Genotyp von C4BPB-mutierten K562-Zellklonen. (b) Vergleich des fehlpaarungssensitiven T7E1-Assays mit der RGEN-vermittelten RFLP-Analyse. Schwarze Pfeile geben das Spaltungsprodukt durch Behandlung mit T7E1-Enzym oder RGEN an.

**[0063] Fig. 25** zeigt die Genotypisierung von RGEN-induzierten Mutationen mittels der RGEN-RFLP-Technik. (a) Analyse von C4BPB-gespaltenen Klonen unter Verwendung von RGEN-RFLP- und T7E1-Assays. Pfeile zeigen die erwarteten Positionen von Banden der durch RGEN oder T7E1 gespaltenen DNA an. (b) Quantitativer Vergleich der RGEN-RFLP-Analyse mit T7E1-Assays. Genomische DNA-Proben von Wildtyp und C4BP6-gespaltenen K562-Zellen wurden in verschiedenen Verhältnissen vermischt und einer PCR-Amplifizierung unterzogen. (c) Genotypisierung von RGEN-induzierten Mutationen im HLA-B-Gen in HeLa-Zellen mittels RFLP- und T7E1-Analysen.

**[0064] Fig. 26** zeigt die Genotypisierung von durch synthetisch hergestellte Nukleasen in Organismen induzierten Mutationen über RGEN-vermittelte RFLP. (a) Genotyp von Pibf1-mutierten Gründertier-Mäusen. (b) Vergleich des fehlpaarungssensitiven T7E1-Assays mit der RGEN-vermittelten RFLP-Analyse. Schwarze Pfeile geben das Spaltungsprodukt durch Behandlung mit T7E1-Enzym oder RGEN an.

**[0065] Fig. 27** zeigt die RGEN-vermittelte Genotypisierung von ZFN-induzierten Mutationen. Der ZFN-Zielort ist eingekästelt. Schwarze Pfeile geben die Banden der durch T7E1 gespaltenen DNA an.

**[0066] Fig. 28** zeigt polymorphe Orte in einem Bereich des humanen HLA-B-Gens. Die Sequenz, die den RGEN-Zielort umgibt, ist die eines PCR-Amplifikats aus HeLa-Zellen. Polymorphe Positionen sind eingekästelt. Der RGEN-Zielort und die PAM-Sequenz sind gestrichelt bzw. in Fett eingekästelt. Die Primersequenzen sind unterstrichen.

**[0067] Fig. 29** zeigt die Genotypisierung von onkogenen Mutationen mittels RGEN-RFLP-Analyse. (a) Mittels RGEN wurde eine wiederkehrende Mutation (c. 133–135 Deletion von TCT) im humanen CTNNB1-Gen in HCT116-Zellen nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurden HeLa-Zellen verwendet. (b) Genotypisierung der KRAS-Substitutionsmutation (c. 34 G > A) in der A549-Krebszelllinie mit RGEN, die fehlgepaarte guide-RNA enthält. Fehlgepaarte Nukleotide sind eingekästelt. Als Negativkontrolle wurden HeLa-Zellen verwendet. Pfeile geben die Banden der durch RGEN gespaltenen DNA an. Die mittels Sanger-Sequenzierung bestätigten DNA-Sequenzen sind dargestellt.

**[0068] Fig. 30** zeigt die Genotypisierung des CCR5-delta32-Allels in HEK293T-Zellen mittels RGEN-RFLP-Analyse. (a) RGEN-RFLP-Assays der Zelllinien. K562-, SKBR3- und HeLa-Zellen wurden als Wildtyp-Kontrollen verwendet. Pfeile geben die Banden der durch RGEN gespaltenen DNA an. (b) DNA-Sequenz von Wildtyp- und delta32-CCR5-Allelen. Sowohl On-Target- als auch Off-Target-Orte von in der RFLP-Analyse verwendeten RGEN sind unterstrichen. Eine Einzelnukleotidfehlpaarung zwischen den beiden Orten ist eingekästelt. Die PAM-Sequenz ist unterstrichen. (c) In-vitro-Spaltung von WT- oder del32-CCR5-Allele tragenden Plasmiden unter Verwendung von wildtypspezifischer RGEN. (d) Bestätigung des Vorhandenseins eines Off-Target-Orts der CCR5-delta32-spezifischen RGEN am CCR5-Locus. In-vitro-Spaltungsassays von Plasmiden, die entweder On-Target- oder Off-Target-Sequenzen tragen, unter Verwendung verschiedener Mengen der del32-spezifischen RGEN.

**[0069]** Fig. 31 zeigt die Genotypisierung einer KRAS-Punktmutation (c. 34 G > A). (a) RGEN-RFLP-Analyse der KRAS-Mutation (c. 34 G > A) in Krebszelllinien. PCR-Produkte aus HeLa-Zellen (die als Wildtyp-Kontrolle verwendet wurden) oder A549-Zellen, die für die Punktmutation homozygot sind, wurden mit RGEN verdaut, deren für die Wildtyp-Sequenz oder die mutierte Sequenz spezifische crRNA perfekt passte. KRAS-Genotypen in diesen Zellen wurden mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt. (b) Plasmide, die entweder die Wildtyp- oder die mutierten KRAS-Sequenzen trugen, wurden unter Verwendung von RGEN mit perfekt passender crRNA oder attenuierter crRNA mit einer Basenfehlpaarung verdaut. Attenuierte crRNA, die zur Genotypisierung gewählt wurden, sind über den Gelen im Kasten markiert.

**[0070]** Fig. 32 zeigt die Genotypisierung einer PIK3CA-Punktmutation (c. 3140 A > G). (a) RGEN-RFLP-Analyse der PIK3CA-Mutation (c. 3140 A > G) in Krebszelllinien. PCR-Produkte aus HeLa-Zellen (die als Wildtyp-Kontrolle verwendet wurden) oder HCT116-Zellen, die für die Punktmutation heterozygot sind, wurden mit RGEN verdaut, deren für die Wildtyp-Sequenz oder die mutierte Sequenz spezifische crRNA perfekt passte. PIK3CA-Genotypen in diesen Zellen wurden mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt. (b) Plasmide, die entweder die Wildtyp- oder die mutierten PIK3CA-Sequenzen trugen, wurden unter Verwendung von RGEN mit perfekt passender crRNA oder attenuierter crRNA mit einer Basenfehlpaarung verdaut. Attenuierte crRNA, die zur Genotypisierung gewählt wurden, sind über den Gelen im Kasten markiert.

**[0071]** Fig. 33 zeigt die Genotypisierung von wiederkehrenden Punktmutationen in Krebszelllinien. (a) RGEN-RFLP-Assays von wiederkehrenden onkogenen Punktmutationen in IDH- (c. 394c > T), (b) PIK3CA- (c. 3140A > G), (c) NRAS- (c. 181C > A) (d) und BRAF-Genen (c. 1799T > A). Gezeigt sind Genotypen aller durch Sanger-Sequenzierung bestätigten Zelllinien. Fehlgepaarte Nukleotide sind eingekästelt. Schwarze Pfeile geben die Banden der durch RGEN gespaltenen DNA an.

#### Beste Ausführungsform der Erfindung

**[0072]** Gemäß einem Aspekt der Erfindung stellt die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung zum Spalten einer Ziel-DNA in eukaryotischen Zellen oder Organismen bereit, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst. Außerdem stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung der Zusammensetzung zum Spalten einer Ziel-DNA in eukaryotischen Zellen oder Organismen bereit, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0073]** In der vorliegenden Erfindung wird die Zusammensetzung auch als eine RNA-gesteuerte Endonuklease(RGEN)-Zusammensetzung bezeichnet.

**[0074]** ZFN und TALEN erlauben eine gezielte Mutagenese in Säugetierzellen, Modellorganismen, Pflanzen und Tierbestand, jedoch unterscheiden sich die mit einzelnen Nukleasen erhaltenen Mutationshäufigkeiten deutlich voneinander. Darüber hinaus zeigen einige ZFN und TALEN überhaupt keine Genom-Editing-Aktivitäten. Eine DNA-Methylierung kann die Bindung dieser synthetisch hergestellten Nukleasen an Zielorte beschränken. Außerdem ist es technisch herausfordernd und zeitraubend, maßgeschneiderte Nukleasen herzustellen.

**[0075]** Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben eine neue RNA-gesteuerte Endonuklease-Zusammensetzung basierend auf dem Cas-Protein entwickelt, um die Nachteile von ZFN und TALEN zu überwinden.

**[0076]** Vor der vorliegenden Erfindung war eine Endonuklease-Aktivität von Cas-Proteinen bekannt. Jedoch war unbekannt, ob die Endonuklease-Aktivität des Cas-Proteins aufgrund der Komplexität des eukaryotischen Genoms in einer eukaryotischen Zelle funktionieren würde. Des Weiteren wurde bisher keine Zusammensetzung, die ein Cas-Protein oder eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure und eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA umfasst, zum Spalten einer Ziel-DNA in eukaryotischen Zellen oder Organismen entwickelt.

**[0077]** Verglichen mit ZFN und TALEN kann die vorliegende auf Cas-Protein basierende RGEN-Zusammensetzung einfacher maßgeschneidert werden, da nur der synthetische guide-RNA-Bestandteil ausgetauscht wird, um eine neue Genom-Editing-Nuklease zu erzeugen. Es sind keine Subklonierungsschritte beteiligt, um maßgeschneiderte RNA-gesteuerte Endonukleasen zu erzeugen. Darüber hinaus bietet die vergleichsweise geringe Größe des Cas-Gens (zum Beispiel 4,2 kbp für Cas9) verglichen mit einem Paar von TALEN-Genen (~6 kbp) in einigen Anwendungen, wie etwa einem virusvermittelten Gentransfer einen Vorteil für diese RNA-gesteuerte Endonukleasen-Zusammensetzung. Des Weiteren hat diese RNA-gesteuerte Endonuklease keine

Off-Target-Wirkungen und induziert daher keine unerwünschten Mutationen, Deletionen, Inversionen und Duplizierungen. Diese Merkmale machen die vorliegende RNA-gesteuerte Endonuklease-Zusammensetzung zu einem skalierbaren, vielseitigen und bequemen Werkzeug zum Genom-Engineering in eukaryotischen Zellen und Organismen. Außerdem können RGEN so entworfen werden, dass sie jegliche DNA-Sequenz anvisieren; annähernd jeglicher Einzelnukleotidpolymorphismus oder jegliche kleine Insertion/Deletion (Indel) kann über eine RGEN-vermittelte RFLP analysiert werden. Die Spezifität von RGEN wird durch den RNA-Bestandteil, der mit einer Ziel-DNA-Sequenz von bis zu 20 Basenpaaren (bp) Länge hybridisiert, sowie durch das Cas9-Protein bestimmt, das das Protospacer benachbarte Motiv (PAM) erkennt. RGEN lassen sich ohne Weiteres neu programmieren, indem der RNA-Bestandteil ausgetauscht wird. Daher bieten RGEN eine Plattform, um die einfache und robuste RFLP-Analyse für verschiedene Sequenzvariationen zu verwenden.

**[0078]** Die Ziel-DNA kann eine endogene DNA oder eine künstliche DNA sein, vorzugsweise eine endogene DNA.

**[0079]** Wie hier verwendet, bezeichnet der Begriff „Cas-Protein“ eine essenzielle Protein-Komponente im CRISPR/Cas-System, die eine aktive Endonuklease oder Nickase bei Komplexbildung mit zwei RNAs bildet, die mit CRISPR-RNA (crRNA) und trans-aktivierende crRNA (tracrRNA) bezeichnet werden.

**[0080]** Die Informationen auf dem Gen und Protein von Cas sind von der GenBank of National Center for Biotechnology Information (NCBI) ohne Einschränkung erhältlich.

**[0081]** Die für Cas-Proteine codierenden CRISPR-assoziierten(Cas)-Gene sind häufig mit CRISPR-Repeat-Spacer-Anordnungen assoziiert. Es wurden mehr als vierzig verschiedene Cas-Proteinfamilien beschrieben. Von diesen Proteinfamilien scheint Cas1 unter den verschiedenen CRISPR/Cas-Systemen ubiquitär vorzukommen. Es gibt drei Arten von CRISPR-Cas-Systemen. Darunter ist das Typ-II-CRISPR/Cas-System, an dem das Cas9-Protein und crRNA und tracrRNA beteiligt sind, beispielhaft und wohlbekannt. Bestimmte Kombinationen von Cas-Genen und Repeat-Strukturen wurden verwendet, um 8 CRISPR-Unterarten zu definieren (Ecoli, Ypest, Nmeni, Dvulg, Tneap, Hmari, Apern und Mtube).

**[0082]** Das Cas-Protein kann mit einer Proteintransduktionsdomäne verknüpft sein. Die Proteintransduktionsdomäne kann Polyarginin oder ein TAT-Protein sein, das sich von HIV ableitet, ist aber nicht darauf beschränkt.

**[0083]** Die vorliegende Zusammensetzung kann die Cas-Komponente in Form eines Proteins oder in Form einer für das Cas-Protein codierenden Nukleinsäure enthalten.

**[0084]** In der vorliegenden Erfindung kann das Cas-Protein jegliches Cas-Protein sein, vorausgesetzt, dass es bei Komplexbildung mit guide-RNA eine Endonuklease- oder Nickase-Aktivität aufweist.

**[0085]** Vorzugsweise ist das Cas-Protein das Cas9-Protein oder Varianten davon.

**[0086]** Die Variante des Cas9-Proteins kann eine mutierte Form von Cas9 sein, bei der der katalytische Aspartatrest durch jegliche andere Aminosäure ausgetauscht wurde. Vorzugsweise kann die andere Aminosäure Alanin sein, ist aber nicht darauf beschränkt.

**[0087]** Des Weiteren kann das Cas-Protein eines sein, das aus einem Organismus wie etwa Streptococcus sp., vorzugsweise Streptococcus pyogenes isoliert wurde, oder ein rekombinantes Protein sein, ist aber nicht darauf beschränkt. Das aus Streptococcus pyogenes stammende Cas-Protein kann das NGG-Trinukleotid erkennen. Das Cas-Protein kann eine Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 109 umfassen, ist aber nicht darauf beschränkt.

**[0088]** Der Begriff „rekombinant“ bei Verwendung in Bezug auf z. B. eine Zelle, eine Nukleinsäure, ein Protein oder einen Vektor gibt an, dass die Zelle, die Nukleinsäure, das Protein oder der Vektor durch die Einführung einer heterologen Nukleinsäure oder eines heterologen Proteins oder durch die Veränderung der nativen Nukleinsäure oder des nativen Proteins modifiziert wurde oder dass die Zelle von einer solchermaßen modifizierten Zelle abstammt. So kann ein rekombinantes Cas-Protein zum Beispiel erzeugt werden, indem die Cas-Protein-codierende Sequenz unter Verwendung der humanen Codontabelle rekonstituiert wird.

**[0089]** In der vorliegenden Erfindung kann die Cas-Protein-codierende Nukleinsäure eine Form eines Vektors sein, wie etwa ein Plasmid, das eine für Cas codierende Sequenz unter einem Promotor wie etwa CMV oder CAG umfasst. Wenn das Cas-Protein Cas9 ist, kann die Cas9-codierende Sequenz von Streptococcus sp.

abgeleitet sein und vorzugsweise von *Streptococcus pyogenes* abgeleitet sein. Zum Beispiel kann die Cas9-codierende Nukleinsäure die Nukleotidsequenz SEQ ID. NO: 1 umfassen. Darüber hinaus kann die Cas9-codierende Nukleinsäure die Nukleotidsequenz umfassen, die eine Homologie von mindestens 50% mit der Sequenz von SEQ ID NO: 1 aufweist, vorzugsweise mindestens 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98 oder 99% zu SEQ ID NO: 1, ist aber nicht darauf beschränkt. Die Cas9-codierende Nukleinsäure kann die Nukleotidsequenz von SEQ ID. NO: 108, 110, 106 oder 107 umfassen.

**[0090]** Wie hier verwendet, bezeichnet der Begriff „guide-RNA“ eine RNA, die für die Ziel-DNA spezifisch ist und einen Komplex mit dem Cas-Protein bilden und das Cas-Protein zur Ziel-DNA bringen kann. In der vorliegenden Erfindung kann die guide-RNA aus zwei RNAs bestehen, d. h. CRISPR RNA(crRNA) und transaktivierende crRNA(tracrRNA), oder eine einkettige RNA(sgRNA) sein, die aus der Fusion eines essenziellen Teils der crRNA und tracrRNA erzeugt wurde. Die guide-RNA kann eine dualRNA sein, die eine crRNA und eine tracrRNA umfasst. Wenn die guide-RNA den essenziellen Teil von crRNA und tracrRNA und einen zum Ziel komplementären Teil umfasst, kann jegliche guide-RNA in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

**[0091]** Die crRNA kann mit einer Ziel-DNA hybridisiert sein.

**[0092]** Die RGEN kann aus dem Cas-Protein und dualRNA (invariabler tracrRNA und zielspezifischer crRNA) oder dem Cas-Protein und sgRNA (Fusion eines essenziellen Teils der invariablen tracrRNA und der zielspezifischen crRNA) bestehen und durch Austausch von crRNA ohne Weiteres umprogrammiert werden.

**[0093]** Die guide-RNA umfasst des Weiteren ein oder mehrere zusätzliche Nukleotide am 5'-Ende der einkettigen guide-RNA oder der crRNA der dualRNA.

**[0094]** Vorzugsweise umfasst die guide-RNA des Weiteren 2 zusätzliche Guanin-Nukleotide am 5'-Ende der einkettigen guide-RNA oder der crRNA der dualRNA.

**[0095]** Die guide-RNA kann in eine Zelle oder einen Organismus in Form von RNA oder für die guide-RNA codierende DNA überführt werden. Die guide-RNA kann in der Form einer isolierten RNA oder als in einen viralen Vektor eingebaute RNA vorliegen oder in einem Vektor codiert sein. Vorzugsweise kann der Vektor ein viraler Vektor, ein Plasmidvektor oder ein Agrobakterienvektor sein, ist aber nicht darauf beschränkt.

**[0096]** Eine DNA, die für die guide-RNA codiert, kann ein Vektor sein, der eine für die guide-RNA codierende Sequenz umfasst. Zum Beispiel kann die guide-RNA in eine Zelle oder einen Organismus überführt werden, indem die Zelle oder der Organismus mit der isolierten guide-RNA oder Plasmid-DNA transfiziert wird, die eine für die guide-RNA codierende Sequenz und einen Promotor umfasst.

**[0097]** Alternativ kann die guide-RNA in eine Zelle oder einen Organismus überführt werden, indem ein virusvermittelter Gentransfer genutzt wird.

**[0098]** Bei der Transfektion von guide-RNA in Form einer isolierten RNA in eine Zelle oder einen Organismus kann die guide-RNA mittels In-vitro-Transkription unter Verwendung von jeglichem im Stand der Technik bekannten In-vitro-Transkriptionssystem hergestellt werden. Die guide-RNA wird anstelle in Form eines Plasmids, das eine für eine guide-RNA codierende Sequenz umfasst, vorzugsweise in Form von isolierter RNA in eine Zelle überführt. Wie hier verwendet, kann der Begriff „isolierte RNA“ austauschbar sein mit „nackter RNA“. Dies ist kosten- und zeitsparend, da ein Klonierungsschritt nicht erforderlich ist. Jedoch ist die Verwendung von Plasmid-DNA oder eines virusvermittelten Gentransfers zur Transfektion der guide-RNA nicht ausgeschlossen.

**[0099]** Die vorliegende RGEN-Zusammensetzung, die ein Cas-Protein oder eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure und eine guide-RNA umfasst, kann aufgrund der Spezifität der guide-RNA für ein Ziel und einer Endonuklease- oder Nickase-Aktivität des Cas-Proteins eine Ziel-DNA spalten.

**[0100]** Wie hier verwendet, bezeichnet der Begriff „Spaltung“ den Bruch des kovalenten Grundgerüsts eines Nukleotidmoleküls.

**[0101]** In der vorliegenden Erfindung kann eine guide-RNA so hergestellt werden, dass sie für jegliches zu spaltende Ziel spezifisch ist. Daher kann die vorliegende RGEN-Zusammensetzung jegliche Ziel-DNA spalten, indem der zielspezifische Teil der guide-RNA manipuliert oder genotypisiert wird.

**[0102]** Die guide-RNA und das Cas-Protein können als ein Paar arbeiten. Wie hier verwendet, kann der Begriff „gepaarte Cas-Nickase“ die als ein Paar arbeitende guide-RNA und das Cas-Protein bezeichnen. Das Paar umfasst zwei guide-RNAs. Die guide-RNA und das Cas-Protein können als Paar arbeiten und zwei Einzelstrangbrüche an verschiedenen DNA-Strängen induzieren. Die beiden Einzelstrangbrüche können durch mindestens 100 bp getrennt sein, sind aber nicht darauf beschränkt.

**[0103]** In dem Beispiel bestätigten die Erfinder der vorliegenden Erfindung, dass gepaarte Cas-Nickase eine gezielte Mutagenese und große Deletionen von chromosomalen Segmenten von bis zu 1 kbp in humanen Zellen erlaubt. Hervorzuheben ist, dass gepaarte Nickasen keine Indels an Off-Target-Orten induzieren, an denen die korrespondierenden Nukleasen Mutationen induzieren. Darüber hinaus begünstigen gepaarte Nickasen, anders als Nukleasen, unerwünschte Translokationen im Zusammenhang mit Off-Target-DNA-Spaltungen nicht. Grundsätzlich verdoppeln gepaarte Nickasen die Spezifität der Cas9-vermittelten Mutagenese und weiten damit die Nützlichkeit von RNA-gesteuerten Enzymen bei Anwendungen aus, die ein präzises Genom-Editing erfordern, wie etwa eine Gen- und Zelltherapie.

**[0104]** In der vorliegenden Erfindung kann die Zusammensetzung zur Verwendung beim Genotypisieren eines Genoms in den eukaryotischen Zellen oder Organismen *in vitro* verwendet werden.

**[0105]** In einer besonderen Ausführungsform kann die guide-RNA die Nukleotidsequenz von SEQ ID. NO. 1 umfassen, wobei der Teil der Nukleotidposition 3–22 ein zielspezifischer Teil ist und so kann die Sequenz dieses Teils in Abhängigkeit vom Ziel verändert werden.

**[0106]** Wie hier verwendet, kann eine eukaryotische Zelle oder ein eukaryotischer Organismus Hefe, ein Pilz, Protozoen, eine Pflanze, eine höhere Pflanze und ein Insekt oder Amphibienzellen oder Säugetierzellen wie etwa CHO, HeLa, HEK293 und COS-1 sein, zum Beispiel ohne Einschränkung kultivierte Zellen (*in vitro*), gefropfte Zellen oder primäre Zellkulturen (*in vitro* und *ex vivo*) und *in-vivo*-Zellen, und auch Säugetierzellen, die menschliche umfassen, die üblicherweise im Stand der Technik verwendet werden.

**[0107]** In einer besonderen Ausführungsform wurde gefunden, dass Cas9-Protein/einkettige guide-RNA orts-spezifische DNA-Doppelstrangbrüche *in vitro* und in Säugetierzellen erzeugen konnten, deren spontane Reparatur mit hohen Häufigkeiten gezielte Genommutationen induzierte.

**[0108]** Darüber hinaus wurde gefunden, dass durch die Injektion von Cas9-Protein/guide-RNA-Komplexen oder Cas9-mRNA/guide-RNA ein einen Ein-Zell-Stadium-Embryo Gen-Knockout-Mäuse induziert und über die Keimbahn übertragbare Mutationen durch das Cas9/guide-RNA-System erzeugt werden können.

**[0109]** Die Verwendung eines Cas-Proteins anstelle einer das Cas-Protein codierenden Nukleinsäure zur Induktion einer gezielten Mutagenese ist vorteilhaft, da keine exogene DNA in einen Organismus eingeführt wird. So kann die ein Cas-Protein und eine guide-RNA umfassende Zusammensetzung verwendet werden, um Therapeutika oder höherwertige Feldfrüchte, Nutztiere, Geflügel, Fische, Haustiere, usw. zu entwickeln.

**[0110]** Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung stellt die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung zum Induzieren einer gezielten Mutagenese in eukaryotischen Zellen oder Organismen bereit, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst. Außerdem stellt die vorliegende Erfindung die Nutzung einer Zusammensetzung zum Induzieren einer gezielten Mutagenese in eukaryotischen Zellen oder Organismen bereit, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0111]** Eine guide-RNA, eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein sind wie oben beschrieben.

**[0112]** Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung stellt die vorliegende Erfindung ein Kit zum Spalten einer Ziel-DNA oder zum Induzieren einer gezielten Mutagenese in eukaryotischen Zellen oder Organismen bereit, das eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0113]** Eine guide-RNA, eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein sind wie oben beschrieben.

- [0114]** Das Kit kann eine guide-RNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein als separate Bestandteile oder als eine Zusammensetzung enthalten.
- [0115]** Das vorliegende Kit kann zusätzliche Bestandteile umfassen, die zum Überführen der guide-RNA und des Cas-Bestandteils in eine Zelle oder einen Organismus erforderlich sind. Zum Beispiel kann das Kit einen Injektionspuffer wie etwa DEPC-behandelten Injektionspuffer, sowie Material enthalten, das zur Analyse von Mutationen an einer Ziel-DNA erforderlich ist, ist aber nicht darauf beschränkt.
- [0116]** Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Herstellen einer eukaryotischen Zelle oder eines eukaryotischen Organismus bereit, die/der ein Cas-Protein und eine guide-RNA umfasst, wobei das Verfahren einen Schritt der Co-Transfektion oder aufeinanderfolgenden Transfektion der eukaryotischen Zelle oder des Organismus mit einer Cas-Protein-codierenden Nukleinsäure oder einem Cas-Protein und einer guide-RNA oder diese guide-RNA codierenden DNA umfasst.
- [0117]** Eine guide-RNA, eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein sind wie oben beschrieben.
- [0118]** In der vorliegenden Erfindung kann eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein und eine guide-RNA oder DNA, die für die guide-RNA codiert, mittels verschiedener, im Stand der Technik bekannter Verfahren in eine Zelle überführt werden, wie etwa Mikroinjektion, Elektroporation, DEAE-Dextran-Behandlung, Lipofektion, nanopartikelvermittelte Transfektion, Proteintransduktionsdomänen-vermittelte Transduktion, virusvermittelter Gentransfer und PEG-vermittelte Transfektion in Protoplasten und so weiter, dies ist aber nicht darauf beschränkt. Des Weiteren können eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein und eine guide-RNA mittels verschiedener, im Stand der Technik bekannter Verfahren zum Verabreichen eines Gens oder eines Proteins, wie etwa eine Injektion, in einen Organismus überführt werden. Eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein können in der Form eines Komplexes mit einer guide-RNA oder separat in eine Zelle überführt werden. An eine Proteintransduktionsdomäne, wie etwa Tat, fusioniertes Cas-Protein kann ebenfalls effizient in Zellen transferiert werden.
- [0119]** Vorzugsweise wird die eukaryotische Zelle oder der Organismus mit einem Cas9-Protein und einer guide-RNA co-transfiziert oder aufeinanderfolgend transfiziert. Die aufeinanderfolgende Transfektion kann zunächst durch Transfektion mit einer Cas-Protein-codierenden Nukleinsäure, gefolgt von einer zweiten Transfektion mit nackter guide-RNA, erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die zweite Transfektion 3, 6, 12, 18, 24 Stunden danach, dies ist nicht aber darauf beschränkt.
- [0120]** Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine eukaryotische Zelle oder einen eukaryotischen Organismus bereit, die/der eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.
- [0121]** Die eukaryotischen Zellen oder Organismen können hergestellt werden, indem die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfassende Zusammensetzung in die Zelle oder den Organismus überführt wird.
- [0122]** Die eukaryotische Zelle kann Hefe, ein Pilz, Protozoen, eine höhere Pflanze sowie ein Insekt, oder Amphibienzellen oder Säugetierzellen wie etwa CHO, HeLa, HEK293 und COS-1 sein, zum Beispiel ohne Einschränkung kultivierte Zellen (in vitro), gepfropfte Zellen und primäre Zellkulturen (in vitro und ex vivo) und In-vivo-Zellen, und auch Säugetierzellen, die menschliche umfassen, die üblicherweise im Stand der Technik verwendet werden. Des Weiteren kann der Organismus Hefe, ein Pilz, Protozoen, eine Pflanze, höhere Pflanze, ein Insekt, eine Amphibie oder ein Säugetier sein.
- [0123]** Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Spalten einer Ziel-DNA oder zum Induzieren einer gezielten Mutagenese in eukaryotischen Zellen oder Organismen bereit, das einen Schritt umfasst, bei dem eine Zelle oder ein Organismus, die/der eine Ziel-DNA umfasst, mit einer Zusammensetzung behandelt wird, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.
- [0124]** Der Schritt der Behandlung einer Zelle oder eines Organismus mit der Zusammensetzung kann erfolgen, indem die Zusammensetzung, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-

RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst, in die Zelle oder den Organismus überführt wird.

**[0125]** Wie oben beschrieben kann eine solche Überführung mittels Mikroinjektion, Transfektion, Elektroporation und so weiter erfolgen.

**[0126]** Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung stellt die vorliegende Erfindung einen Embryo bereit, der ein Genom umfasst, das durch die vorliegende RGEN-Zusammensetzung editiert wird, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst.

**[0127]** In der vorliegenden Erfindung kann jeglicher Embryo verwendet werden und für die vorliegende Erfindung kann der Embryo ein Maus-Embryo sein. Der Embryo kann erzeugt werden, indem PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) und hCG (humanes Choriongonadotropin) in eine weibliche, 4 bis 7 Wochen alte Maus injiziert wird, und die superovulierte weibliche Maus kann mit Männchen gepaart werden und die befruchteten Embryonen können aus den Eileitern entnommen werden.

**[0128]** Die vorliegende RGEN-Zusammensetzung, die in einen Embryo eingeführt wurde, kann eine Ziel-DNA, die komplementär zur guide-RNA ist, durch die Wirkung des Cas-Proteins spalten und eine Mutation in der Ziel-DNA verursachen. So weist der Embryo, in den die vorliegende RGEN-Zusammensetzung eingeführt wurde, ein editiertes Genom auf.

**[0129]** In einer besonderen Ausführungsform wurde gefunden, dass die vorliegende RGEN-Zusammensetzung eine Mutation in einem Maus-Embryo verursachen kann und dass die Mutation an Nachkommen weitergegeben werden kann.

**[0130]** Ein Verfahren zum Einführen der RGEN-Zusammensetzung in den Embryo kann jegliches im Stand der Technik bekannte Verfahren sein, wie etwa Mikroinjektion, Stammzelleninsertion, Retrovirusinsertion und so weiter. Vorzugsweise kann eine Mikroinjektionstechnik verwendet werden.

**[0131]** Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein genommodifiziertes Tier bereit, das durch Überführen des Embryos, der ein durch die vorliegende RGEN-Zusammensetzung editiertes Genom enthält, in die Eileiter eines Tieres erhalten wird.

**[0132]** In der vorliegenden Erfindung bezieht sich der Begriff „genommodifiziertes Tier“ auf ein Tier, dessen Genom im Embryostadium durch die vorliegende RGEN-Zusammensetzung modifiziert wurde, und die Art des Tieres ist nicht beschränkt.

**[0133]** Das genommodifizierte Tier weist Mutationen auf, die durch eine gezielte Mutagenese basierend auf der vorliegenden RGEN-Zusammensetzung verursacht wurden. Die Mutationen können jegliche aus Deletion, Insertion, Translokation und Inversion sein. Der Ort der Mutation hängt von der Sequenz der guide-RNA der RGEN-Zusammensetzung ab.

**[0134]** Das genommodifizierte Tier mit einer Mutation eines Gens kann zur Bestimmung der Funktion des Gens verwendet werden.

**[0135]** Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines genommodifizierten Tieres bereit, das einen Schritt des Einführens der vorliegenden RGEN-Zusammensetzung, die eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein umfasst, in einen Embryo eines Tieres und einen Schritt des Überführens des Embryos in einen Eileiter einer pseudoschwangeren Amme zum Erzeugen eines genommodifizierten Tieres umfasst.

**[0136]** Der Schritt des Einführens der vorliegenden RGEN-Zusammensetzung kann mittels jeglichem im Stand der Technik bekannten Verfahren erreicht werden, wie etwa Mikroinjektion, Stammzelleninsertion, Retrovirusinsertion und so weiter.

**[0137]** Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung stellt die vorliegende Erfindung eine Pflanze bereit, die aus den genommodifizierten Protoplasten regeneriert wird, die durch das Verfahren für eukaryotische, die RGEN-Zusammensetzung umfassende Zellen hergestellt wurden.

**[0138]** Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung stellt die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung zur Genotypisierung von Mutationen oder Variationen in einer isolierten biologischen Probe bereit, umfassend eine für das Ziel-DNA-Sequenz-Cas-Protein spezifische guide-RNA. Außerdem stellt die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung zur Genotypisierung von Nukleinsäuresequenzen in pathogenen Mikroorganismen in einer isolierten biologischen Probe bereit, umfassend eine für die Ziel-DNA-Sequenz spezifische guide-RNA und ein Cas-Protein.

**[0139]** Eine guide-RNA, eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein sind wie oben beschrieben.

**[0140]** Wie hier verwendet, bezeichnet der Begriff „Genotypisieren“ das „Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus(RFLP)-Assay“.

**[0141]** RFLP kann 1) beim Nachweis von durch die synthetisch hergestellten Nukleasen induzierten Indels in Zellen oder Organismen, 2) bei der Genotypisierung von natürlich auftretenden Mutationen oder Variationen in Zellen oder Organismen oder 3) bei der Genotypisierung von DNA von infizierten pathogenen Mikroorganismen, einschließlich Viren oder Bakterien, usw. verwendet werden.

**[0142]** Die Mutationen oder Variationen können durch synthetisch hergestellte Nukleasen in Zellen induziert sein.

**[0143]** Die synthetisch hergestellte Nuklease kann eine Zinkfingernuklease (ZFN), eine transkriptionsaktivatorartige Effekturnuklease (TALEN) oder RGEN sein, ist aber nicht darauf beschränkt.

**[0144]** Wie hier verwendet, umfasst der Begriff „biologische Probe“ Proben zur Analyse, wie etwa Gewebe, Zellen, Vollblut, Serum, Plasma, Speichel, Sputum, Zerebrospinalflüssigkeit oder Urin, ist aber nicht darauf beschränkt.

**[0145]** Die Mutationen oder Variationen können natürlich auftretende Mutationen oder Variationen sein.

**[0146]** Die Mutationen oder Variationen werden durch die pathogenen Mikroorganismen induziert. Diese Mutationen oder Variationen treten nämlich aufgrund der Infektion mit pathogenen Mikroorganismen auf. Wenn die pathogenen Mikroorganismen nachgewiesen werden, wird die biologische Probe als infiziert identifiziert.

**[0147]** Die pathogenen Mikroorganismen können Viren oder Bakterien sein, sind aber nicht darauf beschränkt.

**[0148]** Synthetisch hergestellte, nukleaseinduzierte Mutationen werden durch verschiedene Verfahren nachgewiesen, die fehlpaarungssensitive Surveyor- oder T7-Endonuklease-I(T7E1)-Assays, RFLP-Analyse, fluoreszierende PCR, DNA-Schmelzanalyse sowie Sanger- und Tiefensequenzierung umfassen. Die T7E1- und Surveyor-Assays werden weithin verwendet, unterschätzen jedoch oftmals die Mutationshäufigkeiten, da die Assays Heteroduplexe nachweisen (die durch Hybridisierung von mutierten und Wildtyp-Sequenzen oder zweier unterschiedlich mutierter Sequenzen gebildet werden); sie versagen beim Nachweis von Homoduplexen, die durch Hybridisierung zweier identisch mutierter Sequenzen gebildet werden. So können diese Assays nicht zwischen homozygoten mutierten Biallel-Klonen und Wildtypzellen oder zwischen heterozygoten Biallel-Mutanten und heterozygoten Monoallel-Mutanten unterscheiden (**Fig. 22**). Außerdem können Sequenzpotymorphismen nahe dem Nuklease-Zielort verwirrende Ergebnisse erzeugen, da die Enzyme Heteroduplexe spalten können, die durch Hybridisierung dieser verschiedenen Wildtyp-Allele gebildet wurden. Die RFLP-Analyse ist von diesen Einschränkungen frei und daher eine Methode der Wahl. Tatsächlich war die RFLP-Analyse eines der ersten Verfahren, um synthetisch hergestellte nukleasevermittelte Mutationen nachzuweisen. Unglücklicherweise wird sie jedoch durch die Verfügbarkeit von geeigneten Restriktionsorten eingeschränkt.

**[0149]** Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung stellt die vorliegende Erfindung ein Kit zur Genotypisierung von Mutationen oder Variationen in einer isolierten biologischen Probe bereit, das die Zusammensetzung zur Genotypisierung von Mutationen oder Variationen in einer isolierten biologischen Probe umfasst. Außerdem stellt die vorliegende Erfindung ein Kit zur Genotypisierung von Nukleinsäuresequenzen in pathogenen Mikroorganismen in einer isolierten biologischen Probe bereit, das eine für die Ziel-DNA-Sequenz spezifische guide-RNA und ein Cas-Protein umfasst.

**[0150]** Eine guide-RNA, eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein sind wie oben beschrieben.

**[0151]** Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Genotypisierung von Mutationen oder Variationen in einer isolierten biologischen Probe unter Verwendung der Zusammensetzung zum Genotypisieren von Mutationen oder Variationen in einer isolierten biologischen Probe bereit. Außerdem stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Genotypisierung von Nukleinsäuresequenzen in pathogenen Mikroorganismen in einer isolierten biologischen Probe bereit, umfassend eine für die Ziel-DNA-Sequenz spezifische guide-RNA und ein Cas-Protein.

**[0152]** Eine guide-RNA, eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein sind wie oben beschrieben.

#### Ausführungsform der Erfindung

**[0153]** Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung ausführlicher mit Bezug auf Beispiele beschrieben. Diese Beispiele dienen jedoch nur der Erläuterung und es ist nicht beabsichtigt, dass die Erfindung durch diese Beispiele eingeschränkt wird.

#### Beispiel 1: Genom-Editing-Assay

##### 1-1. DNA-Spaltungsaktivität des Cas9-Proteins

**[0154]** Zunächst wurde die DNA-Spaltungsaktivität des aus *Streptococcus pyogenes* stammenden Cas9 in Gegenwart oder unter Fehlen einer chimären guide-RNA *in vitro* untersucht.

**[0155]** Dazu wurde ein rekombinantes Cas9-Protein, das in *E. coli* exprimiert und daraus isoliert wurde, zum Spalten einer vorverdauten oder zirkulären Plasmid-DNA verwendet, die die aus 23 Basenpaaren (bp) bestehende menschliche CCR5-Zielsequenz enthielt. Eine Cas9-Zielsequenz besteht aus einer 20-bp-DNA-Sequenz komplementär zu crRNA oder einer chimären guide-RNA und dem an den Protospacer angrenzenden Motiv (protospacer adjacent motif, PAM), einem Trinukleotid (5'-NGG-3'), das von Cas9 selbst erkannt wird (**Fig. 1A**).

**[0156]** Insbesondere wurde die Cas9-Codierungssequenz (4.104 bp), die vom *Streptococcus-pyogenes*-Stamm M1 GAS (NC\_002737, 1) gewonnen wurde, unter Verwendung der menschlichen Codonverwendungstabelle rekonstituiert und unter Verwendung von Oligonukleotiden synthetisiert. Zunächst wurden 1-kb-DNA-Segmente unter Verwendung von überlappenden ~35-mer-Oligonukleotiden und Phusion-Polymerase (New England Biolabs) zusammengesetzt und in einen T-Vektor (SolGent) kloniert. Eine Vollängen-Cas9-Sequenz wurde unter Verwendung von vier 1-kbp-DNA-Segmenten durch Überlappungs-PCR zusammengesetzt. Das Cas9-codierende DNA-Segment wurde in p3s subkloniert, das aus pcDNA3.1 (Invitrogen) gewonnen wurde. In diesem Vektor wurde ein Peptid-Tag (NH<sub>2</sub>-GGSGPPKKRKRKVPYDVPDYA-COOH, SEQ ID NO: 2), das das HA-Epitop und ein Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal, NLS) enthält, an den C-Terminus von Cas9 addiert. Die Expression und Kernlokalisierung des Cas9-Proteins in HEK-293T-Zellen wurde mittels Western Blotting unter Verwendung eines anti-HA-Antikörpers (Santa Cruz) bestätigt.

**[0157]** Dann wurde die Cas9-Kassette in pET28-b(+) subkloniert und in BL21(DE3) transformiert. Die Expression von Cas9 wurde 4 h lang bei 25°C unter Verwendung von 0,5 mM IPTG induziert. Das den Hiso-Tag am C-Terminus enthaltende Cas9-Protein wurde unter Verwendung von Ni-NTA-Agarose-Harz (Qiagen) gereinigt und gegen 20 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM KCl, 1 mM DTT und 10% Glycerin (1) dialysiert. Gereinigtes Cas9 (50 nM) wurde mit Supercoiled oder vorverdauter Plasmid-DNA (300 ng) und chimärer RNA (50 nM) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl in NEB-Puffer 3 1 h lang bei 37°C inkubiert. Verdauter DNA wurde mittels Elektrophorese unter Verwendung von 0,8%igem Agarosegel analysiert. Cas9 spaltete die Plasmid-DNA effizient an der erwarteten Position nur in Gegenwart der synthetischen RNA und spaltete ein die Zielsequenz nicht enthaltendes Kontrollplasmid nicht (**Fig. 1B**).

##### 1-2. DNA-Spaltung durch einen Cas9/guide-RNA-Komplex in menschlichen Zellen

**[0158]** Zur Untersuchung, ob der Cas9/guide-RNA-Komplex die Zielsequenz, die zwischen den RFP- und GFP-Sequenzen in Säugetierzellen eingebaut ist, spalten kann, wurde ein RFP-GFP-Reporter verwendet.

**[0159]** In diesem Reporter ist die GFP-Sequenz out-of-frame mit der RFP-Sequenz fusioniert (2). Das aktive GFP wird nur dann exprimiert, wenn die Zielsequenz durch ortsspezifische Nukleasen gespalten wird, was über eine fehleranfällige Reparatur durch nichthomologes End-Joining (NHEJ) des Doppelstrangbruchs (DSB)

eine Rahmenverschiebung kleiner Insertionen oder Deletionen (Indels) um die Zielsequenz herum verursacht (**Fig. 2**).

**[0160]** Die in dieser Studie verwendeten RFP-GFP-Reporterplasmide wurden wie früher beschrieben konstruiert (2). Oligonukleotide, die Zielorten entsprachen (Tabelle 1), wurden synthetisiert (Macrogen) und hybridisiert. Die hybridisierten Oligonukleotide wurden in einen mit EcoRI und BamHI verdauten Reportervektor ligiert.

**[0161]** HEK-293T-Zellen wurden mit Cas9-codierendem Plasmid (0,8 µg) und dem RFP-GFP-Reporterplasmid (0,2 µg) auf einer 24-Well-Platte unter Verwendung von Lipofectamin 2000 (Invitrogen) co-transfiziert.

**[0162]** In der Zwischenzeit wurde die in vitro transkribierte chimäre RNA wie folgt hergestellt. Die RNA wurde in vitro durch Run-off-Reaktionen unter Verwendung des MEGAshortscript-T7-Kits (Ambion) gemäß dem Handbuch des Herstellers transkribiert. Template für die RNA-in-vitro-Transkription wurden durch Hybridisieren zweier komplementärer Einzelstrang-DNAs oder durch PCR-Amplifizierung erzeugt (Tabelle 1). Transkribierte RNA wurde auf einem 8%igen denaturierenden Harnstoff-PAGE-Gel getrennt. Die RNA enthaltende Gelscheibe wurde ausgeschnitten und in Sondenelutionspuffer überführt. RNA wurde in nukleasefreiem Wasser isoliert, worauf eine Extraktion mit Phenol:Chloroform und mit Chloroform sowie eine Ausfällung mit Ethanol folgte. Die gereinigten RNAs wurden mittels Spektrometrie quantifiziert.

**[0163]** 12 Stunden nach der Transfektion wurde durch In-vitro-Transkription hergestellte chimäre RNA (1 µg) unter Verwendung von Lipofectamin 2000 transfiziert.

**[0164]** 3 Tage nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert und sowohl RFP als auch GFP exprimierende Zellen gezählt.

**[0165]** Es wurde gefunden, dass GFP exprimierende Zellen nur erhalten wurden, wenn die Zellen zunächst mit dem Cas9-Plasmid und dann 12 Stunden später mit der guide-RNA transfiziert wurden (**Fig. 2**), was zeigt, dass RGEN die Ziel-DNA-Sequenz in kultivierten menschlichen Zellen erkennen und spalten konnten. So wurden GFP-exprimierende Zellen durch eine aufeinanderfolgende Transfektion des Cas9-Plasmids und der guide-RNA anstelle einer Co-Transfektion erhalten.

Tabelle 1

[Tabelle 1]

Gen		Sequenz (5' nach 3')	SEQ ID NO.
Zur Konstruktion des Reporterplasmids verwendete Oligonukleotide			
CCR5	V	AATTCATGACATCAATTATTATACATCGGAGGAG	3
	R	GATCCTCCTCCGATGTATAATAATTGATGTCATG	4

Im T7E1-Assay verwendete Primer			
CCR5	V1	CTCCATGGTGCTATAGAGCA	5
	V2	GAGCCAAGCTCTCCATCTAGT	6
	R	GCCCTGTCAAGAGTTGACAC	7
C4BPB	V1	TATTTGGCTGGTTGAAAGGG	8
	R1	AAAGTCATGAAATAAACACACCCA	9
	V2	CTGCATTGATATGGTAGTACCATG	10
	R2	GCTGTTCAATTGCAATGGAATG	11
Zur Amplifizierung der Off-Target-Orte verwendete Primer			
ADCY5	V1	GCTCCCACCTTAGTGCTCTG	12
	R1	GGTGGCAGGAACCTGTATGT	13
	V2	GTCATTGGCCAGAGATGTGGA	14
	R2	GTCCCATGACAGGCGTGTAT	15
KCNJ6	V	GCCTGGCCAAGTTTCAGTTA	16
	R1	TGGAGCCATTGGTTTGCATC	17
	R2	CCAGAATAAGCCGTTTCTGAC	18
CNTNAP2	V1	ATCACCGACAACCAGTTTCC	19
	V2	TGCAGTGCAGACTCTTTCCA	20
	R	AAGGACACAGGGCAACTGAA	21
N/A Chr. 5	V1	TGTGGAACGAGTGGTGACAG	22
	R1	GCTGGATTAGGAGGCAGGATTC	23
	V2	GTGCTGAGAACGCTTCATAGAG	24
	R2	GGACCAAACCACATTCTTCTCAC	25
Zum Nachweis von Chromosomdeletionen verwendete Primer			
Deletion	V	CCACATCTCGTTCTCGGTTT	26
	R	TCACAAGCCCACAGATATTT	27

### 1-3. Gezielte Spaltung von endogenen Genen in Säugetierzellen durch RGEN

**[0166]** Um zu testen, ob RGEN für die gezielte Spaltung von endogenen Genen in Säugetierzellen verwendet werden können, wurde genomische DNA analysiert, die aus unter Verwendung von T7 Endonuklease I (T7E1), einer fehlpaarungssensitiven Endonuklease, die durch die Hybridisierung von Wildtyp- und mutierten DNA-Sequenzen gebildete Heteroduplexe spezifisch erkennt und spaltet, transfizierten Zellen isoliert wurde (3).

**[0167]** Zum Einführen von DSB in Säugetierzellen unter Verwendung von RGEN wurden  $2 \times 10^6$  K562-Zellen mit 20 µg Cas9-codierendem Plasmid transfiziert, wobei das Kit 4D-Nukleofector, SF Cell Line 4D-Nukleofector X, Programm FF-120 (Lonza) gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet wurde. Für dieses Experiment wurden K562-Zellen (ATCC, CCL-243) in RPMI-1640 mit 10% FBS und einer Penicillin/Streptomycin-Mischung (100 U/ml bzw. 100 µg/ml) gezüchtet.

**[0168]** Nach 24 Stunden wurden 10–40 µg der in vitro transkribierten chimären RNA in  $1 \times 10^6$  K562-Zellen nukleofiziert. Die in vitro transkribierte chimäre RNA wurde wie im Beispiel 1–2 beschrieben hergestellt.

**[0169]** Die Zellen wurden zwei Tage nach der RNA-Transfektion aufgefangen und genomische DNA wurde isoliert. Die den Zielort umfassende Region wurde mittels PCR unter Verwendung der in Tabelle 1 beschriebenen Primer amplifiziert. Die Amplifikate wurden dem bereits früher beschriebenen T7E1-Assay unterzogen (3). Zur Sequenzierungsanalyse wurden den genomischen Modifizierungen entsprechende PCR-Produkte gereinigt und unter Verwendung des T-Blunt-PCR-Cloning-Kits (SolGent) in den T-Blunt-Vektor inkloniert. Geclonte Produkte wurden unter Verwendung des M13-Primers sequenziert.

**[0170]** Es wurde festgestellt, dass Mutationen nur dann induziert wurden, wenn die Zellen aufeinanderfolgend mit dem Cas9-codierenden Plasmid und dann mit guide-RNA transfiziert wurden (**Fig. 3**). Mutationshäufigkeiten (Indels (%)) in **Fig. 3A**), die aus den relativen DNA-Bandenintensitäten abgeschätzt wurden, waren von der RNA-Dosierung abhängig und lagen im Bereich von 1,3% bis 5,1%. Die DNA-Sequenzanalyse der PCR-Amplifikate bestätigte die Induzierung der RGEN-vermittelten Mutationen an den endogenen Orten. Am Zielort wurden für die fehleranfällige NHEJ typische Indels und Mikrohomologien beobachtet. Die Mutationshäufigkeit, die durch direkte Sequenzierung gemessen wurde, betrug 7,3% (= 7 mutierte Klone/96 Klone), was auf einer Stufe mit durch Zinkfinger-nukleasen (ZFN) oder transkriptionsaktivatorähnlichen Effektor-nukleasen (TALEN) erhaltenen ist.

**[0171]** Um die Mutationen in den Zellen zu induzieren, war eine aufeinanderfolgende Transfektion von Cas9-Plasmid und guide-RNA erforderlich. Aber wenn Plasmide, die guide-RNA codieren, war eine aufeinanderfolgende Transfektion unnötig und die Zellen wurden mit dem Cas9-Plasmid und guide-RNA-codierendem Plasmid co-transfiziert.

**[0172]** In der Zwischenzeit wurden erfolgreich sowohl ZFN als auch TALEN entwickelt, um das menschliche CCR5-Gen zu spalten (3–6), das einen G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptor codiert, einen essenziellen Co-Rezeptor der HIV-Infektion. Eine CCR5-spezifische ZFN wird in den USA derzeit klinisch zur Behandlung von AIDS geprüft (7). Diese ZFN und TALEN haben jedoch Off-Target-Wirkungen, einschließlich sowohl lokaler Mutationen an Orten, deren Sequenzen homolog zur On-Target-Sequenz sind (6, 8–10), als auch Genomumlagerungen, die aus der Reparatur zweier gleichzeitiger DSB resultieren, die an On-Target- und Off-Target-Orten induziert werden (11–12). Die augenfälligsten Off-Target-Orte, die mit diesen CCR5-spezifischen, synthetisch hergestellten Nukleasen einhergehen, liegen in dem CCR2-Locus, der eine enge Homologie mit CCR5 aufweist und sich 15 kpb oberhalb von CCR5 befindet. Um Off-Target-Mutationen im CCR2-Gen und unerwünschte Deletionen, Inversionen und Duplizierungen des 15-kbp-Chromosomsegments zwischen dem CCR5-On-Target- und dem CCR2-Off-Target-Ort zu vermeiden, wählten die Erfinder dieser Erfindung absichtlich den Zielort unseres CCR5-spezifischen RGEN, um eine Region innerhalb der CCR5-Sequenz zu erkennen, die keine offensichtliche Homologie mit der CCR2-Sequenz aufweist.

**[0173]** Die Erfinder der vorliegenden Erfindung untersuchten, ob das CCR5-spezifische RGEN Off-Target-Wirkungen aufweist. Dazu suchten wir potenzielle Off-Target-Orte im menschlichen Genom, indem wir Orte identifizierten, die die größte Homologie mit der beabsichtigten 23-bp-Zielsequenz aufwiesen. Wie erwartet, wurden im CCR2-Gen keinerlei derartige Orte gefunden. Stattdessen wurden vier Orte gefunden, von denen jeder 3 Basenfehlpaarungen mit dem On-Target-Ort aufwies (**Fig. 4A**). Die T7E1-Assays zeigten, dass an diesen Orten keine Mutationen nachgewiesen wurden (Assayempfindlichkeit ~0,5%), was die ausgezeichneten Spezifitäten der RGEN belegt (**Fig. 4B**). Darüber hinaus wurde PCR verwendet, um die Induktion von chromosomalen Deletionen in Zellen nachzuweisen, die separat mit ZFN und für CCR5 spezifische RGEN codierenden Plasmiden transfiziert wurden. Während ZFN Deletionen induzierte, tat RGEN dies nicht (**Fig. 4C**).

**[0174]** Anschließend wurden die RGEN neu programmiert, indem die CCR5-spezifische guide-RNA durch eine neu synthetisierte RNA ausgetauscht wurde, die entworfen wurde, um das menschliche C4BPB-Gen gezielt anzusprechen, das für die Beta-Kette des C4b-bindenden Proteins, eines Transkriptionsfaktors, codiert. Dieses RGEN induzierte mit hoher Häufigkeit Mutationen am chromosomalen Zielort in K562-Zellen (**Fig. 3B**). Die durch das T7E1-Assay und direkte Sequenzierung gemessenen Mutationshäufigkeiten betrugen 14% bzw. 8,3% (= 4 mutierte Klone/48 Klone). Von den vier mutierten Sequenzen enthielten zwei Klone eine Ein-Basen- oder Zwei-Basen-Insertion genau am Spaltungsort, ein Muster, das auch am CCR5-Zielort beobachtet wurde. Diese Ergebnisse zeigten, dass RGEN in Zellen die chromosomale Ziel-DNA an den erwarteten Positionen spalten.

#### Beispiel 2: Durch proteinische RGEN vermitteltes Genom-Editing

**[0175]** RGEN können in vielen verschiedenen Formen in Zellen eingeführt werden. RGEN bestehen aus einem Cas9-Protein, crRNA und tracrRNA. Die beiden RNA können fusioniert werden, um eine einkettige guide-RNA (sgRNA) zu bilden. Ein Plasmid, das Cas9 unter einem Promotor wie etwa CMV oder CAG codiert, kann in Zellen transfiziert werden. crRNA, tracrRNA oder sgRNA können unter Verwendung von diese RNAs codierenden Plasmiden ebenfalls in Zellen exprimiert werden. Die Verwendung von Plasmiden führt jedoch häufig zur Integration des gesamten oder eines Teils der Plasmide in das Wirtsgenom. In der Plasmid-DNA eingebaute bakterielle Sequenzen können in vivo unerwünschte Immunreaktionen verursachen. Zellen, die zur Zelltherapie mit einem Plasmid transfiziert wurden, oder von DNA-transfizierten Zellen abstammende Tiere und Pflanzen müssen vor der Marktzulassung in den meisten entwickelten Ländern ein kostspieliges und

langwieriges Zulassungsverfahren durchlaufen. Darüber hinaus kann Plasmid-DNA mehrere Tage nach der Transfektion in den Zellen bestehen bleiben, was die Off-Target-Wirkungen von RGEN verschlimmert.

**[0176]** Hier nutzten wir ein rekombinantes Cas9-Protein, das mit in vitro transkribierter guide-RNA komplexiert war, um eine gezielte Spaltung von endogenen Genen in menschlichen Zellen zu induzieren. Das rekombinante Cas9-Protein, das mit dem Hexa-Histidin-Tag fusioniert war, wurde in *E. coli* exprimiert und unter Verwendung von herkömmlicher Ni-Ionenaffinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigt. Das gereinigte rekombinante Cas9-Protein wurde in Lagerungspuffer (20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM DTT und 10% Glycerin) konzentriert. Der Cas9-Protein/sgRNA-Komplex wurde mittels Nukleofektion direkt in K562-Zellen eingeführt:  $1 \times 10^6$  K562-Zellen wurden mit 22,5–225 (1,4–14  $\mu$ M) Cas9-Protein, vermischt mit 100  $\mu$ g (29  $\mu$ M) in vitro transkribierter sgRNA (oder crRNA 40  $\mu$ g und tracrRNA 80  $\mu$ g) in 100  $\mu$ l Lösung, unter Verwendung des Kits 4D-Nukleofector, SF Cell Line 4D-Nukleofector X, Program FF-120 (Lonza) gemäß des Protokolls des Herstellers transfiziert. Nach der Nukleofektion wurden die Zellen in 6-Well-Platten in Wachstumsmedium gegeben und 48 h lang inkubiert. Bei der Transfektion von  $2 \times 10^5$  K562-Zellen mit einem 1/5-Verkleinerungsprotokoll wurden 4,5–45  $\mu$ g Cas9-Protein, vermischt mit 6–60  $\mu$ g in vitro transkribierter sgRNA (oder crRNA 8  $\mu$ g und tracrRNA 16  $\mu$ g) verwendet und in 20  $\mu$ l Lösung nukleofiziert. Nukleofizierte Zellen wurden dann in 48-Well-Platten in Wachstumsmedium gegeben. Nach 48 h wurden die Zellen aufgefangen und genomische DNA wurde isoliert. Die den Zielort überspannende genomische DNA-Region wurde mittels PCR amplifiziert und dem T7E1-Assay unterzogen.

**[0177]** Wie in **Fig. 10** gezeigt, induzierte der Cas9-Protein/sgRNA-Komplex Mutationen am CCR5-Locus mit Häufigkeiten im Bereich von 4,8 bis 38% auf eine von der sgRNA- oder Cas9-Protein-Dosis abhängigen Weise und übereinstimmend mit der Häufigkeit, die mit einer Cas9-Plasmidtransfektion erhalten wird (45%). Der Cas9-Protein/crRNA/tracrRNA-Komplex war in der Lage, Mutationen mit einer Häufigkeit von 9,4% zu induzieren. Das Cas9-Protein allein induzierte jedoch keinerlei Mutationen. Bei Transfektion von  $2 \times 10^5$  Zellen mit um 1/5 verringerten Dosen von Cas9-Protein und sgRNA lagen die Mutationshäufigkeiten am CCR5-Locus auf eine dosisabhängige Weise im Bereich von 2,7 bis 57%, was mehr ist, als durch eine Co-Transfektion mit Cas9-Plasmid und sgRNA-Plasmid erhalten wird (32%).

**[0178]** Wir untersuchten auch den Cas9-Protein/sgRNA-Komplex, der das ABCC11-Gen anvisiert, und fanden, dass dieser Komplex Indels mit einer Häufigkeit von 35% induzierte, was den allgemeinen Nutzen dieses Verfahrens belegt.

Tabelle 2

[Tabelle 2]

## Sequenzen von guide-RNA

Ziel	RNA-Typ	RNA-Sequenz (5' nach 3')	Länge	SEQ ID NO.
CCR5	sgRNA	GGUGACAUCAAUUUAUUAACAUGUUUUAGAGC UAGAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU	104 bp	28
		GCUUUUUUU		
	crRNA	GGUGACAUCAAUUUAUUAACAUGUUUUAGAGC UAUGCUGUUUUUG	44 bp	29
	tracrRNA	GGAACCAUCAAACAGCAUAGCAAGUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	86 bp	30

## Beispiel 3: RNA-gesteuertes Genom-Editing bei Mäusen

**[0179]** Um das Gen-Targeting-Potenzial von RGEN bei Mausembryonen im pronukleären (PN) Stadium zu untersuchen, wurden das Forkhead-Box-N1(Foxn1)-Gen, das für die Entwicklung des Thymus und die Kerati-

nozytendifferenzierung wichtig ist (Nehls et al., 1996), und das Proteinkinase-DNA-aktivierte-katalytische-Polypeptid(Prkdc)-Gen, das für ein für DNA-DSB-Reparatur und Rekombination kritisches Enzym codiert, verwendet (Taccioli et al., 1998).

**[0180]** Um die Genom-Editing-Aktivität des Foxn1-RGEN zu bewerten, injizierten wir Cas9-mRNA (10. ng/µl-Lösung) mit verschiedenen Dosen der sgRNA (**Fig. 5a**) in das Zytoplasma von Mäuseembryonen im PN-Stadium und führten T7-Endonuklease-I(T7E1)-Assays (Kim et al. 2009) unter Verwendung von genomischer DNA durch, die von in vitro kultivierten Embryonen erhalten wurde (**Fig. 6a**).

**[0181]** Alternativ injizierten wir die RGEN direkt in Form des rekombinanten Cas9-Proteins (0,3 bis 30 ng/µl), das mit dem zweifachen molaren Überschuss von Foxn1-spezifischer sgRNA (0,14 bis 14 ng/µl) komplexiert war, in das Zytoplasma oder den Pronukleus von Ein-Zell-Mausembryonen und analysierten die Mutationen im Foxn1-Gen unter Verwendung von in vitro kultivierten Embryonen (**Fig. 7**).

**[0182]** Genauer gesagt wurden Cas9-mRNA und sgRNAs in vitro aus linearen DNA-Templaten unter Verwendung des mMESSAGE-mMACHINE-T7-Ultra-Kits (Ambion) bzw. des MEGAshortscript-T7-Kits (Ambion) entsprechend den Anweisungen des Herstellers synthetisiert und mit geeigneten Mengen von mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, Sigma) behandeltem Injektionspuffer (0,25 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7,4) verdünnt. Template für die sgRNA-Synthese wurden unter Verwendung der in Tabelle 3 aufgeführten Oligonukleotide erzeugt. Rekombinantes Cas9-Protein wurde von ToolGen, Inc. erhalten.

Tabelle 3

[Tabelle 3]

RNA-Bezeichnung	Richtung	Sequenz (5' nach 3')	SEQ ID NO.
Foxn1 Nr. 1 sgRNA	V	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGG</u> CAGTCTGACGTCACACTTCCGTTTTAGAGCTAGAAATA	31

		GCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG	
Foxn1 Nr. 2 sgRNA	V	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGG</u> ACTTCCAGGCTCCACCCGACGTTTTAGAGCTAGAAATA GCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG	32
Foxn1 Nr. 3 sgRNA	V	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGG</u> CCAGGCTCCACCCGACTGGAGTTTTAGAGCTAGAAATA GCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG	33
Foxn1 Nr. 4 sgRNA	V	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGG</u> ACTGGAGGGCGAACCCCAAGGTTTTAGAGCTAGAAATA GCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG	34
Foxn1 Nr. 5 sgRNA	V	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGG</u> ACCCCAAGGGGACCTCATGCGTTTTAGAGCTAGAAATA GCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG	35
Prkdc Nr. 1 sgRNA	V	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGG</u> TTAGTTTTTCCAGAGACTT <u>GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGT</u> <u>CCG</u>	36
Prkdc Nr. 2 sgRNA	V	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGG</u> TTGGTTTGCTTGTTTATC <u>GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGT</u> <u>CCG</u>	37
Prkdc Nr. 3 sgRNA	V	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGG</u> CACAAGCAAACCAAAGTCTCGTTTTAGAGCTAGAAATA GCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG	38
Prkdc Nr. 4 sgRNA	V	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGG</u> CCTCAATGCTAAGCGACTTCGTTTTAGAGCTAGAAATAG CAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG	39

**[0183]** Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Korean Food and Drug Administration (KFDA) durchgeführt. Protokolle wurden von den Institutional Animal Care and Use Committees (IACUC) des Laboratory Animal Research Center an der Yonsei University überprüft und zugelassen (Zulassungsnummer: 2013-0099). Alle Mäuse wurden in einer besonderen pathogenfreien Einrichtung des Yonsei Laboratory Animal Research Center gehalten. Als Embryonendonoren bzw. Ammen wurden FVB/NTac (Taconic) und ICR-Mausstämme verwendet. Weibliche FVB/NTac-Mäuse (im Alter von 7–8 Wochen) wurden durch intraperitoneale Injektionen von 5 IU Serumgonadotropin trächtiger Stuten (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG, Sigma) und 5 IU humanem Choriongonadotropin (hCG, Sigma) in 48-Stunden-Intervallen superovuliert. Die superovulierten weiblichen Mäuse wurden mit männlichen FVB/NTac-Zuchtmäusen gepaart und befruchtete Embryonen wurden aus den Eileitern gewonnen.

**[0184]** In das Zytoplasma von befruchteten Eiern mit gut erkennbaren Pronuklei wurden unter Verwendung eines piezogetriebenen Mikromanipulators (Prime Tech) Cas9-mRNA und sgRNAs in M2-Medium (Sigma) injiziert.

**[0185]** Bei der Injektion von rekombinantem Cas9-Protein wurde der Cas9-Protein:Foxn1-sgRNA-Komplex mit DEPC-behandeltem Injektionspuffer (0,25 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7,4) verdünnt und in männliche Pronuklei unter Verwendung eines TransferMan-NK2-Mikromanipulators und eines FemtoJet-Mikroinjektors (Eppendorf) injiziert. Die manipulierten Embryonen wurden in die Eileiter von pseudoschwangeren Ammen überführt, um lebende Tiere zu erzeugen, oder wurden für weitere Analysen in vitro kultiviert.

**[0186]** Um F0-Mäuse und in vitro kultivierte Mausembryonen mit RGEN-induzierten Mutationen zu screenen, wurden wie vorher beschrieben T7E1-Assays unter Verwendung von genomischen DNA-Proben aus Schwanzbiopsien und Lysaten der vollständigen Embryonen durchgeführt (Cho et al., 2013).

**[0187]** Kurz gesagt wurde die den RGEN-Zielort umfassende genomisch Region mittels PCR amplifiziert, geschmolzen und rehybridisiert, um Heteroduplex-DNA zu bilden, die mit T7-Endonuklease 1 (New England Biolabs) behandelt und dann mittels Agarosegelelektrophorese analysiert wurde. Potenzielle Off-Target-Orte wurden durch eine Suche mit Bowtie 0.12.9 identifiziert und wurden ebenfalls auf ähnliche Weise mittels T7E1-Assays überwacht. Die in diesen Assays verwendeten Primer-Paare sind in den Tabellen 4 und 5 aufgeführt.

Tabelle 4

[Tabelle 4]

Im T7E1-Assay verwendete Primer

Gen	Richtung	Sequenz (5' nach 3')	SEQ ID NO.
Foxn1	V1	GTCTGTCTATCATCTCTTCCCTTCTCTCC	40
	V2	TCCCTAATCCGATGGCTAGCTCCAG	41
	R1	ACGAGCAGCTGAAGTTAGCATGC	42
	R2	CTACTCAATGCTCTTAGAGCTACCAGGCTTGC	43
Prkdc	V	GACTGTTGTGGGGAGGGCCG	44
	V2	GGGAGGGCCGAAAGTCTTATTTG	45
	R1	CCTGAAGACTGAAGTTGGCAGAAGTGAG	46
	R2	CTTAGGGCTTCTTCTCTACAATCACG	47

Tabelle 5

[Tabelle 5]

Zur Amplifizierung der Off-Target-Orte verwendete Primer

Gen	Notation	Richtung	Sequenz (5' nach 3')	SEQ ID NO
Foxn1	off 1	V	CTCGGTGTGTAGCCCTGAC	48
		R	AGACTGGCCTGGAACCTCACAG	49
	off 2	V	CACTAAAGCCTGTCAGGAAGCCG	50
		R	CTGTGGAGAGCACACAGCAGC	51
	off 3	V	GCTGCGACCTGAGACCATG	52
		R	CTTCAATGGCTTCTCTGCTTAGGCTAC	53
	off 4	V	GGTTCAGATGAGGCCATCCTTTC	54
		R	CCTGATCTGCAGGCTTAACCCTTG	55
Prkdc	off 1	V	CTCACCTGCACATCACATGTGG	56
		R	GGCATCCACCCTATGGGGTC	57
	off 2	V	GCCTTGACCTAGAGCTTAAAGAGCC	58
		R	GGTCTTGTTAGCAGGAAGGACTG	59
	off 3	V	AAAACCTCTGCTTGATGGGATATGTGGG	60
		R	CTCTCACTGGTTATCTGTGCTCCTTC	61
	off 4	V	GGATCAATAGGTGGTGGGGGATG	62
		R	GTGAATGACACAATGTGACAGCTTCAG	63
	off 5	V	CACAAGACAGACCTCTCAACATTCAGTC	64
		R	GTGCATGCATATAATCCATTCTGATTGCTCTC	65
	off 6	V1	GGGAGGCAGAGGCAGGT	66
		V2	GGATCTCTGTGAGTTTGAGGCCA	67
R1		GCTCCAGAACCTCACTCTTAGGCTC	68	

**[0188]** Durch das T7E1-Assay identifizierte Mutanten-Gründertiere wurden weiter mittels fPCR analysiert. Geeignete Regionen der genomischen DNA wurden wie früher beschrieben sequenziert (Sung et al., 2013). Zur routinemäßigen PCR-Genotypisierung von F1-Abkömmlingen wurden die folgenden Primerpaare sowohl für die Wildtyp- als auch die mutierten Allele verwendet: 5'-CTACTCCCTCCGCAGTCTGA-3' (SEQ ID NO: 69) und 5'-CCAGGCCTAGGTTCCAGGTA-3' (SEQ ID NO: 70) für das Foxn1-Gen, 5'-CCCCAGCATTGCAGATTTCC-3' (SEQ ID NO: 71) und 5'-AGGGCTTCTTCTCTACAATCACG-3' (SEQ ID NO: 72) für das Prkdc-Gen.

**[0189]** Im Falle der Injektion von Cas9-mRNA waren die Mutantenanteile (die Anzahl mutierter Embryonen/Anzahl gesamter Embryonen) dosisabhängig und lag im Bereich von 33% (1 ng/μl sgRNA) bis 91% (100 ng/μl) (Fig. 6b). Sequenzanalysen bestätigten die Mutationen im Foxn1-Gen; die meisten Mutationen waren kleine Deletionen (Fig. 6c), die an solche erinnerten, die durch ZFN und TALEN eingeführt werden (Kim et al., 2013).

**[0190]** Bei der Injektion von Cas9-Protein beeinflussten diese Injektionsdosen und Verfahren das Überleben und die Entwicklung der Mausembryonen in vitro kaum: Über 70% der RGEN-injizierten Embryonen schlüpften in beiden Experimenten normal. Wiederum waren die mit Cas9-Protein-Injektionen erhaltenen mutierten Anteile dosisabhängig und erreichten bei der höchsten Dosis über Pronukleus-Injektion 88% und bei Injektion ins Zytoplasma bis zu 71% (Fig. 7a und Fig. 7b). Ähnlich wie die durch Cas9-mRNA plus sgRNA induzierten Mutationsmuster (Fig. 6c) bestanden die durch den Cas9-Protein-sgRNA-Komplex induzierten im Wesentlichen aus kleinen Deletionen (Fig. 7c). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass RGEN eine hohe Gen-Targeting-Aktivität in Mausembryonen aufweisen.

**[0191]** Ermutigt durch die durch RGEN induzierten hohen Mutationshäufigkeiten und geringe Zytotoxizität erzeugten wir lebende Tiere, indem wir die Mausembryonen in die Eileiter von pseudoschwangeren Ammen überführten.

**[0192]** Bemerkenswerterweise waren die Geburtenraten sehr hoch; sie lagen in einem Bereich von 58% bis 73% und wurden durch zunehmende Dosen von Foxn1-sgRNA nicht beeinflusst (Tabelle 6).

Tabelle 6

[Tabelle 6]

## RGEN-vermitteltes Gen-Targeting in FVB/NTac-Mäusen

Zielgen	Cas9-mRNA + sgRNA (ng/µl)	Injizierte Embryonen	Überführte Embryonen (%)	Neugeborene gesamt (%)	Lebende Neugeborene * (%)	Gründertiere † (%)
Foxn1	10 + 1	76	62 (82)	45 (73)	31 (50)	12 (39)
	10 + 10	104	90 (87)	52 (58)	58 (64)	33 (57)
	10 + 100	100	90 (90)	62 (69)	58 (64)	54 (93)
	Gesamt	280	242 (86)	159 (66)	147 (61)	99 (67)
Prkdc	50 + 50	73	58 (79)	35 (60)	33 (57)	11 (33)
	50 + 100	79	59 (75)	22 (37)	21 (36)	7 (33)
	50 + 250	94	73 (78)	37 (51)	37 (51)	21 (57)
	Gesamt	246	190 (77)	94 (49)	91 (48)	39 (43)

**[0193]** Von 147 Neugeborenen erhielten wir 99 mutierte Gründertier-Mäuse. In Übereinstimmung mit den bei kultivierten Embryonen beobachteten Ergebnissen (**Fig. 6b**) waren die Mutantenanteile proportional zur Dosis von Foxn1-sgRNA und erreichten bis zu 93% (100 ng/µl Foxn1-sgRNA) (Tabellen 6 und 7, **Fig. 5b**).

Tabelle 7

[Tabelle 7]

**[0194]** DNA-Sequenzen von mutierten Foxn1-Allelen, die aus einer Untergruppe von T7E1-positiven Mutanten-Gründertieren identifiziert wurden.

ACTTCCAGGCTCCACCCGACTGGAGGGCGAACCCCAAGG GGACCTCATGCAGG	del+ins	Nr.	Gründertier -Mäuse
ACTTCCAGGC----- AACCCCAAGGGGACCTCATGCAGG	Δ19	1	20
ACTTCCAGGC----- GAACCCCAAGGGGACCTCATGCAGG	Δ18	1	115
ACTTCCAGGCTCC-----	Δ60	1	19
ACTTCCAGGCTCC-----	Δ44	1	108
ACTTCCAGGCTCC----- CAAGGGGACCTCATGCAGG	Δ21	1	64
ACTTCCAGGCTCC----- TTAGGAGGGCGAACCCCAAGGGGACCTCA	Δ12+6	1	126
ACTTCCAGGCTCCACC-----TCATGCAGG	Δ28	1	5
ACTTCCAGGCTCCACCC----- CCAAGGGACCTCATG	Δ21+4	1	61
ACTTCCAGGCTCCACCC----- AAGGGGACCTCATGCAGG	Δ18	2	95, 29
ACTTCCAGGCTCCACCC----- CAAGGGGACCTCATGCAGG	Δ17	7	12, 14, 27, 66, 108, 114, 126
ACTTCCAGGCTCCACCC----- ACCCAAGGGGACCTCATGCAG	Δ15+1	1	32
ACTTCCAGGCTCCACCC----- CACCCAAGGGGACCTCATGCA	Δ15+2	1	124
ACTTCCAGGCTCCACCC----- ACCCAAGGGGACCTCATGCAGG	Δ13	1	32
ACTTCCAGGCTCCACCC----- GGCGAACCCCAAGGGGACCTCATGCAGG	Δ8	1	110
ACTTCCAGGCTCCACCCT----- GGGGACCTCATGCAGG	Δ20+1	1	29
ACTTCCAGGCTCCACCCG----- AACCCCAAGGGGACCTCATGCAGG	Δ11	1	111

ACTTCCAGGCTCCACCCGA----- ACCTCATGCAGG	$\Delta 22$	1	79
ACTTCCAGGCTCCACCCGA----- GGGGACCTCATGCAGG	$\Delta 18$	2	13, 127
ACTTCCAGGCTCCACCCCA----- AGGGGACCTCATGCAGG	$\Delta 17$	1	24
ACTTCCAGGCTCCACCCGA----- ACCCCAAGGGGACCTCATGCAGG	$\Delta 11$	5	14, 53, 58, 69, 124
ACTTCCAGGCTCCACCCGA----- GACCCCAAGGGGACCTCATGCAGG	$\Delta 10$	1	14
ACTTCCAGGCTCCACCCGA----- GGGCGAACCCCAAGGGGACCTCATGCAGG	$\Delta 5$	3	53, 79, 115
ACTTCCAGGCTCCACCCGAC----- CTCATGCAGG	$\Delta 23$	1	108
ACTTCCAGGCTCCACCCGAC----- CCCAAGGGGACCTCATGCAGG	$\Delta 11$	1	3
ACTTCCAGGCTCCACCCGAC----- GAAGGGCCCAAGGGGACCTCA	$\Delta 11+6$	1	66
ACTTCCAGGCTCCACCCGAC----- GAACCCCAAGGGGACCTCATGCAGG	$\Delta 8$	2	3, 66
ACTTCCAGGCTCCACCCGAC----- GGCGAACCCCAAGGGGACCTCATGCAGG	$\Delta 5$	1	27
ACTTCCAGGCTCCACCCGAC-- GTGCTTGAGGGCGAACCCCAAGGGGACCTCA	$\Delta 2+6$	2	5
ACTTCCAGGCTCCACCCGACT----- CACTATCTTCTGGGCTCCTCCATGTC	$\Delta 6+25$	2	21, 114
ACTTCCAGGCTCCACCCGACT---- TGGCGAACCCCAAGGGGACCTCATGCAG	$\Delta 4+1$	1	53
ACTTCCAGGCTCCACCCGACT-- TGCAGGGCGAACCCCAAGGGGACCTCATGC	$\Delta 2+3$	1	126
ACTTCCAGGCTCCACCCGACTTGGAGGGCGAACCCCAAGG GGACCTCATGCAG	+1	15	3, 5, 12, 19, 29, 55, 56, 61, 66, 68, 81, 108, 111, 124, 127
ACTTCCAGGCTCCACCCGACTTTGGAGGGCGAACCCCAAG	+2	2	79, 120

GGGACCTCATGCA			
ACTTCCAGGCTCCACCCGACTGTTGGAGGGCGAACCCCAA GGGGACCTCATGC	+3	1	55
ACTTCCAGGCTCCACCCGACTGGAG(+455)GGCGAACCCC AAGGGGACCTCC	+455	1	13

**[0195]** Zur Erzeugung von Mäusen, bei denen Prkdc das Ziel ist, verabreichten wir eine 5-fach höhere Konzentration von Cas9-mRNA (50 ng/ $\mu$ l) mit zunehmenden Dosen von Prkdc-sgRNA (50, 100 und 250 ng/ $\mu$ l).

Wiederum waren die Geburtenraten sehr hoch; sie lagen im Bereich von 51% bis 60%, was zur Erzeugung einer ausreichenden Anzahl von Neugeborenen für die Analyse genügte (Tabelle 6). Der Mutantenanteil betrug bei der Maximaldosis von Prkdc-sgRNA 57% (21 Mutanten-Gründertiere unter 37 Neugeborenen). Diese mit RGEN erhaltenen Geburtenraten waren rund 2 bis 10 Mal höher als die mit TALEN, die in unserer vorherigen Studie berichtet wurden (Sung et al., 2013). Diese Ergebnisse zeigen, dass RGEN wirkungsvolle Gen-Targeting-Reagenzien mit minimaler Toxizität sind.

**[0196]** Um die Keimbahn-Übertragung der mutierten Allele zu testen, kreuzten wir das Foxn1-Mutanten-Gründertier Nr. 108, ein Mosaik mit vier verschiedenen Allelen (**Fig. 5c** und **Tabelle 8**), mit Wildtyp-Mäusen und überwachten die Genotypen der F1-Nachkommen.

Tabelle 8

[Tabelle 8]

## Genotypen von Foxn1-Mutantenmäusen

Gründertier Nr.	sgRNA (ng/ml)	Genotypisierungszusammenfassung	Nachgewiesene Allele
58*	1	nicht bestimmt	$\Delta 11$
19	100	biallel	$\Delta 60/+ 1$
20	100	biallel	$\Delta 67/\Delta 19$
13	100	biallel	$\Delta 18/+455$
32	10	biallel (heterozygot)	$\Delta 13/\Delta 15 + 1$
115	10	biallel (heterozygot)	$\Delta 18/\Delta 5$
111	10	biallel (heterozygot)	$\Delta 11/+1$
110	10	biallel (homozygot)	$\Delta 8/\Delta 8$
120	10	biallel (homozygot)	+2/+2
81	100	heterozygot	+1/WT
69	100	homozygot	$\Delta 11/\Delta 11$
55	1	Mosaik	$\Delta 18/\Delta 1/+1/+3$
56	1	Mosaik	$\Delta 127/\Delta 41/\Delta 2/+1$
127	1	Mosaik	$\Delta 18/+1/WT$
53	1	Mosaik	$\Delta 11/\Delta 5/\Delta 4/+1/WT$
27	10	Mosaik	$\Delta 17/\Delta 5/WT$
29	10	Mosaik	$\Delta 18/\Delta 20/+1/+1$
95	10	Mosaik	$\Delta 18/\Delta 14/\Delta 8/\Delta 4$
108	10	Mosaik	+1/ $\Delta 17/\Delta 23/\Delta 44$
114	10	Mosaik	$\Delta 17/\Delta 8/\Delta 6+25$
124	10	Mosaik	$\Delta 11/\Delta 15+2/+1$
126	10	Mosaik	$\Delta 17/\Delta 2+3/\Delta 12+6$
12	100	Mosaik	$\Delta 30/\Delta 28/\Delta 17/+1$
5	100	Mosaik	$\Delta 28/\Delta 11/\Delta 2+6/+1$
14	100	Mosaik	$\Delta 17/\Delta 11/\Delta 10$
21	100	Mosaik	$\Delta 127/\Delta 41/\Delta 2/\Delta 6+25$
24	100	Mosaik	$\Delta 17/+1/WT$
64	100	Mosaik	$\Delta 31/\Delta 21/+1/WT$

68	100	Mosaik	$\Delta 17/\Delta 11/+1/WT$
79	100	Mosaik	$\Delta 22/\Delta 5/+2/WT$
61	100	Mosaik	$\Delta 21+4/\Delta 6/+1/+9$
66**	100	Mosaik	$\Delta 17/\Delta 8/\Delta 11+6/+1/WT$
3	100	Mosaik	$\Delta 11/\Delta 8/+1$

Unterstrichene Allele wurden sequenziert.

Allele in Rot wurden mittels Sequenzierung, nicht aber mittels fPCR nachgewiesen.

\* Nur ein Klon sequenziert.

\*\* Nicht bestimmt mittels fPCR.

**[0197]** Wie erwartet waren alle Abkömmlinge heterozygote Mutanten, die das Wildtyp-Allel und eines der mutierten Allele besaßen (**Fig. 5d**). Wir bestätigten auch die Keimbahnübertragung von Foxn1 (**Fig. 8**) und Prkdc (**Fig. 9**) in unabhängigen Gründertier-Mäusen. Unseres Wissens liefern diese Ergebnisse den ersten Beleg dafür, dass RGEN-induzierte mutierte Allele bei Tieren stabil auf F1-Nachkommen übertragen werden.

#### Beispiel 4: RNA-gesteuertes Genom-Editing bei Pflanzen

##### 4-1. Erzeugung von Cas9-Protein

**[0198]** Die vom Streptococcus-pyogenes-Stamm M1 GAS (NC\_002737,1) abstammende, Cas9-codierende Sequenz (4104 bp) wurde in das pET28-b(+)-Plasmid kloniert. Eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) wurde am N-Terminus des Proteins eingeschlossen, um die Lokalisierung des Proteins im Nukleus sicherzustellen. Cas9-ORF enthaltendes pET28-b(+)-Plasmid wurde in BL21(DE3) transformiert. Cas9 wurde dann unter Verwendung von 0,2 mM IPTG 16 h lang bei 18°C induziert und unter Verwendung von Ni-NTA-Agarose-Perlen (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Gereinigtes Cas9-Protein wurde unter Verwendung von Ultracel – 100K (Millipore) eingengt.

##### 4-2. Erzeugung von guide-RNA

**[0199]** Die genomische Sequenz des Arabidopsis-Gens, das für BR11 codiert, wurde in einem Exon, das für das Cas9-Targeting erforderlich ist, auf das Vorhandensein eines NGG-Motivs, das sogenannte Protospacer angrenzende Motiv (PAM), gescreent. Zum Spalten des BR11-Gens in Arabidopsis identifizierten wir zwei RGEN-Zielorte in einem das NGG-Motiv enthaltenden Exon. sgRNAs wurden in vitro unter Verwendung von Templat-DNA erzeugt. Jede Templat-DNA wurde durch Verlängerung mit zwei partiell überlappenden Oligonukleotiden (Macrogen, Tabelle X1) und Phusion-Polymerase (Thermo Scientific) unter Verwendung der folgenden Bedingungen erzeugt:  $-98^{\circ}\text{C}$  30 sec  $\{98^{\circ}\text{C}$  10 sec,  $54^{\circ}\text{C}$  20 sec,  $72^{\circ}\text{C}$  2 min $\} \times 20$ ,  $72^{\circ}\text{C}$  5 min.

Tabelle 9

[Tabelle 9]

#### Oligonukleotide zur Erzeugung der Templat-DNA für die In-vitro-Transkription

Oligonukleotide	Sequenz (5'-3')	SEQ ID NO
BR11 Ziel 1 (Vorwärts)	GAAATTAATACGACTCACTATAGGTTTGAAAGATGG AAGCGCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA ATAAGGCTAGTCCG	73
BR11 Ziel 2 (Vorwärts)	GAAATTAATACGACTCACTATAGGTGAACTAACT GGTCCACAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA ATAAGGCTAGTCCG	74
Universal (Rückwärts)	AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTG ATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGC	75

**[0200]** Die verlängerte DNA wurde gereinigt und als Templat für die Erzeugung der guide-RNAs in vitro unter Verwendung des MEGAscript-T7-Kits (Life Technologies) verwendet. guide-RNA wurde dann mittels Extraktion mit Phenol/Chloroform und Ausfällen mit Ethanol gereinigt. Um Cas9/sgRNA-Komplexe herzustellen, wurden 10 µl gereinigtes Cas9-Protein (12 µg/µl) und 4 µl der beiden sgRNAs (11 µg/µl) in 20 µl NEB3-Puffer (New England Biolabs) gemischt und 10 min lang bei 37°C inkubiert.

#### 4-3. Transfektion des Cas9/sgRNA-Komplexes in Protoplasten

**[0201]** Die Blätter von 4 Wochen alten Arabidopsis-Setzlingen, die aseptisch in Petrischalen gezüchtet wurden, wurden in einer Enzymlösung (1% Cellulose R10, 0,5% Macerozym R10, 450 mM Mannit, 20 mM MES pH 5,7 und CPW-Salz) 8–16 h lang bei 25°C unter Schütteln mit 40 UpM im Dunkeln verdaut. Enzym/Protoplastenlösungen wurden abfiltriert und 3–5 min lang bei 100 × g zentrifugiert. Protoplasten wurden in CPW-Lösung nach dem Zählen der Zellen unter dem Mikroskop (X100) unter Verwendung eines Hämacytometers resuspendiert. Schließlich wurden die Protoplasten mit  $1 \times 10^6$ /ml in MMG-Lösung (4 mM HEPES pH 5,7, 400 mM Mannit und 15 mM  $MgCl_2$ ) resuspendiert. Um die Protoplasten mit dem Cas9/sgRNA-Komplex zu transfizieren, wurden 200 µl (200.000 Protoplasten) der Protoplastensuspension vorsichtig mit 3,3 oder 10 µl Cas9/sgRNA-Komplex [Cas9-Protein (6 µg/µl) sowie zwei sgRNAs (jeweils 2,2 µg/µl)] und 200 µl 40% Polyethylenglykol-Transfektionspuffer (40% PEG4000, 200 mM Mannit und 100 mM  $CaCl_2$ ) in 2-ml-Röhrchen vermischt. Nach 5–20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Transfektion durch Zugabe von Waschpuffer mit W5-Lösung (2 mM MES pH 5,7, 154 mM NaCl, 125 mM  $CaCl_2$  und 5 mM KCl) gestoppt. Dann wurden Protoplasten mittels Zentrifugation über 5 min bei 100 × g aufgefangen, mit 1 ml W5-Lösung gewaschen und weitere 5 min lang bei 100 × g zentrifugiert. Die Protoplastendichte wurde auf  $1 \times 10^5$ /ml eingestellt und sie wurden in modifiziertem KM-8p-Flüssigmedium mit 400 mM Glukose kultiviert.

#### 4-4. Nachweis von Mutationen in Arabidopsis-Protoplasten und Pflanzen

**[0202]** 24 Stunden oder 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Protoplasten aufgefangen und genomische DNA wurde isoliert. Die die zwei Zielorte überspannende genomische DNA-Region wurde mittels PCR amplifiziert und dem T7E1-Assay unterzogen. Wie in **Fig. 11** gezeigt, wurden Indels von RGEN mit hoher Häufigkeit im Bereich von 50% bis 70% induziert. Überraschenderweise wurden Mutationen schon 24 Stunden nach der Transfektion induziert. Offenbar arbeitet das Cas9-Protein unmittelbar nach der Transfektion. PCR-Produkte wurden gereinigt und in das T-Blunt-PCR-Cloning-Kit (Solgent) geklont. Plasmide wurden gereinigt und einer Sanger-Sequenzierung mit M13F-Primer unterzogen. Eine mutierte Sequenz wies an einem Ort eine 7-bp-Deletion auf (**Fig. 12**). Die anderen drei mutierten Sequenzen wiesen Deletionen von ~220-bp-DNA-Segmenten zwischen den beiden RGEN-Orten auf.

#### Beispiel 5: Cas9-Protein-Transduktion unter Verwendung eines zellpenetrierenden Peptids oder einer Proteintransduktionsdomäne

##### 5-1. Konstruktion des His-Cas9-codierenden Plasmids

**[0203]** Cas9 mit einem Cystein am C-Terminus wurde mittels PCR-Amplifizierung unter Verwendung des vorher beschriebenen Cas9-Plasmids {Cho, 2013 #166} als Templat hergestellt und in den das His-Tag am N-Terminus enthaltenden pET28-(a)-Vektor (Novagen, Merk Millipore, Deutschland) geklont.

##### 5-2. Zellkultur

**[0204]** 293T (humane, embryonische Nierenzelllinie) und HeLa-Zellen (humane Eierstockkrebszelllinie) wurden in DMEM (GIBCO-BRL Rockville), ergänzt mit 10% FBS und 1% Penicillin und Streptomycin, gezüchtet.

##### 5-3. Expression und Reinigung des Cas9-Proteins

**[0205]** Um das Cas9-Protein zu exprimieren, wurden E.-coli-BL21-Zellen mit dem Cas9 codierenden pET28-(a)-Vektor transformiert und auf 50 µg/ml Kanamycin enthaltendes Luria-Bertani(LB)-Agarmedium (Amresco, Solon, OH) ausplattiert. Am nächsten Tag wurde eine einzelne Kolonie gepickt und über Nacht in 50 µg/ml Kanamycin enthaltender LB-Nährlösung bei 37°C kultiviert. Am folgenden Tag wurde diese Startkultur bei 0,1 OD600 in 50 µg/ml Kanamycin enthaltende Luria-Nährlösung inokuliert und 2 h lang bei 37°C inkubiert, bis der OD600-Wert 0,6–0,8 erreichte. Um die Cas9-Protein-Expression zu induzieren, wurden die Zellen über Nacht nach Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (Promega, Madison, WI) bis zur Endkonzentration von 0,5 mM bei 30°C kultiviert.

**[0206]** Die Zellen wurden mittels Zentrifugation bei 4000 UpM über 15–20 min aufgefangen, in Lysepuffer (20 mM Tris-Cl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1X Proteaseinhibitor-Cocktail, 1 mg/ml Lysozym) resuspendiert und mittels Ultraschall lysiert (40% Betrieb, 10 s Puls, 30 s Ruhe, 10 min lang auf Eis). Die lösliche Fraktion wurde als Überstand nach 20-minütiger Zentrifugation bei 15.000 UpM bei 4°C abgetrennt. Das Cas9-Protein wurde bei 4°C unter Verwendung einer Ni-NTA-Agarose-Harz enthaltenden Säule (QIAGEN) und des AKTA-Prime-Geräts (AKTA prime, GE Healthcare, Großbritannien) gereinigt. Während dieses Chromatographieschritts wurden lösliche Proteinfractionen auf die Ni-NTA-Agarose-Harz-Säule (GE Healthcare, Großbritannien) mit einem Durchfluss von 1 ml/min geladen. Die Säule wurde mit Waschpuffer (20 mM Tris-Cl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1X Proteaseinhibitor-Cocktail) gewaschen und das gebundene Protein wurde mit einem Durchfluss von 0,5 ml/min mit einem Elutionspuffer (20 mM Tris-Cl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 1X Proteaseinhibitor-Cocktail) eluiert. Die vereinigte, eluierte Fraktion wurde eingeeengt und gegen Lagerungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 200 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 20% Glycerin) dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Bradford-Assays (Biorad, Hercules, CA) quantifiziert und die Reinheit wurde unter Verwendung von Rinderserumalbumin als Kontrolle mittels SDS-PAGE analysiert.

#### 5-4. Konjugation von Cas9 an 9R4L

**[0207]** 1 mg Cas9-Protein, mit einer Konzentration von 1 mg/ml verdünnt in PBS, und 50 µg Maleimid-9R4L-Peptid in 25 µl DW (Peptron, Korea) wurden unter Verwendung eines Mischers 2 h lang bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C vorsichtig vermischt. Um unkonjugiertes Maleimid-9R4L zu entfernen, wurden die Proben unter Verwendung einer Membran mit einer Ausschlussgrenze von einem Molekulargewicht von 50 kDa 24 h lang bei 4°C gegen DPBS (pH 7,4) dialysiert. Das Cas9-9R4L-Protein wurde von der Dialysemembran aufgefangen und der Proteingehalt wurde unter Verwendung eines Bradford-Assays bestimmt.

#### 5-5. Herstellung von sgRNA-9R4L

**[0208]** sgRNA (1 µg) wurde vorsichtig zu verschiedenen Mengen des C9R4LC-Peptids (im Bereich eines Gewichtsverhältnisses von 1 bis 40) in 100 µl DPBS (pH 7,4) gegeben. Diese Mischung wurde bei Raumtemperatur 30 min lang inkubiert und unter Verwendung von RNase-freiem, vollentsalztem Wasser 10-fach verdünnt. Der hydrodynamische Durchmesser und das z-Potential der gebildeten Nanopartikel wurden unter Verwendung von dynamischer Lichtstreuung (Zetasizer-Nanoanalyzer ZS; Malvern instruments, Worcestershire, Großbritannien) gemessen.

#### 5-6. Cas9-Protein- und sgRNA-Behandlungen

**[0209]** Die Zellen wurden wie folgt mit Cas9-9R4L und sgRNA-C9R4LC behandelt: 1 µg sgRNA und 15 µg C9R4LC-Peptid wurden zu 250 ml OPTIMEM-Medium gegeben und 30 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. 24 h nach dem Impfen wurden die Zellen mit OPTIMEM-Medium gewaschen und mit sgRNA-C9R4LC-Komplex 4 h lang bei 37°C behandelt. Die Zellen wurden wiederum mit OPTIMEM-Medium gewaschen und mit Cas9-9R4L 2 h lang bei 37°C behandelt. Nach der Behandlung wurde das Kulturmedium durch serumhaltiges Komplettmedium ersetzt und vor der nächsten Behandlung 24 h lang bei 37°C inkubiert. Für mehrfache Behandlungen mit Cas9 und sgRNA an drei aufeinanderfolgenden Tagen wurde das gleiche Verfahren befolgt.

#### 5-7. Cas9-9R4L und sgRNA-9R4L können endogene Gene in kultivierten Säugetierzellen ohne Verwendung von zusätzlichen Abgabewerkzeugen editieren

**[0210]** Um zu bestimmen, ob Cas9-9R4L und sgRNA-9R4L endogene Gene in kultivierten Säugetierzellen ohne Verwendung von zusätzlichen Abgabewerkzeugen editieren können, behandelten wir 293-Zellen mit auf das CCR5-Gen zielendem Cas9-9R4L und sgRNA-9R4L und analysierten die genomische DNA. Ein T7E1-Assay zeigte, dass 9% des CCR5-Gens in sowohl mit Cas9-9R4L als auch mit sgRNA-9R4L behandelten Zellen gespalten waren und dass die CCR5-Gen-Spaltung in Kontrollzellen, die unbehandelte Zellen, mit entweder Cas9-9R oder sgRNA-9R4L behandelte Zellen oder den beiden unmodifizierten Formen Cas-9 und sgRNA behandelten Zellen umfassten, nicht beobachtet wurde (**Fig. 13**), was darauf hinweist, dass die Behandlung mit dem Cas9-9R4L-Protein und mit 9R4L konjugierter sgRNA, nicht aber mit unmodifiziertem Cas9 und unmodifizierter sgRNA, zu einem wirksamen Genom-Editing von Säugetierzellen führen kann.

## Beispiel 6: Steuerung der Off-Target-Mutation entsprechend der guide-RNA-Struktur

**[0211]** Kürzlich berichteten drei Gruppen, dass RGEN Off-Target-Wirkungen in menschlichen Zellen zeigten. Zu unserer Überraschung induzierten RGEN wirksam Mutationen an Off-Target-Orten, die sich um 3 bis 5 Nukleotide von dem On-Target-Ort unterscheiden. Wir bemerkten jedoch, dass es mehrere Unterschiede zwischen unseren RGEN und den von anderen verwendeten gibt. Zunächst nutzten wir dualRNA, die crRNA plus tracrRNA ist, und keine einzelne guide-RNA (sgRNA), die aus wesentlichen Teilen von crRNA und tracrRNA besteht. Zweitens transfizierten wir K562-Zellen (aber nicht HeLa-Zellen) mit synthetischer crRNA anstelle von crRNA-codierenden Plasmiden. HeLa-Zellen wurden mit crRNA-codierenden Plasmiden transfiziert. Andere Gruppen nutzten sgRNA-codierende Plasmide. Drittens besaß unsere guide-RNA zwei zusätzliche Guanin-Nukleotide am 5'-Ende, die für eine effiziente Transkription durch T7-Polymerase in vitro erforderlich sind. Von anderen wurden keinerlei zusätzliche Nukleotide in die sgRNA eingeführt. So kann die RNA-Sequenz unserer guide-RNA als 5'-GGX<sub>20</sub> dargestellt werden, während 5'-GX<sub>19</sub>, wobei X<sub>20</sub> oder GX<sub>19</sub> der 20-bp-Zielsequenz entsprechen, die von anderen verwendete Sequenz darstellt. Das erste Guanin-Nukleotid wird zur Transkription durch RNA-Polymerase in Zellen benötigt. Um zu testen, ob Off-Target-RGEN-Wirkungen diesen Unterschieden zugeschrieben werden kann, wählten wir vier RGEN, die Off-Target-Mutationen in menschlichen Zellen mit großen Häufigkeiten induzierten (13). Zunächst verglichen wir unser Verfahren der Verwendung von in vitro transkribierter dualRNA mit dem Verfahren der Transfektion von sgRNA-codierenden Plasmiden in K562-Zellen und maßen Mutationshäufigkeiten an On-Target- und Off-Target-Orten mithilfe des T7E1-Assays. Ungeachtet der Zusammensetzung der guide-RNA zeigten drei RGEN vergleichbare Mutationshäufigkeiten an On-Target- und Off-Target-Orten. Interessanterweise induzierte eine RGEN (VEFGA Ort 1) bei Verwendung von synthetischer dualRNA keinerlei Indels an einem validierten Off-Target-Ort, der sich um drei Nukleotide von dem On-Target-Ort (mit OT1-11 bezeichnet, **Fig. 14**) unterscheidet. Jedoch unterschied die synthetische dualRNA nicht den anderen validierten Off-Target-Ort (OT1-3), der sich um zwei Nukleotide von dem On-Target-Ort unterschied.

**[0212]** Anschließend untersuchten wir, ob die Addition von zwei Guanin-Nukleotiden am 5'-Ende von sgRNA RGEN spezifischer machen konnte, indem wir 5'-GGX<sub>20</sub>-(oder 5'-GGGX<sub>19</sub>-)sgRNA mit 5'-GX<sub>19</sub>-sgRNA verglichen. Vier mit Cas9 komplexierte GX<sub>19</sub>-sgRNAs induzierten Indels an On-Target- und Off-Target-Orten gleichermaßen effizient und tolerierten bis zu vier Nukleotidfehlpaarungen. Im krassen Gegensatz dazu unterschieden GGX<sub>20</sub>-sgRNAs Off-Target-Orte effizient. Tatsächlich wies das T7E1-Assay kaum RGEN-induzierte Indels an sechs von sieben validierten Off-Target-Orten nach, wenn wir die vier GGX<sub>20</sub>-sgRNAs verwendeten (**Fig. 15**). Wir bemerkten jedoch, dass zwei GGX<sub>20</sub>-sgRNAs (VEGFA Orte 1 und 3) weniger aktiv an On-Target-Orten waren als die korrespondierenden GX<sub>19</sub>-sgRNAs. Diese Ergebnisse zeigen, dass die zusätzlichen Nukleotide am 5'-Ende die Mutationshäufigkeiten an On-Target- und Off-Target-Orten beeinflussen können, vielleicht durch eine Veränderung der guide-RNA-Stabilität, Konzentration oder Sekundärstruktur.

**[0213]** Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die drei Faktoren, nämlich die Verwendung von synthetischer guide-RNA anstelle von für guide-RNA codierenden Plasmiden, dualRNA anstelle von sgRNA und GGX<sub>20</sub>-sgRNA anstelle von GX<sub>19</sub>-sgRNA, eine kumulative Wirkung auf die Unterscheidung von Off-Target-Orten hat.

**[0214]** Beispiel 7: Gepaarte Cas9-Nickasen Grundsätzlich können Einzelstrangbrüche (ESB) nicht durch das fehleranfällige NHEJ repariert werden, lösen jedoch noch immer eine hochgenaue Homologie-gerichtete Reparatur (HDR) oder eine Basenexzisionsreparatur aus. Die nickaseinduzierte gezielte Mutagenese über HDR ist jedoch viel weniger effizient als eine nukleaseinduzierte Mutagenese. Wir gingen davon aus, dass gepaarte Cas9-Nickasen Komposit-DSB erzeugen würden, was eine DNA-Reparatur über NHEJ oder HDR auslösen würde und so zu einer effizienten Mutagenese führen würde (**Fig. 16A**). Darüber hinaus würden gepaarte Nickasen die Spezifität von Cas9-basiertem Genom-Editing verdoppeln.

**[0215]** Wir untersuchten zunächst mehrere Cas9-Nukleasen und Nickasen, die zum Abzielen auf Orte im AAVS1-Locus entworfen wurden (**Fig. 16B**), in vitro mittels Fluoreszenz-Kapillarelektrophorese. Anders als Cas9-Nukleasen, die beide Stränge von DNA-Substraten spalteten, spalteten Cas9-Nickasen, die sich aus guide-RNA und einer mutierten Form von Cas9, bei denen ein katalytischer Aspartatrest durch Alanin ausgetauscht war (D10A Cas9), zusammensetzten, nur einen Strang, was ortsspezifische Einzelstrangbrüche erzeugte (**Fig. 16C, D**). Interessanterweise induzierten einige Nickasen (AS1, AS2, AS3 und S6 in **Fig. 17A**) jedoch Indels an Zielorten in humanen Zellen, was darauf hindeutet, dass Einzelstrangbrüche in vivo in DBS ungewandelt werden können, wenn auch auf eher ineffiziente Weise. Gepaarte Cas9-Nickasen, die zwei benachbarte Einzelstrangbrüche an gegenüberliegenden DNA-Strängen erzeugen, ergaben Indels mit Häufigkeiten im Bereich von 14% bis 91%, was mit der Wirkung von gepaarten Nukleasen vergleichbar ist (**Fig. 17A**). Die Reparatur zweier Einzelstrangbrüche, die 5'-Überhänge erzeugen würden, führte mit viel höherer Häufig-

keit zur Bildung von Indels als solche, die an drei Genomloci 3'-Überhänge erzeugen (**Fig. 17A** und **Fig. 18**). Außerdem ermöglichten gepaarte Nickasen effizienter ein gezieltes Genom-Editing mittels homologie-gerichteter Reparatur als dies einzelne Nickasen taten (**Fig. 19**).

**[0216]** Als nächstens maßen wir die Mutationshäufigkeiten von gepaarten Nickasen und Nukleasen an Off-Target-Orten unter Verwendung von Tiefensequenzierung. Mit drei sgRNAs komplexierte Cas9-Nukleasen induzierten mit Häufigkeiten im Bereich von 0,5% bis 10% Off-Target-Mutationen an sechs Orten, die sich um ein oder zwei Nukleotide von deren entsprechenden On-Target-Orten unterschieden (**Fig. 17B**). Im Gegensatz dazu erzeugten gepaarte Cas9-Nickasen keine Indels über der Nachweisgrenze von 0,1% an irgendeinem der sechs Off-Target-Orte. Der S2-Off-1-Ort, der sich um ein einziges Nukleotid an der ersten Position am PAM (d. h. N in NGG) von seinen On-Target-Orten unterscheidet, kann als ein weiterer On-Target-Ort betrachtet werden. Wie erwartet war die mit dem S2-sgRNA komplexierte Cas9-Nuklease an diesem Ort ebenso effizient wie am On-Target-Ort. Im scharfen Gegensatz dazu unterschied mit der S2- und AS2-sgRNA komplexiertes D10A-Cas9 diesen Ort mit einem Faktor von 270 von dem On-Target-Ort. Diese gepaarte Nickase unterschied mit Faktoren von 160 bzw. 990 auch die AS2-Off-Target-Orte (Off-1 und Off-9 in **Fig. 17B**) von dem On-Target-Ort.

**[0217]** Beispiel 8: Spleißen von chromosomaler DNA, induziert durch gepaarte Cas9-Nickasen Es wurde berichtet, dass zwei gleichzeitige DSB, die durch synthetisch hergestellte Nukleasen wie ZFN und TALEN erzeugt wurden, große Deletionen der dazwischenliegenden chromosomalen Segmente verursachen können. Wir untersuchten, ob zwei durch gepaarte Cas9-Nickasen induzierte ESB ebenfalls Deletionen in humanen Zellen erzeugen können. Wir nutzten PCR um Deletionsereignisse nachzuweisen und fanden, dass sieben gepaarte Nickasen Deletionen von chromosomalen Segmenten mit bis zu 1,1 kbp ebenso effizient induzierten, wie dies gepaarte Cas9-Nukleasen tun (**Fig. 20A, B**). DNA-Sequenzen der PCR-Produkte bestätigten die Deletionsereignisse (**Fig. 20C**). Interessanterweise blieb die zur sgRNA passende Sequenz in zwei von sieben deletions-spezifischen PCR-Amplifikaten intakt (in **Fig. 20C** unterstrichen). Im Gegensatz dazu erzeugten Cas9-Nuklease-Paare keine Sequenzen, die intakte Zielorte enthielten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass zwei auseinanderliegende Einzelstrangbrüche nicht in zwei separate DSB umgewandelt wurden, um Deletionen des dazwischenliegenden chromosomalen Segments zu begünstigen. Außerdem ist es unwahrscheinlich, dass zwei Einzelstrangbrüche, die durch mehr als 100 bp getrennt sind, unter physiologischen Bedingungen einen Komposit-DSB mit großen Überhängen erzeugen können, da die Schmelztemperatur sehr hoch ist.

**[0218]** Wir schlagen vor, dass zwei auseinanderliegende Einzelstrangbrüche durch Strangersatz in einer Kopf-zu-Kopf-Richtung repariert werden, was zur Bildung eines DSB in der Mitte führt, dessen Reparatur über NHEJ kleine Deletionen verursacht (**Fig. 20D**). Da diese zwei Zielorte während dieses Prozesses intakt bleiben, können Nickasen wieder ESB induzieren, was den Zyklus wiederholt auslöst, bis die Zielorte deletiert sind. Dieser Mechanismus erklärt, warum zwei Offset-Einzelstrangbrüche, die 5'-Überhänge erzeugen, effizient Indels an drei Loci induzieren, solche, die 3'-Überhänge erzeugen, dies aber nicht tun.

**[0219]** Wir untersuchten dann, ob Cas9-Nukleasen und Nickasen unerwünschte chromosomale Translokationen induzieren können, die aus der NHEJ-Reparatur von On-Target- und Off-Target-DNA-Spaltungen resultieren (**Fig. 21A**). Wir konnten unter Verwendung von PCR durch Cas9-Nukleasen induzierte Translokationen nachweisen (**Fig. 21B, C**). Bei Verwendung von genomischer DNA, die aus mit den das As2 + S3-Cas9-Nickase-Paar codierenden Plasmiden transfizierten Zellen isoliert wurde, wurden keinerlei solche PCR-Produkte amplifiziert. Dieses Ergebnis stimmt mit der Tatsache überein, dass sowohl AS2- als auch die S3-Nickase, anders als ihre korrespondierenden Nukleasen, keine Indels an Off-Target-Orten erzeugten (**Fig. 17B**).

**[0220]** Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass gepaarte Cas9-Nickasen eine gezielte Mutagenese und große Deletionen von chromosomalen Segmenten von bis zu 1 kbp in humanen Zellen erlauben. Hervorzuheben ist, dass gepaarte Nickasen keine Indels an Off-Target-Orten induzieren, an denen ihre korrespondierenden Nukleasen Mutationen induzieren. Darüber hinaus begünstigten gepaarte Nickasen, anders als Nukleasen, unerwünschte Translokationen im Zusammenhang mit Off-Target-DNA-Spaltungen nicht. Grundsätzlich verdoppeln gepaarte Nickasen die Spezifität der Cas9-vermittelten Mutagenese und weiten die Nützlichkeit von RNA-gesteuerten Enzymen bei Anwendungen aus, die ein präzises Genom-Editing erfordern, wie etwa Gen- und Zelltherapie. Dieser Ansatz steht jedoch unter dem einen Vorbehalt, dass zwei hoch aktive sgRNAs benötigt werden, um ein effizientes Nickase-Paar herzustellen, was ansteuerbare Orte beschränkt. Wie hier und in anderen Studien gezeigt, sind nicht alle sgRNAs gleich aktiv. Werden einzelne Klone anstelle von Zellpopulationen für weitere Untersuchungen oder Anwendungen genutzt, würde die Wahl der guide-RNAs, die einzigartige Sequenzen in dem Genom darstellen, sowie die Verwendung von optimierter guide-RNA ausreichen, um mit Cas9-Nukleasen einhergehende Off-Target-Mutationen zu vermeiden. Wir schlagen vor, dass sowohl

Cas9-Nukleasen als auch gepaarte Nickasen leistungsfähige Optionen sind, die ein präzises Genom-Editing in Zellen und Organismen erleichtern werden.

**[0221]** Beispiel 9: Genotypisierung mit von CRISPR/Cas-stammenden RNA-gesteuerte Endonukleasen Als Nächstes behaupteten wir, dass RGEN in einer Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus(RFLP)-Analyse verwendet werden und dabei herkömmliche Restriktionsenzyme ersetzen können. Synthetisch hergestellte Nukleasen, einschließlich RGEN, induzieren an Zielorten Indels, wenn die durch die Nukleasen verursachten DSB durch das fehleranfällige nichthomologe End-Joining(NHEJ)-System repariert werden. RGEN, die für eine Erkennung der Zielsequenzen entworfen wurden, können mutierte Sequenzen mit Indels nicht spalten, werden aber Wildtyp-Zielsequenzen effizient spalten.

**[0222]** 9-1. RGEN-Bestandteile crRNA und tracrRNA wurden mittels In-vitro-Transkription unter Verwendung des MEGAShortcript-T7-Kits (Ambion) gemäß den Anweisungen des Herstellers hergestellt. Transkribierte RNAs wurden auf einem 8%igen denaturierenden Harnstoff-PAGE-Gel getrennt. Die RNA enthaltende Gelscheibe wurde ausgeschnitten und in Elutionspuffer überführt. RNA wurde in nukleasefreiem Wasser isoliert, worauf eine Extraktion mit Phenol:Chloroform und mit Chloroform sowie eine Ausfällung mit Ethanol folgte. Die gereinigte RNA wurde mittels Spektrometrie quantifiziert. Template für crRNA wurden durch Hybridisieren eines Oligonukleotids, dessen Sequenz als 5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGX<sub>20</sub>GTTTTAGAGCTATGCTGTTTTG-3' (SEQ ID NO: 76) gezeigt ist, wobei X<sub>20</sub> die Zielsequenz ist, und seines komplementären Oligonukleotids hergestellt. Das Template für tracrRNA wurde durch Verlängern der Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotide (5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGAACCATTCAAAACAGCATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCC G-3' (SEQ ID NO: 77) and 5'-AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCT ATG-3' (SEQ ID NO: 78)) unter Verwendung von Phusion-Polymerase (New England Biolabs) hergestellt.

**[0223]** 9-2. Reinigung des rekombinanten Cas9-Proteins Das in unserem vorherigen Beispiel verwendete Cas9-DNA-Konstrukt, das für am C-Terminus mit dem His6-Tag fusionierte Cas9 codiert, wurde in den pET-28a-Expressionsvektor inseriert. Das rekombinante Cas9-Protein wurde im E.-coli-Stamm BL21(DE3) expriert, der 4 Stunden nach der Induktion mit 1 mM IPTG in LB-Medium bei 25°C kultiviert wurde. Zellen wurden geerntet und in 20 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol und 1 mM PMSF enthaltendem Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei 4°C aufgetaut und mit Ultraschall behandelt. Nach Zentrifugieren wurde das Cas9-Protein im Lysat an Ni-NTA-Agarose-Harz (Qiagen) gebunden, mit 20 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl und 20 mM Imidazol enthaltendem Puffer gewaschen und mit 20 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl und 250 mM Imidazol enthaltendem Puffer eluiert. Das gereinigte Cas9-Protein wurde gegen 20 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM KCl, 1 mM DTT und 10% Glycerin dialysiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

**[0224]** 9-3. T7-Endonuklease-I-Assay Das T7E1-Assay wurde wie folgt durchgeführt. Kurz gesagt wurden unter Verwendung von genomischer DNA amplifizierte PCR-Produkte bei 95°C denaturiert, bei 16°C neu hybridisiert und mit 5 Einheiten T7-Endonuklease I (New England BioLabs) 20 min lang bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden unter Verwendung von 2 bis 2,5% Agarosegelelektrophorese getrennt.

**[0225]** 9-4. RGEN-RFLP-Assay PCR-Produkte (100–150 ng) wurden 60 min lang bei 37°C mit optimierten Konzentrationen (Tabelle 10) von Cas9-Protein, tracrRNA, crRNA in 10 µl NEB-Puffer 3 (1X) inkubiert. Nach der Spaltungsreaktion wurde RNase A (4 µg) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 30 min bei 37°C inkubiert, um RNA zu entfernen. Die Reaktionen wurden mit 30% Glycerin, 1,2% SDS und 100 mM EDTA enthaltendem 6X-Stoppplösungspuffer gestoppt. Die Produkte wurden mittels 1–2,5% Agarosegelelektrophorese getrennt und mittels EtBr-Färbung sichtbar gemacht.

Tabelle 10

[Tabelle 10]

Konzentration von RGEN-Bestandteilen in RFLP-Assays

Bezeichnung des Ziels	Cas9 (ng/µl)	crRNA (ng/µl)	tracrRNA (ng/µl)
C4BPB	100	25	60
PIBF-NGG-RGEN	100	25	60
HLA-B	1,2	0,3	0,7

CCR5-ZFN	100	25	60
CTNNB1 wildtypspezifisch	30	10	20
CTNNB1 mutantenspezifisch	30	10	20
CCR5 WT-spezifisch	100	25	60
CCR5 $\Delta$ 32-spezifisch	10	2,5	6
KRAS WT-spezifisch (wt)	30	10	20
KRAS mutantenspezifisch (m8)	30	10	20
KRAS WT-spezifisch (m6)	30	10	20
KRAS mutantenspezifisch (m6,8)	30	10	20
PIK3CA WT-spezifisch (wt)	100	25	60
PIK3CA mutantenspezifisch (m4)	30	10	20
PIK3CA WT-spezifisch (m7)	100	25	60
PIK3CA mutantenspezifisch (m4, 7)	30	10	20
BRAF WT-spezifisch	30	10	20
BRAF mutantenspezifisch	100	25	60
NRAS WT-spezifisch	100	25	60
NRAS mutantenspezifisch	30	10	20
IDH WT-spezifisch	30	10	20
IDH mutantenspezifisch	30	10	20
PIBF-NAG-RGEN	30	10	60

[0226] Tabelle 11 [Tabelle 11] Primer:

Gen (Ort)	Richtung	Sequenz (5' nach 3')	SEQ ID
-----------	----------	----------------------	--------

			NO
CCR5(RGEN)	V1	CTCCATGGTGCTATAGAGCA	79
	V2	GAGCCAAGCTCTCCATCTAGT	80
	R	GCCCTGTCAAGAGTTGACAC	81
CCR5(ZFN)	V	GCACAGGGTGAACAAGATGGA	82
	R	GCCAGGTACCTATCGATTGTCAGG	83
CCR5(del32)	V	GAGCCAAGCTCTCCATCTAGT	84
	R	ACTCTGACTG GGTCACCAGC	85
C4BPB	V1	TATTTGGCTGGTTGAAAGGG	86
	R1	AAAGTCATGAAATAAACACACCCA	87
	V2	CTGCATTGATATGGTAGTACCATG	88
	R2	GCTGTTTCATTGCAATGGAATG	89
CTNNB1	V	ATGGAGTTGGACATGGCCATGG	90
	R	ACTCACTATCCACAGTTCAGCATTTACC	91
KRAS	V	TGGAGATAGCTGTCAGCAACTTT	92
	R	CAACAA AGCAAAGGTAAAGTTGGTAATAG	93
PIK3CA	V	GGTTTCAGGAGATGTGTTACAAGGC	94
	R	GATTGTGCAATTCCTATGCAATCGGTC	95
NRAS	V	CACTGGGTACTTAATCTGTAGCCTC	96
	R	GGTTCCAAGTCATTCCCAGTAGC	97
IDH1	V	CATCACTGCAGTTGTAGGTTATAACTATCC	98
	R	TTGAAAACCACAGATCTGGTTGAACC	99
BRAF	V	GGAGTGCCAAGAGAATATCTGG	100
	R	CTGAAACTGGTTTCAAAATATTCGTTTTAAGG	101
PIBF	V	GCTCTGTATGCCCTGTAGTAGG	102
	R	TTGCATCTGACCTTACCTTTG	103

9-5. Plasmidspaltungsassay Mit Restriktionsenzym behandeltes linearisiertes Plasmid (100 ng) wurde 60 min lang bei 37°C mit Cas9-Protein (0,1 µg), tracrRNA (60 ng) und crRNA (25 ng) in 10 µl NEB-3-Puffer (1X) inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 30% Glycerin, 1,2% SDS und 100 mM EDTA enthaltender 6X-Stopplösung gestoppt. Die Produkte wurden mittels 1% Agarosegelelektrophorese getrennt und mittels EtBr-Färbung sichtbar gemacht.

**[0227]** 9-6. Strategie der RFLP Neue RGEN mit erwünschten DNA-Spezifitäten können ohne Weiteres durch Austausch von crRNA erzeugt werden; eine erneute Reinigung von maßgeschneiderten Proteinen ist nicht erforderlich, sobald das rekombinante Cas9-Protein verfügbar ist. Synthetisch hergestellte Nukleasen, einschließlich RGEN, induzieren an Zielorten kleine Insertionen oder Deletionen (Indels), wenn die durch die Nukleasen verursachten DSB durch das fehleranfällige nichthomologe End-Joining(NHEJ)-System repariert werden. RGEN, die für eine Erkennung der Zielsequenzen entworfen wurden, spalten Wildtyp-Zielsequenzen effizient, können mutierte Sequenzen mit Indels jedoch nicht spalten (**Fig. 22**).

**[0228]** Wir untersuchten zunächst, ob RGEN Plasmide, die Wildtyp- oder modifizierte C4BPB-Zielsequenzen enthalten, die an der Spaltungsstelle 1- bis 3-basige Indels aufnehmen, differenziert spalten können. Keines der sechs Plasmide mit diesen Indels wurde durch ein C4BPB-spezifisches RGEN5 gespalten, das aus ziel-spezifischer crRNA, tracrRNA und rekombinantem Cas9-Protein bestand (**Fig. 23**). Im Gegensatz dazu wurde das Plasmid mit intakter Zielsequenz effizient durch dieses RGEN gespalten.

**[0229]** 9-7. Nachweis von durch RGEN induzierten Mutationen unter Verwendung eines durch die gleichen RGEN vermittelten RFLP Um die Durchführbarkeit eines durch RGEN vermittelten RFLP zum Nachweis von durch die gleichen RGEN induzierten Mutationen zu testen, nutzten wir anschließend genmodifizierte humane

K562-Krebszellklone, die unter Verwendung eines RGEN-anvisierenden C4BPB-Gens etabliert wurden (Tabelle 12).

**[0230]** Tabelle 12 [Tabelle 12] Zielsequenz von in dieser Untersuchung verwendeten RGEN

Gen	Zielsequenz	SEQ ID NO.
humanes C4BPB	<u>AATGACCACTACATCCTCAAGGG</u>	104
Maus-Pibf1	<u>AGATGATGTCTCATCATCAGAGG</u>	105

In dieser Untersuchung verwendete C4BP8-Mutantenklone weisen verschiedene Mutationen im Bereich von 94-bp-Deletionen bis 67-pb-Insertionen auf (**Fig. 24A**). Wesentlich ist, dass alle in Mutantenklonen auftretende Mutationen zu einem Verlust des RGEN-Zielorts führten. Von 6 analysierten C4BPB-Klonen weisen 4 Klone sowohl Wildtyp- als auch mutierte Allele (+/-) auf und 2 Klone weisen nur mutierte Allele (-/-) auf.

**[0231]** Die PCR-Produkte, die den aus genomischer Wildtyp-K562-DNA amplifizierten RGEN-Zielort überspannen, wurden durch RGEN, die aus zielspezifischer crRNA, tracrRNA und rekombinantem, in *E. coli* exprimiertem und daraus gereinigtem Cas9-Protein, zusammengesetzt war, vollständig verdaut (**Fig. 24B/Spur 1**). Wenn die C46PB-Mutantenklone einer RFLP-Analyse unter Verwendung des RGEN unterzogen wurden, waren PCR-Amplifikate von (+/-)-Klonen, die sowohl Wildtyp- als auch mutierte Allele enthielten, partiell verdaut und die der (-/-)-Klone, die das Wildtyp-Allel nicht enthielten, überhaupt nicht verdaut, was keinerlei Spaltungsprodukte ergab, die der Wildtyp-Sequenz entsprechen (**Fig. 248**). Selbst eine Ein-Basen-Insertion am Zielort blockierte den Verdau (Klon Nr. 12 und Nr. 28) der amplifizierten mutierten Allele durch die C46PB-RGEN, was die hohe Spezifität der RGEN-vermittelten RFLP zeigt. Wir unterzogen die PCR-Amplifikate parallel dem fehlpaarungssensitiven T7E1-Assay (**Fig. 246**). Bemerkenswerterweise war das T7E1-Assay nicht in der Lage (-/-)-Klone von (+/-)-Klonen zu unterscheiden. Um es noch schlimmer zu machen, kann das T7E1-Assay homozygote mutierte Klone, die die gleiche mutierte Sequenz enthalten, nicht von Wildtyp-Klonen unterscheiden, da das Hybridisieren der gleichen mutierten Sequenz einen Homoduplex bildet. So hat die RGEN-vermittelte RFLP bei der Analyse von mutierten Klonen, die durch synthetisch hergestellte Nukleasen, einschließlich ZFN, TALEN und RGEN induziert wurden, einen entscheidenden Vorteil gegenüber dem herkömmlichen fehlpaarungssensitiven Nuklease-Assay.

**[0232]** 9-8. Quantitatives Assay zur RGEN-RFLP-Analyse Wir untersuchten auch, ob die RGEN-RFLP-Analyse ein quantitatives Verfahren ist. Aus dem C46P6-Nullklon und den Wildtyp-Zellen isolierte genomische DNA-Proben wurden mit verschiedenen Verhältnissen vermischt und für PCR-Amplifizierungen verwendet. Die PCR-Produkte wurden einer RGEN-Genotypisierung und parallel dazu dem T7E1-Assay unterzogen (**Fig. 25b**). Wie erwartet war die DNA-Spaltung durch RGEN proportional zum Wildtyp-zu-Mutante-Verhältnis. Im Gegensatz dazu korrelierten die Ergebnisse des T7E1-Assays kaum mit den Mutationshäufigkeiten, die aus den Verhältnissen abgeleitet wurden, und waren inkorrekt, insbesondere bei einem hohen Prozentsatz von Mutanten, einer Situation, in der komplementäre Mutantensequenzen miteinander hybridisieren können, um Homoduplexe zu bilden.

**[0233]** 9-9. Analyse von mutierten Maus-Gründertieren unter Verwendung einer RGEN-vermittelten RFLP-Genotypisierung

**[0234]** Wir wandten auch RGEN-vermittelter RFLP-Genotypisierung (kurz RGEN-Genotypisierung) auf die Analyse von mutierten Maus-Gründertieren an, die durch Injektion von TALEN in Ein-Zell-Mausembryonen erhalten wurden (**Fig. 26A**). Wir entwarfen und verwendeten eine RGEN, die den TALEN-Zielort im Pibf1-Gen erkannte (Tabelle 10). Aus einer Wildtyp-Maus und mutierten Mäusen wurde genomische DNA isoliert und nach PCR-Amplifizierung einer RGEN-Genotypisierung unterzogen. Die RGEN-Genotypisierung wies erfolgreich verschiedene Mutationen nach, die im Bereich von ein bis 27-bp-Deletionen lagen (**Fig. 26B**). Anders als das T7E1-Assay ermöglichte die RGEN-Genotypisierung einen unterscheidenden Nachweis von (+/-)- und (-/-)-Gründertier.

**[0235]** 9-10. Nachweis von in humanen Zellen durch eine CCR5-spezifische ZFN induzierten Mutationen unter Verwendung von RGEN Außerdem verwendeten wir RGEN zum Nachweis von Mutationen, die in humanen Zellen durch eine CCR5-spezifische ZFN, die noch eine weitere Klasse von synthetisch hergestellten Nukleasen darstellen, induziert wurden (**Fig. 27**). Diese Ergebnisse zeigen, dass RGEN Mutationen nachweisen können, die durch andere Nukleasen als die RGEN selbst induziert wurden. Tatsächlich erwarten wir, dass RGEN entworfen werden können, die Mutationen nachweisen können, die durch die meisten, wenn nicht alle

synthetisch hergestellten Nukleasen induziert werden. Die einzige Beschränkung beim Entwurf eines RGEN-Genotypisierungsassays ist, dass ein GG- oder AG-Dinukleotid (CC oder CT am komplementären Strang) in der PAM-Sequenz erforderlich ist, die durch das Cas9-Protein erkannt wird, was im Mittel einmal pro 4 bp auftritt. Wir gehen davon aus, dass Indels, die irgendwo innerhalb der Keimregion mehrerer Basen in crRNA und den PAM-Nukleotiden induziert werden, die RGEN-katalysierte DNA-Spaltung unterbrechen. Tatsächlich identifizierten wir mindestens einen RGEN-Ort in den meisten (98%) der ZFN- und TALEN-Orte.

**[0236]** 9-11. Nachweis von Polymorphismen oder Variationen unter Verwendung von RGEN Anschließend entwarfen wir eine neue RGEN, die einen hoch polymorphen Locus, HLA-B, anvisiert, der für das humane Leukozyten-Antigen B (auch bekannt als MHC-Klasse-I-Protein) codiert, und testeten diese (**Fig. 28**). HeLa-Zellen wurden mit RGEN-Plasmiden transfiziert und die genomische DNA wurde parallel T7E1- und RGEN-RFLP-Analysen unterzogen. Das T7E1 erzeugte falsch positive Banden, die aus Sequenzpolymorphismen nahe am Zielort resultierten (**Fig. 25c**). Wie erwartet, spaltete das gleiche RGEN, das zur Genunterbrechung verwendet wurde, PCR-Produkte aus Wildtyp-Zellen vollständig, die von RGEN-transfizierten Zellen jedoch nur partiell, was auf das Vorhandensein von RGEN-induzierten Indels am Zielort hindeutet. Dieses Ergebnis zeigt, dass die RGEN-RFLP-Analyse gegenüber dem T7E1-Assay eindeutig im Vorteil ist, insbesondere wenn nicht bekannt ist, ob Zielgene Polymorphismen oder Variationen in den interessierenden Zellen aufweisen.

**[0237]** 9-12. Nachweis von wiederkehrenden Mutationen, die bei Krebs gefunden werden, sowie von natürlich auftretenden Polymorphismen durch eine RGEN-RFLP-Analyse Die RGEN-RFLP-Analyse hat Anwendungen über die Genotypisierung von synthetisch hergestellten nukleaseinduzierten Mutationen hinaus. Wir verwendeten die RGEN-Genotypisierung, um bei Krebs zu findende, wiederkehrende Mutationen sowie natürlich auftretende Polymorphismen nachzuweisen. Wir wählten die humane Kolorektalkrebs-Zelllinie HCT116, die eine Funktionsgewinn-3-bp-Deletion im onkogenen CTNNB1-Gen trägt, das für beta-Catenin codiert. Aus genomischer HCT116-DNA amplifizierte PCR-Produkte wurden sowohl von wildtypspezifischen als auch mutantenspezifischen RGEN gespalten, was mit dem heterozygoten Genotyp in HCT116-Zellen übereinstimmt (**Fig. 29a**). Ganz im Gegensatz dazu wurden PCR-Produkte, die aus DNA aus nur Wildtyp-Allele tragenden HeLa-Zellen amplifiziert wurden, vollständig von wildtypspezifischen RGEN verdaut und wurden durch die mutationspezifische RGEN überhaupt nicht gespalten.

**[0238]** Wir stellten auch fest, dass HEK293-Zellen die 32-bp-Deletion (del32) im CCR5-Gen tragen, die für einen essenziellen Co-Rezeptor der HIV-Infektion codiert: Homozygote del32-CCR5-Träger sind immun gegenüber einer HIV-Infektion. Wir entwarfen eine RGEN, die für das del32-Allel spezifisch war, und eine andere, die für das Wildtyp-Allel spezifisch war. Wie erwartet, spaltete die wildtypspezifische RGEN die aus K562-, SKBR3- oder HeLa-Zellen (die als Wildtyp-Kontrollen verwendet wurden) erhaltenen PCR-Produkte vollständig, die aus HEK293-Zellen erhaltenen jedoch nur partiell (**Fig. 30a**), was das Vorhandensein des nicht spaltbaren del32-Allels in den HEK293-Zellen bestätigt. Unerwarteterweise spaltete die del32-spezifische RGEN jedoch die PCR-Produkte aus den Wildtyp-Zellen genauso effizient wie die aus HEK293-Zellen. Interessanterweise hatte diese RGEN einen Off-Target-Ort mit einer Ein-Basen-Fehlpaarung unmittelbar unterhalb des On-Target-Orts (**Fig. 30**). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass RGEN verwendet werden können, um natürlich auftretende Indels nachzuweisen, jedoch keine Sequenzen mit Einzelnukleotidpolymorphismen oder Punktmutationen unterscheiden können, was eine Folge ihrer Off-Target-Wirkungen ist.

**[0239]** Um onkogene Einzelnukleotid-Variationen unter Verwendung von RGEN zu genotypisieren, attenuierten wir die RGEN-Aktivität, indem wir eine guide-RNA mit einer Ein-Basen-Fehlpaarung anstelle einer perfekt passenden RNA einsetzten. RGEN, die perfekt passende guide-RNA enthielten, die für die Wildtyp-Sequenz oder die mutierte Sequenz spezifisch waren, spalteten beide Sequenzen (**Fig. 31a** und **Fig. 32a**). Im Gegensatz dazu unterschieden RGEN, die eine guide-RNA mit einer Ein-Basen-Fehlpaarung enthielten, die beiden Sequenzen, was eine Genotypisierung der drei wiederkehrenden Punktmutationen in den KRAS-, PIK3CA- und IDH1-Genen in humanen Krebszelllinien ermöglichte (**Fig. 29b** und **Fig. 33a, b**). Außerdem konnten wir unter Verwendung von RGEN, die die NAG-PAM-Sequenz erkennen, Punktmutationen in den BRAF- und NRAS-Genen nachweisen (**Fig. 33c, d**). Wir glauben, dass wir RGEN-RFLP zur Genotypisierung eines Großteils, wenn nicht aller Mutationen oder Polymorphismen in humanen und anderen Genomen verwenden können.

**[0240]** Die oben vorgestellten Daten schlagen RGEN als eine Plattform vor, um eine einfache und robuste RFLP-Analyse für verschiedene Sequenzvariationen zu verwenden. RGEN mit ihrer hohen Flexibilität bei der Neuprogrammierung der Zielsequenz können verwendet werden, um verschiedene genetische Variationen (Einzelnukleotidvariationen, kleine Insertionen/Deletionen, strukturelle Variationen) wie etwa mit Erkrankungen einhergehende wiederkehrende Mutationen, mit Wirkstoffreaktionen bei einem Patienten verbundene Genotypen und auch durch synthetisch hergestellte Nukleasen in Zellen induzierte Mutationen nachzuweisen. Hier

verwendeten wir eine RGEN-Genotypisierung, um durch synthetisch hergestellte Nukleasen in Zellen und Tieren induzierte Mutationen nachzuweisen. Grundsätzlich könnte man auch RGEN nutzen, die natürlich auftretende Variationen und Mutationen spezifisch nachweisen und spalten.

**[0241]** Basierend auf der oben erfolgten Beschreibung versteht sich für einen Fachmann, dass verschiedene Alternativen der Ausführungsformen der Erfindung, die hier beschrieben sind, in der Ausführung der Erfindung eingesetzt werden können, ohne von der technischen Idee oder wesentlichen Merkmalen der Erfindung, wie sie in den folgenden Ansprüchen definiert werden, abzuweichen. In dieser Hinsicht dienen die oben beschriebenen Beispiele nur der Erläuterung und es ist nicht beabsichtigt, dass die Erfindung durch diese Beispiele eingeschränkt wird. Der Umfang der vorliegenden Erfindung ist so aufzufassen, dass alle Modifizierungen oder modifizierten Formen, die sich aus der Bedeutung und dem Umfang der folgenden Ansprüche oder deren äquivalenten Konzepte ableiten, darin eingeschlossen sind.

**[0242]** Die Anmeldung offenbart folgende nicht-einschränkende Ausführungsformen der Erfindung:

1. Zusammensetzung zum Spalten einer Ziel-DNA in eukaryotischen Zellen oder Organismen, umfassend eine für die Ziel-DNA spezifische guide-RNA oder eine diese guide-RNA codierende DNA und eine Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder ein Cas-Protein.
2. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1, wobei die Ziel-DNA eine endogene Ziel-DNA ist.
3. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1, wobei die guide-RNA eine dualRNA ist, die eine crRNA und eine tracrRNA umfasst.
4. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1, wobei die guide-RNA eine einkettige guide-RNA (sgRNA) ist.
5. Zusammensetzung nach Ausführungsform 4, wobei die einkettige guide-RNA einen Teil einer crRNA und einer tracrRNA umfasst.
6. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1, wobei die guide-RNA des Weiteren ein oder mehrere zusätzliche Nukleotide am 5'-Ende der einkettigen guide-RNA oder der crRNA der dualRNA umfasst.
7. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1, wobei die guide-RNA des Weiteren 2 zusätzliche Guanin-Nukleotide am 5'-Ende der einkettigen guide-RNA oder der crRNA der dualRNA umfasst.
8. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1, die eine gezielte Mutagenese in eukaryotischen Zellen oder Organismen induziert.
9. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1 zur Verwendung beim Genotypisieren eines Genoms in den eukaryotischen Zellen oder Organismen in vitro.
10. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1, wobei die guide-RNA und das Cas-Protein als ein Paar arbeiten und wobei das Paar zwei guide-RNAs umfasst, die zwei Einzelstrangbrüche an verschiedenen Strängen induzieren.
11. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1, wobei die guide-RNA in der Form einer isolierten RNA vorliegt oder in einem Vektor codiert ist, wobei der Vektor ein viraler Vektor, ein Plasmidvektor oder ein Agrobakterien-Vektor ist.
12. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1, umfassend eine guide-RNA, die für die Ziel-DNA und das Cas9-Protein spezifisch ist.
13. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1 zum Spalten der Ziel-DNA in eukaryotischen Zellen oder Organismen ex vivo oder in vivo.
14. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1, wobei die Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder das Cas-Protein aus der Gattung Streptococcus gewonnen wurde.
15. Zusammensetzung nach Ausführungsform 14, wobei die Gattung Streptococcus Streptococcus pyogenes ist.
16. Zusammensetzung nach Ausführungsform 15, wobei das Cas-Protein das NGG-Trinukleotid erkennt.
17. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1, wobei das Cas-Protein das Cas9-Protein oder eine Variante davon ist.
18. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1, wobei das Cas-Protein mit einer Proteintransduktionsdomäne verknüpft ist.
19. Zusammensetzung nach Ausführungsform 17, wobei die Variante des Cas9-Proteins eine mutierte Form von Cas9 ist, bei der der katalytische Aspartatrest durch jegliche andere Aminosäure ausgetauscht wurde.
20. Zusammensetzung nach Ausführungsform 19, wobei die Aminosäure Alanin ist.
21. Zusammensetzung nach Ausführungsform 1, wobei die Cas-Protein-codierende Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz von SEQ ID NO. 1 oder eine Nukleotidsequenz mit mindestens 50%iger Homologie zu SEQ ID NO. 1 umfasst.
22. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ausführungsformen 1 bis 21 zur gezielten Mutagenese in eukaryotischen Zellen oder Organismen.

23. Kit zum Spalten einer Ziel-DNA in eukaryotischen Zellen oder Organismen, umfassend die Zusammensetzung nach einem der Ausführungsformen 1 bis 21.
24. Verfahren zur Herstellung einer eukaryotischen Zelle oder eines Organismus, umfassend ein Cas-Protein und eine guide-RNA, umfassend einen Schritt der Co-Transfektion oder aufeinanderfolgenden Transfektion der eukaryotischen Zelle oder des Organismus mit einer Cas-Protein-codierenden Nukleinsäure oder einem Cas-Protein und einer guide-RNA oder einer diese guide-RNA codierenden DNA.
25. Verfahren nach Ausführungsform 24, wobei die guide-RNA eine dualRNA ist, die eine crRNA und eine tracrRNA umfasst.
26. Verfahren nach Ausführungsform 24, wobei die guide-RNA eine einkettige guide-RNA ist.
27. Verfahren nach Ausführungsform 26, wobei die einkettige guide-RNA einen Teil einer crRNA und einer tracrRNA umfasst.
28. Verfahren nach Ausführungsform 24, wobei die guide-RNA des Weiteren ein oder mehrere zusätzliche Nukleotide am 5'-Ende der einkettigen guide-RNA oder der crRNA der dualRNA umfasst.
29. Verfahren nach Ausführungsform 24, wobei die guide-RNA des Weiteren 2 zusätzliche Guanin-Nukleotide am 5'-Ende der einkettigen guide-RNA oder der crRNA der dualRNA umfasst.
30. Verfahren nach Ausführungsform 24, wobei die eukaryotische Zelle oder der Organismus mit einem Cas9-Protein und einer guide-RNA co-transfiziert oder aufeinanderfolgend transfiziert wird.
31. Verfahren nach Ausführungsform 24, wobei die aufeinanderfolgende Transfektion zunächst durch Transfektion mit einer Cas-Protein-codierenden Nukleinsäure, gefolgt von einer zweiten Transfektion mit nackter guide-RNA, erfolgt.
32. Verfahren nach Ausführungsform 24, wobei das Cas-Protein das Cas9-Protein oder eine Variante davon ist.
33. Verfahren nach Ausführungsform 24, wobei die Cas-Protein-codierende Nukleinsäure oder das Cas-Protein aus der Gattung Streptococcus gewonnen wurde.
34. Verfahren nach Ausführungsform 33, wobei die Gattung Streptococcus Streptococcus pyogenes ist.
35. Verfahren nach Ausführungsform 32, wobei die Variante des Cas9-Proteins eine mutierte Form von Cas9 ist, bei der der katalytische Aspartatrest durch jegliche andere Aminosäure ausgetauscht wurde.
36. Verfahren nach Ausführungsform 35, wobei die Aminosäure Alanin ist.
37. Verfahren nach Ausführungsform 24, wobei die guide-RNA und das Cas-Protein als ein Paar arbeiten und wobei das Paar zwei guide-RNAs umfasst, die zwei Einzelstrangbrüche an verschiedenen DNA-Strängen induzieren.
38. Verfahren nach Ausführungsform 37, wobei die zwei Einzelstrangbrüche durch mindestens 100 bp voneinander entfernt sind.
39. Verfahren nach Ausführungsform 24, wobei die Transfektion durch das Verfahren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Mikroinjektion, Elektroporation, DEAE-Dextran-Behandlung, Lipofektion, nanopartikelvermittelter Transfektion, Proteintransduktionsdomäne-vermittelter Transduktion, virusvermittelter Gentransfer und PEG-vermittelter Transfektion in Protoplasten durchgeführt wird.
40. Eukaryotische Zelle oder Organismus, umfassend ein Cas-Protein und eine guide-RNA, hergestellt durch das Verfahren nach einem der Ausführungsformen 24 bis 39.
41. Verfahren zum Spalten einer Ziel-DNA in eukaryotischen Zellen oder Organismen, umfassend einen Schritt des Transfizierens der eukaryotischen Zellen oder der Organismen, umfassend eine Ziel-DNA mit einer Zusammensetzung nach einem der Ausführungsformen 1 bis 21.
42. Verfahren nach Ausführungsform 41, wobei die eukaryotischen Organismen Säugetiere oder Pflanzen sind.
43. Verfahren nach Ausführungsform 41, wobei die guide-RNA und das Cas-Protein als ein Paar arbeiten und wobei das Paar zwei guide-RNAs umfasst, die zwei Einzelstrangbrüche an verschiedenen DNA-Strängen induzieren.
44. Verfahren nach Ausführungsform 43, wobei die zwei Einzelstrangbrüche durch mindestens 100 bp voneinander entfernt sind.
45. Verfahren nach Ausführungsform 41, wobei die Transfektion eine Co-Transfektion oder eine aufeinanderfolgende Transfektion ist.
46. Verfahren nach Ausführungsform 45, wobei die aufeinanderfolgende Transfektion zunächst durch Transfektion mit einer Cas-Protein-codierenden Nukleinsäure, gefolgt von einer zweiten Transfektion mit nackter guide-RNA, erfolgt.
47. Verfahren nach Ausführungsform 41, des Weiteren umfassend einen Schritt der Analyse des Musters einer Spaltung, wobei das Muster den Nachweis der Mutation oder Variation im Genom angibt.
48. Embryo, umfassend ein Genom, das durch die Zusammensetzung nach einem der Ausführungsformen 1 bis 21 editiert wurde.
49. Genommodifiziertes Tier, das durch Überführen des Embryos nach Ausführungsform 48 in die Eileiter erhalten wird

50. Pflanze, regeneriert aus den genommodifizierten Protoplasten, die durch das Verfahren nach einem der Ausführungsformen 24 bis 39 hergestellt wurden.
51. Verfahren zur Herstellung eines genommodifizierten Tieres, umfassend einen Schritt des Einführens einer Zusammensetzung nach einem der Ausführungsformen 1 bis 21 in einen Embryo eines Tiers und einen Schritt des Überführens des Embryos in einen Eileiter einer pseudoschwangeren Amme, um ein genommodifiziertes Tier zu erzeugen.
52. Zusammensetzung zur Genotypisierung von Mutationen oder Variationen in einer isolierten biologischen Probe, umfassend eine für das Ziel-DNA-Sequenz-Cas-Protein spezifische guide-RNA.
53. Zusammensetzung nach Ausführungsform 52, wobei die Mutationen oder Variationen durch synthetisch hergestellte Nukleasen in Zellen induziert wurden.
54. Zusammensetzung nach Ausführungsform 52, wobei die Mutationen oder Variationen natürlich auftretende Mutationen oder Variationen sind.
55. Zusammensetzung zur Genotypisierung von Nukleinsäuresequenzen in pathogenen Mikroorganismen in einer isolierten biologischen Probe, umfassend eine für die Ziel-DNA-Sequenz spezifische guide-RNA und ein Cas-Protein.
56. Kit zur Genotypisierung von Mutationen oder Variationen in einer isolierten biologischen Probe, umfassend die Zusammensetzung nach einem der Ausführungsformen 52 bis 55.
57. Verfahren zur Genotypisierung von Mutationen oder Variationen in einer isolierten biologischen Probe unter Verwendung der Zusammensetzung nach einem der Ausführungsformen 52 bis 55.

## [Literatur]

1. M. Jinek et al., *Science* 337, 816 (17. Aug. 2012).
2. H. Kim, E. Um, S. R. Cho, C. Jung, J. S. Kim, *Nat Methods* 8, 941 (Nov. 2011).
3. H. J. Kim, H. J. Lee, H. Kim, S. W. Cho, J. S. Kim, *Genome Res* 19, 1279 (Juli 2009).
4. E. E. Perez et al., *Nat Biotechnol* 26, 808 (Juli 2008).
5. J. C. Miller et al., *Nat Biotechnol* 29, 143 (Feb. 2011).
6. C. Mussolino et al., *Nucleic Acids Res* 39, 9283 (Nov. 2011).
7. J. Cohen, *Science* 332, 784 (13. Mai 2011).
8. V. Pattanayak, C. L. Ramirez, J. K. Joung, D. R. Liu, *Nat Methods* 8, 765 (Sep. 2011).
9. R. Gabriel et al., *Nat Biotechnol* 29, 816 (Sep. 2011).
10. E. Kim et al., *Genome Res*, (20. April 2012).
11. H. J. Lee, J. Kweon, E. Kim, S. Kim, J. S. Kim, *Genome Res* 22, 539 (März 2012).
12. H. J. Lee, E. Kim, J. S. Kim, *Genome Res* 20, 81 (Jan. 2010).
13. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High-frequency offtarget mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotech* vorgezogene Online-Veröffentlichung (2013)

<110> TOOLGEN INCORPORATED

<120> ZUSAMMENSETZUNG ZUM SPALTEN EINER ZIEL-DNA, UMFASSEND EINE FÜR DIE ZIEL-DNA SPEZIFISCHE GUIDE-DNA UND EINE CAS-PROTEIN CODIERENDE NUKLEINSÄURE ODER EIN CAS-PROTEIN, SOWIE DEREN VERWENDUNG

<130> 104653DEGM-ABZ2

<150> US 61/717,324  
<151> 2012-10-23

<150> US 61/803,599  
<151> 2013-03-20

<150> US 61/837,481  
<151> 2013-06-20

<160> 111

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1  
<211> 4107  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Cas9 kodierende Sequenz

<400> 1

atggacaaga agtacagcat cggcctggac atcggtagca acagcgtggg ctgggccgtg 60

atcaccgacg agtacaaggt gcccagcaag aagttcaagg tgctgggcaa caccgaccgc 120

cacagcatca agaagaacct gatcggcgcc ctgctgttcg acagcggcga gaccgccgag 180

gccacccgcc tgaagcgcac cgcccgccgc cgctacacc gccgaagaa ccgcatctgc 240

tacctgcagg agatcttcag caacgagatg gccaaggtgg acgacagctt cttccaccgc 300

ctggaggaga gcttcctggt ggaggaggac aagaagcacg agcggcacc catcttcggc 360

aacatcgtgg acgaggtggc ctaccacgag aagtaccca ccatctacca cctgcgcaag 420

aagctggtgg acagcaccga caaggccgac ctgctgcctga tctacctggc cctggcccac 480

atgatcaagt tccgcggcca cttcctgatc gagggcgacc tgaaccccga caacagcgac 540

gtggacaagc tgttcatcca gctggtgcag acctacaacc agctgttcga ggagaacccc 600

atcaacgcca gcggcgtgga cgccaaggcc atcctgagcg cccgcctgag caagagccgc 660

cgcttgagga acctgatcgc ccagctgccc ggcgagaaga agaacggcct gttcggcaac 720

ctgatcgccc tgagcctggg cctgaccccc aacttcaaga gcaacttcga cctggccgag 780

gacgccaagc tgcagctgag caaggacacc tacgacgacg acctggacaa cctgctggcc 840

cagatcggcg accagtacgc cgacctgttc ctggccgcca agaacctgag cgacgccatc 900

ctgctgagcg acatcctgcg cgtgaacacc gagatcacca aggccccct gagcgccagc 960

atgatcaagc gctacgacga gcaccaccag gacctgacc tgctgaaggc cctggtgcgc 1020

cagcagctgc	ccgagaagta	caaggagatc	ttcttcgacc	agagcaagaa	cggctacgcc	1080
ggctacatcg	acggcgggcg	cagccaggag	gagttctaca	agttcatcaa	gcccacctg	1140
gagaagatgg	acggcaccga	ggagctgctg	gtgaagctga	accgcgagga	cctgctgcgc	1200
aagcagcgca	ccttcgacaa	cggcagcatc	ccccaccaga	tccacctggg	cgagctgcac	1260
gccacctgc	gccgccagga	ggactttctac	cccttcctga	aggacaaccg	cgagaagatc	1320
gagaagatcc	tgaccttccg	catcccctac	tacgtgggcc	ccctggcccc	cggcaacagc	1380
cgcttcgcct	ggatgacccg	caagagcgag	gagaccatca	ccccctggaa	cttcgaggag	1440
gtggtggaca	agggcgccag	cgcccagagc	ttcatcgagc	gcatgaccaa	cttcgacaa	1500
aacctgcca	acgagaaggt	gctgccccaa	cacagcctgc	tgtacgagta	cttcaccgtg	1560
tacaacgagc	tgaccaaggt	gaagtacgtg	accgagggca	tgcgcaagcc	cgccttcctg	1620
agcggcgagc	agaagaaggc	catcgtggac	ctgctgttca	agaccaaccg	caaggtgacc	1680
gtgaagcagc	tgaaggagga	ctacttcaag	aagatcgagt	gcttcgacag	cgtggagatc	1740
agcggcggtg	aggaccgctt	caacgccagc	ctgggcacct	accacgacct	gctgaagatc	1800
atcaaggaca	aggacttcct	ggacaacgag	gagaacgagg	acatcctgga	ggacatcgtg	1860
ctgaccctga	ccctgttcga	ggaccgcgag	atgatcgagg	agcgcctgaa	gacctacgcc	1920
cacctgttcg	acgacaaggt	gatgaagcag	ctgaagcgcc	gccgctacac	cggctggggc	1980
cgcctgagcc	gcaagcttat	caacggcatc	cgcgacaagc	agagcggcaa	gaccatcctg	2040
gacttcctga	agagcgacgg	cttcgccaac	cgcaacttca	tgcagctgat	ccacgacgac	2100
agcctgacct	tcaaggagga	catccagaag	gcccaggtga	gcggccaggg	cgacagcctg	2160
cacgagcaca	tcgccaacct	ggccggcagc	cccgccatca	agaagggcat	cctgcagacc	2220
gtgaaggtgg	tggacgagct	ggtgaaggtg	atgggcccgc	acaagcccga	gaacatcgtg	2280
atcgagatgg	cccgcgagaa	ccagaccacc	cagaagggcc	agaagaacag	ccgcgagcgc	2340
atgaagcgca	tcgaggaggg	catcaaggag	ctgggcagcc	agatcctgaa	ggagcacccc	2400
gtggagaaca	cccagctgca	gaacgagaag	ctgtacctgt	actacctgca	gaacggccgc	2460
gacatgtacg	tggaccagga	gctggacatc	aaccgcctga	gcgactacga	cgtggaccac	2520
atcgtgcccc	agagcttcct	gaaggacgac	agcatcgaca	acaaggtgct	gacccgcagc	2580
gacaagaacc	gcggcaagag	cgacaacgtg	cccagcgagg	aggtggtgaa	gaagatgaag	2640
aactactggc	gccagctgct	gaacgccaa	ctgatcacc	agcgaagtt	cgacaacctg	2700
accaaggccg	agcgcggcgg	cctgagcgag	ctggacaagg	ccggcttcat	caagcggcag	2760
ctggtggaga	cccgccagat	caccaagcac	gtggcccaga	tcctggacag	ccgcatgaac	2820
accaagtacg	acgagaacga	caagctgatc	cgcgaggtga	aggtgatcac	cctgaagagc	2880

aagctggtga gcgacttccg caaggacttc cagttctaca aggtgcgca gatcaacaac 2940  
taccaccacg cccacgacgc ctacctgaac gccgtggtgg gcaccgccct gatcaagaag 3000  
taccccaagc tggagagcga gttcgtgtac ggcgactaca aggtgtacga cgtgcaag 3060  
atgatcgcca agagcgagca ggagatcggc aaggccaccg ccaagtactt cttctacagc 3120  
aacatcatga acttcttcaa gaccgagatc accctggcca acggcgagat ccgcaagcgc 3180  
cccctgatcg agaccaacgg cgagaccggc gagatcgtgt gggacaaggg ccgagacttc 3240  
gccaccgtgc gcaaggtgct gagcatgccc caggtgaaca tcgtgaagaa gaccgaggtg 3300  
cagaccggcg gcttcagcaa ggagagcatc ctgcccaagc gcaacagcga caagctgatc 3360  
gcccgcaaga aggactggga cccaagaag tacggcggct tcgacagccc caccgtggcc 3420  
tacagcgtgc tgggtggtggc caaggtggag aagggaaga gcaagaagct gaagagcgtg 3480  
aaggagctgc tgggcatcac catcatggag cgcagcagct tcgagaagaa ccccatcgac 3540  
ttcctggagg ccaagggcta caaggaggtg aagaaggacc tgatcatcaa gctgcccagg 3600  
tacagcctgt tcgagctgga gaacggccgc aagcgcagc tggccagcgc cggcgagctg 3660  
cagaagggca acgagctggc cctgcccagc aagtacgtga acttctgta cctggccagc 3720  
cactacgaga agctgaaggg cagccccgag gacaacgagc agaagcagct gttcgtggag 3780  
cagcacaagc actacctgga cgagatcatc gagcagatca gcgagttcag caagcgcgtg 3840  
atcctggccg acgccaacct ggacaaggtg ctgagcgcct acaacaagca ccgcgacaag 3900  
cccatccgag agcaggccga gaacatcatc cacctgttca ccctgaccaa cctgggagcc 3960  
cccggccct tcaagtactt cgacaccacc atcgaccgca agcgtacac cagcaccaag 4020  
gaggtgctgg acgccaccct gatccaccag agcatcaccg gtctgtacga gacccgcatc 4080  
gacctgagcc agctgggagg cgactaa 4107

<210> 2  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Peptid-Tag

<400> 2  
Gly Gly Ser Gly Pro<sub>5</sub> Pro Lys Lys Lys Arg<sub>10</sub> Lys Val Tyr Pro Tyr<sub>15</sub> Asp  
1  
Val Pro Asp Tyr Ala<sub>20</sub>

<210> 3  
<211> 34  
<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> F-Primer für CCR5  
  
 <400> 3  
 aattcatgac atcaattatt atacatcgga ggag 34  
  
 <210> 4  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> R-Primer für CCR5  
  
 <400> 4  
 gatcctcctc cgatgtataa taattgatgt catg 34  
  
 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> F1-Primer für CCR5  
  
 <400> 5  
 ctccatgggtg ctatagagca 20  
  
 <210> 6  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> F2-Primer für CCR5  
  
 <400> 6  
 gagccaagct ctccatctag t 21  
  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> R-Primer für CCR5  
  
 <400> 7  
 gccctgtcaa gagttgacac 20  
  
 <210> 8

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> F1-Primer für C4BPB  
  
 <400> 8  
 tatttggctg gttgaaaggg 20  
  
 <210> 9  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> R1-Primer für C4BPB  
  
 <400> 9  
 aaagtcatga aataaacaca ccca 24  
  
 <210> 10  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> F2-Primer für C4BPB  
  
 <400> 10  
 ctgcattgat atggtagtac catg 24  
  
 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> R2-Primer für C4BPB  
  
 <400> 11  
 gctgttcatt gcaatggaat g 21  
  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> F1-Primer für ADCY5  
  
 <400> 12  
 gctcccacct tagtgctctg 20

<210> 13  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> R1-Primer für ADCY5  
  
 <400> 13  
 ggtggcagga acctgtatgt 20  
  
 <210> 14  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> F2-Primer für ADCY5  
  
 <400> 14  
 gtcattggcc agagatgtgg a 21  
  
 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> R2-Primer für ADCY5  
  
 <400> 15  
 gtcccatgac aggcgtgtat 20  
  
 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> F-Primer für KCNJ6  
  
 <400> 16  
 gcctggccea gtttcagtta 20  
  
 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> R1-Primer für KCNJ6  
  
 <400> 17  
 tggagccatt ggtttgcac 20

<210> 18  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> R2-Primer für KCNJ6  
  
 <400> 18  
 ccagaactaa gccgtttctg ac 22  
  
 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> F1-Primer für CNTNAP2  
  
 <400> 19  
 atcaccgaca accagtttcc 20  
  
 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> F2-Primer für CNTNAP2  
  
 <400> 20  
 tgcagtgcag actctttcca 20  
  
 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> R-Primer für CNTNAP2  
  
 <400> 21  
 aaggacacag ggcaactgaa 20  
  
 <210> 22  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> F1-Primer für N/A Chr. 5

<400> 22  
 tgtggaacga gtggtgacag 20

<210> 23  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> R1-Primer für N/A Chr. 5

<400> 23  
 gctggattag gaggcaggat tc 22

<210> 24  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> F2-Primer für N/A Chr. 5

<400> 24  
 gtgctgagaa cgcttcatag ag 22

<210> 25  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> R2-Primer für N/A Chr. 5

<400> 25  
 ggaccaaacc acattcttct cac 23

<210> 26  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> F-Primer für Deletion

<400> 26  
 ccacatctcg ttctcggtt 20

<210> 27  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> R-Primer für Deletion

<400>	27		
		tcacaagccc acagatattt	20
<210>	28		
<211>	105		
<212>	RNA		
<213>	Künstliche Sequenz		
<220>			
<223>	sgRNA für CCR5		
<400>	28		
		ggugacauca auuauuuauac auguuuuaga gcuagaaaua gcaaguuaaa auuaggcuag	60
		uccguuauca acuugaaaaa guggcaccga gucggugcuu uuuuu	105
<210>	29		
<211>	44		
<212>	RNA		
<213>	Künstliche Sequenz		
<220>			
<223>	crRNA für CCR5		
<400>	29		
		ggugacauca auuauuuauac auguuuuaga gcuaugcugu uuug	44
<210>	30		
<211>	86		
<212>	RNA		
<213>	Künstliche Sequenz		
<220>			
<223>	tracrRNA für CCR5		
<400>	30		
		ggaaccuuuc aaaacagcau agcaaguuaa auuaggcuu guccguuauc aacuugaaaa	60
		aguggcaccg agucggugcu uuuuuu	86
<210>	31		
<211>	86		
<212>	DNA		
<213>	Künstliche Sequenz		
<220>			
<223>	Foxn1 #1 sgRNA		
<400>	31		
		gaaattaata cgactcacta taggcagtct gacgtcacac ttccgtttta gagctagaaa	60
		tagcaagtta aaataaggct agtccg	86

<210> 32  
 <211> 86  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Foxn1 #2 sgRNA  
  
 <400> 32  
 gaaattaata cgactcacta taggacttcc aggctccacc cgacgtttta gagctagaaa 60  
 tagcaagtta aaataaggct agtccg 86  
  
 <210> 33  
 <211> 86  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Foxn1 #3 sgRNA  
  
 <400> 33  
 gaaattaata cgactcacta taggccaggc tccacccgac tggagtttta gagctagaaa 60  
 tagcaagtta aaataaggct agtccg 86  
  
 <210> 34  
 <211> 86  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Foxn1 #4 sgRNA  
  
 <400> 34  
 gaaattaata cgactcacta taggactgga gggcgaaccc caaggtttta gagctagaaa 60  
 tagcaagtta aaataaggct agtccg 86  
  
 <210> 35  
 <211> 86  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Foxn1 #5 sgRNA  
  
 <400> 35  
 gaaattaata cgactcacta taggacccca aggggacctc atgcgtttta gagctagaaa 60  
 tagcaagtta aaataaggct agtccg 86  
  
 <210> 36  
 <211> 86

<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Prkdc #1 sgRNA

<400> 36  
gaaattaata cgactcacta taggttagtt tttccagag acttgtttta gagctagaaa 60  
tagcaagtta aaataaggct agtccg 86

<210> 37  
<211> 86  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Prkdc #2 sgRNA

<400> 37  
gaaattaata cgactcacta taggttggtt tgcttggtt tatcgtttta gagctagaaa 60  
tagcaagtta aaataaggct agtccg 86

<210> 38  
<211> 86  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Prkdc #3 sgRNA

<400> 38  
gaaattaata cgactcacta taggcacaag caaaccaaag tctcgtttta gagctagaaa 60  
tagcaagtta aaataaggct agtccg 86

<210> 39  
<211> 86  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Prkdc #4 sgRNA

<400> 39  
gaaattaata cgactcacta taggcctcaa tgctaagcga cttcgtttta gagctagaaa 60  
tagcaagtta aaataaggct agtccg 86

<210> 40  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> F1-Primer für Foxn1

<400> 40  
 gtctgtctat catctcttcc cttctctcc 29

<210> 41  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> F2-Primer für Foxn1

<400> 41  
 tccctaatacc gatggctagc tccag 25

<210> 42  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> R1-Primer für Foxn1

<400> 42  
 acgagcagct gaagtttagca tgc 23

<210> 43  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> R2-Primer für Foxn1

<400> 43  
 ctactcaatg ctcttagagc taccaggctt gc 32

<210> 44  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> F-Primer für Prkdc

<400> 44  
 gactgttgtg gggagggccg 20

<210> 45  
 <211> 24  
 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> F2-Primer für Prkdc  
  
 <400> 45  
 gggagggccg aaagtcttat tttg 24  
  
 <210> 46  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> R1-Primer für Prkdc  
  
 <400> 46  
 cctgaagact gaagttggca gaagtgag 28  
  
 <210> 47  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> R2-Primer für Prkdc  
  
 <400> 47  
 cttagggct tcttctctac aatcacg 27  
  
 <210> 48  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> F-Primer für Foxn1  
  
 <400> 48  
 ctcggtgtgt agccctgacc tcggtgtgta gccctgac 38  
  
 <210> 49  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> R-Primer für Foxn1  
  
 <400> 49  
 agactggcct ggaactcaca g 21  
  
 <210> 50

<211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> F-Primer für Foxn1  
  
 <400> 50  
 cactaaagcc tgtcaggaag ccg 23  
  
 <210> 51  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> R-Primer für Foxn1  
  
 <400> 51  
 ctgtggagag cacacagcag c 21  
  
 <210> 52  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> F-Primer für Foxn1  
  
 <400> 52  
 gctgcgacct gagaccatg 19  
  
 <210> 53  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> R-Primer für Foxn1  
  
 <400> 53  
 cttcaatggc ttcttgctta ggctac 26  
  
 <210> 54  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> F-Primer für Foxn1  
  
 <400> 54  
 ggttcagatg aggccatcct ttc 23

<210> 55  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> R-Primer für Foxn1  
  
 <400> 55  
 cctgatctgc aggcttaacc cttg 24  
  
 <210> 56  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> F-Primer für Prkdc  
  
 <400> 56  
 ctcacctgca catcacatgt gg 22  
  
 <210> 57  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> R-Primer für Prkdc  
  
 <400> 57  
 ggcatccacc ctatggggtc 20  
  
 <210> 58  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> F-Primer für Prkdc  
  
 <400> 58  
 gccttgacct agagcttaaa gagcc 25  
  
 <210> 59  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> R-Primer für Prkdc  
  
 <400> 59

ggtcttgta gcaggaagga cactg 25

<210> 60  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> F-Primer für Prkdc

<400> 60  
 aaaactctgc ttgatgggat atgtggg 27

<210> 61  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> R-Primer für Prkdc

<400> 61  
 ctctcactgg ttatctgtgc tccttc 26

<210> 62  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> F-Primer für Prkdc

<400> 62  
 ggatcaatag gtggtggggg atg 23

<210> 63  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> R-Primer für Prkdc

<400> 63  
 gtgaatgaca caatgtgaca gcttcag 27

<210> 64  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> F-Primer für Prkdc

<400> 64  
 cacaagacag acctctcaac attcagtc 28

<210> 65  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> R-Primer für Prkdc

<400> 65  
 gtgcatgcat ataatccatt ctgattgctc tc 32

<210> 66  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> F1-Primer für Prkdc

<400> 66  
 gggaggcaga ggcaggt 17

<210> 67  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> F2-Primer für Prkdc

<400> 67  
 ggatctctgt gagtttgagg cca 23

<210> 68  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> R1-Primer für Prkdc

<400> 68  
 gctccagaac tcaactcttag gctc 24

<210> 69  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer für Foxn1 -----

<400> 69  
ctactccctc cgcagtctga 20

<210> 70  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer für Foxn1

<400> 70  
ccaggcctag gttccaggta 20

<210> 71  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer für Prkdc

<400> 71  
ccccagcatt gcagatttcc 20

<210> 72  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer für Prkdc

<400> 72  
agggcttctt ctctacaatc acg 23

<210> 73  
<211> 86  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> BRI1 Ziel 1

<400> 73  
gaaattaata cgactcacta taggtttgaa agatggaagc gcgggtttta gagctagaaa 60  
tagcaagtta aaataaggct agtccg 86

<210> 74  
<211> 86

<212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> BRI1 Ziel 2

<400> 74  
 gaaattaata cgactcacta taggtgaaac taaactggtc cacagtttta gagctagaaa 60  
 tagcaagtta aaataaggct agtccg 86

<210> 75  
 <211> 64  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Universal

<400> 75  
 aaaaaagcac cgactcggcg ccactttttc aagttgataa cggactagcc ttattttaac 60  
 ttgc 64

<210> 76  
 <211> 65  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Matrizen für crRNA

<400> 76  
 gaaattaata cgactcacta taggnnnnnn nnnnnnnnnn nnnngtttta gagctatgct 60  
 gtttt 65

<210> 77  
 <211> 67  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> tracrRNA

<400> 77  
 gaaattaata cgactcacta taggaacat taaaacagc atagcaagtt aaaataaggc 60  
 tagtccg 67

<210> 78  
 <211> 69  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> tracrRNA

<400> 78  
 aaaaaaagca ccgactcggg gccacttttt caagttgata acggactagc cttattttaa 60  
 cttgctatg 69

<210> 79  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 79  
 ctccatgggtg ctatagagca 20

<210> 80  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 80  
 gagccaagct ctccatctag t 21

<210> 81  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 81  
 gccctgtcaa gagttgacac 20

<210> 82  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 82  
 gcacaggggtg gaacaagatg ga 22

<210> 83

<211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 83  
 gccaggtacc tatcgattgt cagg 24

<210> 84  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 84  
 gagccaagct ctccatctag t 21

<210> 85  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 85  
 actctgactg ggtcaccagc 20

<210> 86  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 86  
 tatttgctg gttgaaaggg 20

<210> 87  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 87  
 aaagtcatga aataaacaca ccca 24

<210> 88  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 88  
 ctgcattgat atggtagtac catg 24

<210> 89  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 89  
 gctgttcatt gcaatggaat g 21

<210> 90  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 90  
 atggagttgg acatggccat gg 22

<210> 91  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 91  
 actcactatc cacagttcag catttacc 28

<210> 92  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 92

tggagatagc tgtcagcaac ttt 23

<210> 93  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 93  
 caacaaagca aaggtaaagt tggtaatag 29

<210> 94  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 94  
 ggtttcagga gatgtgttac aaggc 25

<210> 95  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 95  
 gattgtgcaa ttcctatgca atcggtc 27

<210> 96  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 96  
 cactgggtac ttaatctgta gcctc 25

<210> 97  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 97  
 ggttccaagt cattcccagt agc 23

<210> 98  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 98  
 catcactgca gttgtaggtt ataactatcc 30

<210> 99  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 99  
 ttgaaaacca cagatctggt tgaacc 26

<210> 100  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 100  
 ggagtgccaa gagaatatct gg 22

<210> 101  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 101  
 ctgaaactgg tttcaaaata ttcgttttaa gg 32

<210> 102  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 102  
gctctgtatg ccctgtagta gg 22

<210> 103  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 103  
tttgcacatg accttacctt tg 22

<210> 104  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Zielsequenz von RGEN

<400> 104  
aatgaccact acatcctcaa ggg 23

<210> 105  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Zielsequenz von RGEN

<400> 105  
agatgatgtc tcacatcag agg 23

<210> 106  
<211> 4170  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Cas9 kodierende Sequenz in p3s-Cas9HC (humanisiert, C-terminales Tagging, humane Zelleexperimente)

<400> 106  
atggacaaga agtacagcat cggcctggac atcggtagca acagcgtggg ctgggccgtg 60  
atcaccgacg agtacaaggt gccagcaag aagttcaagg tgctgggcaa caccgaccgc 120  
cacagcatca agaagaacct gatcggcgcc ctgctgttcg acagcggcga gaccgccgag 180

gccacccgcc tgaagcgcac cgcccgccgc cgctacaccc gccgcaagaa ccgcatctgc	240
tacctgcagg agatcttcag caacgagatg gccaaaggtgg acgacagctt cttccaccgc	300
ctggaggaga gcttcctggt ggaggaggac aagaagcacg agcgccaccc catcttcggc	360
aacatcgtgg acgaggtggc ctaccacgag aagtaccca ccatctacca cctgcgcaag	420
aagctggtgg acagcaccga caaggccgac ctgcgctga tctacctggc cctggcccac	480
atgatcaagt tccgcgcca cttcctgacg gagggcgacc tgaacccga caacagcgac	540
gtggacaagc tgttcatcca gctggtgcag acctacaacc agctgttcga ggagaacccc	600
atcaacgcca gcggcggtga cgccaaggcc atcctgagcg cccgcctgag caagagccgc	660
cgcttgaga acctgatcgc ccagctgccc ggcgagaaga agaacggcct gttcggcaac	720
ctgatcgcct tgagcctggg cctgaccccc aacttcaaga gcaacttcga cctggccgag	780
gacgccaagc tgcagctgag caaggacacc tacgacgacg acctggacaa cctgctggcc	840
cagatcggcg accagtacgc cgacctgttc ctggccgcca agaacctgag cgacgccatc	900
ctgctgagcg acatcctgcg cgtgaacacc gagatcacca aggccccct gagcgccagc	960
atgatcaagc gctacgacga gcaccaccag gacctgacc tgctgaaggc cctggtgctc	1020
cagcagctgc ccgagaagta caaggagatc ttcttcgacc agagcaagaa cggctacgcc	1080
ggctacatcg acggcgggcg cagccaggag gagttctaca agttcatcaa gcccacctg	1140
gagaagatgg acggcaccga ggagctgctg gtgaagctga accgcgagga cctgctgctc	1200
aagcagcgca ccttcgacaa cggcagcatc ccccaccaga tccacctggg cgagctgcac	1260
gccatcctgc gccgccagga ggacttctac cccttcctga aggacaaccg cgagaagatc	1320
gagaagatcc tgaccttcg catcccctac tacgtggggc ccctggcccg cggcaacagc	1380
cgcttcgcct ggatgaccgg caagagcgag gagaccatca ccccctggaa cttcgaggag	1440
gtggtggaca agggcgccag cgcccagagc ttcatcgagc gcatgaccaa cttcgacaag	1500
aacctgcca acgagaaggt gctgcccagg cacagcctgc tgtacgagta cttcaccgtg	1560
tacaacgagc tgaccaaggt gaagtacgtg accgagggca tgcgcaagcc cgccttcctg	1620
agcggcgagc agaagaaggc catcgtggac ctgctgttca agaccaaccg caaggtgacc	1680
gtgaagcagc tgaaggagga ctacttcaag aagatcgagt gcttcgacag cgtggagatc	1740
agcggcggtg aggaccgctt caacgccagc ctgggcacct accacgacct gctgaagatc	1800
atcaaggaca aggacttcct ggacaacgag gagaacgagg acatcctgga ggacatcgtg	1860
ctgaccctga ccctgttcga ggaccgcgag atgatcgagg agcgcctgaa gacctacgcc	1920
cacctgttcg acgacaaggt gatgaagcag ctgaagcgcc gccgctacac cggctggggc	1980
cgcttgagcc gcaagcttat caacggcatc cgcgacaagc agagcggcaa gaccatcctg	2040
gacttcctga agagcgacgg cttcgccaac cgcaacttca tgcagctgat ccacgacgac	2100

agcctgacct	tcaaggagga	catccagaag	gcccaggtga	gcggccaggg	cgacagcctg	2160
cacgagcaca	tcgccaacct	ggccggcagc	cccgccatca	agaagggcat	cctgcagacc	2220
gtgaaggtgg	tggacgagct	ggtgaaggtg	atgggccgcc	acaagcccga	gaacatcgtg	2280
atcgagatgg	cccgcgagaa	ccagaccacc	cagaagggcc	agaagaacag	ccgcgagcgc	2340
atgaagcgca	tcgaggaggg	catcaaggag	ctgggcagcc	agatcctgaa	ggagcacccc	2400
gtggagaaca	cccagctgca	gaacgagaag	ctgtacctgt	actacctgca	gaacggccgc	2460
gacatgtacg	tggaccagga	gctggacatc	aaccgcctga	gcgactacga	cgtggaccac	2520
atcgtgcccc	agagcttcct	gaaggacgac	agcatcgaca	acaaggtgct	gacccgcagc	2580
gacaagaacc	gcggaagag	cgacaacgtg	cccagcgagg	aggtggtgaa	gaagatgaag	2640
aactactggc	gccagctgct	gaacgccaa	ctgatcacc	agcgcaagtt	cgacaacctg	2700
accaaggccg	agcgcggcgg	cctgagcgag	ctggacaagg	ccggcttcat	caagcgccag	2760
ctggtggaga	cccgccagat	caccaagcac	gtggcccaga	tcctggacag	ccgcatgaac	2820
accaagtacg	acgagaacga	caagctgatc	cgcgaggtga	aggtgatcac	cctgaagagc	2880
aagctggtga	gcgacttccg	caaggacttc	cagttctaca	aggtgcgcga	gatcaacaac	2940
taccaccacg	cccacgacgc	ctacctgaac	gccgtggtgg	gcaccgccct	gatcaagaag	3000
tacccaagc	tggagagcga	gttcgtgtac	ggcgactaca	aggtgtacga	cgtgcgcaag	3060
atgatcgcca	agagcgagca	ggagatcggc	aaggccaccg	ccaagtactt	cttctacagc	3120
aacatcatga	acttcttcaa	gaccgagatc	accctggcca	acggcgagat	ccgcaagcgc	3180
cccctgatcg	agaccaacgg	cgagaccggc	gagatcgtgt	gggacaaggg	ccgcgacttc	3240
gccaccgtgc	gcaaggtgct	gagcatgccc	caggtgaaca	tcgtgaagaa	gaccgaggtg	3300
cagaccggcg	gcttcagcaa	ggagagcatc	ctgccaaagc	gcaacagcga	caagctgatc	3360
gcccgcaaga	aggactggga	ccccagaag	tacggcggct	tcgacagccc	caccgtggcc	3420
tacagcgtgc	tgggtggtggc	caaggtggag	aagggcaaga	gcaagaagct	gaagagcgtg	3480
aaggagctgc	tgggcatcac	catcatggag	cgcagcagct	tcgagaagaa	ccccatcgac	3540
ttcctggagg	ccaagggcta	caaggaggtg	aagaaggacc	tgatcatcaa	gctgccaag	3600
tacagcctgt	tcgagctgga	gaacggccgc	aagcgcagtc	tggccagcgc	cggcgagctg	3660
cagaagggca	acgagctggc	cctgcccagc	aagtacgtga	acttcttcta	cctggccagc	3720
cactacgaga	agctgaaggg	cagccccgag	gacaacgagc	agaagcagct	gttcgtggag	3780
cagcacaagc	actacctgga	cgagatcatc	gagcagatca	gcgagttcag	caagcgcgtg	3840
atcctggccg	acgccaacct	ggacaaggtg	ctgagcgcct	acaacaagca	ccgcgacaag	3900
cccatccgcg	agcaggccga	gaacatcatc	cacctgttca	ccctgacca	cctgggcgcc	3960

cccgccgctt tcaagtactt cgacaccacc atcgaccgca agcgctacac cagcaccaag 4020  
 gaggtgctgg acgccaccct gatccaccag agcatcaccg gtctgtacga gacccgcatc 4080  
 gacctgagcc agctggggcg cgacggcggc tccggacctc caaagaaaa gagaaaagta 4140  
 tacccttacg acgtgcccga ctacgcctaa 4170

<210> 107  
 <211> 4194  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Cas9 kodierende Sequenz in p3s-Cas9HN (humanisiertes Codon, N-terminal Tagging (unterstrichen), humane Zellexperimente)

<400> 107  
 atggtgtacc cctacgacgt gcccgactac gccgaattgc ctcaaaaaa gaagagaaag 60  
 gtagggatcc gaattcccgg ggaaaaaccg gacaagaagt acagcatcgg cctggacatc 120  
 ggtaccaaca gcgtgggctg ggccgtgatc accgacgagt acaagggtgcc cagcaagaag 180  
 ttcaagggtgc tgggcaacac cgaccgccac agcatcaaga agaacctgat cggcgccttg 240  
 ctgttcgaca gcggcgagac cgccgaggcc acccgctga agcgcaccgc ccgccgccgc 300  
 tacacccgcc gcaagaaccg catctgctac ctgcaggaga tcttcagcaa cgagatggcc 360  
 aagggtggacg acagcttctt ccaccgcctg gaggagagct tcctggtgga ggaggacaag 420  
 aagcacgagc gccaccccat cttcggcaac atcgtggacg aggtggccta ccacgagaag 480  
 taccaccacca tctaccacct gcgcaagaag ctggtggaca gcaccgaaa ggccgacctg 540  
 cgctgatctt acctggccct ggcccacatg atcaagtcc gcggccactt cctgatcgag 600  
 ggcgacctga accccgacaa cagcgacgtg gacaagctgt tcatccagct ggtgcagacc 660  
 tacaaccagc tgttcgagga gaacccatc aacgccagcg gcgtggacgc caaggccatc 720  
 ctgagcgccc gcctgagcaa gagccgccgc ctggagaacc tgatcgccca gctgcccggc 780  
 gagaagaaga acggcctggt cggcaacctg atcgccctga gcctgggcct gacccccaac 840  
 ttcaagagca acttcgacct ggccgaggac gccaagctgc agctgagcaa ggacacctac 900  
 gacgacgacc tggacaacct gctggcccag atcggcgacc agtacgccga cctgttcctg 960  
 gccgccaaga acctgagcga cgccatcctg ctgagcgaca tcctgcgcgt gaacaccgag 1020  
 atcaccaagg cccccctgag cgccagcatg atcaagcgt acgacgagca ccaccaggac 1080  
 ctgaccctgc tgaaggccct ggtgcgccag cagctgcccg agaagtacaa ggagatcttc 1140  
 ttcgaccaga gcaagaacgg ctacgccggc tacatcgacg gcggcgccag ccaggaggag 1200  
 ttctacaagt tcatcaagcc catcctggag aagatggacg gcaccgagga gctgctggtg 1260  
 aagctgaacc gcgaggacct gctgcgcaag cagcgcacct tcgacaacgg cagcatcccc 1320

caccagatcc	acctgggcga	gctgcacgcc	atcctgcgcc	gccaggagga	cttctacccc	1380
ttcctgaagg	acaaccgcga	gaagatcgag	aagatcctga	ccttccgcat	cccctactac	1440
gtgggcccc	tggcccgcgg	caacagccgc	ttcgctgga	tgacccgcaa	gagcgaggag	1500
accatcacc	cctggaactt	cgaggaggtg	gtggacaagg	gcgccagcgc	ccagagcttc	1560
atcgagcgca	tgaccaactt	cgacaagaac	ctgccaacg	agaaggtgct	gccaagcac	1620
agcctgctgt	acgagtactt	caccgtgtac	aacgagctga	ccaaggtgaa	gtacgtgacc	1680
gagggcatgc	gcaagcccgc	cttctgagc	ggcgagcaga	agaaggccat	cgtggacctg	1740
ctgttcaaga	ccaaccgcaa	ggtgaccgtg	aagcagctga	aggaggacta	cttcaagaag	1800
atcgagtgt	tcgacagcgt	ggagatcagc	ggcgtggagg	accgcttcaa	cgccagcctg	1860
ggcacctacc	acgacctgct	gaagatcatc	aaggacaagg	acttcttga	caacgaggag	1920
aacgaggaca	tcctggagga	catcgtgctg	accctgacct	tgttcgagga	ccgcgagatg	1980
atcgaggagc	gcctgaagac	ctacgcccac	ctgttcgacg	acaaggtgat	gaagcagctg	2040
aagcggccc	gctacaccgg	ctggggccgc	ctgagccgca	agcttatcaa	cgccatccgc	2100
gacaagcaga	gcggcaagac	catcctggac	ttcctgaaga	gcgacggctt	cgccaaccgc	2160
aacttcatgc	agctgatcca	cgacgacagc	ctgacctca	aggaggacat	ccagaaggcc	2220
caggtgagcg	gccagggcga	cagcctgcac	gagcacatcg	ccaacctggc	cgccagcccc	2280
gcatcaaga	agggcatcct	gcagaccgtg	aaggtggtg	acgagctggt	gaaggtgatg	2340
ggccgccaca	agcccagaaa	catcgtgatc	gagatggccc	gcgagaacca	gaccacccag	2400
aagggccaga	agaacagccg	cgagcgcagc	aagcgcagc	aggagggcat	caaggagctg	2460
ggcagccaga	tcctgaagga	gcaccccgtg	gagaacacc	agctgcagaa	cgagaagctg	2520
tacctgtact	acctgcagaa	cgcccgcgac	atgtacgtgg	accaggagct	ggacatcaac	2580
cgctgagcg	actacgacgt	ggaccacatc	gtgccccaga	gcttcttga	ggacgacagc	2640
atcgacaaca	aggtgctgac	ccgcagcgc	aagaaccgcg	gcaagagcga	caacgtgccc	2700
agcagggagg	tggtgaagaa	gatgaagaac	tactggcgcc	agctgctgaa	cgccaagctg	2760
atcaccagc	gcaagttcga	caacctgacc	aaggccgagc	gcggcggcct	gagcgagctg	2820
gacaaggccg	gcttcatcaa	gcgccagctg	gtggagacct	gccagatcac	caagcacgtg	2880
gcccagatcc	tgacagccg	catgaacacc	aagtacgacg	agaacgacaa	gctgatccgc	2940
gaggtgaagg	tgatcacctt	gaagagcaag	ctggtgagcg	acttccgcaa	ggacttccag	3000
ttctacaagg	tgccgagat	caacaactac	caccacgccc	acgacgccta	cctgaacgcc	3060
gtggtgggca	ccgccctgat	caagaagtac	ccaagctgg	agagcgagtt	cgtgtacggc	3120
gactacaagg	tgtacgacgt	gcgcaagatg	atcgccaaga	gcgagcagga	gatcggcaag	3180

gccaccgcca agtactttctt ctacagcaac atcatgaact tcttcaagac cgagatcacc	3240
ctggccaacg gcgagatccg caagcgcccc ctgatcgaga ccaacggcga gaccggcgag	3300
atcgtgtggg acaagggccg cgacttcgcc accgtgcgca aggtgctgag catgccccag	3360
gtgaacatcg tgaagaagac cgaggtgcag accggcggct tcagcaagga gagcatcctg	3420
cccaagcga acagcgacaa gctgatcgcc cgcaagaagg actgggaccc caagaagtac	3480
ggcggcttcg acagccccac cgtggcctac agcgtgctgg tggaggccaa ggtggagaag	3540
ggcaagagca agaagctgaa gagcgtgaag gagctgctgg gcatcaccaat catggagcgc	3600
agcagcttcg agaagaaccc catcgacttc ctggaggcca agggctacaa ggagggtgaag	3660
aaggacctga tcatcaagct gcccaagtac agcctgttcg agctggagaa cggccgcaag	3720
cgcatgctgg ccagcgccgg cgagctgcag aagggcaacg agctggccct gccagcaag	3780
tacgtgaact tcctgtacct ggccagccac tacgagaagc tgaagggcag ccccaggagc	3840
aacgagcaga agcagctggt cgtggagcag cacaagcact acctggacga gatcatcgag	3900
cagatcagcg agttcagcaa gcgctgatc ctggccgacg ccaacctgga caaggtgctg	3960
agcgcttaca acaagcaccg cgacaagccc atccgcgagc aggccgagaa catcatccac	4020
ctgttcacc tgaccaacct gggcgcccc gccgccttca agtacttcga caccaccatc	4080
gaccgcaagc gctacaccag caccaaggag gtgctggacg ccaccctgat ccaccagagc	4140
atcaccggtc tgtacgagac ccgcatcgac ctgagccagc tgggcggcga ctaa	4194

<210> 108

<211> 4107

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Cas9 kodierende Sequenz in Streptococcus pyogenes

<400> 108

atggataaga aataactcaat aggcttagat atcggcacia atagcgtcgg atgggcgggtg	60
atcactgatg aatataaggt tccgtctaaa aagttcaagg ttctgggaaa tacagaccgc	120
cacagtatca aaaaaaatct tataggggct cttttatttg acagtggaga gacagcggaa	180
gcgactcgtc tcaaacggac agctcgtaga aggtatacac gtcggaagaa tcgtatttgt	240
tatctacagg agatTTTTTc aaatgagatg gcgaaagtag atgatagttt ctttcatcga	300
cttgaagagt cttttttggt ggaagaagac aagaagcatg aacgtcatcc tatttttggg	360
aatatagtag atgaagttgc ttatcatgag aaatatccaa ctatctatca tctgcgaaaa	420
aaattggtag atttactga taaagcggat ttgcgcttaa tctatttggc cttagcgcac	480
atgattaagt ttcgtggtca ttttttgatt gagggagatt taaatcctga taatagtgat	540

gtggacaaac	tatttatcca	gttggtagaa	acctacaatc	aattatttga	agaaaaccct	600
attaacgcaa	gtggagtaga	tgctaaagcg	attctttctg	cacgattgag	taaatcaaga	660
cgattagaaa	atctcattgc	tcagctcccc	ggtgagaaga	aaaatggctt	atgtgggaat	720
ctcattgctt	tgctcattgg	ttgaccacct	aattttaaat	caaattttga	tttggcagaa	780
gatgctaaat	tacagctttc	aaaagatact	tacgatgatg	atntagataa	tttattggcg	840
caaattggag	atcaatatgc	tgatttgttt	ttggcagcta	agaattttatc	agatgctatt	900
ttactttcag	atctcctaag	agtaaatact	gaaataacta	aggctcccct	atcagcttca	960
atgattaaac	gctacgatga	acatcatcaa	gacttgactc	ttttaaaagc	tttagttcga	1020
caacaacttc	cagaaaagta	taaagaaatc	ttttttgatc	aatcaaaaaa	cggatatgca	1080
ggttatattg	atgggggagc	tagccaagaa	gaattttata	aattttatcaa	accaatttta	1140
gaaaaaatgg	atggtactga	ggaattattg	gtgaaactaa	atcgtgaaga	tttgcctgac	1200
aagcaacgga	cctttgacaa	cggtcttatt	ccccatcaaa	ttcacttggg	tgagctgcat	1260
gctattttga	gaagacaaga	agacttttat	ccatttttaa	aagacaatcg	tgagaagatt	1320
gaaaaaatct	tgacttttcg	aattccttat	tatgttggtc	cattggcgcg	tgccaatagt	1380
cgttttgcat	ggatgactcg	gaagtctgaa	gaaacaatta	ccccatggaa	ttttgaagaa	1440
gtgtgata	aaggtgcttc	agctcaatca	tttattgaac	gcatgacaaa	ctttgataaa	1500
aatcttcaa	atgaaaaagt	actaccaaaa	catagtttgc	tttatgagta	ttttacgggt	1560
tataacgaat	tgacaaaggt	caaatagttt	actgaaggaa	tgcgaaaacc	agcatttctt	1620
tcaggtagaac	agaagaaagc	cattgttgat	ttactcttca	aaacaaatcg	aaaagtaacc	1680
gttaagcaat	taaaagaaga	ttatttcaaa	aaaatagaat	gttttgatag	tgttgaaatt	1740
tcaggagttg	aagatagatt	taatgcttca	ttaggtacct	accatgattt	gctaaaaatt	1800
attaaagata	aagatttttt	ggataatgaa	gaaaatgaag	atatcttaga	ggatattggt	1860
ttaacattga	ccttatttga	agatagggag	atgattgagg	aaagacttaa	aacatatgct	1920
cacctctttg	atgataaggt	gatgaaacag	cttaaacgtc	gccgttatac	tggttgggga	1980
cgtttgcttc	gaaaattgat	taatggtatt	agggataagc	aatctggcaa	aacaatatta	2040
gattttttga	aatcagatgg	ttttgccaat	cgcaatttta	tgcagctgat	ccatgatgat	2100
agtttgacat	ttaaagaaga	cattcaaaaa	gcacaagtgt	ctggacaagg	cgatagttta	2160
catgaacata	ttgcaaattt	agctggtagc	cctgctatta	aaaaagggtat	tttacagact	2220
gtaaaagttg	ttgatgaatt	ggtcaaagta	atggggcggc	ataagccaga	aaatatcggt	2280
attgaaatgg	cacgtgaaaa	tcagacaact	caaaagggcc	agaaaaattc	gcgagagcgt	2340
atgaaacgaa	tcgaagaagg	tatcaaagaa	ttaggaagtc	agattcttaa	agagcatcct	2400
gttghaaata	ctcaattgca	aaatgaaaag	ctctatctct	attatctcca	aaatggaaga	2460

gacatgtatg tggaccaaga attagatatt aatcgtttaa gtgattatga tgtcgatcac 2520  
attgttccac aaagtttcct taaagacgat tcaatagaca ataaggtcct aacgcgttct 2580  
gataaaaatc gtggtaaatc ggataacgtt ccaagtgaag aagtagtcaa aaagatgaaa 2640  
aactattgga gacaacttct aaacgccaaag ttaatcactc aacgtaagtt tgataattta 2700  
acgaaagctg aacgtggagg tttgagtga cttgataaag ctggttttat caaacgccaa 2760  
ttggttgaaa ctcgccaaat cactaagcat gtggcacaaa ttttgatag tcgcatgaat 2820  
actaaatacg atgaaaatga taaacttatt cgagaggta aagtgattac cttaaaatct 2880  
aaattagttt ctgacttccg aaaagatttc caattctata aagtacgtga gattaacaat 2940  
taccatcatg cccatgatgc gtatctaaat gccgtcgttg gaactgcttt gattaagaaa 3000  
tatccaaaac ttgaatcgga gtttgtctat ggtgattata aagtttatga tgttcgtaaa 3060  
atgattgcta agtctgagca agaaataggc aaagcaaccg caaaatattt cttttactct 3120  
aatatcatga acttcttcaa aacagaaatt aacttgcga atggagagat tcgcaaacgc 3180  
cctctaatacg aaactaatgg ggaaactgga gaaattgtct gggataaagg gcgagatttt 3240  
gccacagtgc gcaaagtatt gtccatgccc caagtcaata ttgtcaagaa aacagaagta 3300  
cagacaggcg gattctcaa ggagtcaatt ttacaaaaa gaaattcgga caagcttatt 3360  
gctcgtaaaa aagactggga tccaaaaaaa tatggtgggt ttgatagtcc aacggtagct 3420  
tattcagtcc tagtggttgc taaggtggaa aaagggaaat cgaagaagtt aaaatccgtt 3480  
aaagagttac tagggatcac aattatggaa agaagttcct ttgaaaaaaa tccgattgac 3540  
tttttagaag ctaaaggata taaggaagtt aaaaaagact taatcattaa actacctaaa 3600  
tatagtcttt ttgagttaga aaacggctgt aaacggatgc tggctagtgc cggagaatta 3660  
caaaaaggaa atgagctggc tctgccaagc aatatgtga atttttata tttagctagt 3720  
cattatgaaa agttgaaggg tagtccagaa gataacgaac aaaaacaatt gtttgtggag 3780  
cagcataagc attattttaga tgagattatt gagcaaatca gtgaattttc taagcgtggt 3840  
attttagcag atgccaattt agataaagtt cttagtgc ataaacaaca tagagacaaa 3900  
ccaatacgtg aacaagcaga aatattatt cttttatcta cgttgacgaa tcttgagct 3960  
cccgtgctt ttaaattttt tgatacaaca attgatcgta aacgatatac gtctacaaaa 4020  
gaagtttttag atgccactct tatccatcaa tccatcactg gtctttatga aacacgcatt 4080  
gatttgagtc agctaggagg tgactaa 4107

<210> 109  
<211> 1368  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Aminosäuresequenz von Cas9 aus *S. pyogenes*

<400> 109  
 Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val  
 1 5 10 15  
 Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe  
 20 25 30  
 Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile  
 35 40 45  
 Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu  
 50 55 60  
 Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys  
 65 70 75 80  
 Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser  
 85 90 95  
 Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys  
 100 105 110  
 His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr  
 115 120 125  
 His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp  
 130 135 140  
 Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His  
 145 150 155 160  
 Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro  
 165 170 175  
 Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr  
 180 185 190  
 Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala  
 195 200 205  
 Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn  
 210 215 220  
 Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn  
 225 230 235 240  
 Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe  
 245 250 255  
 Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp  
 260 265 270  
 Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp  
 275 280 285  
 Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp  
 290 295 300  
 Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser



645					650					655					
Thr	Gly	Trp	Gly	Arg	Leu	Ser	Arg	Lys	Leu	Ile	Asn	Gly	Ile	Arg	Asp
			660					665					670		
Lys	Gln	Ser	Gly	Lys	Thr	Ile	Leu	Asp	Phe	Leu	Lys	Ser	Asp	Gly	Phe
		675					680					685			
Ala	Asn	Arg	Asn	Phe	Met	Gln	Leu	Ile	His	Asp	Asp	Ser	Leu	Thr	Phe
	690					695					700				
Lys	Glu	Asp	Ile	Gln	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Gly	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu
705					710					715					720
His	Glu	His	Ile	Ala	Asn	Leu	Ala	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Lys	Lys	Gly
				725					730					735	
Ile	Leu	Gln	Thr	Val	Lys	Val	Val	Asp	Glu	Leu	Val	Lys	Val	Met	Gly
			740					745					750		
Arg	His	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Val	Ile	Glu	Met	Ala	Arg	Glu	Asn	Gln
		755					760					765			
Thr	Thr	Gln	Lys	Gly	Gln	Lys	Asn	Ser	Arg	Glu	Arg	Met	Lys	Arg	Ile
	770					775					780				
Glu	Glu	Gly	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Lys	Glu	His	Pro
785					790					795					800
Val	Glu	Asn	Thr	Gln	Leu	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu
				805					810					815	
Gln	Asn	Gly	Arg	Asp	Met	Tyr	Val	Asp	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Asn	Arg
			820					825					830		
Leu	Ser	Asp	Tyr	Asp	Val	Asp	His	Ile	Val	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Lys
		835					840					845			
Asp	Asp	Ser	Ile	Asp	Asn	Lys	Val	Leu	Thr	Arg	Ser	Asp	Lys	Asn	Arg
	850					855					860				
Gly	Lys	Ser	Asp	Asn	Val	Pro	Ser	Glu	Glu	Val	Val	Lys	Lys	Met	Lys
865					870					875					880
Asn	Tyr	Trp	Arg	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala	Lys	Leu	Ile	Thr	Gln	Arg	Lys
				885					890					895	
Phe	Asp	Asn	Leu	Thr	Lys	Ala	Glu	Arg	Gly	Gly	Leu	Ser	Glu	Leu	Asp
			900					905					910		
Lys	Ala	Gly	Phe	Ile	Lys	Arg	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Gln	Ile	Thr
		915					920					925			
Lys	His	Val	Ala	Gln	Ile	Leu	Asp	Ser	Arg	Met	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asp
	930					935					940				
Glu	Asn	Asp	Lys	Leu	Ile	Arg	Glu	Val	Lys	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	Ser
945					950					955					960
Lys	Leu	Val	Ser	Asp	Phe	Arg	Lys	Asp	Phe	Gln	Phe	Tyr	Lys	Val	Arg
				965					970					975	
Glu	Ile	Asn	Asn	Tyr	His	His	Ala	His	Asp	Ala	Tyr	Leu	Asn	Ala	Val

980 985 990  
 Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe  
 995 1000 1005  
 Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala Lys  
 1010 1015 1020  
 Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser  
 1025 1030 1035 1040  
 Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala Asn Gly Glu  
 1045 1050 1055  
 Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu Thr Gly Glu Ile  
 1060 1065 1070  
 Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val Arg Lys Val Leu Ser  
 1075 1080 1085  
 Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly  
 1090 1095 1100  
 Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile  
 1105 1110 1115 1120  
 Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser  
 1125 1130 1135  
 Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly  
 1140 1145 1150  
 Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile  
 1155 1160 1165  
 Met Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala  
 1170 1175 1180  
 Lys Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys  
 1185 1190 1195 1200  
 Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser  
 1205 1210 1215  
 Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr  
 1220 1225 1230  
 Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser  
 1235 1240 1245  
 Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys His  
 1250 1255 1260  
 Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys Arg Val  
 1265 1270 1275 1280  
 Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala Tyr Asn Lys  
 1285 1290 1295  
 His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn Ile Ile His Leu  
 1300 1305 1310  
 Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp



atcgacggcg	gcgccagcca	ggaggagttc	tacaagttca	tcaagcccat	cctggagaag	1260
atggacggca	ccgaggagct	gctggtgaag	ctgaaccgcg	aggacctgct	gcgcaagcag	1320
cgcaccttcg	acaacggcag	catccccac	cagatccacc	tgggcgagct	gcacgccatc	1380
ctgcgccgcc	aggaggactt	ctacccttc	ctgaaggaca	accgcgagaa	gatcgagaag	1440
atcctgacct	tccgcatccc	ctactacgtg	ggccccctgg	cccgcggcaa	cagccgcttc	1500
gcctggatga	cccgcaagag	cgaggagacc	atcaccccct	ggaacttcga	ggaggtggtg	1560
gacaagggcg	ccagcgccca	gagcttcac	gagcgcatga	ccaacttcga	caagaacctg	1620
cccaacgaga	aggtgctgcc	caagcacagc	ctgctgtacg	agtacttcac	cgtgtacaac	1680
gagctgacca	aggtgaagta	cgtgaccgag	ggcatgcgca	agccccctt	cctgagcggc	1740
gagcagaaga	aggccatcgt	ggacctgctg	ttcaagacca	accgcaaggt	gaccgtgaag	1800
cagctgaagg	aggactactt	caagaagatc	gagtgcctcg	acagcgtgga	gatcagcggc	1860
gtggaggacc	gcttcaacgc	cagcctgggc	acctaccacg	acctgctgaa	gatcatcaag	1920
gacaaggact	tcctggacaa	cgaggagaac	gaggacatcc	tggaggacat	cgtgctgacc	1980
ctgaccctgt	tcgaggaccg	cgagatgac	gaggagcgcc	tgaagacct	cgcccacctg	2040
ttcgacgaca	aggtgatgaa	gcagctgaag	cgccgccgct	acaccggctg	gggccgcctg	2100
agccgcaagc	ttatcaacgg	catccgcgac	aagcagagcg	gcaagaccat	cctggacttc	2160
ctgaagagcg	acggcttcgc	caaccgcaac	ttcatgcagc	tgatccacga	cgacagcctg	2220
accttcaagg	aggacatcca	gaaggcccag	gtgagcggcc	agggcgacag	cctgcacgag	2280
cacatcgcca	acctggccgg	cagccccgcc	atcaagaagg	gcaccctgca	gaccgtgaag	2340
gtggtggacg	agctggtgaa	ggtgatgggc	cgccacaagc	ccgagaacat	cgtgatcgag	2400
atggccccgcg	agaaccagac	caccagaag	ggccagaaga	acagccgca	gcgcatgaag	2460
cgcatcgagg	agggcatcaa	ggagctgggc	agccagatcc	tgaaggagca	ccccgtggag	2520
aacaccagc	tgcagaacga	gaagctgtac	ctgtactacc	tgcagaacgg	ccgcgacatg	2580
tacgtggacc	aggagctgga	catcaaccgc	ctgagcgact	acgacgtgga	ccacatcgtg	2640
ccccagagct	tcctgaagga	cgacagcatc	gacaacaagg	tgctgacctg	cagcgacaag	2700
aaccgcggca	agagcgacaa	cgtgcccagc	gaggaggtgg	tgaagaagat	gaagaactac	2760
tggcggcagc	tgctgaacgc	caagctgatc	accagcgca	agttcgacaa	cctgaccaag	2820
gccgagcgcg	gcgccctgag	cgagctggac	aaggccggct	tcacaaagcg	ccagctggtg	2880
gagaccgcc	agatcaccaa	gcacgtggcc	cagatcctgg	acagccgcat	gaacaccaag	2940
tacgacgaga	acgacaagct	gatccgcgag	gtgaaggtga	tcaccctgaa	gagcaagctg	3000
gtgagcgact	tccgcaagga	cttccagttc	tacaaggtgc	gcgagatcaa	caactaccac	3060

```

cacgcccacg acgcctacct gaacgccgtg gtgggcaccg ccctgatcaa gaagtacccc 3120
aagctggaga gcgagttcgt gtacggcgac tacaaggtgt acgacgtgcg caagatgatc 3180
gccaaagacg agcaggagat cggcaaggcc accgccaagt acttcttcta cagcaacatc 3240
atgaacttct tcaagaccga gatcacctg gccaacggcg agatccgcaa gcgccccctg 3300
atcgagacca acggcgagac cggcgagatc gtgtgggaca agggccgca cttcgccacc 3360
gtgcgcaagg tgctgagcat gccccaggtg aacatcgtga agaagaccga ggtgcagacc 3420
ggcggcttca gcaaggagag catcctgccc aagcgcaaca gcgacaagct gatcgcccgc 3480
aagaaggact gggaccccaa gaagtacggc ggcttcgaca gccccaccgt ggcctacagc 3540
gtgctggtgg tggccaaggt ggagaagggc aagagcaaga agctgaagag cgtgaaggag 3600
ctgctgggca tcaccatcat ggagcgcagc agcttcgaga agaaccatcg acttctctg 3660
gaggccaagg gctacaagga ggtgaagaag gacctgatca tcaagctgcc caagtacagc 3720
ctgttcgagc tggagaacgg ccgcaagcgc atgctggcca gcgccggcga gctgcagaag 3780
ggcaacgagc tggccctgcc cagcaagtac gtgaacttcc tgtacctggc cagccactac 3840
gagaagctga agggcagccc cgaggacaac gagcagaagc agctgttcgt ggagcagcac 3900
aagcactacc tggacgagat catcgagcag atcagcgagt tcagcaagcg cgtgatcctg 3960
gccgacgcca acctggacaa ggtgctgagc gcctacaaca agcaccgca caagcccac 4020
cgcgagcagg ccgagaacat catccacctg ttcacctga ccaacctggg cgccccgc 4080
gccttcaagt acttcgacac caccatcgac cgcaagcgt acaccagcac caaggaggtg 4140
ctggacgcca ccctgatcca ccagagcatc accggtctgt acgagacccg catcgacctg 4200
agccagctgg gcggcgacta a 4221

```

```

<210> 111
<211> 1406
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

```

```

<220>
<223> Aminosäuresequenz von Cas9 (pET-Cas9N3T)

```

```

<400> 111
Met Gly Ser Ser His His His His His Val Tyr Pro Tyr Asp Val
 1          5          10
Pro Asp Tyr Ala Glu Leu Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Ile
 20          25          30
Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp
 35          40          45
Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys
 50          55          60

```

Val Pro Ser Lys Lys Phe Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser  
 65 70 75 80  
 Ile Lys Lys Asn Leu Ile Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr  
 85 90 95  
 Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg  
 100 105 110  
 Arg Lys Asn Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met  
 115 120 125  
 Ala Lys Val Asp Asp Ser Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu  
 130 135 140  
 Val Glu Glu Asp Lys Lys His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile  
 145 150 155 160  
 Val Asp Glu Val Ala Tyr His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu  
 165 170 175  
 Arg Lys Lys Leu Val Asp Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile  
 180 185 190  
 Tyr Leu Ala Leu Ala His Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile  
 195 200 205  
 Glu Gly Asp Leu Asn Pro Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile  
 210 215 220  
 Gln Leu Val Gln Thr Tyr Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn  
 225 230 235 240  
 Ala Ser Gly Val Asp Ala Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys  
 245 250 255  
 Ser Arg Arg Leu Glu Asn Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys  
 260 265 270  
 Asn Gly Leu Phe Gly Asn Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro  
 275 280 285  
 Asn Phe Lys Ser Asn Phe Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu  
 290 295 300  
 Ser Lys Asp Thr Tyr Asp Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile  
 305 310 315 320  
 Gly Asp Gln Tyr Ala Asp Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp  
 325 330 335  
 Ala Ile Leu Leu Ser Asp Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys  
 340 345 350  
 Ala Pro Leu Ser Ala Ser Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln  
 355 360 365  
 Asp Leu Thr Leu Leu Lys Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys  
 370 375 380  
 Tyr Lys Glu Ile Phe Phe Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr  
 385 390 395 400

Ile Asp Gly Gly Ala Ser Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro  
 405 410 415  
 Ile Leu Glu Lys Met Asp Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn  
 420 425 430  
 Arg Glu Asp Leu Leu Arg Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile  
 435 440 445  
 Pro His Gln Ile His Leu Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln  
 450 455 460  
 Glu Asp Phe Tyr Pro Phe Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys  
 465 470 475 480  
 Ile Leu Thr Phe Arg Ile Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly  
 485 490 495  
 Asn Ser Arg Phe Ala Trp Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr  
 500 505 510  
 Pro Trp Asn Phe Glu Glu Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser  
 515 520 525  
 Phe Ile Glu Arg Met Thr Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys  
 530 535 540  
 Val Leu Pro Lys His Ser Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn  
 545 550 555 560  
 Glu Leu Thr Lys Val Lys Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala  
 565 570 575  
 Phe Leu Ser Gly Glu Gln Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys  
 580 585 590  
 Thr Asn Arg Lys Val Thr Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys  
 595 600 605  
 Lys Ile Glu Cys Phe Asp Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg  
 610 615 620  
 Phe Asn Ala Ser Leu Gly Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys  
 625 630 635 640  
 Asp Lys Asp Phe Leu Asp Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp  
 645 650 655  
 Ile Val Leu Thr Leu Thr Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu  
 660 665 670  
 Arg Leu Lys Thr Tyr Ala His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln  
 675 680 685  
 Leu Lys Arg Arg Arg Tyr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu  
 690 695 700  
 Ile Asn Gly Ile Arg Asp Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe  
 705 710 715 720  
 Leu Lys Ser Asp Gly Phe Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His  
 725 730 735

Asp Asp Ser Leu Thr Phe Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser  
 740 745 750  
 Gly Gln Gly Asp Ser Leu His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser  
 755 760 765  
 Pro Ala Ile Lys Lys Gly Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu  
 770 775 780  
 Leu Val Lys Val Met Gly Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu  
 785 790 795  
 Met Ala Arg Glu Asn Gln Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg  
 805 810  
 Glu Arg Met Lys Arg Ile Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln  
 820 825 830  
 Ile Leu Lys Glu His Pro Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys  
 835 840 845  
 Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln  
 850 855 860  
 Glu Leu Asp Ile Asn Arg Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val  
 865 870 875 880  
 Pro Gln Ser Phe Leu Lys Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr  
 885 890  
 Arg Ser Asp Lys Asn Arg Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu  
 900 905 910  
 Val Val Lys Lys Met Lys Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys  
 915 920 925  
 Leu Ile Thr Gln Arg Lys Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly  
 930 935 940  
 Gly Leu Ser Glu Leu Asp Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val  
 945 950 955 960  
 Glu Thr Arg Gln Ile Thr Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg  
 965 970 975  
 Met Asn Thr Lys Tyr Asp Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys  
 980 985 990  
 Val Ile Thr Leu Lys Ser Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe  
 995 1000 1005  
 Gln Phe Tyr Lys Val Arg Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp  
 1010 1015 1020  
 Ala Tyr Leu Asn Ala Val Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro  
 1025 1030 1035 1040  
 Lys Leu Glu Ser Glu Phe Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val  
 1045 1050 1055  
 Arg Lys Met Ile Ala Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala  
 1060 1065 1070

Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile  
 1075 1080 1085  
 Thr Leu Ala Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn  
 1090 1095 1100  
 Gly Glu Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr  
 1105 1110 1115 1120  
 Val Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr  
 1125 1130 1135  
 Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg  
 1140 1145 1150  
 Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys Lys  
 1155 1160 1165  
 Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val Val  
 1170 1175 1180  
 Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys Glu  
 1185 1190 1195 1200  
 Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro  
 1205 1210 1215  
 Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu  
 1220 1225 1230  
 Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg  
 1235 1240 1245  
 Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu  
 1250 1255 1260  
 Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr  
 1265 1270 1275 1280  
 Glu Lys Leu Lys Gly Ser Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe  
 1285 1290 1295  
 Val Glu Gln His Lys His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser  
 1300 1305 1310  
 Glu Phe Ser Lys Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val  
 1315 1320 1325  
 Leu Ser Ala Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala  
 1330 1335 1340  
 Glu Asn Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala  
 1345 1350 1355 1360  
 Ala Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser  
 1365 1370 1375  
 Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly  
 1380 1385 1390  
 Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp  
 1395 1400 1405

**ZITATE ENHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**Zitierte Nicht-Patentliteratur**

- Fu et al. (2013) [0052]
- Fu et al. (2013) [0053]
- Nehls et al., 1996 [0179]
- Taccioli et al., 1998 [0179]
- Kim et al. 2009 [0180]
- Cho et al., 2013 [0186]
- Sung et al., 2013 [0188]
- Kim et al., 2013 [0189]
- Sung et al., 2013 [0195]
- Cho, 2013 #166 [0203]

### Schutzansprüche

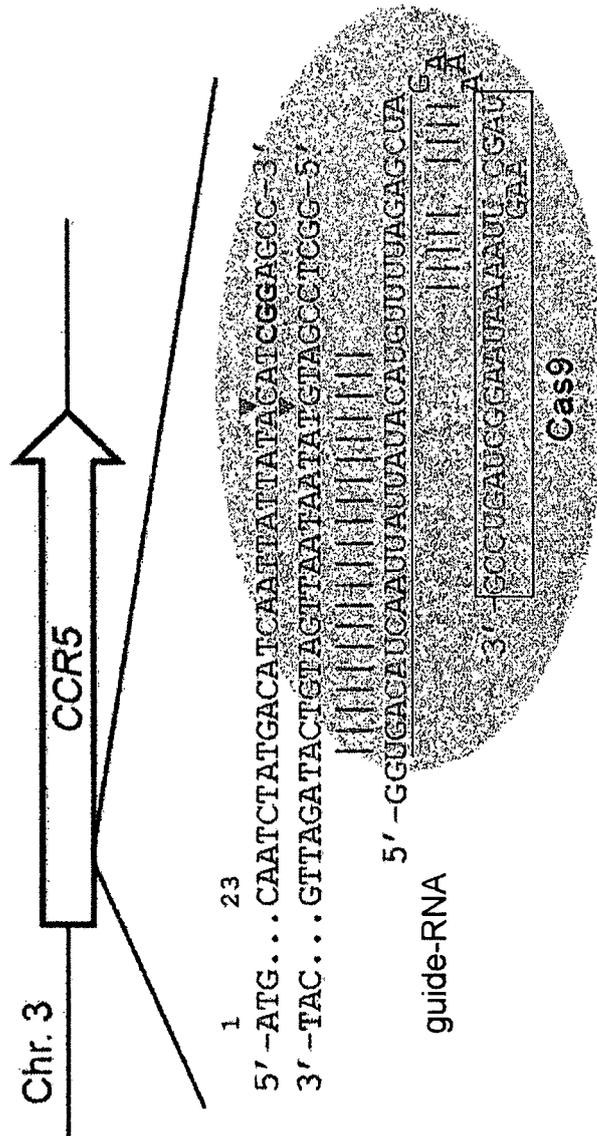
1. Typ-II-CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9(CRISPR-Associated Protein 9)-Zusammensetzung zum Spalten einer Zielnukleinsäure in einer Säugerzelle, wobei die Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung Folgendes umfasst:
  - a. das Cas9-Polypeptid oder eine ein Cas9-Polypeptid codierende Nukleinsäure; und
  - b. eine chimäre guide-RNA, die einen crRNA(CRISPR RNA)-Teil fusioniert an einen tracrRNA(trans Activating crRNA)-Teil umfasst.
2. Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Cas9-Polypeptid ein Cas9-Protein und ein Kernlokalisierungssignal (Nuclear Localization Signal, NLS) umfasst.
3. Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei das NLS am C-Terminus des Cas9-Proteins lokalisiert ist.
4. Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung nach Anspruch 2 oder 3, wobei das Cas9-Protein aus *Streptococcus pyogenes* stammt.
5. Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nukleinsäuresequenz für die Expression in Säugerzellen codonoptimiert ist.
6. Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die chimäre guide-RNA spezifisch für die Zielnukleinsäure ist.
7. Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die chimäre guide-RNA ferner zwei zusätzliche Guanin-Nukleotide an ihrem 5'-Ende umfasst.
8. Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei es sich bei der Säugerzelle um eine menschliche Zelle handelt.
9. Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei es sich bei der Zielnukleinsäure um DNA handelt.
10. Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung nach Anspruch 9, wobei es sich bei der DNA um eine genomische Sequenz im Genom der Säugerzelle handelt.
11. Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Zielnukleinsäure eine Sequenz aufweist, die 20 zum crRNA-Teil der chimären guide-RNA komplementäre Nukleotide und ein Trinukleotid-PAM (Protospacer Adjacent Motif) umfasst, wobei das PAM aus dem Trinukleotid 5'-NGG-3' besteht, wobei N für ein beliebiges Nukleotid steht.
12. Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei das Spalten einer Zielnukleinsäure durch Einführen eines Doppelstrangbruchs in eine Zielnukleinsäure erfolgt.
13. Säugerzelle, umfassend die Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 12.
14. Säugerzelle nach Anspruch 13, wobei es sich bei der Säugerzelle um eine menschliche Zelle handelt.
15. Nichtmenschlicher Organismus, umfassend die Säugerzelle nach Anspruch 13 oder 14.
16. Verwendung der Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zum Spalten einer Zielnukleinsäure in einer Säugerzelle.
17. Verwendung
  - a. eines Cas9-Polypeptids oder einer ein Cas9-Polypeptid codierenden Nukleinsäure; und
  - b. einer chimären guide-RNA, die einen crRNA(CRISPR RNA)-Teil fusioniert an einen tracrRNA(trans Activating crRNA)-Teil umfasst,
 zum Spalten einer Zielnukleinsäure in einer Säugerzelle.

18. Verwendung nach Anspruch 17, wobei das Cas9-Polypeptid oder die Nukleinsäure vor Einführen der chimären guide-RNA in die Säugerzelle eingeführt wird.
19. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18, wobei das Cas9-Polypeptid wie in einem der Ansprüche 2 bis 4 definiert ist.
20. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18, wobei die Nukleinsäure wie in Anspruch 5 definiert ist.
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei die chimäre guide-RNA wie in Anspruch 6 oder 7 definiert ist.
22. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 21, wobei es sich bei der Säugerzelle um eine menschliche Zelle handelt.
23. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 22, wobei die Zielnukleinsäure wie in einem der Ansprüche 9 bis 11 definiert ist.
24. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 23, wobei das Spalten einer Zielnukleinsäure durch Einführen eines Doppelstrangbruchs in eine Zielnukleinsäure erfolgt.
25. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 24, wobei es sich bei der Verwendung um eine In-vitro-Verwendung handelt.
26. Verwendung der Typ-II-CRISPR/Cas9-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zum Genom-Editing in der Gentherapie oder Zelltherapie.
27. Verwendung
- eines Cas9-Polypeptids oder einer ein Cas9-Polypeptid codierenden Nukleinsäure; und
  - einer chimären guide-RNA, die einen crRNA(CRISPR RNA)-Teil fusioniert an einen tracrRNA(trans Activating crRNA)-Teil umfasst,
- zum Genom-Editing bei der Gentherapie oder Zelltherapie eines dieser bedürftigen Patienten.
28. Verwendung nach Anspruch 27, wobei das Cas9-Polypeptid oder die Nukleinsäure dem Patienten vor Verabreichen der chimären guide-RNA verabreicht wird.
29. Verwendung nach Anspruch 27 oder 28, wobei die chimäre einzelsträngige guide-RNA wie in Anspruch 6 oder 7 definiert ist.

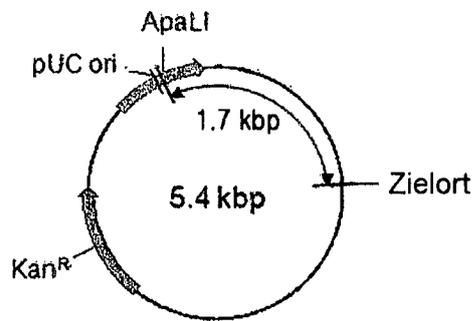
Es folgen 56 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

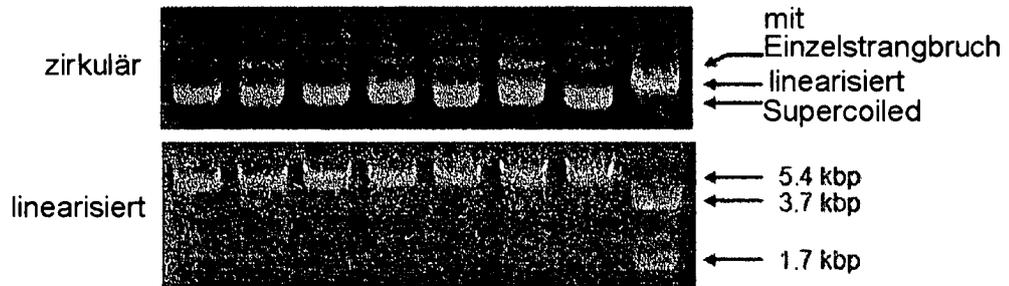
[Fig. 1a]



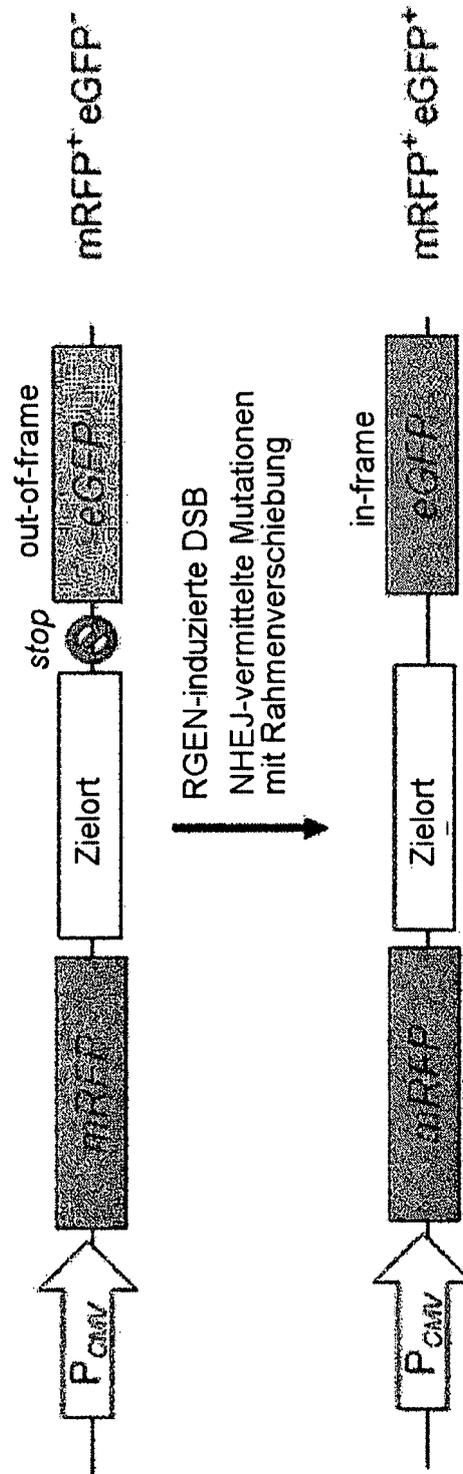
[Fig. 1b]



Cas9:	-	+	-	+	-	+	-	+
guide-RNA:	-	-	+	+	-	-	+	+
Zielsequenz:	-	-	-	-	+	+	+	+



[Fig. 2a]





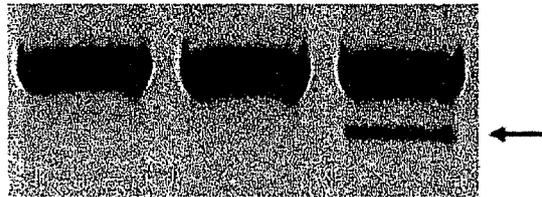
[Fig. 3b]

**C4BPB**

Plasmid-DNA: leer

Cas9

guide-RNA: - - +



Indel (%)

14

8.3% (4/48) mutiert

```

TATGTGCAATGACCACTACATCCT--CAAGGGCAGCAATCGGAGCCAG WT
TATGTGCAATGACCACTACATCCTT-CAAGGGCAGCAATCGGAGCCAG +1
TATGTGCAATGACCACTACATCCTCTCAAGGGCAGCAATCGGAGCCAG +2
TATGTGCAATG-----GAGCCAG -30
TATGTGCAATGAC-----180 bp----- -180
    
```

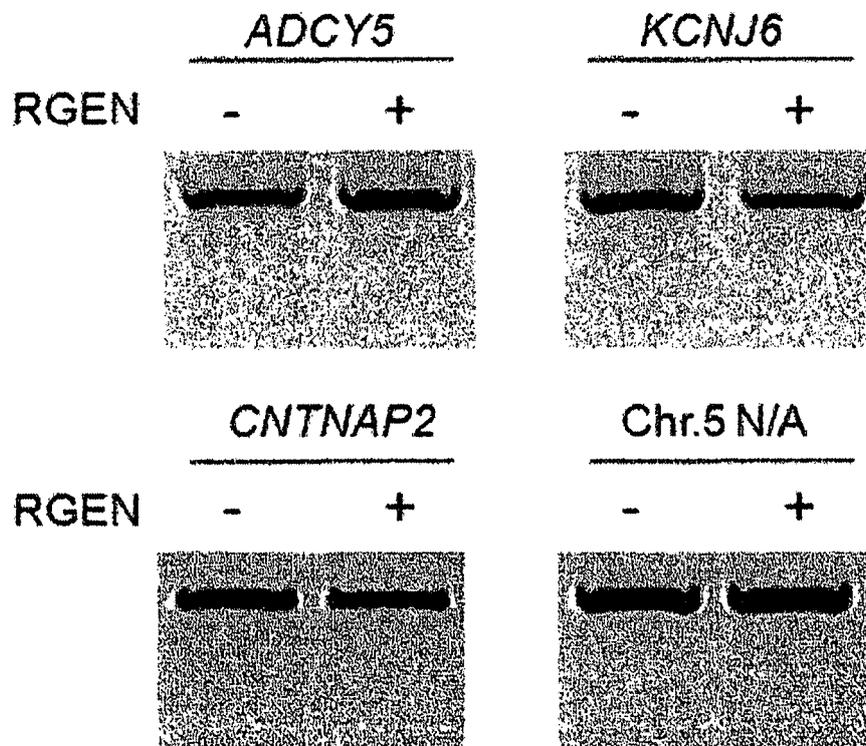
[Fig. 4a]

```

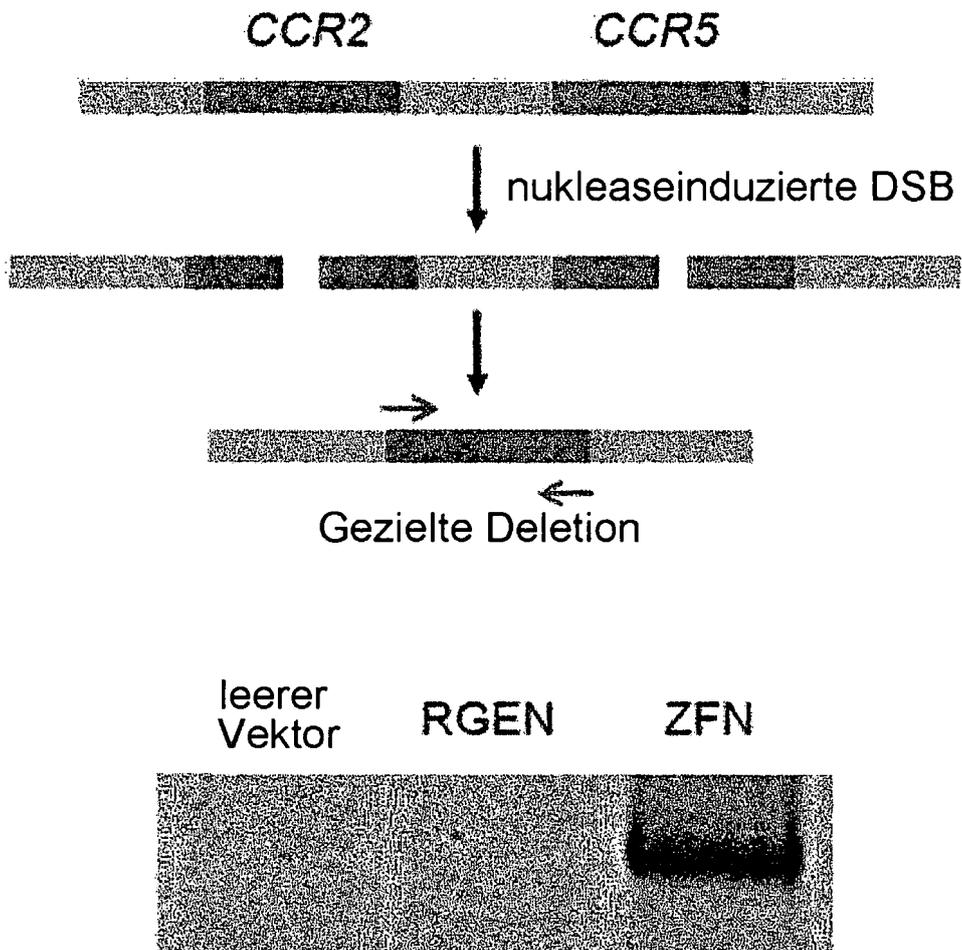
TGACATCAATTATTATACATCGG CCR5

TGACATCAATTATTATAgATgGa ADCY5
TGACATCAcTTATTATgCATgGG KCNJ6
TGACATaAATTATTcTACATgGG CNTNAP2
TGAaATCAATTATcATAgATCGG Chr. 5 N/A
    
```

[Fig. 4b]

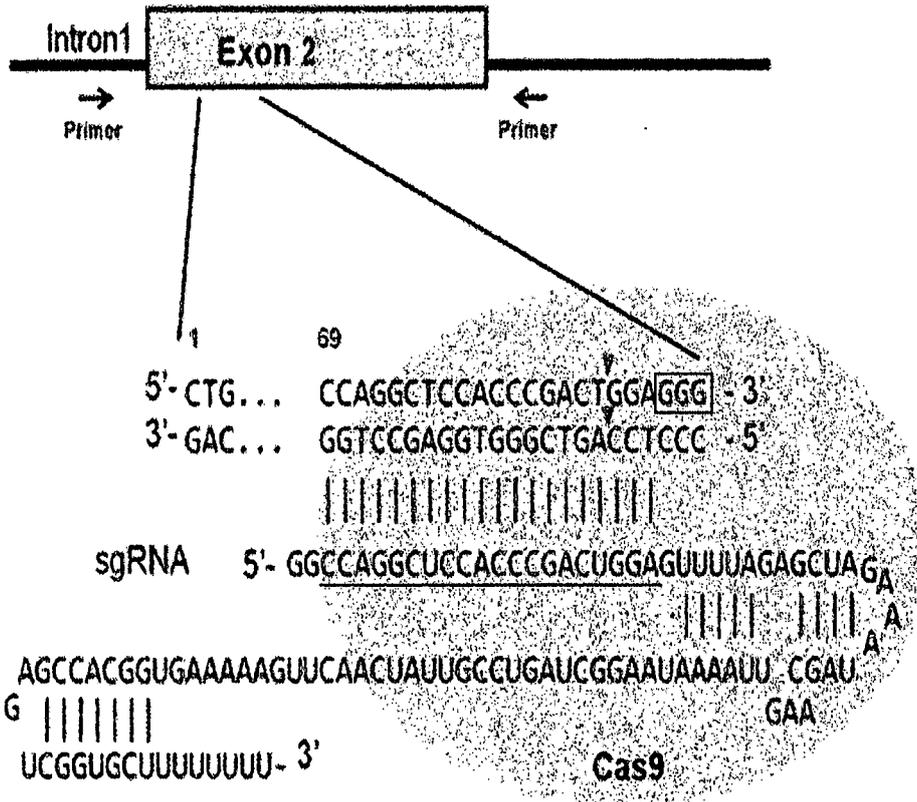


[Fig. 4c]

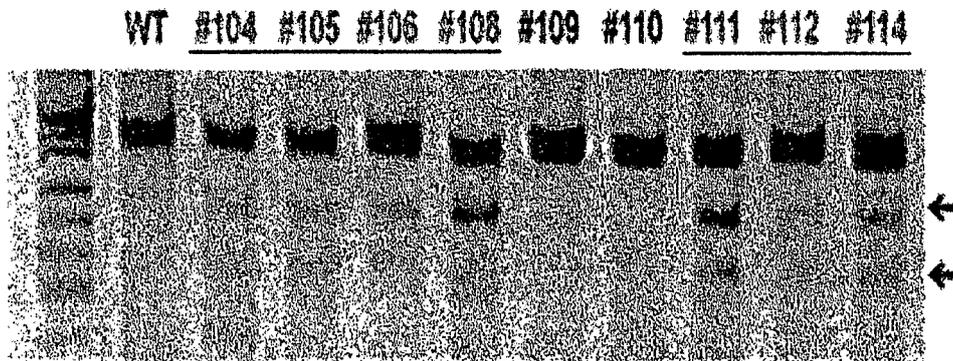


[Fig. 5a]

*Foxn1*



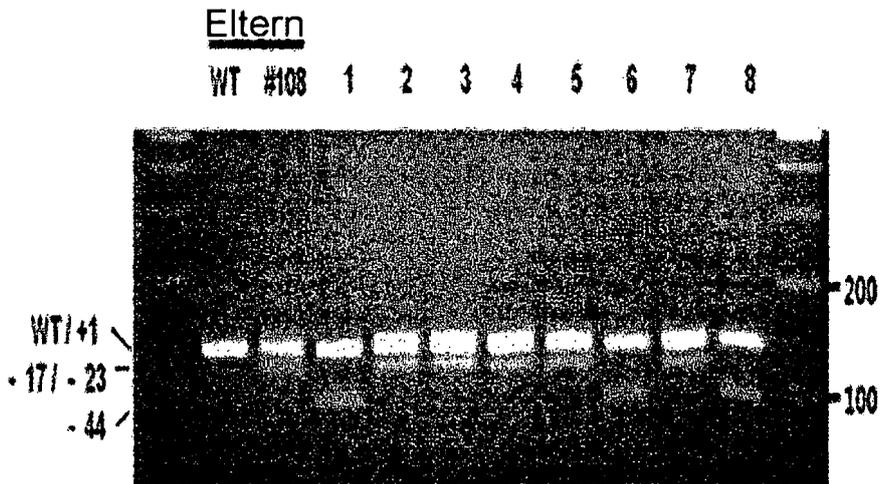
[Fig. 5b]



[Fig. 5c]

WT				
ACTTCCAGGCTCCACCCGACT		▼	GGAGGGCGAACCCCAAGGGGACCTCATGCAGG	
#108				
ACTTCCAGGCTCC-----	-----44bp-----	▼		-44 (X6)
ACTTCCAGGCTCCACCCGAC-	-----		CTCATGCAGG	-23 (X2)
ACTTCCAGGCTCCACCC-	-----		CAAGGGGACCTCATGCAGG	-17 (X1)
ACTTCCAGGCTCCACCCGACT	TTGGAGGGCGAACCCCAAGGGGACCTCATGCAGG			+1 (X1)
#111				
ACTTCCAGGCTCCACCCGACT	TTGGAGGGCGAACCCCAAGGGGACCTCATGCAGG	▼		+1 (X2)
ACTTCCAGGCTCCACCCG-	-----		AACCCCAAGGGGACCTCATGCAGG	-11 (X6)
#114				
ACTTCCAGGCTCCACCCGACT	-----	▼	CACTATCTTCTGGGCTCCTCATGTC	-6 +25 (X3)
ACTTCCAGGCTCCACCC-	-----		CAAGGGGACCTCATGCAGG	-17 (X6)
ACTTCCAGGCTCCACCCGAC-	-----		GAACCCCAAGGGGACCTCATGCAGG	-8 (X1)

[Fig. 5d]





[Fig. 7a]

**Pronukleus-Injektion**



Cas9 protein (nM)	sgRNA (nM)	Untersuchte Embryonen	Mutanten (%)
2	4	20	3 (15%)
20	40	15	5 (33%)
200	400	17	15 (88%)

[Fig. 7b]

**Intrazytoplasmatische Injektion**

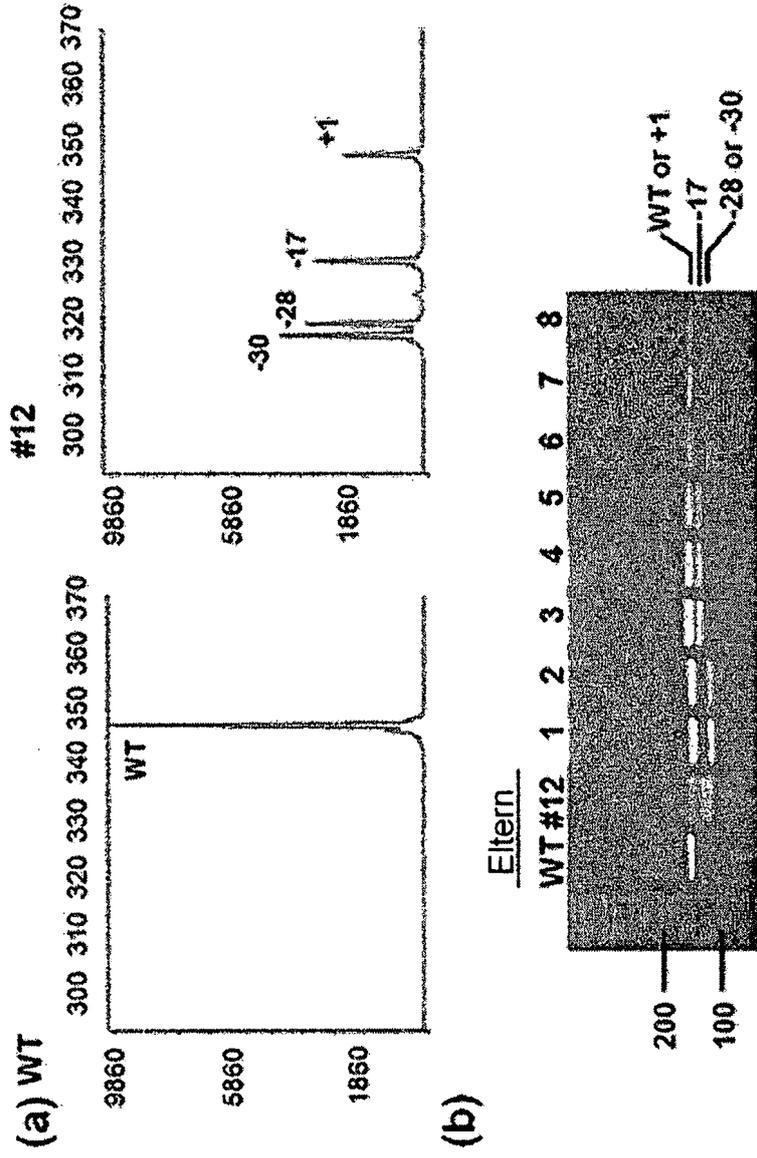


Cas9 protein (nM)	sgRNA (nM)	Untersuchte Embryonen	Mutanten (%)
2	4	18	1 (6%)
20	40	19	6 (32%)
200	400	14	10 (71%)

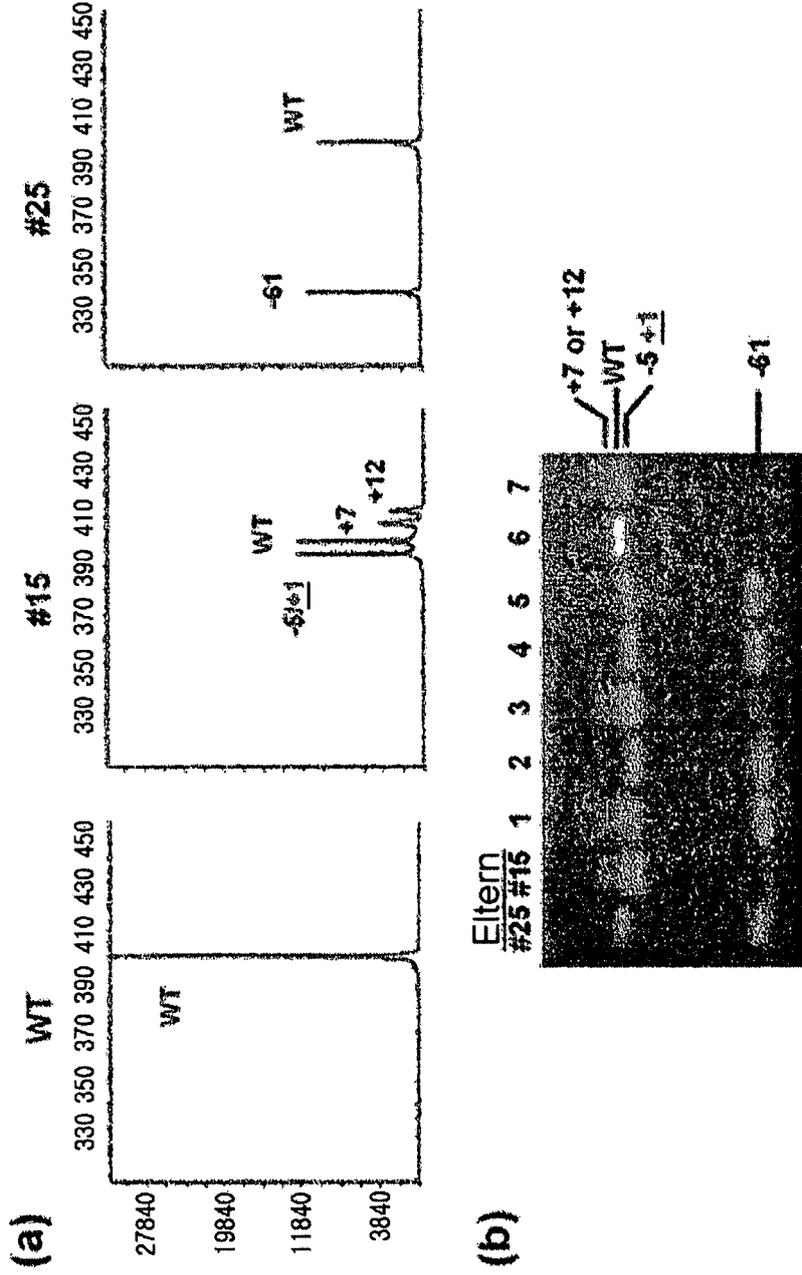
[Fig. 7c]

Sequenz	Indel	Embryo Nr.
ACTTCCAGGGCTCCACCCCGACTGGAGGGGGAACCCCAAGGGACCTCATGCCAG	WT	
ACTTCCAGGGGAACCC-----AAGGGACCTCATGCCAG	Δ18	2
ACTTCCAGGGCTCCAC-----AAGGGACCTCATGCCAG	Δ20	1
ACTTCCAGGGCTCCACCC-----AAGGGACCTCATGCCCC	Δ19	1
ACTTCCAGGGCTCCACCC-----CAAGGGACCTCATGCCAG	Δ17	1
ACTTCCAGGGCTCCACCCGA-----ACCCCAAGGGACCTCATGCCAG	Δ11	3
ACTTCCAGGGCTCCACCCGAA--GGAGGGCCGNAACCCCAAGGGACCTCATGCCA	Δ3+1	1
ACTTCCAGGGCTCCACCCGACT--AGGGGGAACCCCAAGGGACCTCATGCCAG	Δ2	1
ACTTCCAGGGCTCCACCCGACTGGGAGGGCCGNAACCCCAAGGGACCTCATGCCA	+1	1
ACTTCCAGGGCTCCACCCGACTTGGAGGGCCGNAACCCCAAGGGACCTCATGCCA	+1	10
ACTTCCAGGGCTCCACCCGA-----GGGGAACCCCAAGGGACCTCATGCCAG	Δ6	1
ACTTCCAGGGCTCCACCCGA-----GGGGAACCCCAAGGGACCTCATGCCAG	Δ5	2
ACTTCCAGGGCTCCACCC-----TCATGCCAG	Δ28	1
-----AGGGGAACCCCAAGGGACCTCATGCCAG	Δ126	1
Gesamt		26

[Fig. 8]



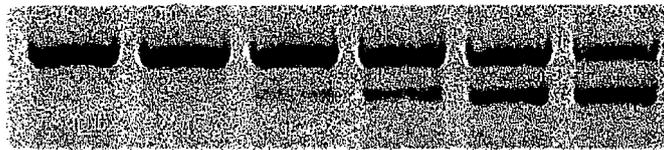
[Fig. 9]



[Fig. 10a]

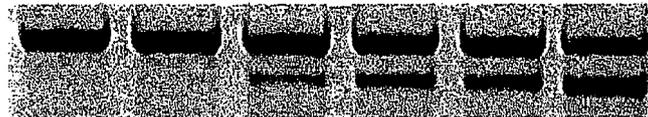
**CCR5#4**

sgRNA	-	100 (29)	10 (2.9)	30 (8.8)	100 (29)	50 (15)	µg (µM)
Cas9-Protein	225 (14)	-	22.5 (1.4)	75 (4.5)	225 (14)	-	µg (µM)
Cas9-Plasmid	-	-	-	-	-	5	µg



4.8 18 38 47 indel (%)

sgRNA	-	100 (29)			50 (15)	µg (µM)	
Cas9-Protein	225 (14)	-	22.5 (1.4)	75 (4.5)	225 (14)	-	µg (µM)
Cas9-Plasmid	-	-	-	-	-	5	µg



12 30 33 43 indel (%)

crRNA	-	40 (29)	20 (15)	µg (µM)	
tracrRNA	-	80 (29)	40 (15)	µg (µM)	
Cas9-Protein	225 (14)	-	225 (14)	-	µg (µM)
Cas9-Plasmid	-	-	-	5	µg



9.4 42 indel (%)

[Fig. 10b]

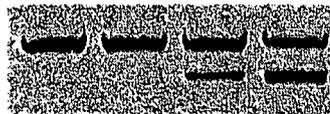
**CCR5#4**

Cas9-Protein	45 (14)	-	15 (4.5)					-	$\mu\text{g} (\mu\text{M})$
sgRNA	-	60 (87)	1.3 (1.9)	3.2 (4.6)	8 (12)	20 (29)	50 (73)	-	$\mu\text{g} (\mu\text{M})$
sgRNA-Plasmid	-	-	-	-	-	-	-	1	$\mu\text{g}$
Cas9-Plasmid	-	-	-	-	-	-	-	1	$\mu\text{g}$



Indel (%) 2.7 8.3 33 51 57 32

Cas9-Protein	45 (14)	-	4.5 (1.4)	15 (4.5)	$\mu\text{g} (\mu\text{M})$
sgRNA	-	60 (87)	6 (8.7)	20 (29)	$\mu\text{g} (\mu\text{M})$



Indel (%) 27 51

[Fig. 10c]

**CCR5**

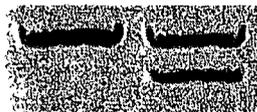
```

CAATCTATGACATCAATTATTATA-▼CATCGGAGCCCTGCCAAAAAATCAA      WT
CAATCTATGACATCAATTATTAT-----CGGAGCCCTGCCAAAAAATCAA      -4
CAATCTATGACATCAATTAT-----CATCGGAGCCCTGCCAAAAAATCAA      -4
CAATCTATGACATCAATTAT-----CGGAGCCCTGCCAAAAAATCAA      -7
CAATCTATGACATCAATTATTAT--CATCGGAGCCCTGCCAAAAAATCAA      -1
CAATCTATGACATCAATTATTATAACATCGGAGCCCTGCCAAAAAATCAA      +1
CAATCTATGACAA-----GAGCCCTGCCAAAAAATCAA      -17,+1
    
```

[Fig. 10d]

**ABCC11**

Cas9-Protein	-	15 (4.5)	$\mu\text{g} (\mu\text{M})$
sgRNA	-	20 (29)	$\mu\text{g} (\mu\text{M})$



Indel (%) 35

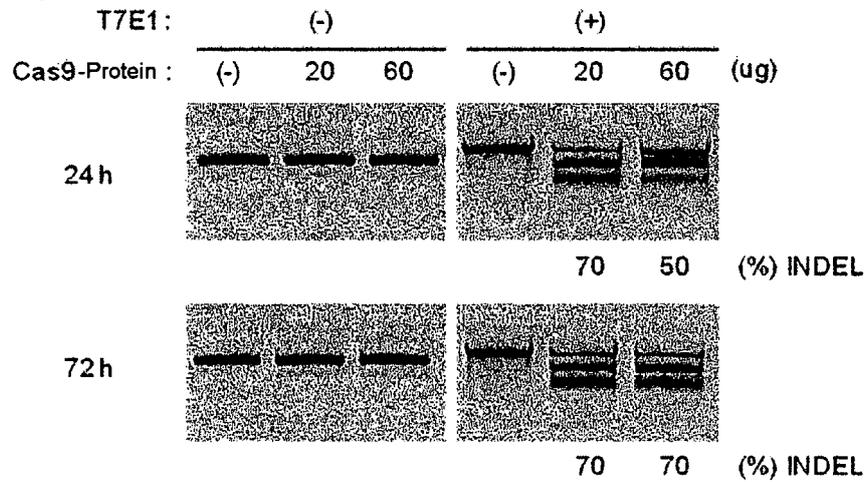
[Fig. 10e]

**ABCC11**

```

TTCTCAAGGCAGCATCATACTTCCCCACGGTGGGACAGCTGCCCTCCCTGG WT
TTCTCAAGGCAGCATCATACTTCC-----CTGGGACAGCTGCCCTCCCTGG -6
TTCTCAAGGCAGCATCATACTTC---CACGGTGGGACAGCTGCCCTCCCTGG -3
TTCTCAAGGCAGC-----TGCCCTCCCTGG -29
TTCTCAAGGCAGCATCATACTT-----CCCTCCCTGG -20
TTCTCAAGGCAGCATCATACTT-----CCCTCCCTGG -20
TTCTC----- -256
    
```

[Fig. 11]





[Fig. 13]

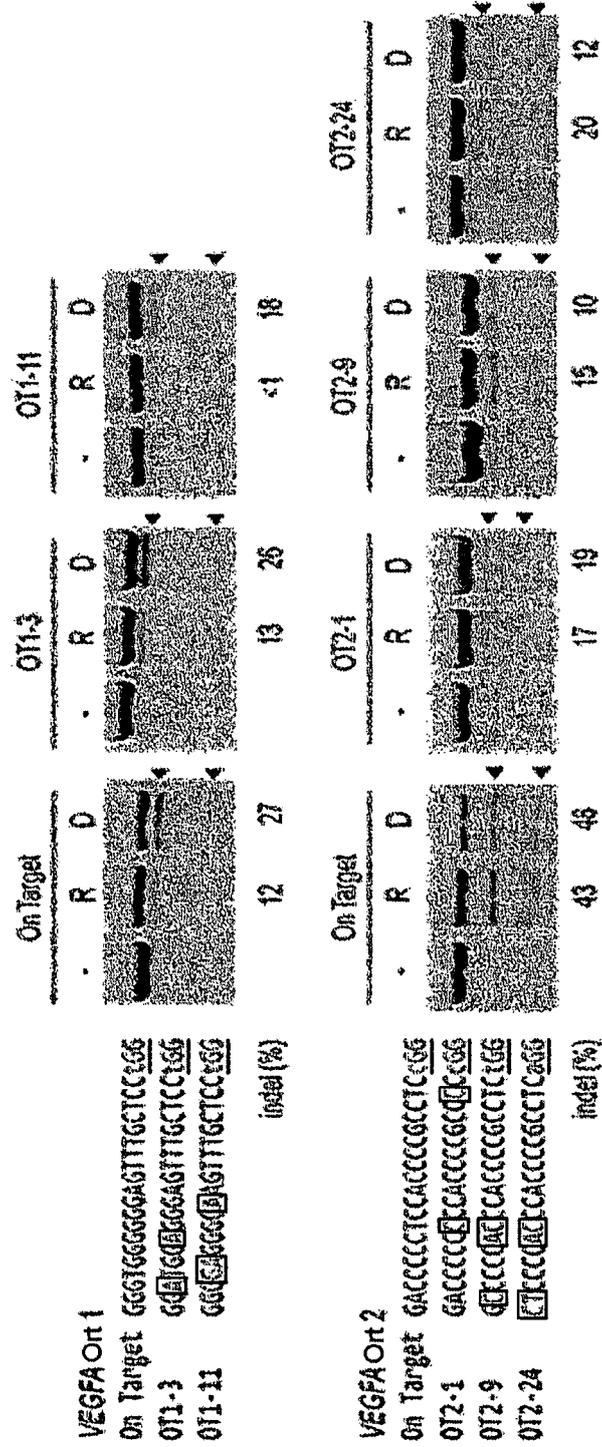
Cas9	-	+	-	-	-	+	-
Cas9-9R4L	-	-	+	-	-	-	+
sgRNA	-	-	-	+	-	+	-
sgRNA-9R4L	-	-	-	-	+	-	+



Indel (%)

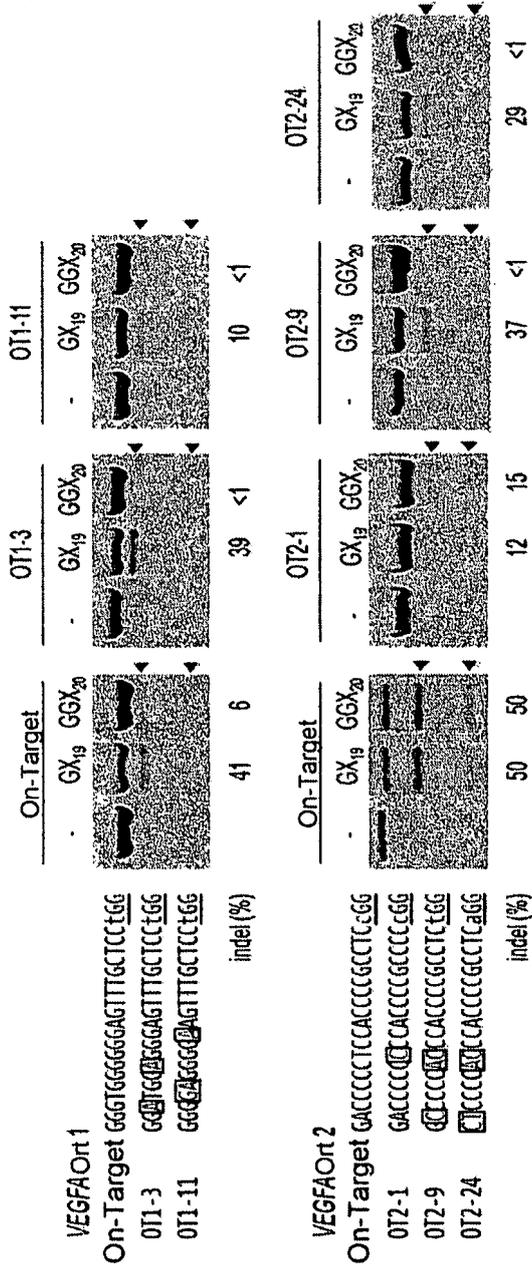
9

[Fig. 14a]

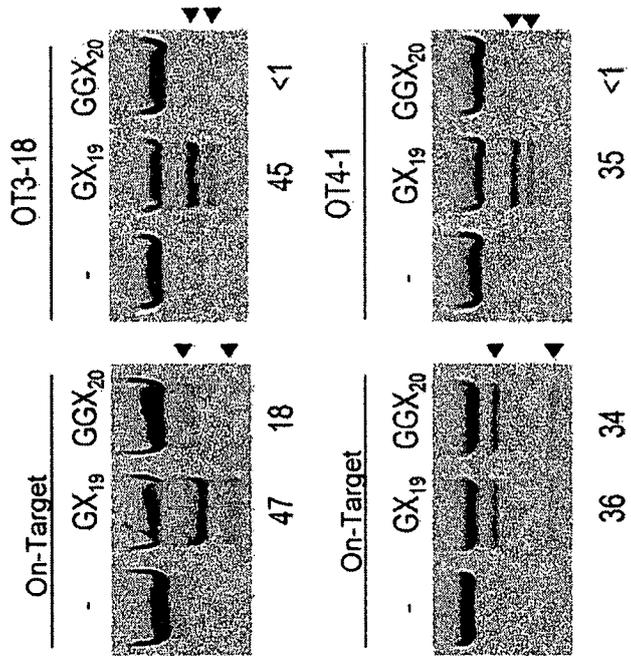




[Fig. 15a]



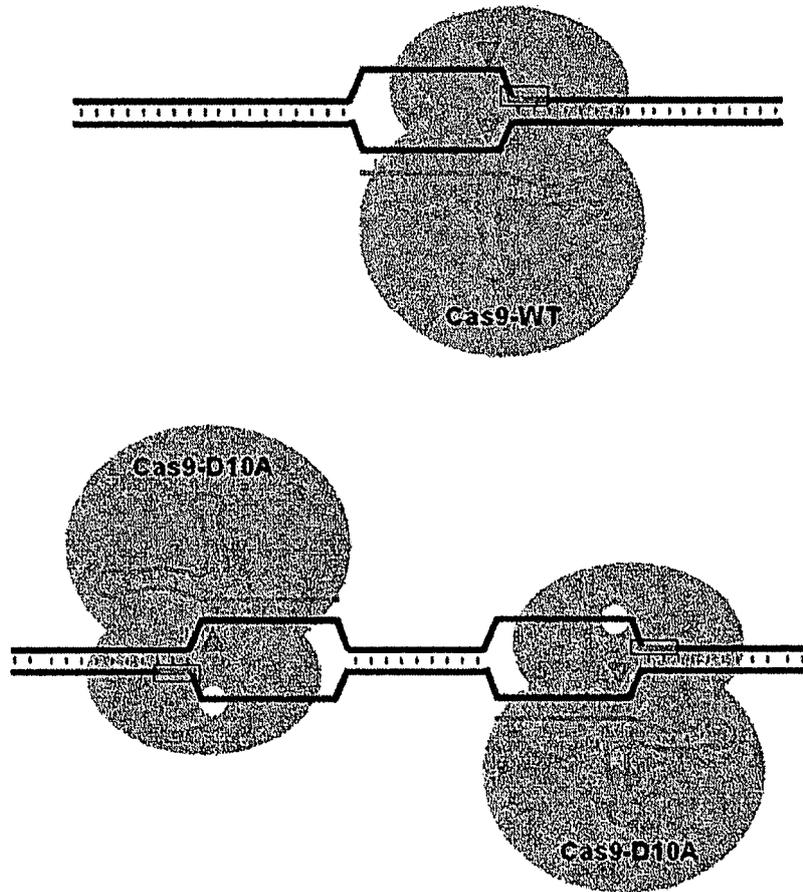
[Fig. 15b]



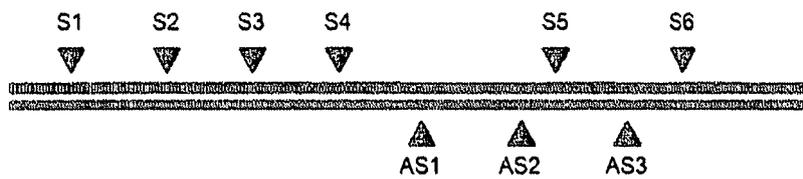
**VEGFA** **Ort 3**  
 On-Target GGTGAGTGAGTGTCGGTGTGG  
 OT3-18 TTGTCGGTGAGTGTCGGTGTGG  
 indel (%)

**EMX1**  
 On-Target GAGTCCGAGCAGAAGAAGAGGG  
 OT4-1 GAGTTAGAGCAGAAGAAGAAaGG  
 indel (%)

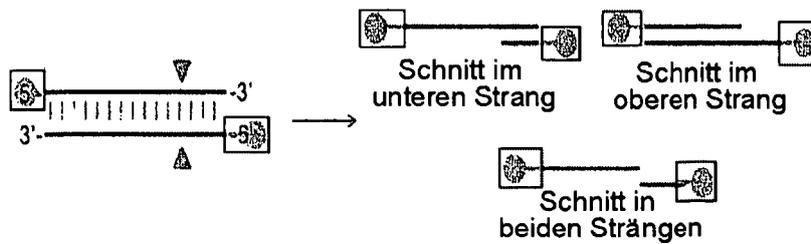
[Fig. 16a]



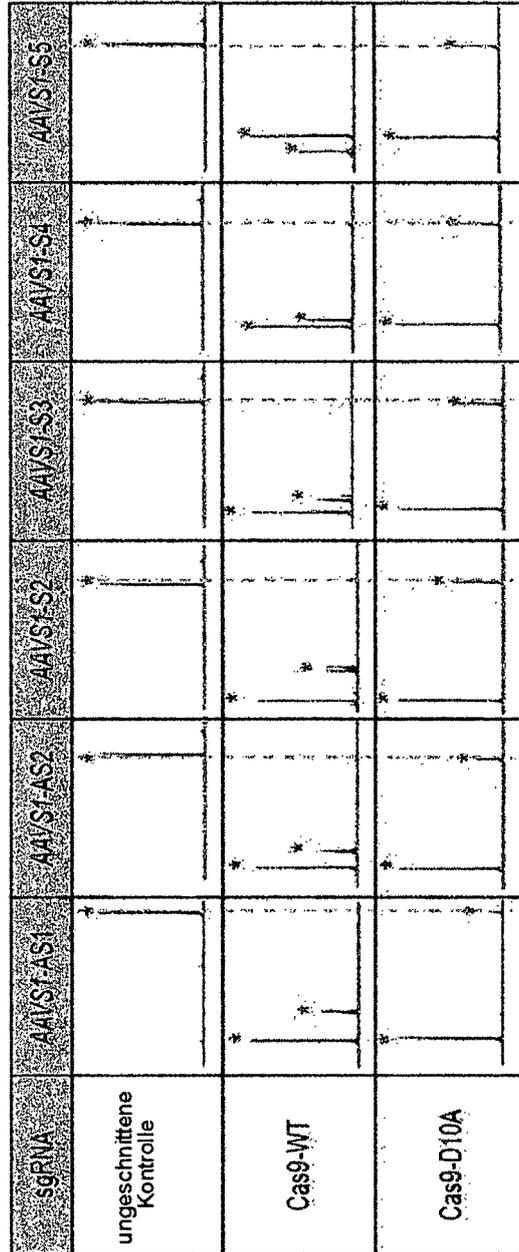
[Fig. 16b]  
AAVS1-Locus



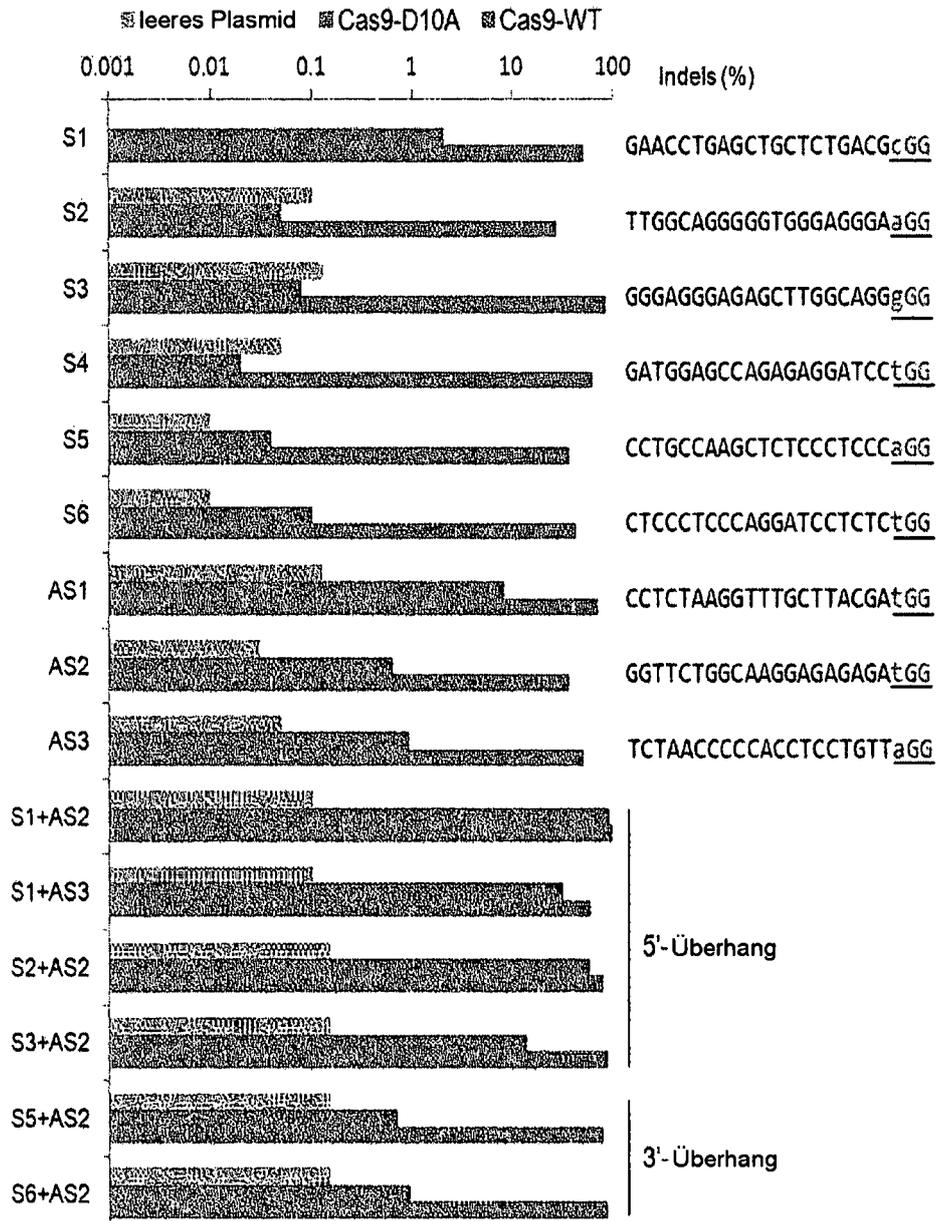
[Fig. 16c]



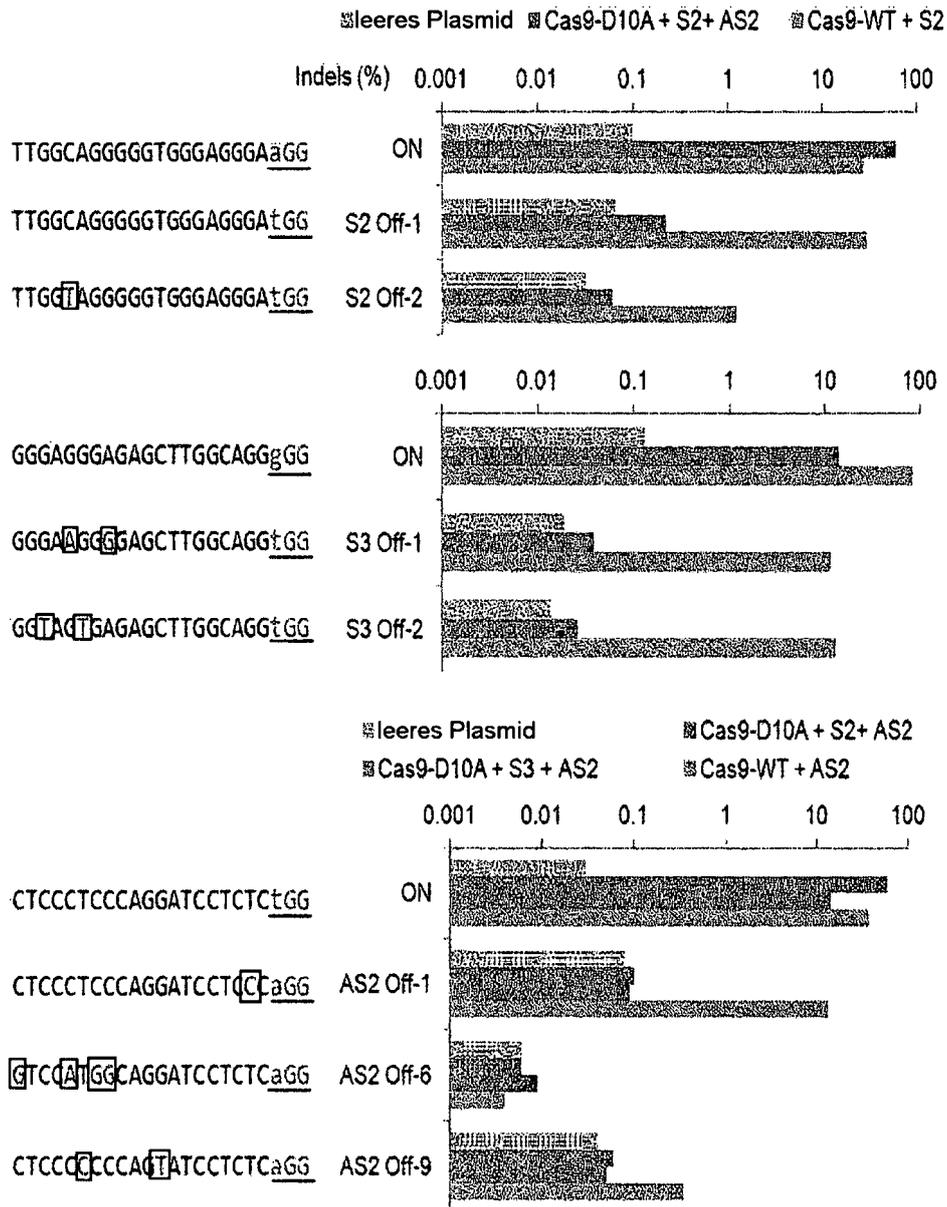
[Fig. 16d]



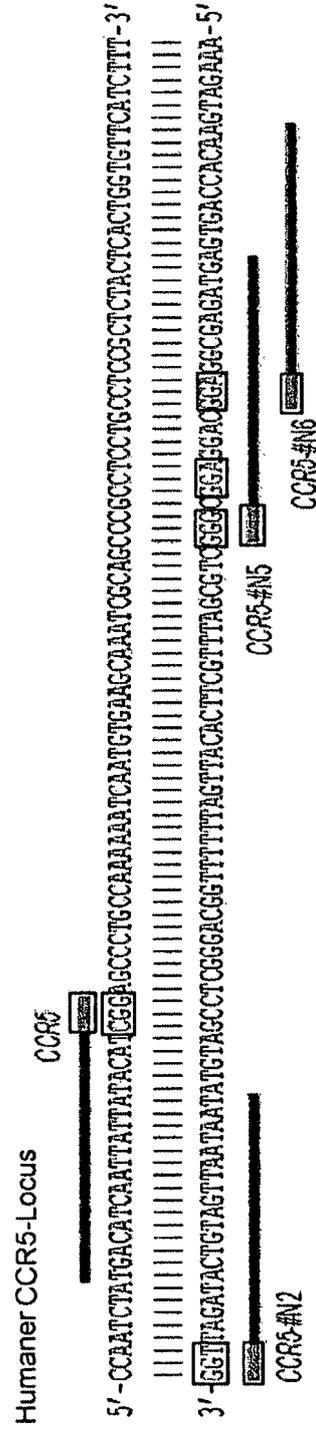
[Fig. 17a]



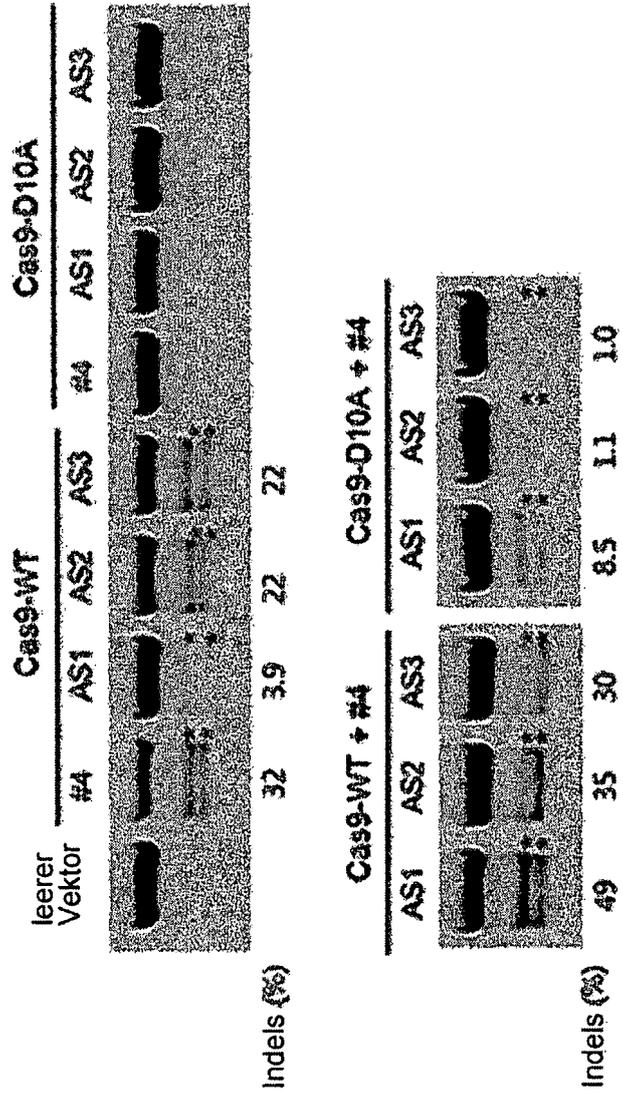
[Fig. 17b]



[Fig. 18a]

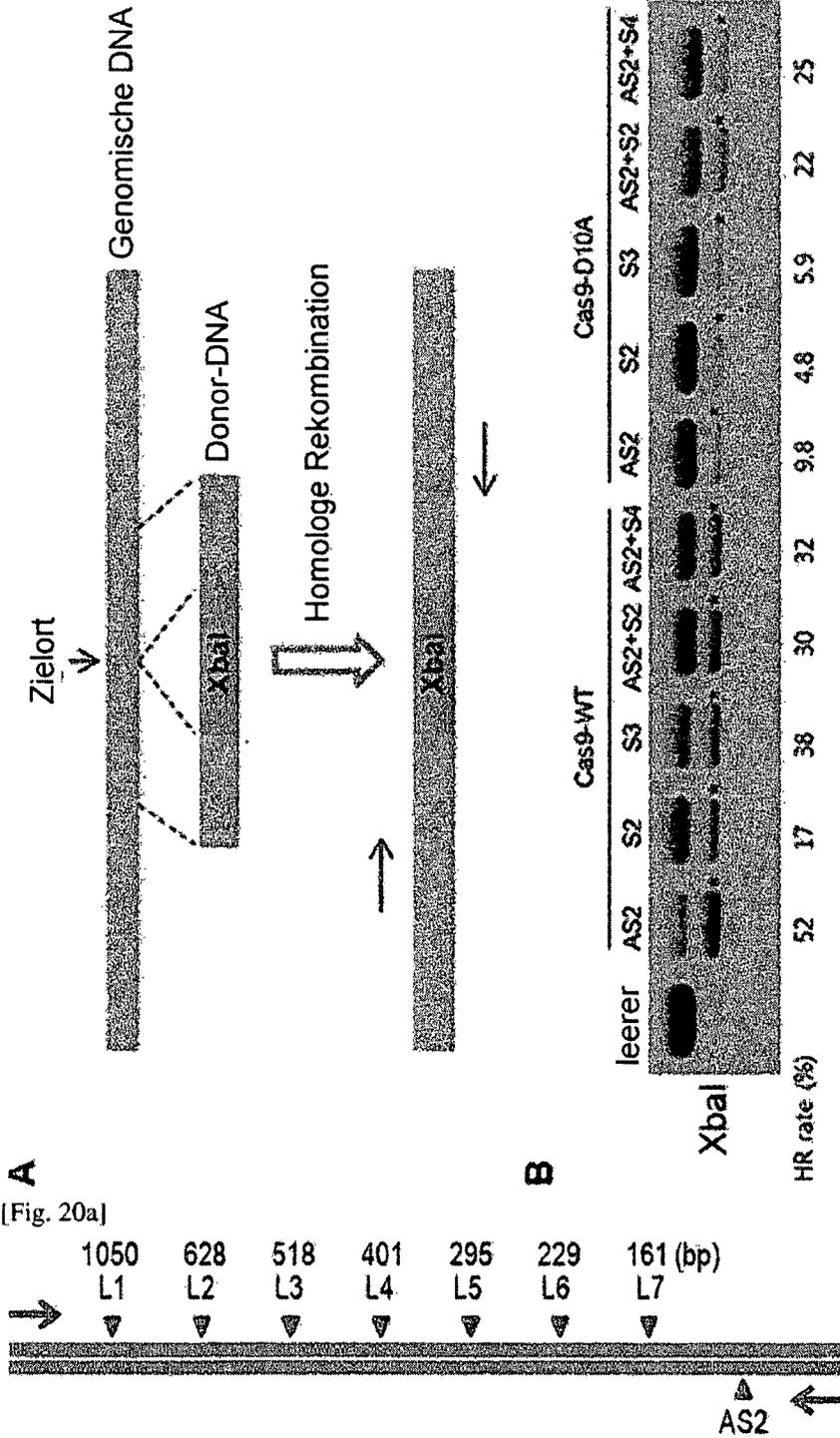


[Fig. 18b]

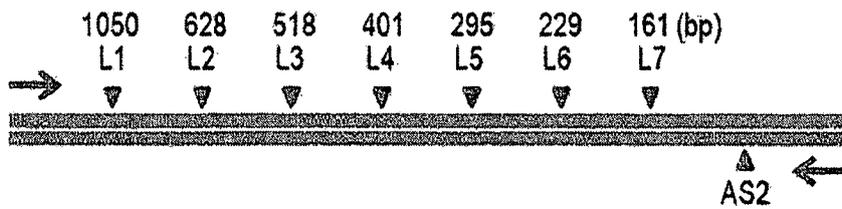




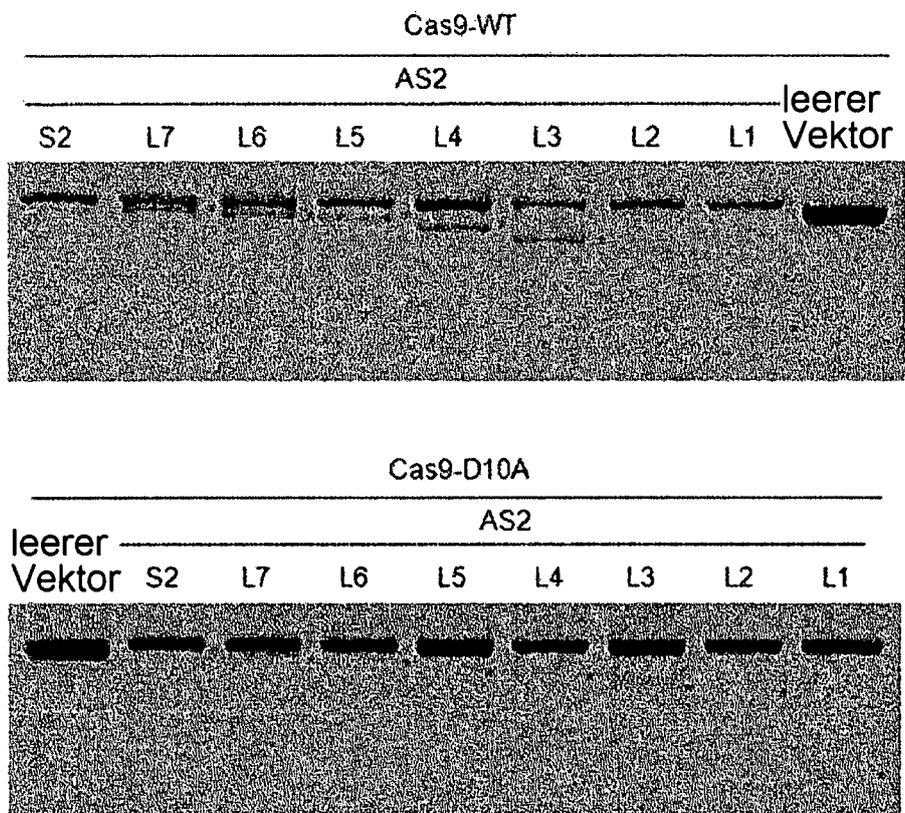
[Fig. 19]



[Fig. 20a]

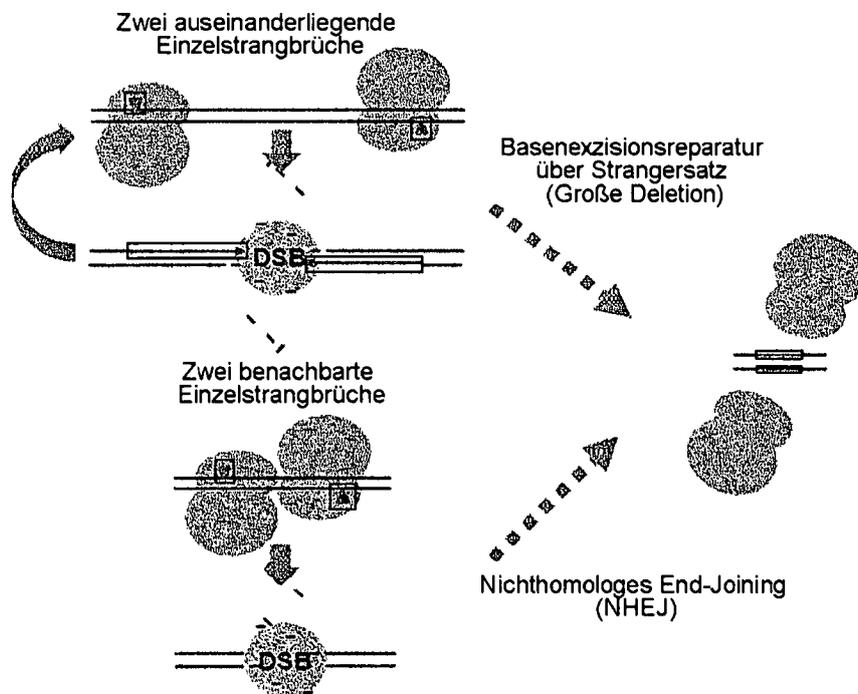


[Fig. 20b]

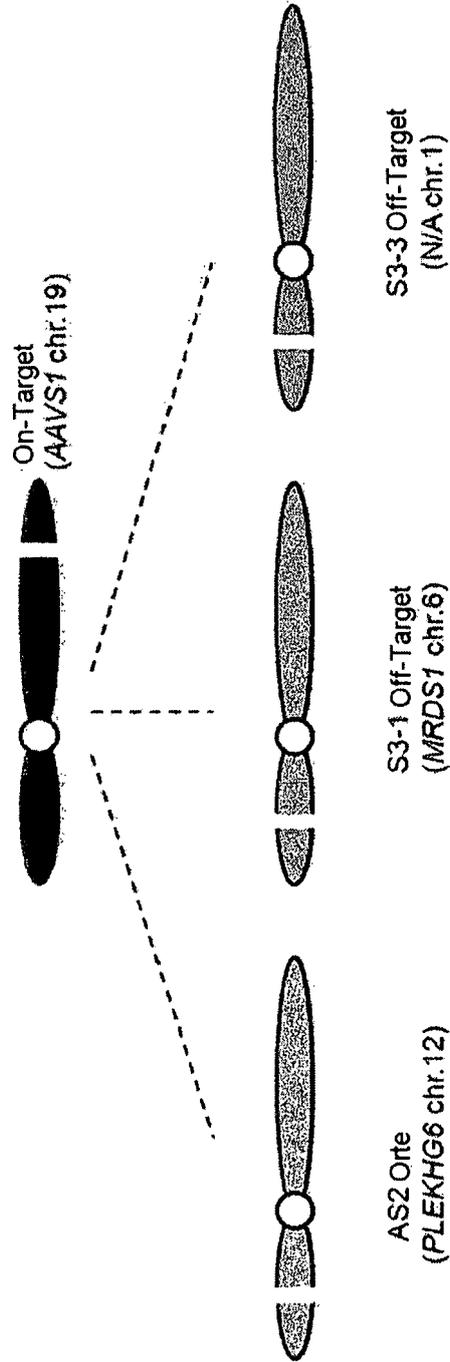




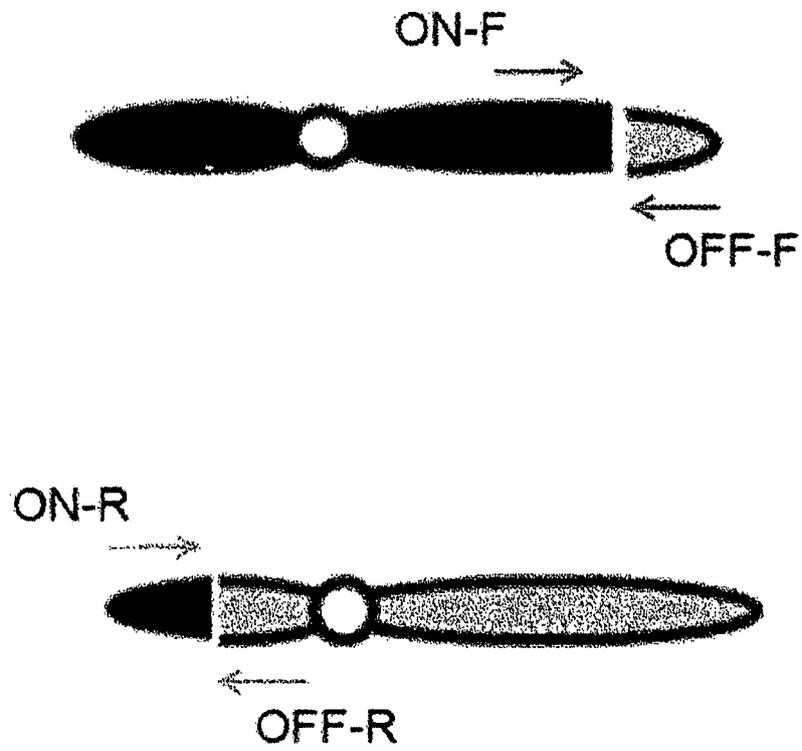
[Fig. 20d]



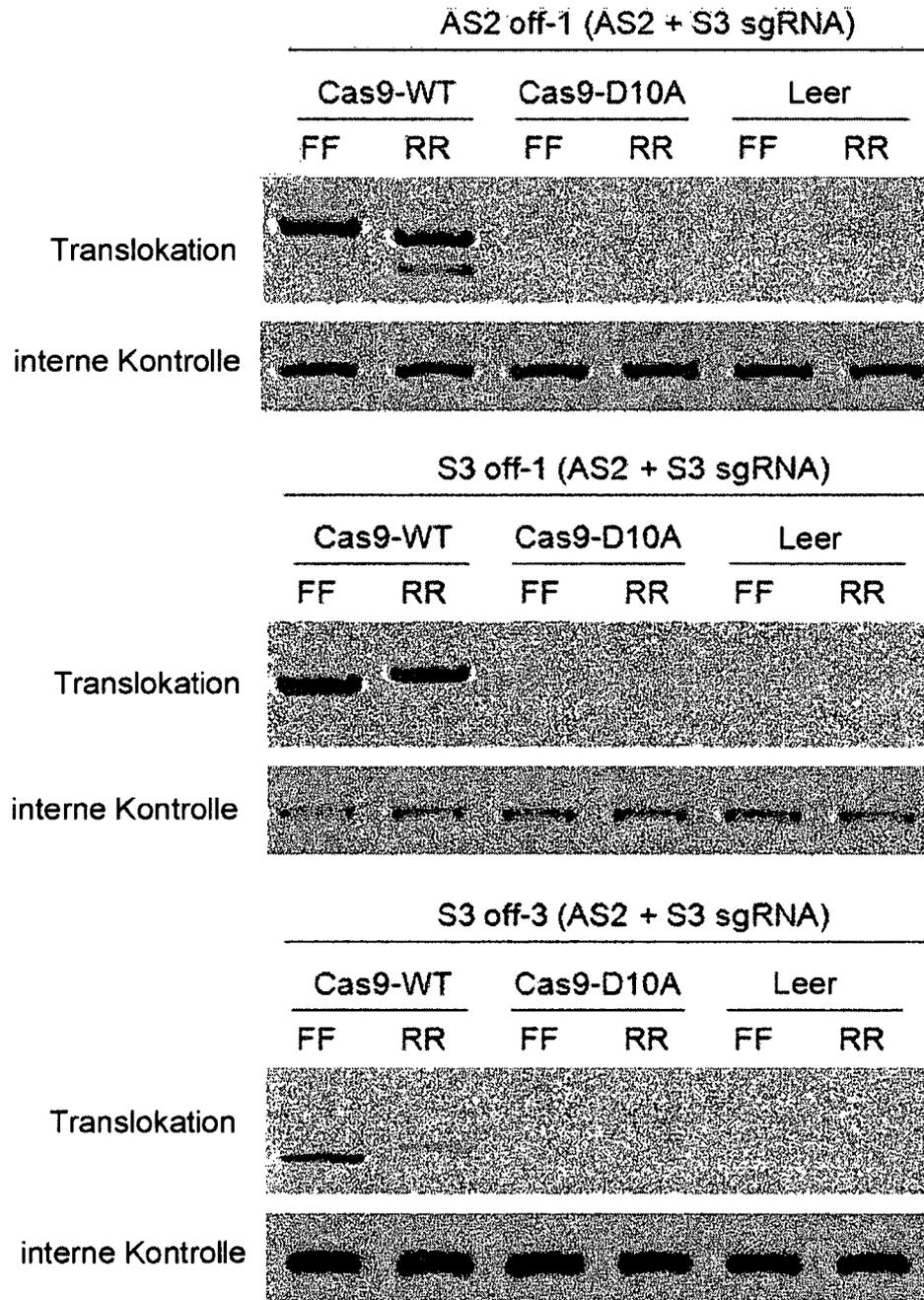
[Fig. 21a]



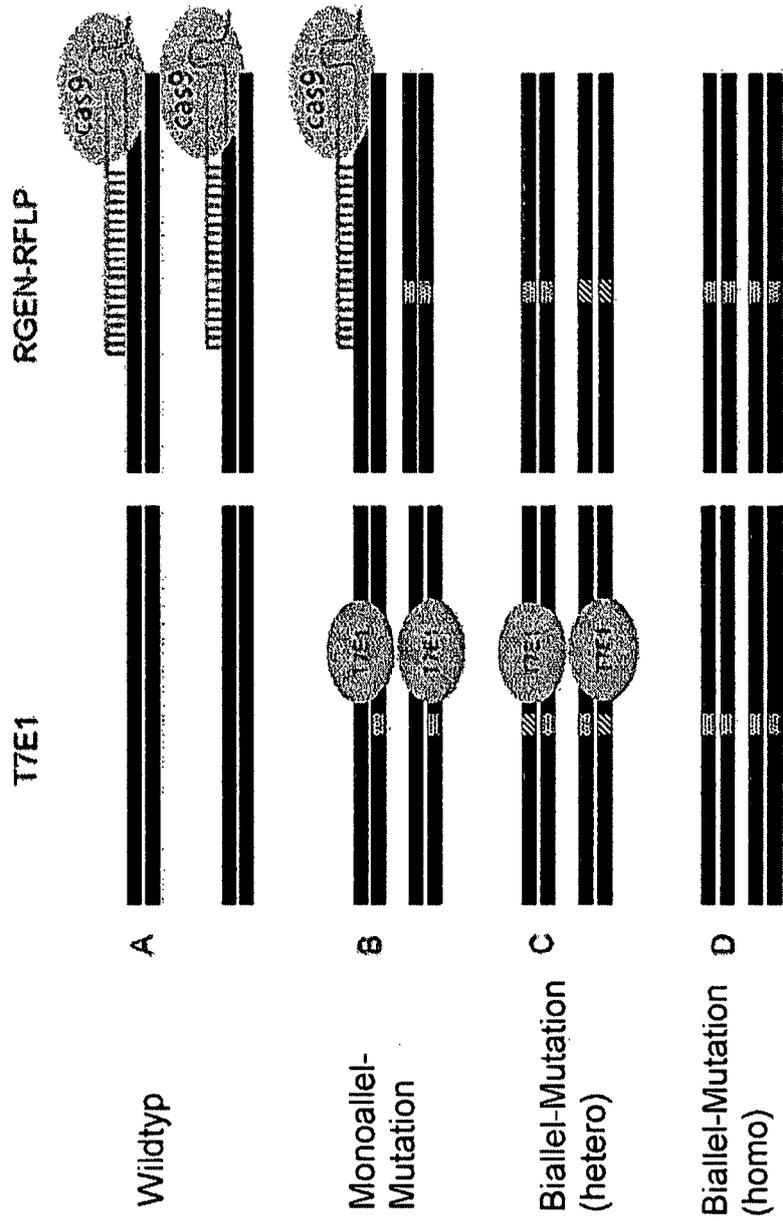
[Fig. 21b]



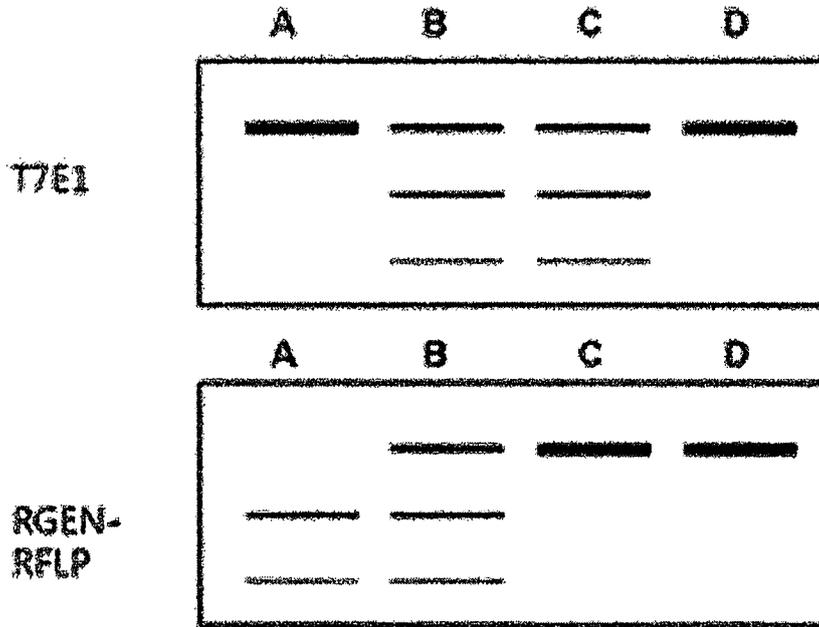
[Fig. 21c]



[Fig. 22a]



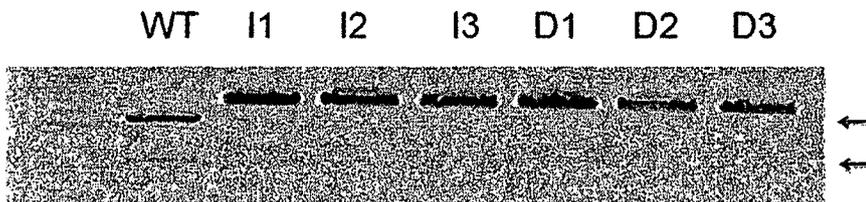
[Fig. 22b]



[Fig. 23]

Plasmid-Zielsequenz

AATGACCACTACATCCT---CAAGGG WT  
 AATGACCACTACATCCTT-CAAGGG I1  
 AATGACCACTACATCCTTT-CAAGGG I2  
 AATGACCACTACATCCTTTTCAAGGG I3  
 AATGACCACTACATCCT----AAGGG D1  
 AATGACCACTACATCCT-----AGGG D2  
 AATGACCACTACATCCT-----GGG D3



[Fig. 24a]

#1 (+/-)

```

TATGTGCCAATGACCACTACATCCT---CAGGGCAGCAATCGGAG WT
TATGTGCCAATGACCACTACATCCTCCTCAGGGCAGCAATCGGAG +3
    
```

#2 (+/-)

```

TATGTGCCAATGACCACTACATCCTCAGGGCAGCAATCGGAG WT
TATGTGCCAATGACCACTACATC-----AATCGGAG -12
    
```

#5 (+/-)

```

TATGTGCCAATGACCACTACATCCTCAGGGCAGCAATCGGAG WT
TATGTGCCAATGACCACTACAT-----CAGCAATCGGAG -9
    
```

#6 (+/-)

```

TATGTGCCAATGACCACTACATCCTCAGGGCAGCAATCGGAG WT
TATGTGCCAATGACCACTACATSC-----AGCAATCGGAG -6
    
```

#12 (-/-)

```

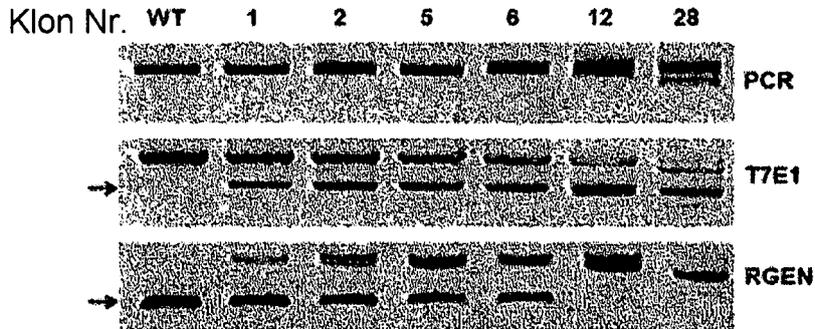
-----CAGCAATCGG -36
TATGTGCCAATGACCACTACATCCT-----TCAAGGCAGCAATCGG +1
TATGTGCCAATGACCACTACATCCT-----CAGGGCAGCAATCGG +1
TATGTGCCAATGACCACTACATCCT/67bp/CAGGGCAGCAATCGG +67
    
```

#28 (-/-)

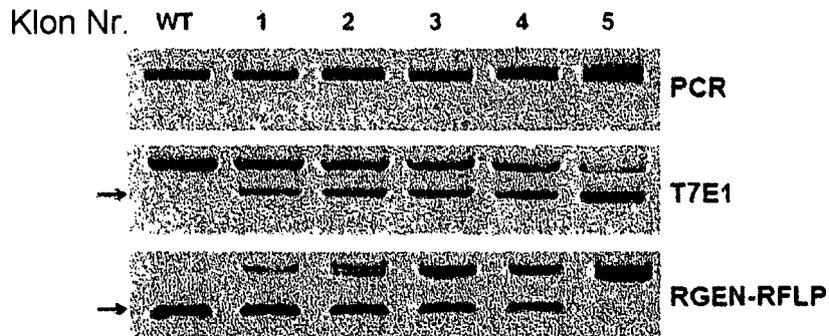
```

TATGTGCCAATGACCACTACATCCTCAGGGCAGCAATCGG +1
TATGTGCCAATGACCACTACAT-----GGCAGCAATCGG -7,+1
TATGTGCCAATGACCACTACAT----- -94
    
```

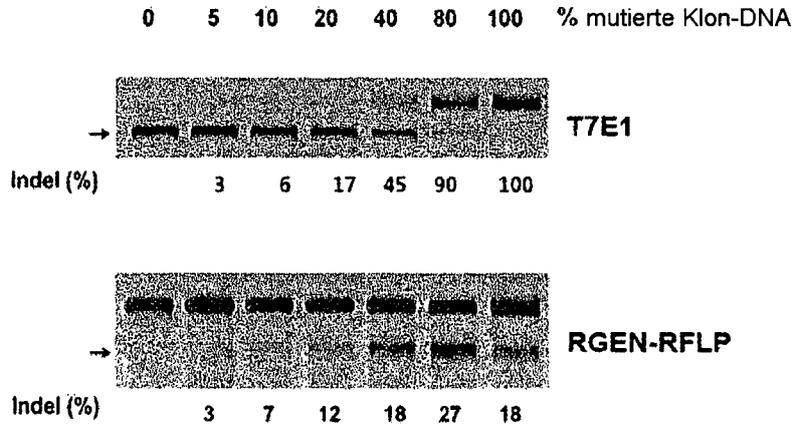
[Fig. 24b]



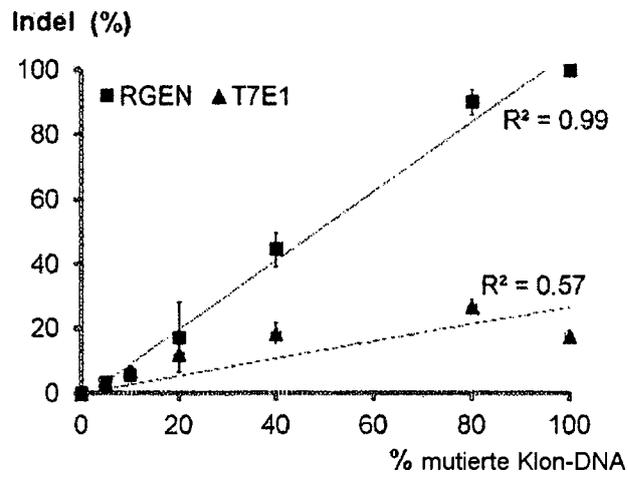
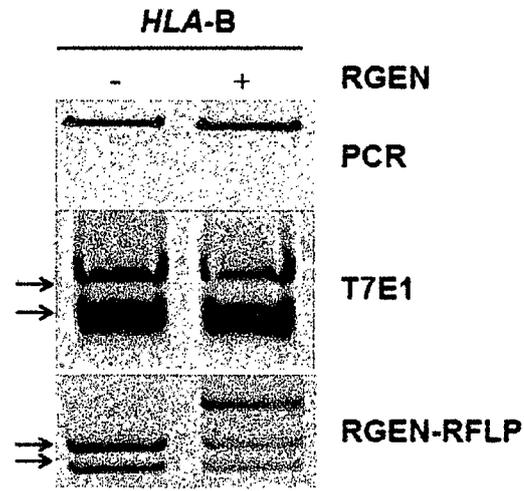
[Fig. 25a]



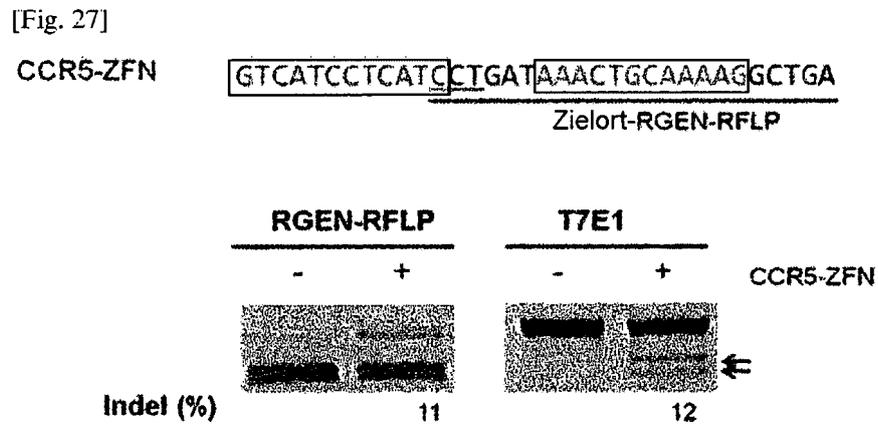
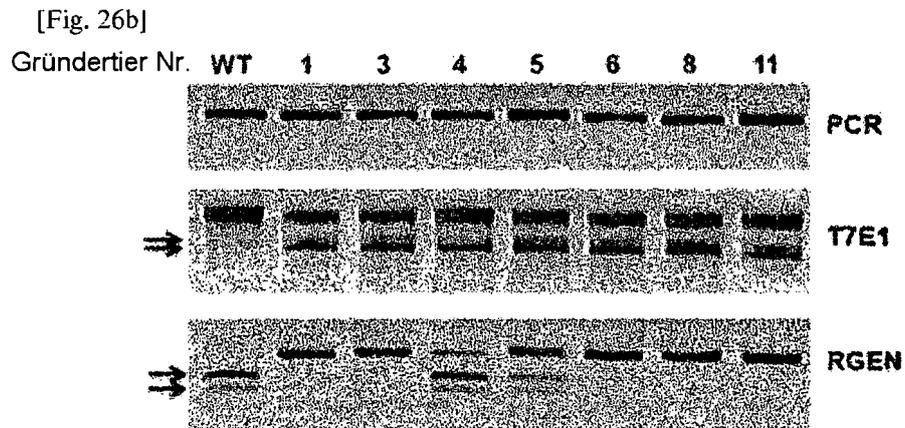
[Fig. 25b]



[Fig. 25c]





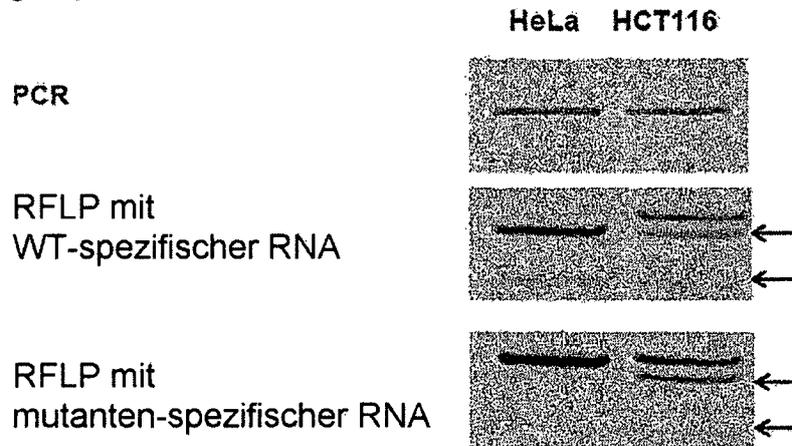


[Fig. 28]

Vorwärtsprimer  GCTGGTCTGGGTTCTGTGCCCTTCCCCACCCAGGCCACCCAGGTGTCTGTCCATTCTCAGGCTG  
GTCACATGGGTGGTCTAGGGTGTCCCATGAGAGATGCAAGGCCCTGAATTTTCTGACTCTTCCCATCA  
GACCCCAAAGACAATGTGACCCACCACCCCTCTCTGACCATGAGGCCACCCCTGAGGTGCTGGGCC  
TGGGTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGCAGGACCAAACTCAGGACACGGA  
GCTTGTGGAGACCAGACCAGCAGGAGATAGAACCCTCCAGAAGTGGGCAGCTGTGGTGGTCTGGGA  
GAGAGCAGAGATACACATGCCATGTACAGCATGAGGGCTGCCGAAGCCCTCACCCCTGAGATGGGGTA  
AGGAGGGGATGAGGGGTCATATCTTTTCATATCTGTTCTCAGGGAAAGCAGGAGCCCTTCTGGAGCCCT  
TCAGCAGGGTCAGGGCCCTCATCTTCCCTCCCTTCCAGAGCCCTCTCCAGTCCACCATCCCCATC  
GTGGGCATTGTTGCTGGCCCTGGCTGTCTAGCAGTTGTGGTCATCG

 Rückwärtsprimer

[Fig. 29a]



**HeLa**

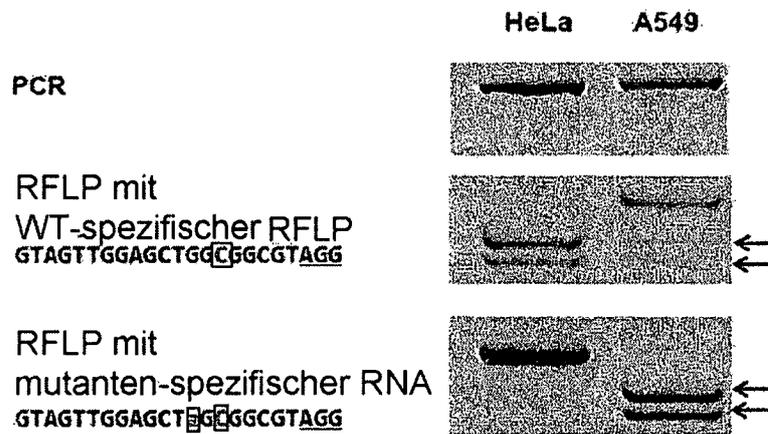
ACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGG Wildtyp

**HCT116**

ACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGG Wildtyp

ACTACCACAGCTCCT---CTGAGTGG c.133-135 del TCT

[Fig. 29b]



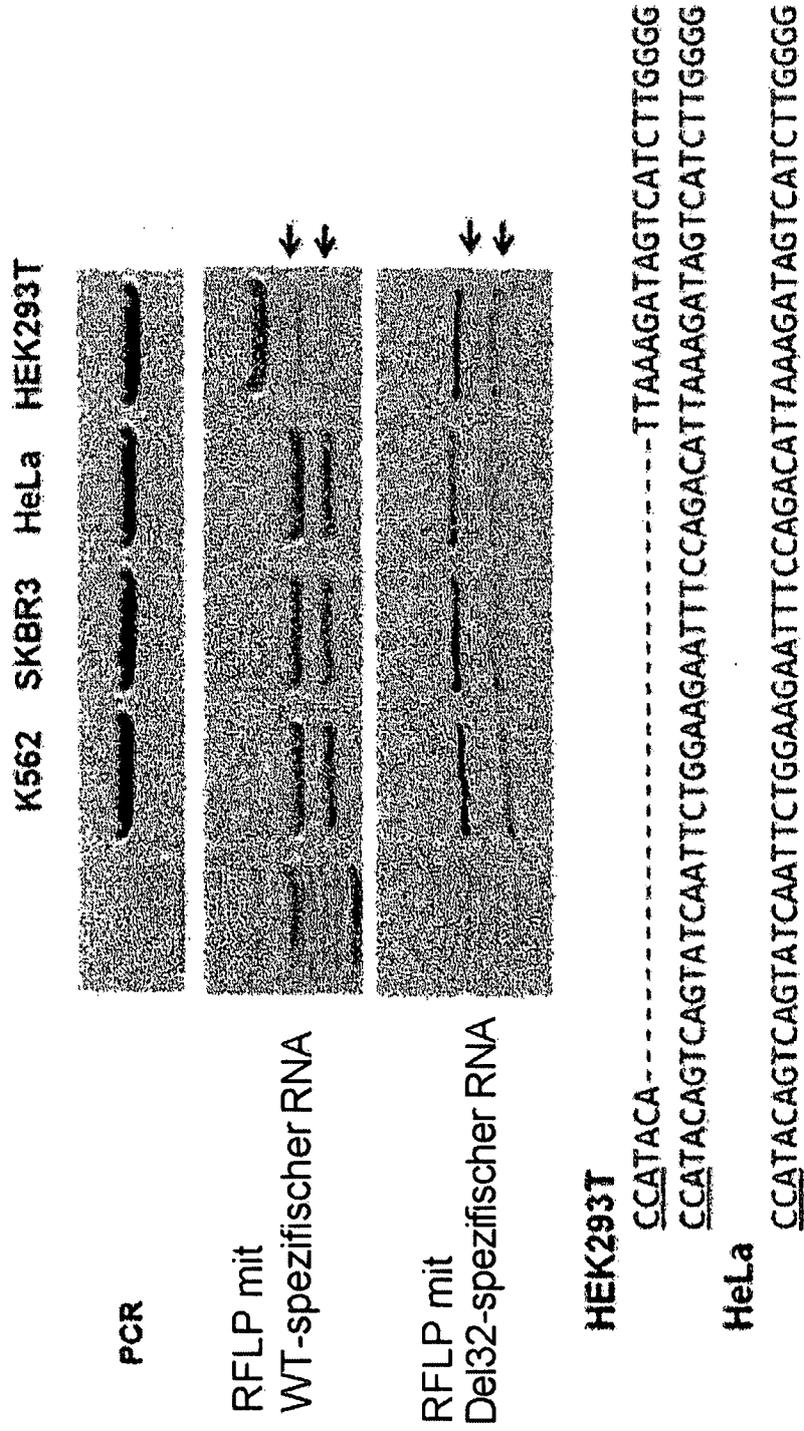
**HeLa**

GTAGTTGGAGCTGGCTGGCGTAGG Wildtyp

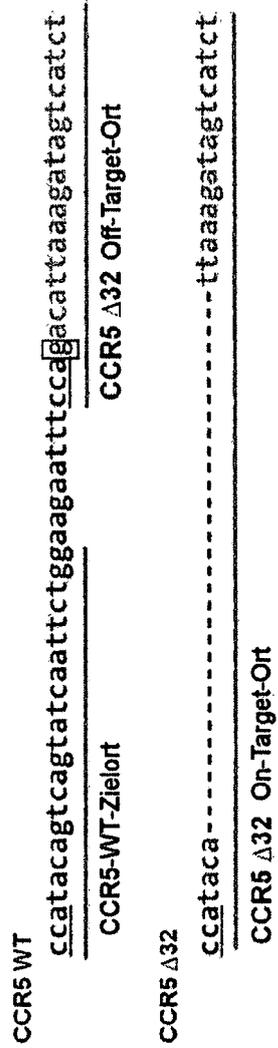
**A549**

GTAGTTGGAGCTGGCTGGCGTAGG c.34G>A

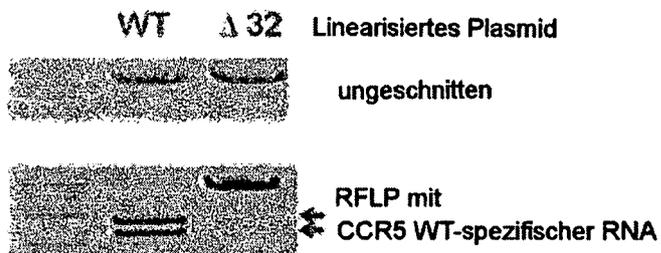
[Fig. 30a]



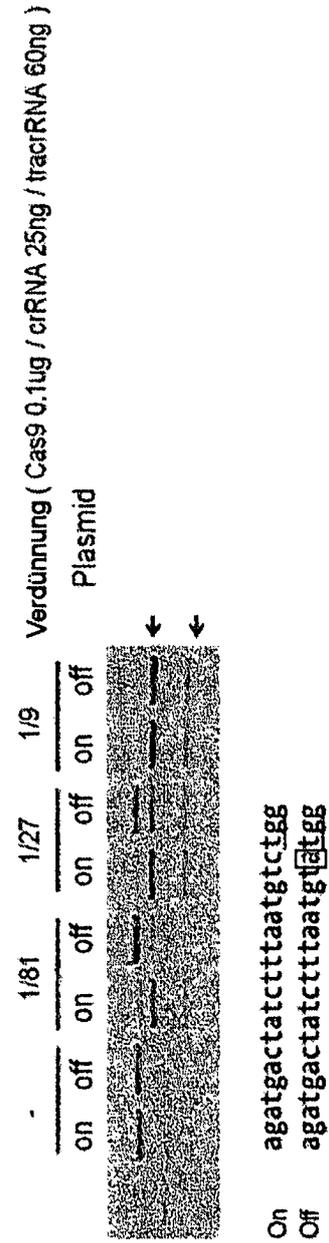
[Fig. 30b]



[Fig. 30c]



[Fig. 30d]



[Fig. 31a]

**KRAS**

**HeLa**

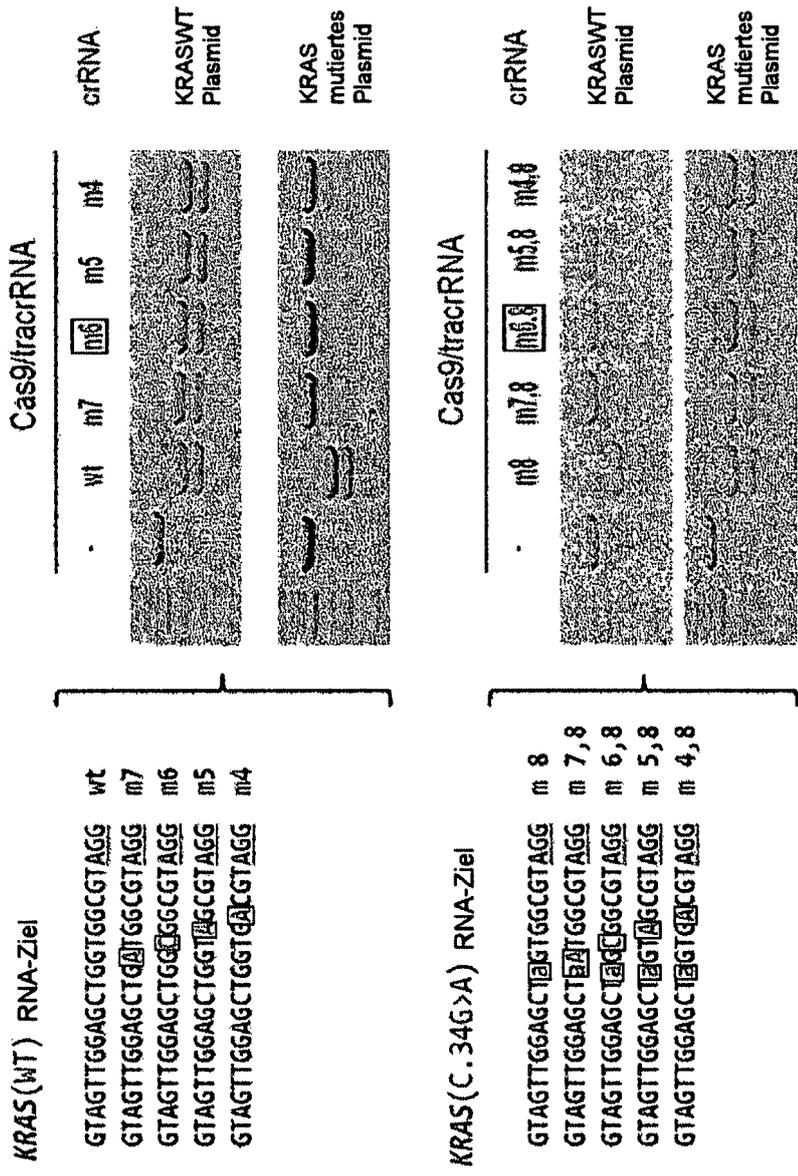
GTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGG Wildtyp

**A549**

GTAGTTGGAGCT $\square$ GTGGCGTAGG c.34G>A



[Fig. 31b]



[Fig. 32a]

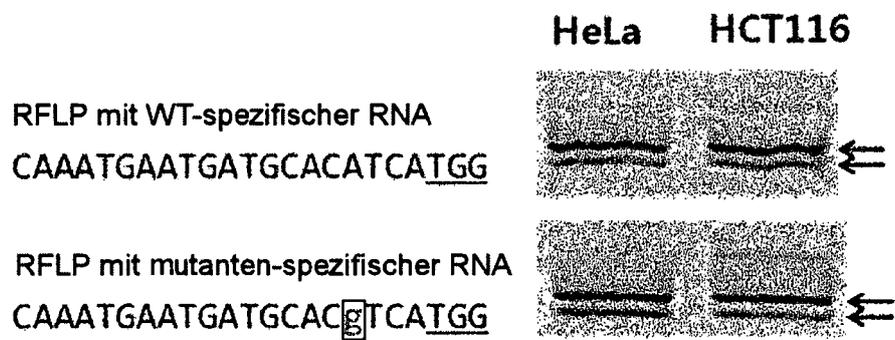
**PIK3CA**

**HeLa**

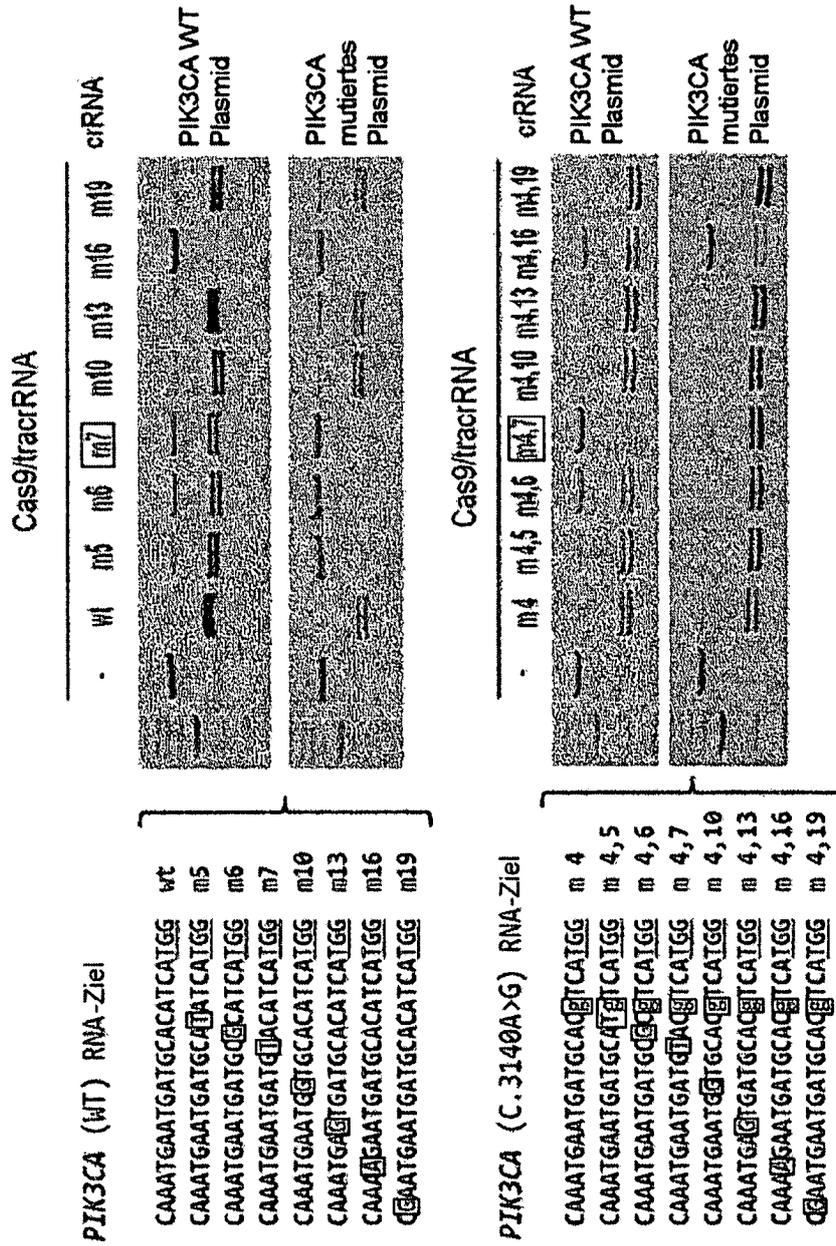
CAAATGAATGATGCACATCATGG Wildtyp

**HCT116**

CAAATGAATGATGCACATCATGG Wildtyp  
 CAAATGAATGATGCACgTCATGG C.3140A>G



[Fig. 32b]



[Fig. 33a]

**IDH1**

**HeLa**

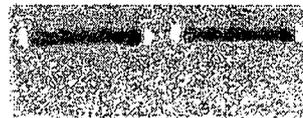
ATCATAGGTCGTCATGCTTATGG Wildtyp

**HT1080**

ATCATAGGTCGTCATGCTTATGG Wildtyp  
ATCATAGGTTGTCATGCTTATGG c.394C>T

**PCR**

HeLa HT1080



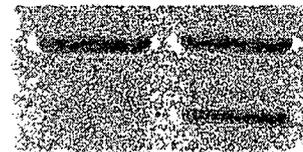
RFLP mit WT-spezifischer RNA

ATCATAGGTCGTCTGCTTATGG



RFLP mit mutanten-spezifischer RNA

ATCATAGGTTGTCCTGCTTATGG



[Fig. 33b]

**PIK3CA**

**HeLa**

CAAATGAATGATGCACATCATGG Wildtyp

**HCT116**

CAAATGAATGATGCACATCATGG Wildtyp

CAAATGAATGATGCACgTCATGG C.3140A>G

**PCR**

HeLa HCT116



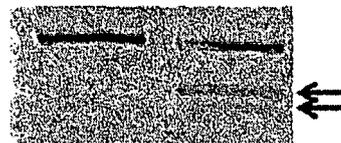
**RFLP mit  
WT-spezifischer RNA**

CAAATGAATGATGTACATCATGG



**RFLP mit  
mutanten-spezifischer RNA**

CAAATGAATGATGTACgTCATGG



[Fig. 33c]

**NRAS**

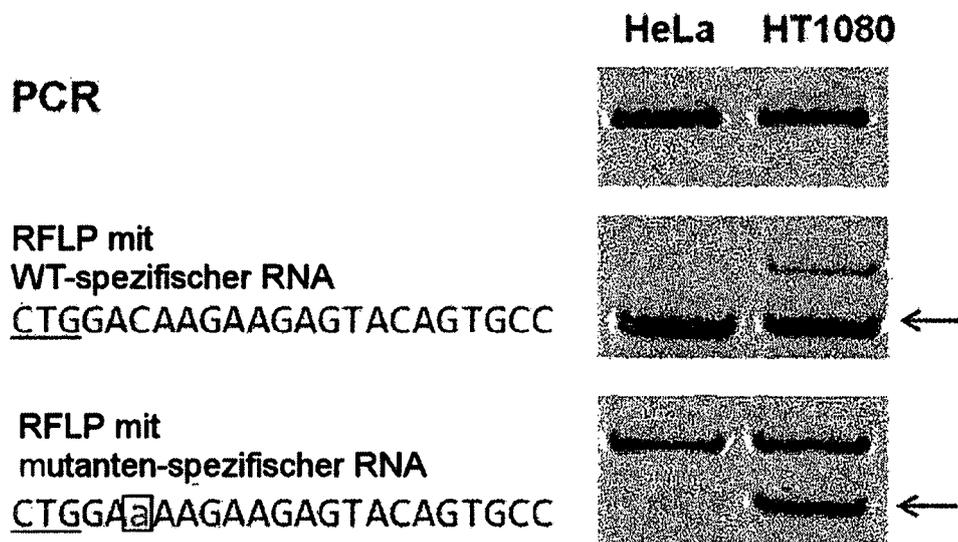
**HeLa**

CTGGACAAGAAGAGTACAGTGCC Wildtyp

**HT1080**

CTGGACAAGAAGAGTACAGTGCC Wildtyp

CTGGAAAAGAAGAGTACAGTGCC c.181C>A



[Fig. 33d]

**BRAF**

**HeLa**

ACTCCATCGAGATTTCACTGTAG Wildtyp

**HT29**

ACTCCATCGAGATTTCACTGTAG Wildtyp

ACTCCATCGAGATTTCTGTAG (c.1799T>A)

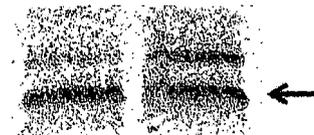
**PCR**

**HeLa HT29**



RFLP mit  
WT-spezifischer RNA

ACTCCATCGAGATTTCACTGTAG



RFLP mit  
mutanten-spezifischer RNA

ACTCCATCGAGATTTCTGTAG

