Herstellung einer VEGF depletierten RPE Zelllinie zur Etablierung eines VEGF Biosensorsystems für die nicht-invasive Messung im Auge



Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Simon Ney

aus Waldshut-Tiengen

Gießen 2020

Herstellung einer VEGF depletierten RPE Zelllinie zur Etablierung eines

VEGF Biosensorsystems für die nicht-invasive Messung im Auge

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Ney, Simon

aus Waldshut-Tiengen

Gießen 2020

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde unter der Leitung von Prof. Dr. med. Birgit Lorenz des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. med. vet. Knut Stieger Gutachter: PD Dr. biol. hom. Sebastian Peter Galuska

Tag der Disputation: 01.09.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Eir	leitu	ing	1 -
	1.1	Ret	tina und retinales Pigmentepithel	1 -
	1.1	.1	Anatomie der Retina	1 -
	1.1	.2	Retinales Pigmentepithel und ARPE-19	1 -
	1.2	Erk	rankungen der Retina	2 -
	1.2	.1	Altersassoziierte Makuladegeneration	2 -
	1.2	.2	Diabetische Retinopathie	3 -
	1.3	Vas	scular Endothelial Growth Factor und dessen Rezeptoren	4 -
	1.4	Akt	uelle Therapie von neovaskulären Erkrankungen	5 -
	1.5	VE	GF-Biosensor	6 -
	1.5	.1	Anti-VEGF als Bindedomäne	6 -
	1.5	.2	Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer	7 -
	1.6	Her	rstellung von Knockout oder Knockin Zelllinien	8 -
1.7 Gen-Knockout mit CRISP		Ger	n- <i>Knockout</i> mit CRISPR-Cas9	9 -
	1.7	.1	Funktion CRISPR-Cas9	9 -
	1.7	.2	DNA-Reparatur durch NHEJ	10 -
	1.8	Ziel	lsetzung	12 -
2	Ма	teria	l und Methoden	13 -
	2.1	Mat	terial	13 -
	2.1	.1	Geräteliste	13 -
	2.1	.2	Verbrauchsmaterialien	14 -
	2.1	.3	Chemikalien und Enzyme	15 -
	2.1	.4	Medien und Puffer	17 -
	2.1	.5	Kit Systeme und Software	18 -
	2.1	.6	Oligonukleotide	19 -
	2.1	.7	Plasmide	20 -
	2.1	.8	Zelllinien und Bakterienstämme	22 -
	2.2	Met	thoden	23 -

2.2.1	Zel	lkultur	- 23 -
2.2.1	.1	Kultur eukaryotischer Zellen	- 23 -
2.2.1	.2	Einfrieren eukaryotischer Zellen	- 23 -
2.2.1	.3	Zellen zählen	- 24 -
2.2.2	Hei	rstellung elektrokompetenter XL1 E. coli Zellen	- 24 -
2.2.3	Ext	raktion von Plasmiden und DNA	- 24 -
2.2.3	.1	Plasmidisolation im Mini-Maßstab	- 24 -
2.2.3	.2	Plasmidisolation im Maxi-Maßstab	- 25 -
2.2.3	.3	Extraktion genomischer DNA	- 26 -
2.2.3	.4	DNA-/Plasmidkonzentration messen	- 26 -
2.2.4	Enz	zymatischer Restriktionsverdau	- 27 -
2.2.5	Aga	arosegelelektrophorese	- 28 -
2.2.6	Klo	nierung	- 28 -
2.2.6	.1	Hybridisierung	- 28 -
2.2.6	.2	Ligation	- 28 -
2.2.6	.3	Nachverdau	- 29 -
2.2.6	.4	Elektroporation	- 29 -
2.2.6	.5	Sequenzierung von Plasmid DNA	- 30 -
2.2.6	.6	Glycerolstock	- 30 -
2.2.7	Tra	Insfektion	- 30 -
2.2.8	BR	ET-Assay mit NHEJ Biosensor	- 32 -
2.2.9	Sel	ektion mit Puromycin	- 32 -
2.2.9	.1	Bestimmung der Puromycingrenzkonzentration	- 32 -
2.2.9	.2	Selektion der ARPE-19 VEGF-KO	- 33 -
2.2.10 Sej		paration	- 33 -
2.2.11	Ge	nerierung der ARPE19-VEGF-KO-Zelllinien	- 33 -
2.2.1	1.1	Kultur der ARPE-19-VEGF-KO nach Transfektion	- 33 -
2.2.1	1.2	Kultur der ARPE-19-VEGF-KO nach Separation	- 34 -
2.2.12	VE	GF ELISA	- 36 -

	2.2.1	3 Zell Proliferations Assay	- 36 -
	2.2.1	4 Statistische Auswertung	- 37 -
3	Erge	onisse	- 38 -
3	5.1 E	Erstellung und Kontrolle der guideRNA Sequenzen	- 38 -
	3.1.1	Design der guideRNA Sequenzen	- 38 -
	3.1.2	Klonierung der Plasmide	- 39 -
	3.1.3	Restriktionskontrollverdau des Plasmids	- 40 -
	3.1.4	Verifizierung der Klonierungen mittels Sanger Sequenzierung	- 41 -
3	.2 A	Aktivitätstestung der Plasmide in HEK 293-T durch NHEJ Biosensor	- 41 -
3	.3 H	lerstellung der VEGF-KO Zelllinie durch transiente Transfektion	- 43 -
	3.3.1	Optimierung der Transfektionsbedingungen für ARPE19	- 43 -
	3.3.2	Puromycin Selektionskonzentration	- 44 -
	3.3.3	Transfektion und Aufzucht der VEGF-KO Zelllinie	- 45 -
3	.4 E	rfolgskontrolle des VEGF-KO	- 47 -
	3.4.1	VEGF-Sandwich-ELISA	- 47 -
	3.4.2	Proliferationsassay	- 49 -
4	Disku	ussion	- 51 -
5	Zusa	nmenfassung	- 60 -
6	Summary6		
7	7 Abkürzungsverzeichnis		- 62 -
8	Abbildungsverzeichnis 6		
9	Tabellenverzeichnis 68		
10	0 Literaturverzeichnis 66		
11	11 Erklärung zur Dissertation 73		
12	12 Danksagung 74 -		

1 Einleitung

1.1 Retina und retinales Pigmentepithel

1.1.1 Anatomie der Retina

Die Netzhaut des menschlichen Auges besteht aus mehreren verschiedenen Schichten. Zum einen aus Sinnes- und Nervenzellen, wie den Photorezeptoren und den weiterleitenden Nervenzellen, die zur Wahrnehmung und Verarbeitung des visuellen Sinneseindrucks nötig sind, zum anderen aus dem retinalen Pigmentepithel, das unter anderem zur Absorption von Streulicht zuständig ist und über Phagozytose die abgestoßenen Außensegmente der Photorezeptoren aufnimmt (Sachsenweger und Klauß 2003). Die Photorezeptoren liegen dem Pigmentepithel an, ohne dass eine zelluläre Verbindung besteht. Die Retina wird hinter dem Pigmentepithel durch die Bruchmembran von der Choroidea und den dortigen Gefäßen abgetrennt (Sachsenweger und Klauß 2003). Die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Netzhaut wird zum einen über den choroidialen Plexus, der das Pigmentepithel und die Photorezeptoren versorgt, und zum anderen über die Zentralarterie, welche die inneren Schichten erreicht, gewährleistet (Aumüller und Wurzinger 2010). Die äußere und innere Blut-Retina-Schranke sind nur von sehr kleinen Molekülen passierbar, wodurch im Auge ein vom restlichen Körper abgetrenntes Kompartiment entsteht. Da alle größeren Stoffe aktiv durch diese Schranke transportiert werden müssen, unterscheiden sich deren Konzentrationen im Auge von denen im restlichen Körper und sind somit auch schlecht zu messen (Strauss 2011).

1.1.2 Retinales Pigmentepithel und ARPE-19

Das retinale Pigmentepithel (RPE) ist ein einschichtiges Epithel. Auf der basalen Seite liegt es der Bruch'schen Membran, einer spezialisierten Basalmembran, und dem choroidealen Kapillarplexus an, an der apikalen Seite steht es in Kontakt mit den Außensegmenten der Photorezeptoren (siehe 1.1.1). Durch *tight-junctions* zwischen den Zellen gehört das RPE mit zur Blut-Retina-Schranke, die das Auge zu einem immunologisch abgetrennten Bereich im Körper macht (Strauss 2011; Wenkel und Streilein 2000). Das RPE ist sowohl in der Entwicklung als auch in der Funktion eng an die Photorezeptoren gekoppelt (Strauss 2005). Über lange Membranfortsätze umschließt es die Außensegmente der Photorezeptoren, ohne direkte Zellkontakte zu bilden. Dadurch ist es in großem Umfang zum großen Austausch mit den Photorezeptoren in der Lage, die keine eigene Gefäßversorgung haben. Die Aufgabe

des RPE ist somit eine optimale Umgebung für die Photorezeptoren zu schaffen, in dem es neue Nährstoffe aus dem Blut aufnimmt und verbrauchte Stoffe entsorgt (Strauss 2016). Bei der Zufuhr ist neben der Versorgung mit Sauerstoff, Zucker und Elektrolyten vor allem der visuelle Zyklus von Retinal wichtig. Dieses wird bei der Sehkaskade von 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal umgewandelt, von den Photorezeptoren abgegeben und im RPE über einen Enzymkomplex wieder zurückgesetzt. Die Sauerstoffzufuhr und Weitergabe erfolgt über Diffusion, wobei das Sauerstoffangebot unter anderem über HIF und VEGF geregelt wird (siehe 1.3). Aufgenommen wird dagegen hauptsächlich Laktat, das durch den hohen Energieumsatz der Photorezeptoren anfällt, und Wasser, welches aus der vorderen Augenkammer kommt und durch den nach außen gerichteten Sog zur besseren Stabilität von RPE und Photorezeptoren beiträgt (Strauss 2011). Das RPE hat phagozytotische Eigenschaften, wodurch es zusätzlich auch abgestoßene Membranscheiben der Außensegmente aufnehmen kann, die durch den oxidativen Stress des Lichts geschädigt wurden (Finnemann et al. 1997; Strauss 2011). In Phagosomen werden diese Membranscheiben dann verdaut. Der oxidative Stress des Lichts wird zusätzlich reduziert, in dem die Pigmentierung des RPE mit melaninhaltigen Granula Streulicht absorbiert (Strauss 2005).

Die ARPE-19 Zelllinie ist eine natürliche menschliche Zelllinie des RPE, welche von einem 19-jährigen Spender entnommen und kultiviert wurde (Dunn et al. 1996). Nach ausführlicher Analyse konnte gezeigt werden, dass die ARPE-19 Zellen auch unter Kulturbedingungen eine einschichtige Zellschicht bilden und sich nach apikal und basal ausrichten. Auf Proteinebene wurden die für die Erneuerung des Retinals wichtigen Proteine CRALBP und RPE65 nachgewiesen (Dunn et al. 1996). Für die Forschung ist diese Zelllinie vor allem interessant, da sie sehr langlebig, widerständig gegenüber den Umgebungsbedingungen und transfizierbar ist. Außerdem konnten die Zellen bereits erfolgreich in einer semipermeablen Membran immobilisiert, implantiert und weiter kultiviert werden (Kauper et al. 2012, Patent: DE60011761).

1.2 Erkrankungen der Retina

1.2.1 Altersassoziierte Makuladegeneration

Die Altersassoziierte Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Ursache von starken Sehverschlechterungen und Erblindungen im höheren Alter (Lang 2004; Sachsenweger und Klauß 2003; Jager et al. 2008). Es werden zwei Formen der AMD unterschieden. Die häufigere Form ist die nicht-exsudative oder trockene AMD, bei der lipidhaltige Drusen zwischen Pigmentepithel und Bruchmembran durch Ablagerungen entstehen. Durch diese Drusen hebt sich das Pigmentepithel von der Bruchmembran ab und die über Diffusion vermittelte Versorgung des Pigmentepithels wird gestört. Daraus folgt eine Dysfunktion des Pigmentepithels und der anliegenden Photorezeptoren, was sich in einer langsam progredienten Sehverschlechterung bemerkbar macht (Bertram 2015; Sachsenweger und Klauß 2003). Durch die Versorgungsstörung von Sauerstoff kann es über den Hypoxie-induzierten Faktor zu einer vermehrten Expression von VEGF kommen (Ferrara et al. 2003). Dies hat zur Folge, dass sich choroidiale Gefäße neu bilden und es zu einem erhöhten Flüssigkeitsaustritt aus den Gefäßen kommt. Dadurch entsteht die zweite Form, die exsudative oder feuchte AMD (Lang 2004). Sie verläuft schwerer und schneller progredient (Jager et al. 2008). Durch die Neovaskularisationen, die auch die Bruchmembran und das Pigmentepithel durchbrechen können, und durch die vermehrte Exsudation hebt sich das Pigmentepithel weiter ab und es kommt zusätzlich zu einer Trennung zwischen dem Pigmentepithel und den Photorezeptoren, was zu einem Funktionsverlust führt (Jager et al. 2008; Sachsenweger und Klauß 2003).

1.2.2 Diabetische Retinopathie

Die Diabetische Retinopathie (DR) ist die häufigste mikrovaskuläre Folge bei Diabetes Mellitus und nach der AMD die zweithäufigste Erblindungsursache im höheren Alter (Sachsenweger und Klauß 2003; Lang 2004). Es wird die proliferative DR von der nichtproliferativen DR unterschieden (Heng et al. 2013). Durch den langfristig erhöhten Zuckerspiegel kommt es zu einer Verdickung der Basalmembran und Schädigung des retinalen Gefäßendothels, welches aus der Zentralarterie entspringt. Ein Frühzeichen dieser Schädigungen sind Mikroaneurysmen, durch die die Blut-Retina-Schranke gestört wird und vermehrt Serum austritt. Es kommt zu lipidhaltigen Ablagerungen in der Netzhaut und zu einem Makulaödem mit Visusminderung. Durch Verschlüsse einzelner Kapillaren kann es zu kleinen Blutungen in der Netzhaut kommen (Sachsenweger und Klauß 2003). Nach einiger Zeit kann es durch anhaltend hypoxische Zustände zur Steigerung der Symptomatik in die proliferative DR kommen. Über die vermehrte Expression von VEGF kommt es zu retinalen Neovaskularisationen mit weiter verstärkten Exsudationen (Heng et al. 2013). Da sich die Wachstumsfaktoren per Diffusion im ganzen Auge ausbreiten können, kann es auch zu Neovaskularisationen im Bereich der Iris mit der Gefahr eines sekundären Winkelblockglaukoms kommen. Sehverschlechterungen bis hin zur Erblindung sind über ein fortschreitendes Makulaödem, Netzhautablösungen und spontane Glaskörpereinblutungen möglich (Sachsenweger und Klauß 2003; Lang 2004).

1.3 Vascular Endothelial Growth Factor und dessen Rezeptoren

Der zentrale Wachstumsfaktor für Blut- und Lymphgefäße ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Zu der Familie von Signalmolekülen zählen mehrere Isoformen VEGF-A bis VEGF-D, sowie der Placental Growth Factor (PIGF), welche in unterschiedlichen Stadien der Blut- und Lymphgefäßbildung beteiligt sind (Ferrara et al. 2003). Außerdem gibt mit VEGF-E eine virale Isoform, sowie VEGF-F, welches Bestandteil eines Schlangengifts ist (Yamazaki et al. 2009). Für die Neubildung von Blutgefäßen und zur Steigerung der Permeabilität der bestehenden Gefäße ist VEGF-A der wichtigste Faktor (Woolard et al. 2004; Wimmer et al. 2015). Dieser liegt im Normalfall als Homodimer vor, wodurch er jeweils an zwei Rezeptoren binden kann, welche anschließend dimerisieren (DiSalvo et al. 1995). VEGF-A besteht aus acht Exonen und sieben Intronen und wird zudem alternativ gespliced, wodurch verschieden lange Proteine entstehen, die leicht unterschiedliche Funktionen haben (Arcondéguy et al. 2013). Der Hauptvertreter von VEGF-A ist die Variante mit 165 Aminosäuren, was durch ein Heraussplicen von Exon6 erreicht wird. Einen großen Unterschied unabhängig von der Länge macht Exon8, das über eine proximale Splicestelle zu der beschriebenen pro-angionetischen Form führt, über die distale Splicestelle jedoch anti-angionetisch wirkt (Woolard et al. 2004; Pritchard-Jones et al. 2007). Durch den Transkriptionsfaktor Hypoxia Inducible Factor (HIF), welcher im Falle einer Sauerstoffunterversorgung vermehrt vorhanden ist, wird die Expression von pro-angionetischem VEGF-A gesteigert (Shweiki et al. 1992; Wu et al. 2018). VEGF-A bindet an die Tyrosinkinase tragenden VEGF-Rezeptoren 1 und 2, was durch Neuropilin-Co-Rezeptoren unterstützt wird. Nach Dimerisierung und Phosphorylierung der Rezeptoren wird über intrazelluläre Signalwege des VEGF-Rezeptors-2 die Angiogenese über Zellteilung und Migration der Zellen gesteigert. Bei vorhandenen Zellen kommt es über die Ausschüttung von Kohlenstoffmonoxid zu einer Vasodilatation und eine stärkere Fenestrierung führt zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäße. Über eine Bindestelle für Heparinsulfat kann die Bindung an die Rezeptoren zusätzlich verstärkt werden (Ferrara et al. 2003; Simons et al. 2016). Durch diese Vielzahl an Auswirkungen wird die Sauerstoffversorgung im entsprechenden Gewebe gesteigert. Neben den physiologischen Eigenschaften spielt VEGF-A auch eine Rolle bei verschiedenen Krankheiten, dies sind neben den oben beschriebenen Augenerkrankungen vor allem Tumore. Diese haben durch ihr ungebremstes Wachstum einen hohen Sauerstoffverbrauch und sind darauf angewiesen neue Gefäße zur Versorgung aufzubauen. Anderenfalls kommt es wie beim Glioblastom zu ausgedehnten Nekrosen (Shweiki et al. 1992; Woolard et al. 2004). Im Folgenden ist immer, wenn von VEGF die Rede ist, VEGF-A gemeint.

1.4 Aktuelle Therapie von neovaskulären Erkrankungen

Zur Behandlung von VEGF-induzierten Krankheiten stehen aktuell mehrere VEGFbindende Medikamente zur Verfügung. Ziel dieser Medikamente ist es über eine hochaffine Bindung von VEGF keinen Kontakt zu den VEGF-Rezeptoren zuzulassen und die neovaskulären Auswirkungen zu unterbinden. Der monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin®) ist eigentlich zur Tumortherapie entwickelt worden und wird in der Augenheilkunde nur als Off-Label-Use verwendet. Dessen Antikörperfragment Ranibizumab (Lucentis®) hat das gleiche Wirkungsprofil, ist für die anti-angiogene Therapie im Auge zugelassen, kostet aber deutlich mehr. Daneben steht mit Aflibercept (Eylea®) ein Fusionsprotein, das aus einem Fc-Fragment eines IgG-Antikörpers und zwei Bindedomänen von VEGF-Rezeptoren besteht, zur Behandlung zur Verfügung (Cai und Bressler 2017; Pauleikhoff 2014).

Bei der altersassoziierten Makuladegeneration gibt es bisher keine ursächliche Therapie. Die bestehenden Konzepte richten sich gegen die Symptome und versuchen ein Fortschreiten der Krankheit zu verhindern. Dazu zählen zum einen Rauchverbot, da das Rauchen eines der größten Risikofaktoren darstellt, sowie die nahrungsergänzende Einnahme von Antioxidantien wie Zink- und Kupferoxid (Jager et al. 2008). Bei Sichtproblemen werden vergrößernde oder elektronische Sehhilfen empfohlen. Regelmäßige augenärztliche Kontrollen helfen den möglichen Übergang der Erkrankung in die exsudative Form möglichst früh zu erkennen (Bertram 2015). Bei auftretenden Neovaskularisationen besteht mit der intravitrealen operativen Medikamentengabe (IVOM) mit VEGF-Antikörpern eine weitere Option der Therapie. Hier kann durch die regelmäßige subretinale Injektion von VEGF-Antikörpern der VEGF-Spiegel gesenkt werden und das Fortschreiten der Neovaskularisationen sowie der subretinale Flüssigkeitsaustritt vermindert werden. Dadurch kann es auch wieder zu Verbesserungen der Sehleistung kommen (Jager et al. 2008). Für die Injektionen bestehen verschiedene Schemata, wie zum Beispiel eine monatliche Injektion, oder eine zweimonatliche Injektion nach dreimaliger Initiativgabe.

Auch bei der Diabetischen Retinopathie (DR) ist das Augenmerk der Behandlung auf die Vermeidung und Verringerung des Erkrankungsfortschritts gelegt. In erster Linie ist hier die Einstellung des Diabetes und Senken des Zuckers in physiologische Bereiche wichtig. Regelmäßige Kontrollen beim Augenarzt sind wichtig, um Gefäßveränderungen im Auge frühzeitig zu erkennen. Ohne Makulaödem ist bei fortgeschrittener nichtproliferativer, sowie bei der proliferativen Form der DR eine panretinale Laserkoagulation sinnvoll. Bei einem klinisch erkennbaren Makulaödem unterscheidet man zwischen einer Behandlung mit lokaler Laserkoagulation, wenn die Fovea nicht betroffen ist, und einer Behandlung durch IVOM mit VEGF-Antikörpern und gegebenenfalls Steroiden, wenn auch diese beteiligt ist (Heng et al. 2013; Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ) et al. 2015).

Problematisch bei den Injektionstherapien ist, dass die Auswirkungen nicht direkt gemessen werden können und dass bisher keine Langzeitdaten zur kontinuierlichen Injektionstherapie über mehr als zwei Jahre vorliegen. Die Kontrolle der Auswirkung ist bisher nur durch die Veränderung des Visus oder durch die Messung der Flüssigkeitsansammlung im subretinalen Bereich durch eine optische Kohärenztomografie möglich. Diese folgen zwar den veränderten VEGF-Werten, allerdings mit einiger Verzögerung, wodurch ein erneuter Anstieg von VEGF nicht rechtzeitig bemerkt werden kann (Muether et al. 2012).

1.5 VEGF-Biosensor

Um die Diagnostik und dadurch auch die Therapie zu verbessern, wurde ein VEGF-Biosensor entwickelt. Ziel ist es, durch diesen Sensor eine nicht-invasive, lokale Messung der VEGF-Konzentration am Ort des Krankheitsgeschehens, also retinal und subretinal, zu ermöglichen (Wimmer et al. 2017).

1.5.1 Anti-VEGF als Bindedomäne

Damit der Biosensor VEGF erkennen kann, braucht er zunächst eine Domäne, die an VEGF binden kann. Solche spezifischen Bindedomänen existieren bereits zum Beispiel an den Rezeptorbindestellen der VEGF-Rezeptoren (siehe 1.3) oder an den Bindestellen der Anti-VEGF-Moleküle (Ahmad et al. 2012). Im vorliegenden Biosensor wurde die Bindedomäne aus dem monoklonalen Antikörper Ranibizumab (Lucentis®) entnommen (Wimmer et al. 2017). Um zu vermeiden, dass die leichte Kette und der antigenbindende Teil der schweren Kette sich erst finden müssen, um über eine Disulfidbrücke verbunden zu werden, wurden die beiden Ketten über einen Peptidlinker zu einem Molekül verbunden. Der so generierte Antikörper wird dann an einem Stück als Einzelkette (scFab = single chain antigen-binding fragment) exprimiert. Somit wird auch gewährleistet, dass alle Moleküle in gleicher Menge vorhanden sind, da sich bei unterschiedlicher Expression der beiden Ketten, je nach Verhältnis auch zwei leichte Ketten miteinander verbinden können (Wimmer 2018).

1.5.2 Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer

Der Biosensor nutzt die Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer (BRET)-Technologie, um die Menge des VEGF zu quantifizieren (De et al. 2007). Dafür besteht er aus dem vorher beschriebenen scFab aus Ranibizumab (Lucentis®), an das an das eine Ende eine Luciferase (Luc8) und an das andere Ende ein grün fluoreszierendes Protein (GFP2) angehängt wurde (Wimmer et al. 2017). Die Luciferase ist ein Enzym, welches mit einem passenden Substrat (Coelenterazine400a/CLZ400a) Licht emittieren kann. Das GFP kann ebenfalls Licht emittieren, muss dazu aber von extern angeregt werden. Die beiden Fluorophore sind so ausgewählt, dass das emittierte Licht der Luciferase passend zu der Anregungsenergie des GFP ist (siehe Abbildung 1; Pfleger et al. 2006).



Abbildung 1: BRET-Spektrum

Spektrum der Emission von RLuc8 nach Substratumsatz (CLZ400a), sowie der Anregung und Emission von GFP2 (Pfleger et al. 2006).

Im Grundzustand des Biosensors ist die sterische Konformation zwischen der Luciferase und dem GFP allerdings so, dass es nur zu einer geringen Anregung durch den BRET kommt (Wimmer 2018). In Anwesenheit von VEGF, welches als Homodimer zwei Bindestellen besitzt, kommt es durch die jeweilige Bindung der leichten und der schweren Kette an VEGF zu einer Annäherung und Konformationsänderung dieser beiden Ketten. Entsprechend ist auch die Konformation der beiden Fluorophore verändert und der Energieübertrag ist größer, was sich in einer stärkeren Emission von grünem Licht durch das GFP bemerkbar macht (Kocan et al. 2008; Wimmer 2018). Misst man nun mit geeigneten Filtern die Emission von blauem und grünen Licht, lässt sich die Menge von VEGF zurück rechnen. Dafür wird die BRET-Ratio aus dem Quotienten von grüner durch blauer Lichtemission gebildet. Wegen dieser Normalisierung durch die Leuchtkraft der Luciferase ist die BRET-Ratio nur von der VEGF-Konzentration abhängig und nicht von der Menge des Biosensors (Borroto-Escuela et al. 2013).

1.6 Herstellung von Knockout oder Knockin Zelllinien

Zur Veränderung der DNA stehen unter anderem zwei entgegengesetzte Mechanismen zur Verfügung. Es besteht zum einen die Möglichkeit ein Gen dauerhaft auszuschalten, sodass es nicht mehr exprimiert werden kann, dies wird als Gen-*Knockout* bezeichnet. Andererseits, kann aber auch eine zusätzliche DNA-Sequenz in eine Zelle gebracht werden, welche für zusätzliche oder korrigierte Proteine codiert, dies wird als Gen-*Knockin* bezeichnet (Rago et al. 2007; Yamamoto 2015).

Zum *Knockout* von Genen werden meist über die Transfektion von spezifischen Endonukleasen (CRISPR-Cas9, TALEN, Zink-Finger) ein oder zwei Doppelstrangbrüche in der DNA der Zelle erzeugt. Anschließend besteht die Möglichkeit diesen Bruch oder die Brüche über den fehleranfälligen NHEJ-Reparaturweg wieder zu schließen und so den codierenden Bereich zu verändern (Kumita et al. 2019; Maeder und Gersbach 2016). Es kann aber auch das ganze Stück durch ein zusätzlich eingebrachtes Template ersetzt werden, auch hier kann dann das ursprüngliche Genprodukt nicht mehr hergestellt werden (Rago et al. 2007). Wird ein zusätzliches Template in das bestehende Genom eingebracht, wird von einer permanenten oder stabilen Transfektion gesprochen, anderenfalls wird bei einer transienten Transfektion das eingebrachte Material in Form von Plasmiden oder Proteinen nach einiger Zeit von der Zelle wieder abgebaut (Stepanenko und Heng 2017).

Beim *Knockin* von Genen stehen die gleichen Mechanismen wie beim *Knockout* zur Verfügung (Maeder und Gersbach 2016). Der Ort des Strangbruchs sollte aber so gewählt werden, dass keine bestehenden Gene getroffen werden (Rago et al. 2007; Yamamoto 2015). Durch die Integration von zusätzlicher DNA-Sequenz ist diese Transfektion immer permanent.

Da es bei einzelnen Zellen schwierig ist den Erfolg des *Knockouts* oder *Knockins* zu erkennen, wird diesen bei *in vitro* Versuchen auf den eingebrachten Templates oft eine Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum mitgegeben. Durch eine anschließende Kultivierung der Zellen mit diesem Antibiotikum können die gesuchten Zellen über ihren

Überlebensvorteil selektiert werden (Rago et al. 2007; Doyle et al. 2012; Stepanenko und Heng 2017). Je nach Art der Transfektion ist dann auch die Resistenz entweder dauerhaft oder nur transient vorhanden.

1.7 Gen-Knockout mit CRISPR-Cas9

1.7.1 Funktion CRISPR-Cas9

CRISPR steht für Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und ist damit zunächst nur eine Beschreibung für einen DNA-Abschnitt (Savić und Schwank 2016). Für den Gen-Knockout und andere gentherapeutische Verfahren hat sich der Name zwar etabliert, hier ist aber vor allem die Endonuklease Cas9 (CRISPRassociated) von Bedeutung (Crudele und Chamberlain 2018). Diese bakterielle Endonuklease ist in der Lage eine RNA zu binden, die aus einem der Repeats mit dem zugehörigen Spacer besteht. Zusammen werden sie als crRNA (CRISPR-RNA) bezeichnet. Dabei wird der gleichbleibende Repeat über eine weitere RNA, der tracrRNA (trans-activating crRNA), an das Enzym (Cas9) gebunden. Der Spacer-Abschnitt dient dazu die Endonuklease an der DNA entlang zu leiten und zu einem spezifischen Ort zu führen (guideRNA) (Lone et al. 2018; Savić und Schwank 2016; Yanik et al. 2017). Bakterien nutzen diesen Mechanismus, um fremde DNA-Sequenzen zu erkennen, die zum Beispiel bei viralen Infektionen durch Bakteriophagen in die Zelle gebracht und gespeichert wurden. Bei einer erneuten Infektion kann das Bakterium dann spezifisch gegen das virale Genom aktiv werden. Die Endonuklease Cas9 setzt an den Stellen mit der in den Spacern gespeicherten Sequenz Schnitte in die virale DNA und die viralen Proteine können nicht mehr hergestellt werden. So kann das Bakterium die erneute Infektion abwehren (Lone et al. 2018). Mithilfe der vorgeschalteten PAM-Sequenz (Protospacer Adjacent Motif), welche im bakteriellen Genom nicht vorkommt, sorgt das Bakterium dafür, dass Cas9 ausschließlich in fremde und keine eigene DNA schneidet (Lone et al. 2018).

Um nun einen Doppelstrangbruch für einen Gen-*Knockout* künstlich herbeizuführen braucht man zum einen die Endonuklease Cas9, zum anderen die passende tracrRNA und Repeat-Sequenz mit entsprechender guideRNA. Die RNA-Abschnitte wurden zur einfacheren Nutzung fusioniert (single guideRNA = sgRNA) und so muss nur eine passende guideRNA gefunden und eingesetzt werden (Lone et al. 2018; Savić und Schwank 2016). Diese guideRNA muss so ausgewählt werden, dass sie an eine

vorgeschaltete PAM-Sequenz angrenzt, damit ein Schnitt im Genom erfolgen kann. Die Sequenz sollte dazu möglichst einzigartig sein, um nicht an anderen Stellen im Genom zusätzliche Schnitte zu verursachen, welche dann zu ungewollten Auswirkungen bis hin zum Zelltod führen können (Yanik et al. 2017). Falls es mehrere Splicevarianten des auszuschaltenden Proteins gibt, sollte der Schnitt außerdem so erfolgen, dass eine Sequenz, die in allen Varianten vorkommt, adressiert wird. Bei der Suche nach passenden guideRNAs helfen Onlinetools, wie zum Beispiel CRISPR gRNA Design tool (www.atum.bio), Cas-Designer (http://www.rgenome.net) oder CRISPR sgRNA Design Tool (www.genscript.com), die in Genomdatenbanken oder nach Eingabe einer Zielsequenz nach passenden Sequenzen im Genom der gewünschten Spezies suchen. Gleichzeitig wird im restlichen Genom geschaut, ob die Sequenz mehrfach vorkommt und auch nach Sequenzen geschaut, die sich um eine oder wenige Basen unterscheidet.

1.7.2 DNA-Reparatur durch NHEJ

Der DNA-Reparaturweg des Non-Homologous End Joining (NHEJ) ist einer von drei zelleigenen Reparaturwegen in menschlichen Zellen (Yanik et al. 2017). Im Gegensatz zum HDR (Homology directed repair) oder MMEJ (Microhomology-mediated end joining) wird zur Reparatur eines Doppelstrangbruchs kein Template oder größere Regionen übereinstimmender Basen benötigt (Chang et al. 2017). Im Falle eines Doppelstrangbruchs der DNA muss dieser als erstes erkannt werden. Über eine Kaskade mit mehreren Proteinen und Enzymen werden die getrennten DNA-Doppelstränge stabilisiert (Yanik et al. 2017). Anschließend werden über die Nuklease Artemis einige Basen abgetrennt, sowie über die DNA-Polymerasen λ und μ Basen wieder angehängt, bis eine Überlagerung der beiden Strängen mit einer bis vier Basen Übereinstimmung möglich ist (Chang et al. 2017). Über die Polymerasen werden dann die für einen vollständigen Strang fehlenden Basen aufgefüllt. Zum Abschluss wird mithilfe der Ligase 4 in einem Proteinkomplex das Rückgrat der beiden DNA-Stränge wieder verschlossen (Lieber 2008; Yanik et al. 2017). Durch die ungezielte Entfernung (durch Nukleasen) und Addition (durch Polymerasen) von Basen ist die Reparatur des Strangbruchs sehr fehleranfällig. Es kommt zu zufälligen Deletionen und Insertionen. Diese Fehler im DNA-Code werden von der Zelle allerdings toleriert, da dieser Weg einfach und schnell verfügbar ist. Im Falle der somatischen Rekombination der Antikörper ist die zufällige Veränderung sogar gewünscht (Lieber 2008).



Abbildung 2: Gen-Knockout mit CRISPR/Cas9 und NHEJ

A) DNA-Abschnitt codierend für 6 beliebige Aminosäuren (AS)

- B) DNA-Doppelstrangbruch durch CRISPR-Cas9
- C) Stabilisierung der getrennten Strangenden
- D) Bearbeitung der DNA-Enden durch Nukleasen und Polymerasen
- **E)** die fehlenden Nukleotide werden von Polymerasen μ und λ passend eingesetzt
- **F)** Nach Ligation durch die DNA-Ligase 4 ist der Strang wieder repariert. Durch den Frameshift sind jedoch ab der AS-4 auch alle folgenden Aminosäuren verändert (*)

Finden der Doppelstrangbruch und die fehlerhafte Reparatur in einem codierenden Bereich statt, wird dadurch die Sequenz meist so stark verändert, dass kein funktionierendes Protein mehr exprimiert werden kann. Dies liegt unter anderem daran, dass die DNA-Codierung in Basentriplets angelegt ist und es durch eine Verschiebung von einer oder zwei Basen zu einem gänzlich anderen Leseraster führt (Shi et al. 2015; Lone et al. 2018). Die Veränderung oder Inaktivierung von einem einzelnen Gen wird von der Zelle gegenüber einem kompletten Verlust des DNA-Abschnitts aber bevorzugt (Lieber 2008).

Dieser Fehler der Reparatur wird beim Gen-*Knockout* genutzt. Nachdem durch eine Endonuklease wie Cas9 ein Doppelstrangbruch erzeugt wurde, wird dieser fehlerhaft geschlossen. Durch präzise Auswahl des Ort des Strangbruchs durch die guideRNA, sodass die wichtigen Merkmale des Proteins, wie Rezeptorbindestellen oder enzymatisch aktive Zentren, getroffen werden, lässt sich ein Gen dann ausschalten (Shi et al. 2015; Jasin und Haber 2016).

1.8 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es, eine Zelllinie des Retinalen Pigmentepithels zu entwickeln, welche kein eigenes Wachstumshormon VEGF mehr exprimiert. Dafür sollte mithilfe der Genschere CRISPR-Cas9 in dem für VEGF codierenden Bereich im Genom geschnitten werden und durch den fehleranfälligen NHEJ-Reparaturweg die Sequenz so geändert werden, dass kein funktionelles Protein mehr exprimiert werden kann. Für die Endonuklease Cas9 mussten passende guideRNA Sequenzen identifiziert und anschließend in einen guideRNA-Cas9-Vektor kloniert werden. Die so hergestellten Plasmide sollten überprüft und die Aktivität der guideRNA-Cas9 Komplexe untersucht werden. Der Gen-*Knockout* sollte dann mit den Plasmiden, die die beste Aktivität zeigen, durchgeführt werden. Die dafür notwendige Transfektion und Selektion der transfizierten Zellen sollten anhand bestehender Protokolle optimiert werden. Schließlich sollten die generierten Zelllinien kultiviert, die Proliferation evaluiert und der Erfolg des VEGF-Gen-*Knockouts* auf Proteinebene mit einem ELISA verifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräteliste

Tabelle 1: Geräteliste

Gerät	Тур	Hersteller, Ort
Autoklav	DX-65	Systec, Linden
Dest. H ₂ O Anlage	Arium 611DI	Sartorius, Göttingen
Dunkelhaube	BioDocAnalyze BDR 5	Biometra, Göttingen
Eismaschine	Scotsman AF80	Kälte-Berlin, Berlin
Elektrophorese Power Supply	PS 305 T	Biometra, Göttingen
Fluoreszenz Mikroskop	BioZero BZ 8100 E	Keyence, Neu-Isenburg
Gefrierschrank -20 °C	GN2856-20	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus HFU 586 Top	Thermo Scientific, Darmstadt
Gelkammer	Compact M	Biometra, Göttingen
Heizblock	Thermoblock TB2	Biometra, Göttingen
Inkubator (eukaryotisch)	C150	Binder, Tuttlingen
Inkubator (prokaryotisch)	BD115	Binder, Tuttlingen
Kühlschrank 4 °C	Premium TP 1760	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank 4 °C	KT 3L 17A	Bosch, Gerlingen
Magnetrührer	RCT classic	IKA, Staufen
Mikroskop	IT 400	VWR International, Darmstadt
Multimode Platereader	Infinite M1000Pro	Tecan, Gröding (AUT)
Multipipette	Handy Step	Brand, Wertheim
Multiporator für Transformationen	Multiporator 4308	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Expert Pro	Mettler Toledo, Gießen
Photometer	Biophotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	1 / 10 / 20 / 200 / 1000 / 5000 µl	Brand, Wertheim

Gerät	Тур	Hersteller, Ort	
Pipetten	Reference 10 / 20 / 100 µl	Eppendorf, Hamburg	
Schüttler	Centromat H/MOII	Sartorius, Göttingen	
Schüttler	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg	
Spülmaschine	G 7883 CD	Miele Professional, Gütersloh	
Sterilbank	MSC-Advantage	Thermo Scientific, Darmstadt	
Stickstofftonne -196 °C	Thermolyne Locator Plus 6	Thermo Scientific, Darmstadt	
Trockenschrank	FED115	Binder, Tuttlingen	
Vortexer	444-1372	VWR International, Darmstadt	
Vortexer	444-0202	VWR International, Darmstadt	
Vortexer	uniTexer 1	Lab Logistic Group, Meckenheim	
Waage	Item PA 2102	Ohaus, Zürich (CH)	
Wasserbad	TW12	Julabo, Seelbach	
Zentrifuge	Mini Star	VWR International, Darmstadt	
Zentrifuge	4K15	Sigma, Osterode	
Zentrifuge	1-15PK	Sigma, Osterode	

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Тур	Hersteller, Ort	
Eppendorf Reagiergefäß	0,2 ml PCR	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf	
Eppendorf Reagiergefäß	1,5 / 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht	
Falcon Reagiergefäß	15 / 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen	
Filteraufsatz	"rapid"-Filtermax	TPP AG, Trasadingen (CH)	
Glaspipetten	5 / 10 / 20 ml	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	
Handschuhe	Vasco nitril white	B. Braun, Melsungen	
Kryoröhrchen (mit Barcode)	0,5 ml Safe MX500	LVL Technologies, Crailsheim	

Material	Тур	Hersteller, Ort	
Mikrotiterplatte	Costar 96 Well white	Corning GmbH, Kaiserslautern	
Multipipettenspitzen	PD Tips 1,25 / 5 ml	Brand, Wertheim	
Parafilm	PM996	Bemis Europe, Braine L'Alleud (BE)	
Pipettenspitzen	10 µl	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf	
Pipettenspitzen	10 / 5000 µl	Brand, Wertheim	
Pipettenspitzen	200 / 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht	
Pipettenspitzen steril	10 / 200 / 1000 µl	nerbe plus, Winsen/Luhe	
Transwelleinsätze	ThisCerts 6Well 0,4 μm	Greiner Bio-One, Frickenhausen	
Zellkultur Platten	Cellstar 6 / 24 / 96 Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen	
Zellkultur Platten	Cellstar 100*20 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen	
Zellkultur Platten	Petridish 100*15 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen	
Zellkultur Platten	TC Schale 60	Sarstedt, Nümbrecht	
Zellschaber	CellScraper 16 cm	Sarstedt, Nümbrecht	

2.1.3 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 3: \	Verwendete	Chemikalien
--------------	------------	-------------

Name	Hersteller, Ort
Accutase	Anprotec, Bruckberg
Agarose LE	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Coelenterazine 400a	Nanolight Inc., Pinetop (USA)
ddH ₂ O	Eigene Aufbereitung
D-Glukose	Roth, Karlsruhe
dH ₂ O	Eigene Aufbereitung
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrophosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
DMEM	Anprotec, Bruckberg

Name	Hersteller, Ort
DNA-Größenstandard	Thermo Scientific, Darmstadt
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol 100%	Roth, Karlsruhe
Ethanol 70%	Roth, Karlsruhe (verdünnt)
Fötales Kälber Serum (FKS)	Anprotec, Bruckberg
GelRed DNA-Farbstoff	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Kalium-Chlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrophosphat (KH2PO4)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Darmstadt
L-Glutamin	Anprotec, Bruckberg
Luria-Broth Base (LB)	Thermo Scientific, Darmstadt
Magnesium-Chlorid (MgCl)	Merck, Darmstadt
Natrium-Chlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
PEI-Mix	Polysciences Europe GmbH, Hirschberg
Penicillin/Streptomycin	Anprotec, Bruckberg
Puromycin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Select Agar	Thermo Scientific, Darmstadt
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Tris 1M	Roth, Karlsruhe
Trypton aus Kasein	Roth, Karlsruhe
Tween20	Roth, Karlsruhe
VEGFA ₁₆₅	Acro Biosystems, Newark (USA)

Tabelle 4: Verwendete Enzyme

Alle Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs GmbH aus Frankfurt a.M., Deutschland bezogen und nach Herstellerangabe verwendet.

Name	Schnittstelle/Funktion
AVRII	5' C ' CTAGG 3' 3' GGATC ' C 5'
BbsI-HF	5' GAAGACNN ' NNNN 3' 3' CTTCTGNNNNN ' 5'
BsiWI-HF	5' C ' GTACG 3' 3' GCATG ' C 5'
DRAIII-HF	5' CACNNN ' GTG 3' 3' GTG ' NNNCAC 5'
T4 DNA-Ligase	Katalyse der Phosphodiesterbindung aus einer Hydroxyl- und einer Phosphatgruppe

2.1.4 Medien und Puffer

- Zellkulturmedium (DMEM+++):
 - 87% DMEM mit 10% FKS, 2% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin
- Einfriermedium:
 - 90% FKS mit 10% DMSO
- Bakterienkulturmedien:
 - LB Medium: 25 g Luria-Broth Base ad 1000 ml ddH₂O
 - LB Agar: 12,5 g Luria-Broth Base, 7,5 g Select Agar, ad 500 ml ddH₂O, mit 500 µl Ampicillin
 - SOC Medium: 20 gTrypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 0,25M KCl, 5 ml 2M MgCl₂, 20 ml 1M Glucose, ad 1000 ml dH₂O, pH 7,0

- 6x DNA-Loading Dye: bezogen von New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
- 10x Cut Smart Puffer: bezogen von New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
- 10x Ligase Puffer: bezogen von New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
- 10x PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄, ad 1000 ml dH₂O, pH 7,4
- 10x TBE Puffer: 242,2 g 1M Tris, 102,7 g 0,82M Borsäure, 7,44 g 10 mM EDTA, ad 2 l dH_20
- Hepes-Puffer: 1 mM aus HEPES in dH₂0
- S1-, S2-, S3-Puffer: Resuspensationspuffer mit RNase A, Lysepuffer mit SDS, Neutralisationpuffer, bezogen von MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
- VEGF-ELISA Waschpuffer: 1x PBS mit 0,05% Tween20

2.1.5 Kit Systeme und Software

Tabelle 5: Verwendete Software

Name	Hersteller, Ort
BZ-8100 Observation Application v.1.10 (BZ Viewer)	Keyence, Neu-Isenburg
Chromas light v.2.1	Technelysium Pty Ltd, South Brisbane Australien
Citavi 6 für Windows	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
CRISPR gRNA Design tool	https://www.atum.bio/eCommerce/cas9/
i-control v.1.11	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Microsoft PowerPoint für Office 356 64bit v.16.0.	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word für Office 356 64bit v.16.0.	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SigmaPlot v.12.0	Systat Software GmbH, Erkrath

Tabelle 6: Verwendete Kit-Systeme

Name	Hersteller, Ort
Genomic DNA Mini Kit	Invitrogen/Thermo Scientific, Darmstadt
Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
VEGF DuoSet ELISA DY293B Abweichende Konzentrationen: Captureantikörper: 100 µg/ml Detektionsantikörper: 10 µg/ml VEGFA-Standard: 0,1 µg/ml	R&D Systems Inc, Minneapolis (USA)
MTT Zellproliferations Assay Kit	Cayman Chemical, Ann Arbor (USA)

2.1.6 Oligonukleotide

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide PAM-Sequenz NGG in rot

Name	Sequenz	Interne Nr.
G-Seq-Primer	GAC TAT CAT ATG CTT ACC GT	#3056
T-Seq-Primer	AGC CCG ACG TCG TCC AGA TTG	#4041
VEGFKO g1f	cacc AGC AGC CCC CGC ATC GCA TC	#4358
VEGFKO g1r	aaac GA TGC GAT GCG GGG GCT GCT	#4359
VEGFKO g2f	cacc AGC TCG GAG GTC GTG GCG CT	#4360
VEGFKO g2r	aaac AG CGC CAC GAC CTC CGA GCT	#4361
VEGFKO g3f	cacc AGG AGC CGT GGT CCG CGC GG	#4362
VEGFKO g3r	aaac CC GCG CGG ACC ACG GCT CCT	#4363
VEGFKO g4f	cacc AAA CAC AGA CTC GCG TTG CA	#4364
VEGFKO g4r	aaac TG CAA CGC GAG TCT GTG TTT	#4365
VEGFKO g5f	cacc CCA CCA GGG TCT CGA TTG GA	#4366
VEGFKO g5r	aaac TC CAA TCG AGA CCC TGG TGG	#4367
VEGFKO g6f	cacc ATG TCC ACC AGG GTC TCG AT	#4368
VEGFKO g6r	aaac AT CGA GAC CCT GGT GGA CAT	#4369
VEGFKO g7f	cacc CTG CCA TCC AAT CGA GAC CC	#4370
VEGFKO g7r	aaac GG GTC TCG ATT GGA TGG CAG	#4371

Name	Sequenz	Interne Nr.
VEGFKO t1f	ctagg AGC AGC CCC CGC ATC GCA TCA GG	#4340
VEGFKO t1r	gtac CC TGA TGC GAT GCG GGG GCT GCT c	#4341
VEGFKO t2f	ctagg AGC TCG GAG GTC GTG GCG CT <mark>G GG</mark>	#4342
VEGFKO t2r	gtac CC CAG CGC CAC GAC CTC CGA GCT c	#4343
VEGFKO t3f	ctagg AGG AGC CGT GGT CCG CGC GG <mark>G GG</mark>	#4344
VEGFKO t3r	gtac CC CCC GCG CGG ACC ACG GCT CCT c	#4345
VEGFKO t4f	ctagg AAA CAC AGA CTC GCG TTG CA <mark>A GG</mark>	#4346
VEGFKO t4r	gtac CC TTG CAA CGC GAG TCT GTG TTT c	#4347
VEGFKO t5f	ctagg CCA CCA GGG TCT CGA TTG GA <mark>T GG</mark>	#4348
VEGFKO t5r	gtac CC ATC CAA TCG AGA CCC TGG TGG c	#4349
VEGFKO t6f	ctagg ATG TCC ACC AGG GTC TCG ATT GG	#4350
VEGFKO t6r	gtac CC AAT CGA GAC CCT GGT GGA CAT c	#4351
VEGFKO t7f	ctagg CTG CCA TCC AAT CGA GAC CCT GG	#4352
VEGFKO t7r	gtac CC AGG GTC TCG ATT GGA TGG CAG c	#4353

- 2.1.7 Plasmide
 - pGFP2



Abbildung 3: Plasmidkarte pGFP2

• pRLuc8



```
<u>Abbildung 4:</u> Plasmidkarte pRLuc8
pcDNA-RLuc8 wurde von Andreas Loening entwickelt (Loening et al. 2007).
```

• pRLuc8GFP2 (NHEJ-Sensor)



Abbildung 5: Plasmidkarte pRLuc8GFP2



<u>Abbildung 6:</u> Plasmidkarte px459T0 pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid #48139; http://n2t.net/addgene:48139 ; RRID:Addgene_48139) (Ran et al. 2013)

2.1.8 Zelllinien und Bakterienstämme

Zelllinien:

- ARPE-19 (ATCC: CRL-2302) Humanes retinales Pigmentepithel
- HEK293-T (ATCC: CRL-3216) Humane embryonale Nierenzelllinie

Bakterienstämme

 XL1 Blue Ecoli recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F[´] proAB laclqZΔM15 Tn10 (Tetr)]

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

- 2.2.1.1 Kultur eukaryotischer Zellen
 - HEK293-T (siehe 2.1.8)

Die Kultur der HEK293-T Zellen in DMEM+++ (siehe 2.1.4) erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ im luftfeuchtigkeitsgesättigten Brutschrank. Bei Konfluenz wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 1 ml Accutase abgelöst und anschließend mit 9 ml DMEM+++ resuspendiert, 1 ml der Zellsuspension wurde in eine frische Zellkulturschale übertragen und wieder mit DMEM+++ auf 10 ml aufgefüllt.

• ARPE19 (siehe 2.1.8)

Die Kultur der ARPE-19 Zellen in DMEM+++ (siehe 2.1.4) erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ im luftfeuchtigkeitsgesättigten Brutschrank. Bei Konfluenz wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 10 ml 1x PBS gründlich gewaschen und anschließend mit 1 ml Accutase abgelöst. Zum besseren Lösen wurden die Zellen mit Accutase für 10 Minuten bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Die Zellen wurden dann mit 9 ml DMEM+++ resuspendiert, 1 ml der Zellsuspension wurde in eine frische Zellkulturschale übertragen und mit DMEM+++ auf 10 ml aufgefüllt.

2.2.1.2 Einfrieren eukaryotischer Zellen

Zur längerfristigen Aufbewahrung von eukaryotischen Zellkulturen wurde erst das Medium abgenommen, die Zellen mit 10 ml 1x PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Accutase gelöst. Dann wurden sie mit 9 ml DMEM+++ wieder resuspendiert und mit 280 xg, bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspendierung in 1 ml Einfriermedium (siehe 2.1.4) wurden die Zellen erst einige Tage bei -80 °C eingefroren und anschließend bei -196 °C in der Stickstofftonne gelagert.

Zum erneuten Ausplattieren der Zellen wurden diese bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurden sie in 10 ml DMEM+++ resuspendiert und in einer Zellkulturschale ausgebracht. Nach 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchte waren die Zellen adhärent und das Medium konnte mit frischem Kulturmedium ersetzt werden.

2.2.1.3 Zellen zählen

Um Zellen zu zählen wurden das Medium entfernt und die Zellen mit gleicher Menge 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit Accutase von der Zellkulturplatte abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. In eine mit Ethanol gereinigte und angedrücktem Deckglas vorbereitete Neubauer Zählkammer wurde 20 µl der Zellsuspension gegeben und vier Großquadrate ausgezählt. Dazu wurden alle Zellen berücksichtigt, die innerhalb der drei Linien sind oder zumindest zwei Linien berühren. Das Ergebnis wurde als Mittelwert durch vier geteilt und ergibt somit die Anzahl der Zellen in 0,1 mm³ = 0,1 µl. Durch Multiplikation mit 10.000 erhält man die Zellzahl pro Milliliter der Zellsuspension. Bei erwartbar hohen Zellzahlen wurde die Suspension vor dem Zählen mit Medium verdünnt.

2.2.2 Herstellung elektrokompetenter XL1 E. coli Zellen

Um XL1 E. coli Zellen (siehe 2.1.8) für eine Elektroporation vorzubereiten wurden 5 μ l eines entsprechenden Glycerolstocks in 5 ml LB-Medium mit 5 μ l Tetracyclin bei 37 °C und 180 rpm für 16 Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Diese Übernachtkultur wurde dann in 200 ml LB-Medium mit 200 μ l Tetracyclin gegeben und weiter auf dem Schüttler inkubiert, bis eine fotometrische Dichte (OD600) von 0,6 - 0,8 erreicht wurde. Um das Wachstum anschließend zu stoppen wurde die Zellsuspension für 30 Minuten auf Eis gelegt, in 50 ml Falcons umgefüllt und dann bei 5.100 xg und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das jeweilige Pellet mit 50 ml gekühltem HEPES resuspendiert und erneut für 10 Minuten zentrifugiert. Dies wurde jeweils mit Resuspendierung in 25 ml HEPES, 10 ml und 5 ml gekühltem Glycerin wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml gekühltem Glycerin resuspendiert und je 50 μ l in ein 2 ml Tube aliquotiert. Diese wurden erst in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Extraktion von Plasmiden und DNA

2.2.3.1 Plasmidisolation im Mini-Maßstab

Durch die alkalische Lyse können Bakterienzellen aufgeschlossen und die darin befindlichen Plasmide aufgereinigt werden. Dazu wurde am Vortag eine einzelne Bakterienkolonie mithilfe einer Pipettenspitze in 5 ml LB-Medium und 5 µl Ampicillin gegeben und bei 180 rpm und 37 °C für 16 Stunden kultiviert. 1,75 ml dieser Kultur wurden dann mit 5.000 xg für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die im Pellet befindlichen Zellen wurden anschließend mit je 100 µl S1-Puffer (Resuspension), S2-Puffer (Lysierung) und S3-Puffer (Neutralisation) (siehe 2.1.4) erst resuspendiert und dann durch einmaliges Invertieren gemischt, sodass die Zellen aufgeschlossen wurden und die Plasmide und Proteine im Überstand gelöst sind. Durch Zentrifugation bei 10.000 xg für 10 Minuten wurden die Zelltrümmer abgesetzt und der Überstand mit den Plasmiden in ein neues Tube pipettiert. Durch Zugabe von 700 µl Ethanol 100% wurden die Plasmide ausgefällt und durch Zentrifugation bei 17.968 xg und 4 °C für 30 Minuten als Pellet vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet mit 200 µl Ethanol 70% gewaschen und erneut bei 17.968 xg und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abkippen des Waschalkohols wurde das Pellet für 5 Minuten luftgetrocknet, in 30 µl ddH₂O zur weiteren Verwendung resuspendiert und auf 4 °C gelagert.

2.2.3.2 Plasmidisolation im Maxi-Maßstab

Verwendet wurde das Qiagen Maxi Kit nach Herstellerangaben (siehe 2.1.5). Zur Vorbereitung wurden 100 µl Ampicillin in 100 ml LB-Medium gegeben und mit 100 µl eines Glycerolstock beimpft. Anschließend wurde die Kultur bei 180 rpm und 37 °C für 16 Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 5.525 xg und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Anschließend wurde das Zellpellet nacheinander mit je 10 ml der Reagenzien P1, P2 und P3 resuspendiert, um die Zellen aufzuschließen. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis befinden sich die Plasmide in der Lösung. Die übrigen größeren Zellbestandteile wurden erst bei 11.627 xg und 4 °C für 30 Minuten und der folgende Überstand nochmals für 15 Minuten abzentrifugiert. Währenddessen wurden die Filtersäulen mit 10 ml Equilibrierungs-Puffer (QBT) vorbereitet und anschließend mit dem Überstand befüllt. Nach zweimaligem Waschen mit je 30 ml Waschpuffer (QC) befinden sich die Plasmide im Filter der Säule. Die Säulen wurden auf neue Falcone gesetzt und die Plasmide mit 15 ml Elutions-Puffer (QF) resuspendiert. Mit Hilfe von 10,5 ml Isopropanol und anschließender Zentrifugation bei 11.627 xg und 4 °C für 30 Minuten wurden die Plasmide ausgefällt. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und der Schritt mit 5 ml Ethanol 70% wiederholt, wobei nur 10 Minuten zentrifugiert wurde. Das Plasmidpellet wurde nach Abkippen des Überstands für 15 Minuten an der Luft getrocknet und je nach Menge mit bis zu 500 µl ddH₂O resuspendiert.

2.2.3.3 Extraktion genomischer DNA

Verwendet wurde das Pure Link, Genomic DNA Mini Kit von Invitrogen nach Herstellerangaben (siehe 2.1.5). Zur Vorbereitung wurden ungefähr fünf Millionen Zellen in Kultur angezüchtet. Nach Abnahme des Kulturmediums wurden die Zellen mit 10 ml 1x PBS gewaschen, mit 1 ml Accutase abgelöst und anschließend wieder in 9 ml DMEM+++ resuspendiert. Zur Separation der Zellen wurden sie bei 280 xg für 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl 1x PBS resuspendiert. Nach Zugabe von je 20 µl Proteinkinase K und RNase A wurde der Ansatz durch Vortexen gut gemischt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Genomic Lysis/Binding Buffer dazu gegeben, durch Vortexen gut gemischt und bei 55 °C für 10 Minuten im Heizblock inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol 100% wurde der Ansatz in eine zum Kit gehörige Säule gefüllt und bei 10.000 xg für eine Minute zentrifugiert, wodurch sich die DNA nun im Säulenfilter befindet. Zum Aufreinigen wurde erst 500 µl Wash Buffer1 dazugegeben und bei 10.000 xg für eine Minute zentrifugiert, dann 500 µl Wash Buffer2 und bei 17.968 xg für 3 Minuten zentrifugiert. Zum Eluieren der DNA in ein neues Tube wurden 100 µl Elution Buffer dazu gegeben, für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 17.968 xg für eine Minute zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20 °C eingefroren.

2.2.3.4 DNA-/Plasmidkonzentration messen

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde mit dem jeweiligen Lösungsmedium ein Nullwert (Blank) gesetzt und anschließend nach jeweils gutem Spülen 7 µl der Probe in die Messküvette gegeben und bei 230 nm im BioPhotometer gemessen.

- 2.2.4 Enzymatischer Restriktionsverdau
 - 1) Zur Herstellung der Plasmide durch Restriktionsklonierung, wurden die Plasmide px459T0 (Ran et al. 2013) und pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 (mit dem NHEJ Sensor) zuerst an zwei Stellen hydrolysiert und ein kleiner Teil herausgeschnitten (siehe 2.1.7 und 2.1.3). Dazu wurden je 1000 ng der Plasmide mit 2,0 µl 10x Cut Smart Buffer und je 1,5 µl Restriktionsenzym in ddH₂O gegeben, sodass 20,0 µl angesetzt wurden. Da BbsI-HF eine spezifische Bindedomäne, aber keine spezifische Restriktionsdomäne besitzt (siehe Tabelle 4), war hier nur ein Enzym notwendig. Der durch Vortexen gut gemischte Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und die Enzyme anschließend für 20 Minuten im Heizblock bei 65 °C inaktiviert.

	рх459Т0	pRLuc8GFP2
Plasmid	1,0 µg	1,0 µg
10x Cut Smart Buffer	1,5 µl	1,5 µl
BbsI-HF	1,5 µl	
BsiWI-HF		1,5 µl
Avrll		1,5 µl
ddH ₂ O	ad 20,0 µl	ad 20,0 µl

Tabelle 8: Ansatz des Restriktionsverdaus zur Vorbereitung der Ligation

2) Zur Kontrolle der klonierten Plasmide wurden diese mit DrallI-HF (siehe 2.1.3) hydrolysiert. Dafür wurden je 1000 ng der Plasmide mit je 1 μl 10x Cut Smart Buffer und 1 μl DrallI-HF in entsprechend ddH₂O gegeben, sodass insgesamt 10 μl angesetzt wurden. Als Negativkontrolle diente je ein Ansatz ohne Enzym. Die Ansätze wurden 2 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend per Agarosegelelektrophorese analysiert.

Tabelle 9: Ansatz des Restriktionsverdaus zur Kontrolle	
---	--

	px459 lg1-7
Plasmid	1 µg
10x Cut Smart Buffer	1 µl
DrallI-HF	1 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Größenbestimmung von DNA-Fragmenten. Dazu wurden 50 ml 1x TBE Puffer mit 0,5 g Agarose-LE aufgekocht, mit 4 µl GelRed DNA-Farbstoff versetzt und 30 Minuten in einer Elektrophoresekammer polymerisiert. Anschließend wurde das Gel in 1x TBE Puffer eingelegt. Die zu analysierende DNA-Probe (10 µl) wurde mit 5 µl 6x Loading Buffer vermischt, 12 µl davon wurden auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurde in die Seitentaschen je 7 µl DNA-Größenstandard gegeben. Nach einer Stunde bei 100 V Spannung in der Elektrophoresekammer sind die negativ geladenen DNA-Fragmente je nach Größe durch das Gel gewandert. Durch Belichtung mit ultraviolettem Licht können die DNA-Fragmente wegen des DNA-Farbstoffs sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.2.6 Klonierung

Die benötigten Plasmidvektoren wurden per Restriktionsklonierung hergestellt (siehe 2.2.4).

2.2.6.1 Hybridisierung

Die Guide- und Target-Inserts wurden als forward und reverse Oligonukleotide synthetisiert (siehe 2.1.6). Zur Hybridisierung wurden je 8 μ l der Oligonukleotide mit 4 μ l ddH₂O gemischt, für 10 Minuten im Heizblock bei 90 °C inkubiert und dann für 30 Minuten abgekühlt. Hybridisiert wiesen die Inserts nun die passenden "*sticky ends*" für die Restriktionsklonierung auf.

Hybridisierung	Guide	Target
Forward Oligonukleotid	8 µl (g1f-7f)	8 µl (t1f-7f)
Reverse Oligonukleotid	8 µl (g1r-7r)	8 µl (t1r-7r)
ddH ₂ O	4 µl	4 µl

Tabelle 10: Hybridisierung der Guide-Inserts, sowie der Target-Inserts

2.2.6.2 Ligation

Um die Inserts nun mit den Plasmiden zu verbinden wurden sie zusammengebracht und mithilfe der T4 DNA-Ligase (siehe 2.1.3), welche die Phosphodiesterbindung des DNA-Rückgrats katalysiert, über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Dazu wurden 2 µl
(100 ng) des zuvor linearisierten Plasmids mit 2 μ l 10x Ligase Puffer, 5 μ l des hybridisierten Inserts und 1 μ l T4 DNA-Ligase in ddH₂O gelöst, sodass 20 μ l Ansätze entstanden.

Ligation	рх459Т0	pRLuc8GFP2
Plasmid	100 ng = 2 µl	100 ng = 2 µl
Hybridisiertes Insert	5 µl (g1-7)	5 µl (t1-7)
10x Ligase Puffer	2 µl	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl	1 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl	ad 20 µl

			<u> </u>		
Iahelle	11. I iua.	tion der	(-juide-Inserts	sowie der	larget-Inserts
Tubolio	TT. LIGU		Guido moono,	000000000	Turgot moonto

2.2.6.3 Nachverdau

Es besteht die Möglichkeit, dass auch das ausgeschnittene DNA-Fragment, das beim Restriktionsverdau entstanden ist, statt des gewünschten Inserts wieder in das Plasmid ligiert wurde. Um diese fehlerhaften Plasmide zu vermeiden, wurde nach der Ligation ein erneuter Restriktionsverdau durchgeführt. Bei erfolgreicher Ligation ist die BsiWI-HF Schnittstelle verändert und das Plasmid bleibt intakt. Für den Nachverdau wurden zu den 20 µl der ligierten Ansätze erneut 1 µl BsiWI-HF gegeben, nach Vortexen erst für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und das Enzym dann für 20 Minuten im Heizblock bei 65 °C inaktiviert.

Tabelle 12: Nachverdau des ligierten pRLuc8GFP2 lt1-7

Nachverdau	pRLuc8GFP2	
Plasmid	20 µl (lt1-7)	
BsiWI-HF	1 µl	

2.2.6.4 Elektroporation

Um die hergestellten Plasmide nun zu vervielfältigen wurden die Plasmide per Elektroporation in elektrokompetente XL1 E. coli Bakterien transformiert (siehe 2.1.8). Dazu wurden 3 µl des Ligationsansatzes zu 50 µl XL1 E. coli gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis wurde der Ansatz luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette gegeben und mit 2000 V für 5 ms elektroporiert. Der Ansatz wird mit 1 ml SOC-Medium aufgenommen und in ein neues Tube übertragen. Durch den angelegten Strom wird die Bakterienwand durchlässig und kann das Plasmid aufnehmen. Zur Isolation der

Bakterien mit erfolgreicher Transformation befindet sich auf den Plasmiden eine Resistenz gegen Ampicillin. Für die Ausbildung der Resistenz wurden die Tubes bei 180 rpm und 37 °C für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension durch Zentrifugation mit 17.968 xg für 5 Minuten eingedickt und 800 µl des Überstands abgenommen. Im restlichen Medium wurden die Bakterien resuspendiert und anschließend auf einer Ampicillin haltigen LB-Agar Platte ausgestrichen. Zum Wachstum der selektierten Klone wurden die Platten bei 37 °C und gesättigter Luftfeuchte über Nacht inkubiert.

2.2.6.5 Sequenzierung von Plasmid DNA

Die Sequenzierungen von Plasmiden wurde von Microsynth Seqlab GmbH (Göttingen) durchgeführt und mit Chromas (siehe 2.1.5) ausgewertet. Zur Vorbereitung wurden 6 μ l des zu analysierenden Plasmids mit 6 μ l ddH₂O und 3 μ l eines 1:10 verdünnten, entsprechenden Sequenzierungsprimers (siehe 2.1.6) gemischt.

Sequenzierung	px459	pRLuc8GFP2
Plasmid	6 µl	6 µI
ddH ₂ O	6 µl	6 µl
Drimer 1:10 verdünnt	3 μl G-Seq-Primer	
		3 μl T-Seq-Primer

Tabelle 13: Sequenzierungsansatz je Plasmi	id
--	----

2.2.6.6 Glycerolstock

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden Glycerolstocks angefertigt. Dazu wurde 250 µl eine Bakterienkultur mit 160 µl Glycerin gemischt und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.7 Transfektion

Zur Vorbereitung der Transfektionen wurden die Zellen am Vortag gezählt (siehe 2.2.1.3) und je nach Ansatz pro Well eine definierte Anzahl Zellen in eine 6-Well-Platte gegeben, auf 2,0 ml mit DMEM+++ aufgefüllt und über Nacht bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchte im Brutschrank inkubiert. Direkt vor der Transfektion wurde das Medium erneut abgenommen und durch 1,5 ml frisches Medium ersetzt. Die Plasmid-DNA (siehe 2.1.7) wurde in 100 μ l NaCl gelöst, gevortext und 200 / 300 μ l PEI-Mix dazu gegeben. Die Ansätze wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. Um die zellschädigende Wirkung des PEI-Mix zu minimieren wurde das Medium nach 5 Stunden Inkubation im luftfeuchtigkeitsgesättigten Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ abgenommen und durch 2,0 ml frisches DMEM+++ ersetzt. Die genauen Mengen der Zellen und Transfektionsansätze sind im Folgenden aufgelistet.

- 1. Transfektion mit px459 und pRLuc8GFP2 in HEK 293-T zur Aktivitätsmessung
 - Je Konstrukt (G1-G7) einmal pRLuc8GFP2 allein und einmal mit px459
 - pRLuc8 allein zur Kontrolle (Loening et al. 2007)
- 2. Transfektion mit pGFP2 in ARPE-19 zur Optimierung
 - Je Zellanzahl sechs verschiedene Kombinationen aus PEI-Mix-Menge und Plasmid-Menge
- 3. Transfektion mit px459 in ARPE-19 zum VEGF-KO
 - Gleiche Zellzahl und PEI-Mix-Menge
 - 1) nur mit 5,0 μg G2, 2) nur mit 5,0 μg G4, 3) nur mit 5,0 μg G6,
 4) mit je 2,5 μg G2 und G4, 5) mit je 2,5 μg G4 und G6,
 6) mit je 2,5 μg G2 und G6, 7) mit je 1,7 μg G2, G4 und G6

	Ansatz 1 (Aktivität)	Ansatz 2 (Optimierung)	Ansatz 3 (VEGF-KO)
Anzahl Zellen	750.000	250.000 / 500.000	500.000
PEI-Mix	200 µl	200 µl / 300 µl	300 µl
NaCl	100 µl	100 µl	100 µl
Plasmid	2,0 µg pRLuc8GFP2 2,5 µg px459	3,0 µg / 4,0 µg / 5,0 µg pGFP2	Insgesamt 5,0 μg px459 mit G2 / G4 / G6
Kontrolle	1,0 µg pRLuc8	keine	Negativ: ohne Plasmid Positiv: mit pGFP2

Tabelle	14.	Menden	der	verschiedenen	Transf	ektionsar	nsätze
Tabelle	17.	Mongon	uci	VCISCINCUCIICI	nansi	Chuonsai	ISALZO

2.2.8 BRET-Assay mit NHEJ Biosensor

Für das BRET-Assay (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) werden die Proteine zuerst aus den Zellen extrahiert. Dazu wurde das Medium 24 Stunden nach Transfektion abgenommen und die Zellen mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgelöst, in 100 µl 1x PBS durch Aufund Abpipettieren resuspendiert und in ein 1,5 ml Tube übertragen. Durch zweimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen und Vortexen wurden die Zellen lysiert und die Proteine im PBS gelöst. Durch Zentrifugation bei 17.968 xg und 4 °C für 10 Minuten wurden die Zelltrümmer entfernt und der Überstand mit den Proteinen in ein neues Tube übertragen.

Zur Lumineszenzmessung wurden je 5 µl Zelllysat in eine weiße Lumineszenz 96-Well-Platte pipettiert. Vor der Messung werden in jedes Well automatisch 100 µl Luciferasesubstrat (Coelenterazine 400a, 10 ng/ml in 1x PBS verdünnt) injiziert. Anschließend kann im Dual-Lumineszenz Mode die Lichtemission der Luciferase (RLuc8) und des angeregten grün fluoreszierenden Proteins (GFP2) quantifiziert werden (siehe Abbildung 1). Hierzu wurde das Emissionsmaximum der Luciferase mit dem Filter "Magenta" (< 450 nm), das des GFPs mit dem Filter "Green" (500 - 550 nm) erfasst.

Zur Auswertung wurde der Quotient aus Intensität der GFP2 Emission durch Intensität der Luciferase Emission gebildet. Zur Normalisierung wurde der Quotient der Luciferase als Einzelmolekül abgezogen.

2.2.9 Selektion mit Puromycin

2.2.9.1 Bestimmung der Puromycingrenzkonzentration

Zur Optimierung der notwendigen Puromycinkonzentration zur Selektion der mit Puromycinresistenz tragenden Plasmidvektoren (siehe 2.1.7) transfizierten Zellen wurden pro 6-Well 200.000 ARPE-19 Zellen in 2 ml DMEM+++ ausgesät und über Nacht bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und mit frischem puromycinhaltigen Medium ersetzt (0,5 - 4,0 µg/ml). Drei Tage lang wurden die Zellen nach je 24 Stunden mikroskopiert und dokumentiert. Es wurde die Konzentration bestimmt, bei der die Zellen vollständig abgestorben sind. Die nächstniedrigere Puromycinkonzentration wurde als Selektionskonzentration bei den *Knockout*-Versuchen verwendet.

2.2.9.2 Selektion der ARPE-19 VEGF-KO

Zur Selektion der transient transfizierten ARPE-19 VEGF-KO wurde das bisherige Medium abgenommen und die Zellen mit 2 ml (6Well) / 10 ml (Zellkulturschale) 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde das Medium mit 2 ml / 10 ml frischem DMEM+++ mit 1 µg/ml Puromycin ersetzt. Nach 72 Stunden Inkubation bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank wurde das puromycinhaltige Medium wieder abgenommen, die Zellen zwei Mal mit 2 ml / 10 ml 1x PBS erneut gewaschen, um die abgestorbenen Zellen und das Puromycin vollständig zu entfernen, und mit entsprechend frischem DMEM+++ bedeckt.

2.2.10 Separation

Um von den größeren Zellkulturplatten einzelne Zellklone separieren zu können wurde deren Wachstum zuerst im Lichtmikroskop verfolgt und die Klone auf dem Deckel markiert. Sobald eine Klon auf circa 30 - 50 Zellen angewachsen war konnte er mithilfe einer 200 µl Pipette unter Sicht durchs Mikroskop vorsichtig am Boden abgeschabt werden und dann in die Pipette eingesogen werden. Die so gewonnenen Zellen eines einzelnen Zellklons wurden entweder in eine neue 24-Well-Platte oder in eine neue 6-Well-Platte mit Transwell-Einsatz gegeben und dort weitergezogen.

2.2.11 Generierung der ARPE19-VEGF-KO-Zelllinien

Auch die Kultur der ARPE-19-VEGF-KO erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ im luftfeuchtigkeitsgesättigten Brutschrank. Zweimal die Woche wurde das Medium gewechselt, bei Konfluenz wurden die Zellen wie zuvor beschrieben 1:10 geteilt (siehe 2.2.1). Die genaue Behandlung ließ sich in die drei folgenden Gruppen aufteilen und ist in Abbildung 7 skizziert.

2.2.11.1 Kultur der ARPE-19-VEGF-KO nach Transfektion

Im ersten Ansatz wurden die Zellen nach der Transfektion (siehe 2.2.7) nach 24 Stunden Inkubation und einem Waschschritt mit 2 ml 1x PBS mit 250 µl Accutase aus der 6-Well Platte abgelöst und in eine 100 mm Zellkulturplatte überführt. Nach drei Tagen Selektion (siehe 2.2.9.2) wurden die Zellen nach den beiden Waschschritten direkt mit 1 ml Accutase abgelöst, auf 10 ml mit DMEM+++ aufgefüllt und in 200 µl Schritten auf eine 96-Well-Platte zur Separation verteilt. Durch die Separation sollte gewährleistet werden, dass die einzelnen transfizierten Zellen als alleinige Klone aufwachsen. Nach einer Woche wurde das komplette Medium abgenommen und durch 200 µl frisches DMEM+++ ersetzt, wobei vier Wells schon einen Zusatz von 10 ng/ml VEGF₁₆₅ bekamen, um das Wachstum zu beschleunigen. Um auto- und parakrin ausgeschleuste Faktoren nicht ständig zu entfernen, wurde ab dann zweimal die Woche ein nur halber Mediumwechsel durchgeführt, wobei nun überall 10 ng/ml VEGF₁₆₅ enthalten war.

- Im zweiten Ansatz wurden die Zellen nach der Transfektion (siehe 2.2.7) nach 24 Stunden Inkubation und einem Waschschritt mit 2 ml 1x PBS mit 250 µl Accutase aus der 6-Well Platte abgelöst und in eine große Zellkulturplatte überführt. Nach Adhärenz an der neuen Platte am nächsten Tag wurde die Selektion mit Puromycin (siehe 2.2.9.2) wie zuvor durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen jedoch in der großen Zellkulturplatte belassen und hier zweimal die Woche ein halber Mediumwechsel (5 ml) mit DMEM+++ mit 10 ng/ml VEGF₁₆₅ durchgeführt.
- Im dritten Ansatz wurden die Zellen direkt nach der Transfektion (siehe 2.2.7) mit 10 ng/ml VEGF₁₆₅ haltigem DMEM+++ bedeckt, damit die transfizierten Zellen direkt die gleichen Wachstumsbedingungen haben wie die untransfizierten um sie herum. Am Folgetag wurde die Selektion mit Puromycin für drei Tage durchgeführt (siehe 2.2.9.2), wobei zusätzlich zum Puromycin auch noch 10 ng/ml VEGF₁₆₅ dazu gegeben wurden. Außerdem fand die Selektion dieses Mal in der 6-Well-Platte statt, um den zusätzlichen Stress der Umbettung in eine neue Zellkulturplatte zu vermeiden. Anschließend wurde zweimal die Woche ein halber Mediumwechsel mit 1ml DMEM+++ mit 10 ng/ml VEGF₁₆₅ durchgeführt.

2.2.11.2 Kultur der ARPE-19-VEGF-KO nach Separation

Nach der Separation einzelner Zellklone (siehe 2.2.10) wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt:

 Separierte Klone in einer 24-Well-Platte wurden wie bisher behandelt und das 10 ng/ml VEGF₁₆₅ haltige Medium zweimal pro Woche zur Hälfte getauscht. Bei Stagnation des Wachstums wurden die Zellen außerdem einmalig mit Accutase im gleichen Well verteilt. Dazu wurde das Medium komplett abgenommen, die Zellen mit 2 ml 1x PBS gewaschen, mit 500 µl Accutase abgelöst und mit 2 ml frischem VEGF haltigem DMEM+++ resuspendiert. Separierte Klone in einer 6-Well-Platte mit Transwell-Einsatz wurden ohne die Zugabe von VEGF ins Medium gehalten. Dafür wurden in den Transwelleinsatz Wildtyp ARPE-19 Zellen gegeben, sodass diese parakrin über das Medium die Versorgung der Zellen mit Gen-*Knockout* übernehmen konnten. Für den zweimal pro Woche stattfindenden halben Mediumwechsel wurden für die untere 6-Well-Kammer 1 ml, für den Transwelleinsatz 0,5 ml mit DMEM+++ ausgetauscht.



Abbildung 7: Übersichtsplan der Zellkultur

2.2.12 VEGF ELISA

Verwendet wurden die Reagenzien des Human VEGF DuoSet ELISA (siehe 2.1.5). Zur Vorbereitung wurde eine entsprechende Anzahl von 8-Well-Strips in einen Rahmen eingesetzt und mit je 100 µl des in PBS verdünnten Captureantikörpers (1 µg/ml) bei 350 rpm und 18°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde der Captureantikörper mit drei Mal je 400 µl Waschpuffer (siehe 2.1.4) ausgewaschen und die freien Bindestellen anschließend mit je 100 µl 1x Reagent Diluent bei 500 rpm und 18 °C über 2 Stunden blockiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurde je 100 µl der Proben in Dreifachbestimmung und der VEGF-Standardreihe in Zweifachbestimmung dazu gegeben. Dazu wurden am Vortag 50.000 Zellen pro 24-Well mit je 500 µl DMEM+++ ausgesät, welche zuvor fünf Mal mit 1x PBS gewaschen wurden. Die Standardreihe wurde mit 1x Reagent Diluent jeweils 1:1 verdünnt, sodass sich Konzentrationen von 2 ng/ml bis 31,25 pg/ml ergaben. Zur Kontrolle wurden je auch 100 µl 1x Reagent Diluent und DMEM+++ mit getestet. Die Proben wurden anschließend wieder bei 500 rpm und 18 °C für 2 Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden erst 100 µl des Detektionsantikörpers in 100 ng/ml verdünnt bei je 500 rpm und 18 °C für 2 Stunden und anschließend 100 µl des Streptavidin-HRP-Antikörpers 1:40 verdünnt für 20 Minuten inkubiert. Nach einem letzten Waschschritt wurden je 100 µl der aus A und B 1:1 gemischten Substratlösung dazu gegeben. Sobald im höchsten Standard ein kräftiges Blau zu sehen war, wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung beendet. Die Intensität der Färbung wurde anschließend im Platereader bei 450 nm gemessen, die Referenzwellenlänge wurde laut Herstellerangaben auf 630 nm festgelegt. Mithilfe der Standardgeraden konnte dann die VEGF-Konzentration der einzelnen Proben errechnet werden.

2.2.13 Zell Proliferations Assay

Zur Messung der Zellproliferation wurde das MTT Zell Proliferations Assay Kit von Cayman Chemical nach Herstellerangaben verwendet (siehe 2.1.5). Zur Vorbereitung wurde die Puffertablette in 100 ml ddH₂O gelöst. In 5 ml davon wurde das MTT Salz gelöst und durch Vortexen gut gemischt. Die kristalllösende Lösung wurde durch Mischen des SDS Salzes und der Hydrochlorid-Lösung hergestellt. Die vorbereiteten Zellen wurden gezählt (siehe 2.2.1.3) und jeweils 50.000 Zellen pro 96-Well ausgesät und auf 300 μ l mit DMEM+++ aufgefüllt. Verglichen wurden Wildtyp ARPE-19 Zellen und vier der erstellten VEGF-KO Klone. Jede dieser Zelllinien wurde entweder mit purem Medium oder mit Zusatz von 10 ng/ml VEGF₁₆₅ für 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C,

5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchte inkubiert. Anschließend wurde bei allen Wells das Medium abgenommen und durch 100 µl frisches DMEM+++ ersetzt, 10 µl MTT dazu gegeben, vorsichtig gemischt und die Zellen wieder für 4 Stunden in den Brutschrank gestellt. In dieser Zeit wurde das MTT-Salz durch die Zellen aufgenommen und durch NAD(P)H Oxidoreduktasen in Formazankristalle umgewandelt. Durch Zugabe von 100 µl der kristalllösenden Lösung und Inkubation im Brutschrank werden die Kristalle aufgelöst und ein violetter Farbstoff frei. Die Intensität des Farbstoffs ist äquivalent zu der Menge an NAD(P)H Oxidoreduktasen. Bei stärkerer Proliferation liegen mehr Zellen vor und damit auch mehr Oxidoreduktasen. Die Intensität ist damit direkt von der Proliferation abhängig und kann anschließend im Platereader bei einer definierten Absorption von 570 nm ermittelt werden und zur Auswertung mit den anderen Ansätzen direkt verglichen werden.

2.2.14 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Versuche in drei unabhängigen Experimenten und in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur statistischen Auswertung wurden die Mittelwerte und Standartabweichungen, sowie der paired-t-Test genutzt. Berechnet wurden diese Werte mithilfe von SigmaPlot (siehe 2.1.5).

3 Ergebnisse

- 3.1 Erstellung und Kontrolle der guideRNA Sequenzen
- 3.1.1 Design der guideRNA Sequenzen

Um mithilfe von CRISPR-Cas9 im Genom der Zellen schneiden zu können, mussten als erstes passende Schnittstellen gefunden werden, die eine entsprechende PAM-Sequenz (siehe 1.7) aufweisen und möglichst einzigartig im Genom sind. Dazu wurde das "CRISPR gRNA Design tool" auf www.atum.bio genutzt. Hier wurden sieben verschiedene Sequenzen ausgewählt (siehe Tabelle 15 und Abbildung 8), welche anschließend auf ihre Eignung hin geprüft werden sollten. Dafür wurde der NHEJ-Sensor (pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2, siehe 2.1.7) verwendet.

Tabelle 15:	Sequenz der guideRNA	s
	PAM-Sequenz NGG in r	ot

Name	Sequenz	Strang
gRNA1	AGC AGC CCC CGC ATC GCA TCA GG	Antisense
gRNA2	AGC TCG GAG GTC GTG GCG CT <mark>G GG</mark>	Sense
gRNA3	AGG AGC CGT GGT CCG CGC GG <mark>G GG</mark>	Sense
gRNA4	AAA CAC AGA CTC GCG TTG CA <mark>A GG</mark>	Sense
gRNA5	CCA CCA GGG TCT CGA TTG GA <mark>T GG</mark>	Antisense
gRNA6	ATG TCC ACC AGG GTC TCG ATT GG	Antisense
gRNA7	CTG CCA TCC AAT CGA GAC CCT GG	Sense



<u>Abbildung 8:</u> Bindestellen der verschiedenen gRNAs Startcodon von VEGF in Exon1 (ATG), Stoppcodon je nach Splicevariante in Exon8a oder 8b (TGA). Längenverhältnisse der gRNAs, Intron- und Exonlängen aus Darstellungsgründen nicht maßstabsgetreu. Abbildung modifiziert nach Pritchard-Jones et al. 2007.

3.1.2 Klonierung der Plasmide

Zur Herstellung der benötigten Plasmide mit Guidesequenzen für den späteren Gen-*Knockout* und Targetsequenzen für die Kontrolle der Aktivität mit dem NHEJ-Sensor wurden die Sequenzen zunächst als Oligonukleotide (siehe 2.1.6) bei metabion GmbH (Planegg) bestellt und zuvor um passende Überhangsequenzen für die Ligation in die Schnittstellen erweitert. Um aus den Oligonukleotid Einzelsträngen Doppelstränge zu erstellen wurden sie wie in 2.2.6.1 beschrieben hybridisiert. Zur Integration der Sequenzen in die beiden Plasmide müssen diese zuerst aufgetrennt werden. Dies wurde durch einen enzymatischen Restriktionsverdau (siehe 2.2.4) erreicht. Dadurch wird ein kleines Stück DNA aus dem Plasmid herausgeschnitten und es bleiben charakteristische Überhänge (*"sticky ends"*) übrig. Durch das entsprechende Design der einzubauenden Sequenzen konnten sich diese dort stattdessen anlagern und wurden mithilfe der T4 DNA-Ligase ligiert (siehe 2.2.6.2). Nun lag für jede Sequenz ein Target- und ein Guideplasmid vor.

Da es bei der Ligation auch sein kann, dass das herausgeschnittene Stück des ursprünglichen Plasmids wieder integriert wird, wurden die falsch ligierten Targetplasmide erneut enzymatisch hydrolysiert, weil dies bei den korrekt ligierten Plasmiden aufgrund einer anderen Basenabfolge im Bereich der ursprünglichen Schnittstelle nicht möglich ist. Da die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym bei den Guideplasmiden zur Schnittstelle versetzt ist, ist dies hier nicht möglich (siehe 2.1.3 und 2.2.6.3). Zur Vervielfältigung der erstellten Plasmide wurden sie per Elektroporation in entsprechend kompetente XL1 E. coli Bakterien eingebracht (siehe 2.2.6.4). Durch die Ampicillinresistenz auf beiden Plasmiden konnten die Bakterien selektiert werden, sodass auf den Kulturplatten nur noch die Bakterien überleben konnten, die bei der Elektroporation auch ein Plasmid aufgenommen hatte. Zur Sicherstellung der Reinheit der Kultur wurde von den Bakterien eine einzelne Kolonie gepickt und in flüssigem Medium vermehrt. Aus dieser wurde, nach Kontrolle der richtigen Plasmidintegration durch Sequenzierung (siehe 3.1.4), zur längeren Aufbewahrung ein Glycerolstock erstellt (siehe 2.2.6.6).





3.1.3 Restriktionskontrollverdau des Plasmids

Zur Kontrolle der erstellten Plasmide wurde ein Restriktionskontrollverdau durchgeführt. Dafür wurden die Plasmide zunächst im Mini-Maßstab aus den Bakterien extrahiert und aufgereinigt (siehe 2.2.3.1). Eine kleine Probe der Plasmide wurde erneut mit einem bestimmten Restriktionsenzym versetzt und die Größe der geschnittenen Fragmente anschließend mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt (siehe 2.2.4 und 2.2.5). In Abbildung 9a sind die Schnittstellen von DralII zu sehen. Das gesamte Plasmid ist 9174 bp groß, die erwartbaren Fragmente müssten 6055 bp, 2393 bp und 726 bp groß sein. In der Agarosegelelektrophorese in Abbildung 9b konnten diese Größen für alle generierten Plasmide ohne Nebenprodukte bestätigt werden. Es konnte daher von einer reinen Bakterienkultur ausgegangen werden. Die Integration der guideRNA-Sequenzen lässt sich so aber noch nicht bestätigen und wurde daher im folgenden Schritt kontrolliert.

- 40 -

3.1.4 Verifizierung der Klonierungen mittels Sanger Sequenzierung

Um sicher zu gehen, dass die getesteten Plasmide auch die richtige Sequenz in sich enthalten, wurden diese mittels Sanger Sequenzierung analysiert. Die Plasmide wurden mit passenden Sequenzierprimern (siehe 2.2.6.5) versetzt und zur Analyse zu Microsynth Seqlab (Göttingen) geschickt. In Abbildung 10a zeigt sich exemplarisch für Target5 (siehe Tabelle 15, gRNA5 und Tabelle 7, VEGFKO t5f), sowie in Abbildung 10b für Guide5 (siehe Tabelle 7, VEGFKO g5f) dass die richtige Sequenz im Plasmid zu finden war und keine anderen Varianten des Plasmids zu erkennen sind. Dies wurde für alle Plasmide durchgeführt.



<u>Abbildung 10:</u> Sequenzierungsbeispiel nach Sanger Sequenzierung **A)** Target5 in pRLuc8GFP2 und **B)** Guide5 in px459

3.2 Aktivitätstestung der Plasmide in HEK 293-T durch NHEJ Biosensor

Um die Aktivität der verschiedenen guideRNAs in Kombination mit Cas9 zu testen, wurde eine Kotransfektion aus dem zu testenden Plasmid und dem passenden Reporterplasmid durchgeführt (siehe 2.2.7 und Abbildung 11). Einen Tag später konnten die erstellten Proteine im Photometer gemessen werden (siehe 2.2.8). Der Versuch wurde drei Mal mit Vierfachbestimmung durchgeführt (n = 12 Messungen).





A) Nach Kotransfektion hat die Zelle beide Plasmide aufgenommen. Im Folgenden werden die, durch nur einen Promoter (P) gekoppelten, blau leuchtende Luciferase und das dadurch angeregte GFP exprimiert, sowie das Cas9 (gelb) mit der passenden guideRNA. **B)** Die guideRNA kann die zwischen die Luciferase und das GFP geklonte Targetsequenz erkennen und einen Schnitt durch Cas9 verursachen. Durch die fehlerhafte NHEJ-Reparatur wird der Schnitt geschlossen. Das nachfolgend codierte GFP kann im Falle eines Frameshifts durch den Abbruch am entsprechenden Stopcodon (x) nicht mehr korrekt exprimiert werden und verliert seine Leuchtfähigkeit.

In Abbildung 12a ist die BRET-Ratio als Quotient aus grüner Emission durch blaue Emission für die jeweiligen Plasmide gezeigt. Wenn Cas9, mit der jeweiligen guideRNA im Komplex, das Reporterplasmid schneidet, wird der Schnitt durch den zelleigenen NHEJ-Reparaturweg wieder geschlossen (siehe 1.7.2). Durch Insertionen und Deletionen kommt es zum Frameshift der nachfolgenden Sequenz, welcher bei Verschiebung um eine oder um zwei Basen zu einen Stopcodon im GFP führt, da dieses keinen eigenen Promotor besitzt. Dadurch ist weniger GFP vorhanden und somit die BRET-Ratio niedriger. Ist die Affinität der guideRNA nicht so hoch, kommt es in weniger Zellen zu einem Schnitt, es kann mehr GFP exprimiert werden und die BRET-Ratio ist höher. Als Negativkontrolle wurde die BRET-Ratio der Luciferase ohne GFP gemessen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Ratio der Negativkontrolle von den Ergebnissen abgezogen und die Differenz der BRET-Ratio in Prozent zur Einfachtransfektion (ohne Cas9) angegeben. Anhand dieser Prozentzahlen lässt sich die Effizienz der Cas9 Konstrukte in Abbildung 12b ablesen. Die beste Effizienz ergab sich bei Guide2 mit 46,55%, gefolgt von Guide6 mit 30,72% und Guide4 mit 29,99%. Auch die anderen vier Konstrukte waren statistisch hoch signifikant aktiv, wurden aufgrund der schlechteren Aktivität aber nicht weiter verwendet.





A) BRET-Ratio der verschiedenen Ansätze. Je guideRNA einmal als alleinige Transfektion (dunkelgrau) und einmal als Kotransfektion mit dem passenden Cas9-Plasmid (hellgrau). Zur Kontrolle dient eine alleinige Transfektion von pRLuc8 (schwarz). In Anwesenheit von Cas9 kann das Reporterplasmid geschnitten werden und es wird weniger GFP2 exprimiert, wodurch die BRET-Ratio sinkt (** p < 0,001).

weniger GFP2 exprimiert, wodurch die BRET-Ratio sinkt (** p < 0,001). **B)** Nach Normalisierung der Werte durch Abzug der BRET-Ratio der Luciferase kann die Aktivität der einzelnen guideRNAs bestimmt werden. Je affiner die guideRNA zur passenden DNA-Sequenz passt, desto häufiger findet ein Schnitt und in zwei Drittel der Fälle ein Frameshift statt.

3.3 Herstellung der VEGF-KO Zelllinie durch transiente Transfektion

3.3.1 Optimierung der Transfektionsbedingungen für ARPE19

Um möglichst viele Zellen durch die Transfektion zu erreichen wurden verschiede Mengen an Plasmid und PEI-Mix, sowie unterschiedliche Zellzahlen verwendet (siehe 2.2.7). Durch die Fluoreszenz des transfizierten GFPs konnte anschließend



<u>Abbildung 13:</u> Optimierung der Transfektionsbedingungen Verwendet wurden in **A)** 250.000 Zellen, 200 μl PEI-Mix und 3 μg Plasmid, in **B)** 250.000 Zellen, 300 μl PEI-Mix und 4 μg Plasmid, in **C)** 500.000 Zellen, 200 μl PEI-Mix und 3 μg Plasmid und in **D)** 500.000 Zellen, 300 μl PEI-Mix und 5 μg Plasmid. (Maßstab 100 μm)

mikroskopisch ermittelt werden, wie viele Zellen durch die Transfektion erreicht wurden. In den Abbildungen 13a-d sind die grün angefärbten Zellen gut zu erkennen. Das beste Transfektionsergebnis zeigte sich in Abbildung 13d, hier wurden 500.000 Zellen am Vortag ausgesät und 5 µl Plasmid in 300 µl PEI-Mix mit 100 µl NaCl zur Transfektion verwendet.

3.3.2 Puromycin Selektionskonzentration

Bei der Transfektion der Zellen werden nie alle Zellen erreicht. Um im Folgenden jedoch eine Zelllinie zu finden, bei der die Transfektion erfolgreich war, ist es wichtig, die transfizierten Zellen von den übrigen zu trennen. Diese Selektion konnte mithilfe von Puromycin erfolgen, da auf dem transfizierten px459T0-Plasmid eine Resistenz gegenüber diesem zelltoxischem Antibiotikum vorhanden ist (siehe 2.1.7). Durch Inkubation der ARPE-19 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen wurde die Grenzkonzentration ermittelt, die nötig ist, um alle untransfizierten Zellen abzutöten (siehe 2.2.9.1). Eine höhere Konzentration sollte vermieden werden, um die Zellen nach

der Transfektion nicht zusätzlich zu stressen und weil das Plasmid mit der Resistenz nur transient verfügbar ist.

Die folgenden Abbildungen sind nach drei Tagen Zellkultur mit gleicher Zellzahl mit 0 µg/ml, 0,5 µg/ml und 1,0 µg/ml Puromycin in DMEM+++ aufgenommen worden.



Abbildung 14: Puromycin Selektionskonzentration

Nachdem in jedes Well gleich viele Zellen gegeben wurden zeigt sich in **A**) ohne Zugabe von Puromycin eine konfluente Zellkultur. In **B**) sind bei 0,5 μ g/ml Puromycin die Zellkontakte lockerer, sowie einige tote Zellen zu sehen. In **C**) sind bei 1,0 μ g/ml Puromycin fast keine Zellkontakte mehr vorhanden und fast alle Zellen abgestorben. (Maßstab 100 μ m)

Es zeigen sich konfluente ARPE-19 Zellen in der Kontrolle ohne Puromycin, die wie üblich in engem Kontakt zueinander liegen (Abbildung 14a). Bei 0,5 μ g/ml sind schon einige tote Zellen, sowie eine Lockerung der Zellkontakte zu sehen (Abbildung 14b). Bei 1,0 μ g/ml schwimmt der Großteil der Zellen schon abgestorben oben auf, die restlichen Zellen haben ihre Kontakte untereinander verloren und befinden sich kurz vor oder in verschiedenen Stadien der Apoptose (Abbildung 14c). In den Ansätzen mit höheren Konzentrationen waren alle Zellen schon nach kürzerer Zeit tot. Dadurch ergibt sich eine Selektionskonzentration von 1 μ g/ml.

3.3.3 Transfektion und Aufzucht der VEGF-KO Zelllinie

Nach Herstellung der benötigten Plasmide (mit Guide2, Guide4 und Guide6), deren Kontrolle und Optimierung der Bedingungen konnte die Transfektion durchgeführt werden (siehe 2.2.7). Die genaue Reihenfolge der Arbeitsschritte wird in 2.2.11 beschrieben und ist in Abbildung 7 skizziert. Um nach der Transfektion nur mit den transfizierten Zellen weiter zu arbeiten wurde eine Selektion mit Puromycin durchgeführt (siehe 2.2.9.2). In den späteren Versuchsansätzen wurde auf ein frühzeitiges Ablösen und Umbetten der Zellen verzichtet, da dies für die Zellen zusätzlichen Stress bedeutet und anfangs deutlich mehr Zellen abgestorben sind. Dies führte dazu, dass aus dem

ersten Versuchsansatz in der 96-Wellplatte keine Zellkultur über längere Zeit zu halten war. Sowohl Zellen aus dem zweiten Ansatz in den 100 mm Zellkulturplatten, als auch Zellen aus dem dritten Ansatz in der anfänglichen 6-Wellplatte konnten kultiviert werden und später in einzelne Zelllinien separiert werden (siehe 2.2.10).

Nach der Zugabe von VEGF konnte ein schnelleres Wachstum beobachtet werden, jedoch konnte hier aufgrund der wenigen Zellen keine Überprüfung des Zusammenhangs stattfinden. Um möglichst physiologische Kulturbedingungen zu schaffen wurde daher mit der Gabe von VEGF fortgefahren und in späteren Ansätzen auch so früh wie möglich begonnen.

Die anschließende Trennung in einen Ansatz in 24-Wellplatten und einen anderen in 6-Wellplatten mit Transwell Einsatz diente vor allem der Testung, ob die Zellen auch ohne Zugabe von VEGF nur durch parakrine Unterstützung von den umliegenden Zellen überleben können. Aus beiden Ansätzen konnten Zelllinien so weit kultiviert werden, dass ihre Anzahl ausreichte, um sie weiter zu analysieren. Insgesamt wurden zwischenzeitlich 80 verschiedene Zelllinien kultiviert, wobei einige schon nach der Separation direkt abstarben.

Bei der Aufzucht der einzelnen Zelllinien konnte festgestellt werden, dass die Zellen schneller wuchsen, wenn noch weitere Zellen in der Umgebung waren. Allerdings beschränkte sich dies auf die Zeit, bis die Zellen in einem Bereich konfluent beieinander lagen, hier konnte teils über mehrere Tage mikroskopisch kein Wachstum festgestellt werden (siehe Abbildung 15a-c). Aus diesem Grund wurden solche Zelllinien wie beschrieben mit Accutase abgelöst und im gleichen Well verteilt, wodurch eine erneute Proliferation ausgelöst wurde (siehe Abbildung 15e+f).

Die verschiedenen Ansätze bei der Transfektion schienen keinen Unterschied zu machen. Aus fünf der sieben Ansätze konnten vollbewachsene Zellkulturplatten kultiviert werden. Lediglich bei Ansatz 2 mit ausschließlich Guide 4 und bei Ansatz 6 mit einer Kombination von Guide 2 und Guide 6 gelang dies nicht (siehe Tabelle 16). Die Zellkulturen wurden so lange fortgeführt, bis es zur Konfluenz in der Zellkultur Platte kam (siehe Abbildung 15g+h).



<u>Abbildung 15:</u> Zellkultur der ARPE19-VEGF-KO **A+B)** Stopp des Zellwachstums der zweiten Generation **C)** Stopp des Zellwachstums der dritten Generation im Transwell (8t) **D)** normale ARPE-19, gepickt zur Kontrolle, normales Wachstum **E+F)** Verteilung durch Accutase, erneutes Zellwachstum **G)** Nach Übertrag in Zellkultur Platte (16t) **H)** Wachstum in der Zellkultur Platte, vor ELISA (8t) (Maßstab 100 μm)

3.4 Erfolgskontrolle des VEGF-KO

3.4.1 VEGF-Sandwich-ELISA

Nach Kultivierung der Zelllinien sollten diese mithilfe eines Sandwich-ELISA gegenüber VEGF auf den Erfolg des Gen-*Knockouts* getestet werden (siehe 2.2.12). Sollte der einzelne Zellklon durch die Transfektion mit Cas9 verändert worden sein, dürfte im

ELISA kein VEGF mehr nachweisbar sein. In Tabelle 16 sind die getesteten Zelllinien mit Name und angewendetem Transfektionsansatz (siehe 2.2.7) zu sehen.

Als Positivkontrolle wurde die Wildtyp ARPE-19 Zelllinie ohne Transfektion verwendet, als Negativkontrolle diente DMEM+++ ohne in Berührung mit Zellen gekommen zu sein. Nach Abzug der Negativkontrolle und Berechnung der Standardgeraden ergeben sich die in Abbildung 16 gezeigten Werte aus einem Experiment in Dreifachbestimmung. Die ARPE-19 Positivkontrolle produzierten $35,44 \pm 16,98$ pg/ml VEGF, die Zelllinie 13ab 76,67 ± 17,55 pg/ml, die Zelllinie 42b $21,39 \pm 3,25$ pg/ml und die Zelllinie 64b 2,28 ± 2,76 pg/ml. Bei den Zelllinien 8t, 10t und 16t lagen die Werte unterhalb der Nachweisgrenze, wobei die Signifikanz im t-Test bei allen drei deutlich unter 0,05 lag (8t: p = 0,006, 10t: p = 0,014, 16t: p = 0,008). Die Zelllinie 64b ist mit p = 0,029 ebenfalls statistisch signifikant erniedrigt. Die Zelllinie 13ab liegt mit einer Signifikanz von p = 0,043 leicht signifikant über den Werten der Positivkontrolle. Die Zelllinie 42b war mit p = 0,232 im t-Test nicht signifikant niedriger.





Mithilfe des VEGF-Sandwich-ELISA wurde kontrolliert, ob die etablierten Zelllinien noch eigenes VEGF exprimieren. Nach Abzug der Negativkontrolle (nur Medium) ergeben sich die in der Abbildung gezeigten Werte. Die Zelllinien 8t, 10t, 16t und 64b sind statistisch signifikant erniedrigt (* p < 0,05), 42b ist nicht signifikant erniedrigt (p = 0,232), 13ab ist statistisch gerade signifikant mit (# p = 0,043) erhöht.

Name	Transfektionsansatz	Verwendete Guides
8t	Nr. 3	Guide6
10t	Nr. 4	Guide2 + Guide4
13ab	Nr. 4	Guide2 + Guide4
16t	Nr. 7	Guide2 + Guide4 + Guide6
42b	Nr. 1	Guide2
64b	Nr. 5	Guide4 + Guide6

Tabelle 16: Etablierte Zelllinien mit Zuordnung zum Transfektionsansatz

3.4.2 Proliferationsassay

Um die Auswirkung des Gen-*Knockouts* auf das Wachstumsverhalten zu untersuchen wurde ein Proliferationsassay durchgeführt (siehe 2.2.13). Als Positivkontrolle wurde die Wildtyp ARPE-19 Zelllinie ohne Transfektion verwendet. Die statistische Berechnung erfolgte aus einem Experiment in Dreifachbestimmung. In Abbildung 17 ist die Absorption bei 570 nm aufgetragen, welche direkt proportional zur Proliferation ist. Diese ist für Wildtyp ARPE-19 der Positivkontrolle bei 1,80 ± 0,06 AU, für die Zelllinie 8t bei 1,94 ± 0,15 AU, für 16t bei 1,89 ± 0,18 AU und für 64b bei 1,95 ± 0,22 AU. Mit Signifikanzen von p = 0,075 (8t), p = 0,308 (16t) und p = 0,176 (64b) konnte hier kein Unterschied festgestellt werden. Lediglich die Zelllinie 10t war mit 1,97 ± 0,11 AU leicht signifikant erhöht (p = 0,018). Die Zugabe von 10 ng/ml VEGF₁₆₅ sorgte für keine signifikante Änderung der Proliferation im Vergleich zur gleichen Zelllinie ohne VEGF-Zugabe. Die Absorption der WT-ARPE-19+VEGF lag bei 1,85 ± 0,21 AU, für 8t+VEGF bei 1,92 ± 0,18 AU, für 10t+VEGF bei 1,98 ± 0,22 AU, für 16t+VEGF bei 1,96 ± 0,14 AU und für 64b+VEGF bei 1,70 ± 0,18 AU.



Abbildung 17: Proliferationsassay Das Wachstumsverhalten der Zelllinien ist nach erfolgreichem VEGF-KO nicht beeinträchtigt. Die Proliferation der Zelllinie 10t ist sogar leicht signifikant erhöht. Die Zugabe von VEGF steigert die Proliferation der Zellen nicht (* p < 0,05).

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnten drei Zelllinien etabliert werden, die ohne eigene VEGF-Produktion viabel sind. Dazu wurden mehrere guideRNAs in Cas9 haltige Plasmide kloniert. Diejenigen Konstrukte, die im Test mit dem NHEJ-Sensor die beste Aktivität zeigten, wurden zur Transfektion der Zellen verwendet. Nach Separation einzelner Zelllinien und Kultivierung dieser, konnte bei drei dieser Zelllinien im Sandwich-ELISA keine VEGF-Produktion mehr nachgewiesen werden.

Zum Knockout des VEGF-Gens wurde die CRISPR assoziierte Endonuklease 9 (Cas9) verwendet, welche mithilfe einer guideRNA sehr präzise Schnitte im Genom setzen kann (siehe 1.7.1). Im Unterschied zu anderen Endonukleasen, wie TALEN oder Zinkfinger, ist die Herstellung der aktiven Konstrukte leichter und schneller, da lediglich die Sequenz für die guideRNAs synthetisiert und in ein Cas9 enthaltendes Plasmid kloniert werden müssen. Dadurch ist es einfacher möglich mehrere verschiedene guideRNAs zu erstellen, zu testen und die besten zur weiteren Verwendung auszuwählen (Lone et al. 2018). Von Nachteil bei der Erstellung der guideRNAs ist allerdings, dass diese eine PAM-Sequenz benötigen. Dadurch ist die Lokalisation der Schnittstelle und die Anzahl der zur Verfügung stehenden Seguenzen eingeschränkt (Jasin und Haber 2016). Durch die Nutzung von Cas9 Varianten mit unterschiedlichen PAM-Sequenzen ist dieser Nachteil immer weniger relevant (Maeder und Gersbach 2016). Von Bedeutung ist dies allerdings bei Genomeditierungen, wenn eine bestimmte Seguenz oder Base geändert werden soll. Bei der Nutzung für einen Gen-Knockout ist der exakte Ort der Schnittstelle weniger relevant, solange es zur Inaktivierung des Gens führt. Wichtig ist, dass sämtliche Splicevarianten des Proteins adressiert werden und dass keine aktiven Nebenprodukte entstehen, wenn zum Beispiel die Rezeptorbindestellen weiter korrekt exprimiert werden.

Nach erfolgtem Schnitt im Genom durch die Endonuklease wird dieser durch die zelleigenen Reparaturwege wieder geschlossen. Normalerweise geschieht dies durch NHEJ, was über zufällige Insertionen und Deletionen von Basen sehr fehleranfällig ist (siehe 1.7.2). Bei der Zellteilung, wenn das homologe Chromosom vorliegt, oder durch Zugabe eines passenden Templates kann die Reparatur mittels HDR (Homology directed repair) oder MMEJ (Microhomology-mediated end joining) aber auch ohne Fehler ablaufen (Yanik et al. 2017). Für einen Gen-*Knockout*, wie in dieser Arbeit, ist eine fehlerhafte Reparatur des Doppelstrangbruchs ausdrücklich erwünscht. Durch die

zufälligen Insertionen und Deletionen kommt es in zwei von drei Fällen zu einer Verschiebung des dreibasigen Leserasters und dadurch zur Inaktivierung des nachfolgend codierten Proteins (siehe 1.7.2). Auch in den Fällen ohne Verschiebung kann es durch den Einbau oder den Verlust von Aminosäuren zu ausreichenden Veränderungen im Protein kommen, um die Funktion auszuschalten.

Zunächst wurden die in der Online-Datenbank gefundenen guideRNA Sequenzen in das passende Cas9-haltige Plasmid, sowie zur Kontrolle die gleiche Sequenz als Ziel zum Schneiden in das NHEJ-Sensor-haltige Plasmid kloniert. Die Sicherstellung des erfolgten Einbaus konnte durch die exakte Sequenzierung der Plasmide gewährleistet werden (siehe 3.1.4). Da im NHEJ-Sensor die Zielsequenz zwischen die Luciferase und das GFP kloniert wurde und diese einen gemeinsamen Promotor haben, werden im Normalfall gleiche Mengen der beiden Proteine exprimiert. Bei Kotransfektion mit Cas9 kann die Zielsequenz geschnitten werden und durch NHEJ-vermittelte Reparatur kommt es im Idealfall in zwei Dritteln der Fälle zu einem Frameshift in der Sequenz, wodurch es jeweils zu einem Stopcodon im GFP kommt. Durch die verminderte Expression von aktivem GFP2 sinkt die Intensität vom abgestrahlten grünen Licht und gleichmäßig dazu die BRET-Ratio, in der diese Intensität im Zähler steht (siehe 2.2.8, Wimmer, unveröffentlichte Daten). Die maximal erreichbare Reduktion der BRET-Ratio ist somit 66,67%. Bei einer gleichzeitigen Kotransfektion ist dieser Wert nicht ganz erreichbar, da in der Zeit, bis das Cas9 translatiert und das Reporterplasmid geschnitten wird, auch dieses schon translatiert und ein funktionierendes GFP exprimiert wird. Eventuell haben auch manche Zellen nur das Plasmid mit dem NHEJ-Sensor aufgenommen, allerdings ist das bei der Menge an Zellen und an transfiziertem Plasmid zu vernachlässigen. Nach Normalisierung durch Abzug der BRET-Ratio der Luciferase allein lässt sich die Aktivität in Prozent des Ausgangswertes ohne Cas9-Komplex angeben. Bei Werten zwischen 47% und 30% könnten die guideRNA-Cas9-Konstrukte zwar noch aktiver sein, für den angestrebten in vitro Knockout wurden diese aber als ausreichend angenommen und sind vergleichbar zu gleichen Experimenten in der Arbeitsgruppe (siehe Wimmer, unveröffentlichte Daten).

Warum die Aktivität der verschiedenen guideRNA-Cas9-Konstrukte so unterschiedlich ist, ist bisher noch nicht geklärt und Gegenstand der aktuellen Forschung. Mögliche Ansatzpunkte sind die räumliche Struktur der guideRNA, die Menge an Guanin und Cytosin, welche über drei Wasserstoffbrücken einen besseren Kontakt zueinander haben, sowie bestimmte Basen an verschiedenen Stellen der Sequenz, die eine positive Korrelation zur Aktivität zeigen (Zhang et al. 2015). Nur durch diese Gründe lassen sich

die Unterschiede in der Aktivität der sieben untersuchten guideRNAs dieser Arbeit aber nicht erklären.

Im Gegensatz zum bisher oft verwendeten T7-Endonuklease-I-Assay lassen sich mit dem NHEJ-Sensor mehrere guideRNA-Cas9-Komplexe direkt quantitativ miteinander vergleichen (Sentmanat et al. 2018). Ein weiterer Vorteil ist die schnellerer, kostengünstigere und einfachere Durchführung, da nach Transfektion nur die Proteine extrahiert werden müssen, anstatt die DNA zu extrahieren und diese mit passenden Primern per PCR zu amplifizieren (siehe Wimmer, unveröffentlichte Daten).

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Transfektionseffizienz, neben der Auswahl aktiverer Cas9-Konstrukte, ist die Optimierung der Transfektionsbedingungen. Hier könnte über weitere Kombinationen aus unterschiedlichen Mengen von Zellzahl, PEI-Mix und Plasmid die Effizienz gesteigert werden. Für die gestellten Anforderungen waren die gefundenen Mengen (siehe 3.3.1) aber ausreichend, auch weil im Anschluss eine Anreicherung der transfizierten Zellen über eine Selektion möglich war (Yan et al. 2018). Vor allem bei *in vivo* Versuchen ist diese aber nicht möglich, da hier alle vorhandenen Zellen behandelt werden sollen und ein Herausnahme der untransfizierten Zellen nicht praktikabel ist. Dafür wäre eine weitere Optimierung der Transfektion, um mehr Zellen zu erreichen, förderlich.

Durch die Selektion konnte gezielt nur mit den transfizierten Zellen weitergearbeitet werden, ohne das untransfizierte Zellen, die womöglich Proliferations- oder Überlebensvorteile haben und die transfizierten Zellen verdrängen, in der Kultur vorkommen. Auch die Selektion könnte über exaktere Bestimmung der Puromycingrenzkonzentration im Zehntel-Bereich (0,1 ng/ml) bei Bedarf noch optimiert werden (siehe 3.3.2). Durch eine höhere Puromycinkonzentration könnte die Selektion hin zu ausschließlich transfizierten Zellen erhöht werden. Allerdings besteht dann auch die Möglichkeit, dass die durch eine erfolgreiche genomische Editierung zusätzlich gestressten Zellen ausselektiert werden und lediglich Zellen überleben, die zwar das Plasmid aufgenommen haben, aber genomisch nicht verändert wurden. Da der selbst ermittelte Wert sich mit der Literatur deckte (Sheu et al. 2017) und die Zelllinien durch die spätere Kontrolle mit dem VEGF-ELISA weiter geprüft wurden, war der Wert von 1 µg/ml für diese Arbeit ausreichend.

Um die Chancen des *Knockouts* zu erhöhen wurden bei der Transfektion nicht nur einzelne guideRNA-Cas9-Komplexe, sondern auch Kombinationen von zwei oder allen drei genutzt, wie es Bakterien auch zur Abwehr des viralen Genoms tun. Durch mehrere guideRNAs steigt die Wahrscheinlichkeit, dass mindestens ein Komplex zu einem Schnitt führt. Außerdem besteht auch die Möglichkeit, dass nach einem Schnitt von zwei Komplexen das Zwischenstück herausgeschnitten wird (Lone et al. 2018).

Nach erfolgreicher Transfektion gestaltete sich die Kultivierung der ARPE-19 Zellen nach der Selektion schwierig (siehe Abbildung 7). Im ersten Versuchsansatz waren nur noch etwa 50 Zellen pro 100 mm Zellkulturplatte lebend zu erkennen. Diese wurden in einer Verdünnungsreihe isoliert, um später daraus je eine einzelne klonale Zelllinie zu bekommen. Die Zellproliferation war anschließend aber so gering, dass nur wenige Zellen sich überhaupt teilten und diese nach einigen Teilungen ebenfalls die Proliferation einstellten oder abstarben. Eine Unterstützung der Zellen durch Zugabe von VEGF₁₆₅ sorgte für ein längeres Überleben und eine schnellere Proliferation und wurde deswegen auch bei den kommenden Ansätzen weiter geführt. Später wurde damit direkt nach der Transfektion begonnen, um mögliche Überlebensnachteile der transfizierten Zellen ohne eigene VEGF-Produktion gegenüber den untransfizierten Wildtyp Zellen zu verringern. Ein Nachteil wurde durch die Zugabe von VEGF als Annäherung an physiologische Zustände nicht angenommen. Nach späterer Durchführung des Proliferationsassays, bei dem keine Unterschiede erkennbar waren, lässt sich vermuten, dass die Zugabe von VEGF aber nicht notwendig war und die schwierige Kultivierung an anderen Faktoren lag (siehe 3.4.2). Ob eine anfängliche Unterstützung durch VEGF bei den einzelnen Zellen vorlag, lässt sich im Nachhinein nicht sagen.

Ein weiterer Stressfaktor für die Zellen waren die Passagen in neue Wells, daher wurde diese Anzahl in späteren Ansätzen auf ein Minimum reduziert (siehe Abbildung 7). Dadurch konnten die Zellen besser parakrin miteinander in Kontakt treten, waren so näher an realen Kulturbedingungen und mussten sich nicht ständig neu um die Expression von extrazellulären Matrix- und Kontaktproteinen kümmern. Die Proliferation war durch diese Maßnahmen besser, allerdings mussten die Klone mikroskopisch kontrolliert werden, damit nicht verschiedene Zelllinien konfluieren. Um die Zelllinien anschließend dennoch voneinander zu trennen, wurden sie unter mikroskopischer Sicht separiert (siehe 2.2.10) und als klonaler Zellverbund von 20 bis 50 Zellen in ein neues Well zur weiteren Kultivierung übertragen. Da dies freihand durchgeführt wurde, war es erst nach einiger Übung erfolgreicher. Allerdings bleibt diese Technik fehleranfällig, da einige Zellen durch das Abschaben von der Zellkulturplatte absterben und auch unter permanenter Sicht nicht ausgeschlossen werden kann, dass zusätzliche Zellen einer anderen Linie durch den Sog in die Pipette mitgenommen werden. Eine Separation durch eine Verdünnungsreihe ist hier präziser, hätte aber vermutlich auch unter

optimierten Bedingungen deutlich länger gedauert oder nicht zum Erfolg geführt. Eine spätere genomische Kontrolle der Zellen, bei der sich zeigt, ob die Zelllinie rein ist, ist ohnehin geplant, aber nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Weitere unterstützende Maßnahmen bei der Kultivierung waren die Verteilung eines gewachsenen Zellklons durch Accutase im eigenen Well, sowie die Verwendung von Transwelleinsätzen, welche Wildtyp ARPE-19 Zellen beinhalteten. Da einige Zelllinien bei einer Größe von etwa 100 Zellen nicht weiter proliferierten, wurden durch die Accutase die Zellkontakte wieder gelöst und die gefühlte Konfluenz der Zellen aufgehoben (siehe Abbildung 15). Dies führte erfolgreich zu einer erneuten Proliferation aller Zellen, wenn genug Zellen im Well und diese dadurch trotzdem noch nah genug beieinander waren.

Durch die Verwendung der Transwelleinsätze sollten die Umgebungsbedingungen durch die parakrine Aktivität der Wildtyp Zellen verbessert werden. Auch hier kann nicht genau bestimmt werden, ob dies zur besseren Kultivierung beigetragen hatte, da die spätere Proliferation wie beschrieben keine Unterschiede aufwies. Für die spätere Verwendung der Zellen in einer implantierten Alginatsphäre im Auge konnte aber gezeigt werden, dass eine Co-Kultivierung von KO-Zellen und Wildtyp Zellen problemlos möglich ist.

Dass die drei generierten Zelllinien (8t, 10t und 16t) alle aus dem Transwellansatz entstanden sind, ist eher darauf zurückzuführen, dass dieser als letztes durchgeführt wurde und die praktische Übung im Separieren, sowie die anderen Optimierungen der Kultivierung schon vorhanden waren, als dass der Transwelleinsatz einen erkennbaren Vorteil gebracht hätte. Die Zelllinie 64b kam ebenfalls aus diesem letzten Ansatz wurde aber ohne Transwelleinsatz kultiviert (siehe Abbildung 7). Abschließend lässt sich nach mikroskopischer Betrachtung bei der Kultivierung sagen, dass die Proliferation durch die Anwesenheit von mehr Zellen im Umfeld und vor allem über direkte Zell-Zell-Kontakte am besten gefördert wurde.

Nach erfolgreicher Kultivierung mehrerer Zelllinien wurde der Gen-*Knockout* durch einen VEGF-Sandwich-ELISA getestet (siehe 3.4.1). Bei einer Nachweisgrenze von 9 pg/ml (Herstellerangabe) ist dieser Test sehr präzise, um zu prüfen, ob das gesuchte Protein noch exprimiert wird. Nach Abzug der Negativkontrolle ist es bei den Zelllinien 8t, 10t und 16t daher sehr wahrscheinlich, dass diese kein VEGF mehr exprimieren.

Auch die Zelllinie 64b ist statistisch deutlich reduziert und eventuell ganz ohne VEGF. Da die anderen drei Zelllinien aber bessere Werte haben, wurde sie nicht weiter verwendet. Möglicherweise war hier auch die in Exon7 schneidende Guide4 aktiv, welches allerdings nicht in allen Splicevarianten vorkommt. So wäre zwar die aktivste VEGF-Isoform 165 ausgeschaltet, kürzere Isoformen könnten aber dennoch exprimiert werden und durch die intakten VEGF-Rezeptorbindestellen weiter aktiv sein (Woolard et al. 2004; Arcondéguy et al. 2013).

Interessant ist, dass bei Zelllinie 42b keine signifikante Veränderung der VEGF-Konzentration gefunden wurde. Dies kann zum einen damit zusammenhängen, dass die Selektion nicht gut genug funktioniert hat oder es gar nicht zu einem Schnitt im Genom gekommen ist. Möglich ist auch, dass der Schnitt stattgefunden hat, er aber wieder zufällig richtig repariert wurde, oder eine falsche Reparatur trotzdem zu keiner Änderung der Aminosäuren geführt hat, da fast alle Aminosäuren durch verschiedene DNA-Triplets codiert werden. Schaut man sich die Orte der guideRNAs im VEGF-Gen aber genauer an (siehe Abbildung 8), fällt auf, dass die hier verwendete Guide2 zwar im Exon1 schneidet, allerdings ist die Stelle vor dem Startcodon ATG. Finden hier nur kleine Veränderungen statt, kann es sein, dass es trotzdem zur Produktion eines regulären Proteins kommt, da die translatierte Sequenz, die erst mit dem Startcodon beginnt, unverändert ist.

Ungewöhnlich ist, dass bei der Zelllinie 13ab eine signifikant höhere VEGF-Konzentration gemessen wurde. Dies ist bei einer Signifikanz von 0,043 zwar auch noch zufällig möglich, es kann aber auch zu genomischen Veränderungen gekommen sein, die zu einer erhöhten Expression führen. Möglich ist zum Beispiel eine Veränderung im Regulationsbereich von VEGF, da Guide2 sehr weit vorne im Exon1 schneidet und hier ein zweiter Promotorbereich, sowie zwei weitere alternative Startcodons liegen (Arcondéguy et al. 2013). Ebenfalls möglich ist, dass die Messenger-RNA von VEGF über eine Veränderung im Bereich von Exon1 stabilisiert wird und dadurch, anders als im normoxyschen Normalfall, langsamer degradiert wird. Dies würde ebenfalls zu einer höheren Expression führen, welche von den natürlichen Zellen unter hypoxischen Bedingungen erwünscht ist (Arcondéguy et al. 2013).

Der Nachweis, dass bei den drei Zelllinien unter der Nachweisgrenze kein VEGF mehr im Überstand zu finden ist, lässt allerdings noch keine Rückschlüsse zu, was in der Zelle auf genomischer Ebene passiert ist. Dafür müssten weitere Tests wie eine Sequenzierung oder eine qPCR stattfinden, um die Veränderungen auf DNA- und RNA-Ebene festzustellen. Daher lässt sich bisher auch nicht sagen, ob entscheidende Unterschiede zwischen den drei etablierten Zelllinien bestehen. Es ist möglich, dass in den Zelllinien 8t und 16t Guide6 die aktive und entscheidende guideRNA war, da diese in Exon3 schneidet, in dem sich die VEGF-Rezeptor1-Bindestelle befindet (siehe Abbildung 8; Woolard et al. 2004). Aber auch hier kann es zu unterschiedlichen Sequenzen durch NHEJ-Reparatur gekommen sein, die eventuell später noch unterschiedliche Eigenschaften aufweisen.

Für alle Endonukleasen gilt, dass sie möglichst nur an einer spezifischen Stelle aktiv sind und keine weiteren Veränderungen im Genom verursachen. Ob dies der Fall ist, ist schwierig zu zeigen und wurde in dieser Arbeit nicht behandelt, da eine off-target-Aktivität das Ergebnis solange nicht beeinträchtigt, wie die Zelle viabel bleibt und die Produktion und Expression des Biosensors später möglich ist. Relevant ist dies allerdings bei gentherapeutischen Verfahren *in vivo*, bei denen es zu weitreichenden Auswirkungen auf den Organismus kommen könnte (Zhang et al. 2015).

Ein gutes Zeichen für die Viabilität der Zellen ist hier, dass die Proliferation bei allen Zelllinien vergleichbar ist (siehe 3.4.2). Vor allem, dass keine der Zelllinien eine verminderte Proliferation aufweist, lässt hoffen, dass alle Zelllinien im Folgenden über längere Zeit kultiviert werden können und keine relevanten off-target-Effekte aufgetreten sind. Die nur leicht, aber signifikant erhöhte Proliferation von Zelllinie 10t verwundert etwas. Möglicherweise sorgt hier die Abwesenheit von VEGF zu einer erhöhten Expression anderer Wachstumsfaktoren wie Fibroblasten-Wachstumsfaktoren oder Transformierender Wachstumsfaktor β (Ferrara et al. 2003). Ebenfalls möglich ist, dass die Zelllinie durch unbekannte off-target-Effekte oder bereits im Voraus ein gesteigerte Proliferation hat und daher bei der Selektion einen Vorteil hatte.

Nach Abschluss dieser Dissertation ist ein weiteres Zwischenziel des gesamten Projekts erreicht. Um die diagnostische Lücke zu schließen, die bei VEGF-assoziierten Krankheiten wie der Altersassoziierten Makuladegeneration oder der Diabetischen Retinopathie besteht, wurde zuerst ein neuer Biosensor entwickelt (siehe 1.5). Dieser kann nicht invasiv die aktuelle VEGF-Konzentration messen, wenn er vor Ort auf der Zelloberfläche exprimiert wird. "Vor Ort" bedeutet in diesem Fall im Bereich der Retina, beziehungsweise subretinal. Hier soll der Biosensor auf Zellen exprimiert werden, die wiederum in einer implantierten Alginatsphäre abgekapselt sind. Dadurch kann im Vorfeld eine kontrollierte Transfektion des Biosensors *in vitro* stattfinden, was die systemischen Nachteile einer Genomeditierung, wie off-target-Aktivität in anderen Zellen oder eine Immunreaktion gegenüber CRISPR-Cas9 vermeidet (Maeder und Gersbach 2016; Crudele und Chamberlain 2018). Durch die Poren der Alginatsphäre können die abgekapselten Zellen nicht entweichen, jedoch können gelöste Proteine und Nährstoffe

problemlos ausgetauscht werden. Die Verwendung von RPE-Zellen in der Sphäre hat zum einen den Vorteil, dass die Zellen in ihrer natürlichen Umgebung sind, zum anderen sind sie in vorherigen Versuchen bereits erforscht und als geeignet befunden worden (Kauper et al. 2012). Von Vorteil könnte auch die Fähigkeit der Phagozytose der RPE Zellen sein, wodurch sie abgestorbene Zellen in der Sphäre abbauen können (siehe 1.1.2; Strauss 2011).

Damit der Biosensor vor der Expression auf der Zelle nicht schon intrazellulär mit VEGF in Kontakt kommt und so die Messung der extrazellulären Konzentration verfälscht, war es das Ziel, dass die entsprechende Zelllinie ein VEGF-Gen-*Knockout* aufweist. Diese Zelllinie, beziehungsweise zur weiteren Untersuchung drei davon, konnten etabliert werden.

Nun gilt es in weiteren Versuchen das Plasmid für den VEGF-Biosensor stabil in die generierten Zellen zu transfizieren, damit der Biosensor dauerhaft exprimiert werden kann. Anschließend müssen die Eigenschaften des Biosensors überprüft werden, da dieser bisher nur in seiner löslichen Form untersucht wurde. Es besteht die Möglichkeit, dass die VEGF-Bindung sowie die Konformitätsänderung, die zur Erhöhung der BRET-Ratio nötig ist, durch die Verankerung auf der Zelloberfläche gestört oder sogar verhindert wird. Entsprechende Veränderungen der VEGF-Bindestellen oder der Verankerung auf der Zelloberfläche könnten dann notwendig werden. Sobald dies erfolgreich abgeschlossen wurde, können die Zellen ohne eigenes VEGF und mit exprimiertem Biosensor in eine Alginatsphäre gebracht werden und so ins Auge implantiert werden. Somit ist eine nicht invasive Diagnostik der subretinalen VEGF-Menge nach einmaliger Implantation möglich.

Da für die Therapie aber weiterhin regelmäßige, wenn auch hoffentlich weniger, Injektionen von VEGF-Antikörpern nötig sind, besteht in einem nächsten Schritt die Möglichkeit auch diese Antikörper von den implantierten Zellen herstellen zu lassen (Kauper et al. 2012). Dazu müsste ein weiteres Plasmid stabil transfiziert werden, welches für den Antikörper codiert. Da eine dauerhafte Expression der Antikörper nicht erwünscht ist, weil dadurch auch die physiologischen Eigenschaften des VEGF inhibiert würden, könnte die Expression zum Beispiel über ein TetOn-, TetOff-System oder durch ein anderes System zur regulierbaren Expression von außen gesteuert werden (Stieger et al. 2006; Gossen und Bujard 1992). Somit wäre auch die Therapie nichtinvasiv, bei gleicher einmaliger Implantation möglich. Schwieriger zu steuern wird die Therapie, wenn, wie in häufigen Fällen, beide Augen betroffen sind (Jager et al. 2008).

5 Zusammenfassung

Bei neovaskulären Krankheiten wie der altersassoziierten Makuladegeneration oder der diabetischen Retinopathie kommt es zu einer Überproduktion von VEGF im Bereich der Netzhaut. Durch Gefäßneubildungen oder erhöhte Exsudation kommt es zu Ablösungen der Netzhaut und zu massiven Einschränkungen des Sehvermögens. Die bisherige Therapie besteht unter anderem aus klonalen VEGF-Antikörpern, welche subretinal injiziert werden. Eine Messung der direkten Auswirkung und eine personalisierte Anpassung der Therapie ist dabei nicht möglich. Um einen neuen Biosensor zur VEGF-Messung im Auge nutzen zu können, war das Ziel der Arbeit daher eine Zelllinie zu etablieren, die kein eigenes VEGF produziert.

Der Gen-*Knockout* des VEGF ist mithilfe des CRISPR-Cas9 Systems erfolgt. Dazu wurden mehrere guideRNAs erstellt, welche die Cas9 Endonuklease spezifisch zur richtigen Basensequenz im Genom führen soll. Nach Klonierung der Guides in ein Plasmid, welches für Cas9 codiert, und Kontrolle der Ausführung, zeigten drei Guides eine gute Aktivität im Test mit dem NHEJ-Sensor. Nach Optimierung der Transfektionsund Selektionsbedingungen für die ausgewählten ARPE-19 Zellen wurde die Transfektion mit diesen drei Guides in verschiedenen Kombinationen durchgeführt.

Durch die Separation einzelner Zellklone wurden verschiedene Zelllinien etabliert, welche anschließend auf den erfolgreichen Gen-*Knockout* auf Proteinlevel kontrolliert wurden. Der dafür verwendete Sandwich-ELISA zeigte drei Zelllinien auf, bei denen das VEGF unter der Nachweisgrenze lag. Im Proliferationsassay zeigte sich keine Verminderung der Zellteilung im Vergleich mit den Wildtyp ARPE-19 Zellen.

In folgenden Schritten gilt es nun den VEGF-Biosensor auf der Zellmembran dieser Zellen zu verankern und die Zellen im Bereich der Augenhintergrundes immobilisiert dauerhaft zu kultivieren. Dann kann durch die Zugabe des Luciferasesubstrats jederzeit die aktuelle VEGF-Konzentration gemessen werden und die Therapie entsprechend angepasst werden.

6 Summary

Neovascular diseases like the age-related macular degeneration or the diabetic retinopathy come along with a pathological upregulation of VEGF in the area of the retina. The formation of new vessels and an increased exudation leads to a detachment of the retina and thereby to a loss of vision. Amongst others, the treatment of these diseases is composed of the subretinal injection of monoclonal antibodies targeting VEGF. A measurement of the direct impact and a personalized adjustment of the therapy is still not possible. The aim of this study was the creation of a cell line unable to express VEGF on its own, thereby allowing the use of a new biosensor detecting VEGF in the eye.

The CRISPR-Cas9 system was used to knockout the VEGF gene. Several guideRNAs were designed to guide the endonuclease Cas9 to the target sequence within the genome. They were cloned in a plasmid which also contains the coding sequence for Cas9, checked for the correct integration and tested for their activity using a custom made NHEJ biosensor. Three of these guides showed high activity and were subsequently used for the knockout strategy. The conditions for transfection and selection of the used ARPE-19 cells were optimized whereupon the transfection was carried out using three guideRNAs in different combinations.

After the transfection, single cell clones were separated and subsequently tested for the success of the knockout at protein level. The VEGF-sandwich-ELISA detected no VEGF expression in three cell lines. The proliferation assay showed no reduction of the cell division rate compared to wildtype ARPE-19 cells.

After finishing this study with the generation of the three VEGF-knockout cell lines, the VEGF-biosensor can be expressed on the surface of these cells. An immobilization of the cells and implantation in the eye opens the possibility of a noninvasive measurement of VEGF by only adding the substrate for the luciferase. Thus, the therapy could be individually adjusted for each patient.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
(d)dH ₂ O	(doppelt) destilliertes Wasser
٦°	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
μm	Mikrometer
ad	Bis
AMD	Altersassoziierte Makuladegeneration
AU	Absorptions-Units
bp	Basenpaare
BRET	Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer
Cas9	CRISPR assoziierte Endonuklease 9
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Diabetische Retinopathie
E. coli	Escherichia Coli
et al.	und andere
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HIF	Hypoxia Inducible Factor
IVOM	Intravitreale operative Medikamentengabe
КО	Knockout
L	Liter
Μ	Mol
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol

Abkürzung	Erklärung
ms	Millisekunden
ng	Nanogramm
NHEJ	Non-Homologous End Joining
nm	Nanometer
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Picogramm
RLuc	Renilla reniformis Luciferase
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	Umdrehungen pro Minute
scFab	single chain antigen-binding fragment
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp
xg	Mal Erdbeschleunigung

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: BRET-Spektrum	7 -
Abbildung 2: Gen-Knockout mit CRISPR/Cas9 und NHEJ	11 -
Abbildung 3: Plasmidkarte pGFP2	20 -
Abbildung 4: Plasmidkarte pRLuc8	21 -
Abbildung 5: Plasmidkarte pRLuc8GFP2	21 -
Abbildung 6: Plasmidkarte px459T0	22 -
Abbildung 7: Übersichtsplan der Zellkultur	35 -
Abbildung 8: Bindestellen der verschiedenen gRNAs	38 -
Abbildung 9: Restriktionskontrollverdau von px459	40 -
Abbildung 10: Sequenzierungsbeispiel nach Sanger Sequenzierung	41 -
Abbildung 11: NHEJ Biosensor	42 -
Abbildung 12: BRET-Assay	43 -
Abbildung 13: Optimierung der Transfektionsbedingungen	44 -
Abbildung 14: Puromycin Selektionskonzentration	45 -
Abbildung 15: Zellkultur der ARPE19-VEGF-KO	47 -
Abbildung 16: VEGF Sandwich-ELISA	48 -
Abbildung 17: Proliferationsassay	50 -
9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräteliste	13 -
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	14 -
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	15 -
Tabelle 4: Verwendete Enzyme	17 -
Tabelle 5: Verwendete Software	18 -
Tabelle 6: Verwendete Kit-Systeme	19 -
Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide	19 -
Tabelle 8: Ansatz des Restriktionsverdaus zur Vorbereitung der Ligation	27 -
Tabelle 9: Ansatz des Restriktionsverdaus zur Kontrolle	27 -
Tabelle 10: Hybridisierung der Guide-Inserts, sowie der Target-Inserts	28 -
Tabelle 11: Ligation der Guide-Inserts, sowie der Target-Inserts	29 -
Tabelle 12: Nachverdau des ligierten pRLuc8GFP2 lt1-7	29 -
Tabelle 13: Sequenzierungsansatz je Plasmid	30 -
Tabelle 14: Mengen der verschiedenen Transfektionsansätze	31 -
Tabelle 15: Sequenz der guideRNAs	38 -
Tabelle 16: Etablierte Zelllinien mit Zuordnung zum Transfektionsansatz	49 -

10 Literaturverzeichnis

Ahmad, Zuhaida Asra; Yeap, Swee Keong; Ali, Abdul Manaf; Ho, Wan Yong; Alitheen, Noorjahan Banu Mohamed; Hamid, Muhajir (2012): scFv antibody: principles and clinical application. In: *Clinical & developmental immunology* 2012, S. 980250. DOI: 10.1155/2012/980250.

Arcondéguy, Tania; Lacazette, Eric; Millevoi, Stefania; Prats, Hervé; Touriol, Christian (2013): VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. In: *Nucleic acids research* 41 (17), S. 7997–8010. DOI: 10.1093/nar/gkt539.

Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ); Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin (DEGAM); Deutsche Diabetes-Gesellschaft (DDG); Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM); Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG); Verband der Diabetesberatungs- und Schulungsberufe in Deutschland (VDBD) et al. (2015): Nationale Versorgungsleitlinie Prävention und Therapie von Netzhautkomplikationen bei Diabetes - Langfassung, 2. Auflage: Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF).

Aumüller, Gerhard; Wurzinger, Laurenz J. (2010): Anatomie. 2. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1055/b-002-46981.

Bertram, B. (2015): Altersabhängige Makuladegeneration AMD. Leitlinie Nr 21 Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e.V. Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft e.V. Online verfügbar unter https://www.dog.org/wpcontent/uploads/2009/09/Leitlinie-Nr-21-Altersabh%C3%A4ngige-Makuladegeneration-AMD-Stand-30-10-2015.pdf.

Borroto-Escuela, Dasiel O.; Flajolet, Marc; Agnati, Luigi F.; Greengard, Paul; Fuxe, Kjell (2013): Bioluminescence resonance energy transfer methods to study G protein-coupled receptor-receptor tyrosine kinase heteroreceptor complexes. In: *Methods in cell biology* 117, S. 141–164. DOI: 10.1016/B978-0-12-408143-7.00008-6.

Cai, Sophie; Bressler, Neil M. (2017): Aflibercept, bevacizumab or ranibizumab for diabetic macular oedema: recent clinically relevant findings from DRCR.net Protocol T. In: *Current opinion in ophthalmology* 28 (6), S. 636–643. DOI: 10.1097/ICU.000000000000424.

Chang, Howard H. Y.; Pannunzio, Nicholas R.; Adachi, Noritaka; Lieber, Michael R. (2017): Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 18 (8), S. 495–506. DOI: 10.1038/nrm.2017.48.

Crudele, Julie M.; Chamberlain, Jeffrey S. (2018): Cas9 immunity creates challenges for CRISPR gene editing therapies. In: *Nature communications* 9 (1), S. 3497. DOI: 10.1038/s41467-018-05843-9.

De, Abhijit; Loening, Andreas Markus; Gambhir, Sanjiv Sam (2007): An improved bioluminescence resonance energy transfer strategy for imaging intracellular events in single cells and living subjects. In: *Cancer research* 67 (15), S. 7175–7183. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4623.

DiSalvo, J.; Bayne, M. L.; Conn, G.; Kwok, P. W.; Trivedi, P. G.; Soderman, D. D. et al. (1995): Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor.placenta growth factor heterodimer. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (13), S. 7717–7723. DOI: 10.1074/jbc.270.13.7717.

Doyle, Alfred; McGarry, Michael P.; Lee, Nancy A.; Lee, James J. (2012): The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. In: *Transgenic research* 21 (2), S. 327–349. DOI: 10.1007/s11248-011-9537-3.

Dunn, K. C.; Aotaki-Keen, A. E.; Putkey, F. R.; Hjelmeland, L. M. (1996): ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. In: *Experimental eye research* 62 (2), S. 155–169. DOI: 10.1006/exer.1996.0020.

Ferrara, Napoleone; Gerber, Hans-Peter; LeCouter, Jennifer (2003): The biology of VEGF and its receptors. In: *Nature medicine* 9 (6), S. 669–676. DOI: 10.1038/nm0603-669.

Finnemann, S. C.; Bonilha, V. L.; Marmorstein, A. D.; Rodriguez-Boulan, E. (1997): Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (24), S. 12932–12937. DOI: 10.1073/pnas.94.24.12932.

Gossen, M.; Bujard, H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (12), S. 5547–5551. DOI: 10.1073/pnas.89.12.5547.

Heng, L. Z.; Comyn, O.; Peto, T.; Tadros, C.; Ng, E.; Sivaprasad, S.; Hykin, P. G. (2013): Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments. In: *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 30 (6), S. 640–650. DOI: 10.1111/dme.12089.

Jager, Rama D.; Mieler, William F.; Miller, Joan W. (2008): Age-related macular degeneration. In: *The New England journal of medicine* 358 (24), S. 2606–2617. DOI: 10.1056/NEJMra0801537.

Jasin, Maria; Haber, James E. (2016): The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair. In: *DNA repair* 44, S. 6–16. DOI: 10.1016/j.dnarep.2016.05.001.

Kauper, Konrad; McGovern, Cahil; Sherman, Sandy; Heatherton, Pam; Rapoza, Rob; Stabila, Paul et al. (2012): Two-year intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor by encapsulated cell technology implants in patients with chronic retinal degenerative diseases. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 53 (12), S. 7484–7491. DOI: 10.1167/iovs.12-9970.

Kocan, Martina; See, Heng B.; Seeber, Ruth M.; Eidne, Karin A.; Pfleger, Kevin D. G. (2008): Demonstration of improvements to the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technology for the monitoring of G protein-coupled receptors in live cells. In: *Journal of biomolecular screening* 13 (9), S. 888–898. DOI: 10.1177/1087057108324032.

Kumita, Wakako; Sato, Kenya; Suzuki, Yasuhiro; Kurotaki, Yoko; Harada, Takeshi; Zhou, Yang et al. (2019): Efficient generation of Knock-in/Knock-out marmoset embryo via CRISPR/Cas9 gene editing. In: *Scientific Reports* 9 (1), S. 12719. DOI: 10.1038/s41598-019-49110-3.

Lang, Gerhard K. (2004): Augenheilkunde. Verstehen - lernen - anwenden. 3., vollst. überbearb. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.

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

Loening, Andreas Markus; Wu, Anna M.; Gambhir, Sanjiv Sam (2007): Red-shifted Renilla reniformis luciferase variants for imaging in living subjects. In: *Nature Methods* 4 (8), S. 641–643. DOI: 10.1038/nmeth1070. Lone, Bilal Ahmad; Karna, Shibendra Kumar Lal; Ahmad, Faiz; Shahi, Nerina; Pokharel, Yuba Raj (2018): CRISPR/Cas9 System: A Bacterial Tailor for Genomic Engineering. In: *Genetics research international* 2018, S. 3797214. DOI: 10.1155/2018/3797214.

Maeder, Morgan L.; Gersbach, Charles A. (2016): Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. In: *Molecular Therapy* 24 (3), S. 430–446. DOI: 10.1038/mt.2016.10.

Muether, Philipp S.; Hermann, Manuel M.; Viebahn, Ulrike; Kirchhof, Bernd; Fauser, Sascha (2012): Vascular endothelial growth factor in patients with exudative age-related macular degeneration treated with ranibizumab. In: *Ophthalmology* 119 (10), S. 2082–2086. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.07.041.

Pauleikhoff, D. (2014): Die Anti-VEGF-Therapie bei der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration: Therapeutische Strategien. Stellungnahme der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, der Retinologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands. Online verfügbar unter http://cms.augeninfo.de/fileadmin/stellungnahmen/Anti-VEGF-

Therapie_bei_der_neovask_Therapeut_Strategie.pdf.

Pfleger, Kevin D. G.; Seeber, Ruth M.; Eidne, Karin A. (2006): Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. In: *Nature protocols* 1 (1), S. 337–345. DOI: 10.1038/nprot.2006.52.

Pritchard-Jones, R. O.; Dunn, D. B. A.; Qiu, Y.; Varey, A. H. R.; Orlando, A.; Rigby, H. et al. (2007): Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. In: *British journal of cancer* 97 (2), S. 223–230. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603839.

Rago, Carlo; Vogelstein, Bert; Bunz, Fred (2007): Genetic knockouts and knockins in human somatic cells. In: *Nature protocols* 2 (11), S. 2734–2746. DOI: 10.1038/nprot.2007.408.

Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Wright, Jason; Agarwala, Vineeta; Scott, David A.; Zhang, Feng (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. In: *Nature protocols* 8 (11), S. 2281–2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143.

Sachsenweger, Matthias; Klauß, Volker (2003): Augenheilkunde. [Online-Ausg.], 2., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1055/b-002-10325.

Savić, Nataša; Schwank, Gerald (2016): Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. In: *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 168, S. 15–21. DOI: 10.1016/j.trsl.2015.09.008.

Sentmanat, Monica F.; Peters, Samuel T.; Florian, Colin P.; Connelly, Jon P.; Pruett-Miller, Shondra M. (2018): A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing. In: *Scientific Reports* 8 (1), S. 888. DOI: 10.1038/s41598-018-19441-8.

Sheu, Shwu-Jiuan; Chen, Jiunn-Liang; Bee, Youn-Shen; Chen, Yi-An; Lin, Shi-Han; Shu, Chih-Wen (2017): Differential autophagic effects of vital dyes in retinal pigment epithelial ARPE-19 and photoreceptor 661W cells. In: *PLoS ONE* 12 (3). DOI: 10.1371/journal.pone.0174736.

Shi, Junwei; Wang, Eric; Milazzo, Joseph P.; Wang, Zhihua; Kinney, Justin B.; Vakoc, Christopher R. (2015): Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. In: *Nature biotechnology* 33 (6), S. 661–667. DOI: 10.1038/nbt.3235.

Shweiki, D.; Itin, A.; Soffer, D.; Keshet, E. (1992): Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. In: *Nature* 359 (6398), S. 843–845. DOI: 10.1038/359843a0.

Simons, Michael; Gordon, Emma; Claesson-Welsh, Lena (2016): Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17, 611 EP -. DOI: 10.1038/nrm.2016.87.

Stepanenko, Aleksei A.; Heng, Henry H. (2017): Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. In: *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 773, S. 91–103. DOI: 10.1016/j.mrrev.2017.05.002.

Stieger, Knut; Le Meur, Guylène; Lasne, Françoise; Weber, Michel; Deschamps, Jack-Yves; Nivard, Delphine et al. (2006): Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. In: *Molecular Therapy* 13 (5), S. 967–975. DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.12.001.

Strauss, Olaf (2005): The retinal pigment epithelium in visual function. In: *Physiological reviews* 85 (3), S. 845–881. DOI: 10.1152/physrev.00021.2004.

Strauss, Olaf (2011): Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. The Retinal Pigment Epithelium. Hg. v. Helga Kolb, Eduardo Fernandez und Ralph Nelson. Salt Lake City (UT).

Strauss, Olaf (2016): Pharmacology of the retinal pigment epithelium, the interface between retina and body system. In: *European journal of pharmacology* 787, S. 84–93. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.03.066.

Wenkel, H.; Streilein, J. W. (2000): Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 41 (11), S. 3467–3473.

Wimmer, Tobias (2018): Entwicklung eines Systems zur Kontrolle des "Vascular Endothelial Growth Factor" Spiegels im Auge. Dissertation. JLU Gießen.

Wimmer, Tobias; Lorenz, Birgit; Stieger, Knut (2015): Functional Characterization of AAV-Expressed Recombinant Anti-VEGF Single-Chain Variable Fragments In Vitro. In: *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 31 (5), S. 269–276. DOI: 10.1089/jop.2014.0125.

Wimmer, Tobias; Schroeter, Eva; Lorenz, Birgit; Stieger, Knut (2017): Detection of the Vascular Endothelial Growth Factor with a Novel Bioluminescence Resonance Energy Transfer Pair Using a Two-Component System. In: *Sensors (Basel, Switzerland)* 17 (1). DOI: 10.3390/s17010145.

Woolard, Jeanette; Wang, Wen-Ying; Bevan, Heather S.; Qiu, Yan; Morbidelli, Lucia; Pritchard-Jones, Rowan O. et al. (2004): VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. In: *Cancer research* 64 (21), S. 7822–7835. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0934.

Wu, Jing-Biao; Tang, Ya-Ling; Liang, Xin-Hua (2018): Targeting VEGF pathway to normalize the vasculature: an emerging insight in cancer therapy. In: *OncoTargets and therapy* 11, S. 6901–6909. DOI: 10.2147/OTT.S172042.

Yamamoto, Takashi (Hg.) (2015): Targeted genome editing using site-specific nucleases. ZFNs, TALENs, and the CRISPR/Cas9 system. Tokyo: Springer.

Yamazaki, Yasuo; Matsunaga, Yukiko; Tokunaga, Yuko; Obayashi, Shinya; Saito, Mai; Morita, Takashi (2009): Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-Fs) Exclusively Vary Their Structures and Functions among Species S. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (15), S. 9885–9891. DOI: 10.1074/jbc.M809071200. Yan, Hong-Bin; Smout, Michael J.; Ju, Chuan; Folley, Anne E.; Skinner, Danielle E.; Mann, Victoria H. et al. (2018): Developmental Sensitivity in Schistosoma mansoni to Puromycin To Establish Drug Selection of Transgenic Schistosomes. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (8). DOI: 10.1128/AAC.02568-17.

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

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

11 Erklärung zur Dissertation

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der die Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Ort, Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Zuerst möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger für die Überlassung des Themas und die ausführliche Betreuung bedanken. Durch die offene und unterstützende Art war die Zeit sehr angenehm. Die Empfehlung meiner Vorgänger (von Philipp, Lennart und Eva) kann ich nur bestätigen.

Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz danke ich herzlich für die Bereitstellung der Labor- und Büroräume.

Ein großer Dank geht an Herrn (jetzt Dr.) Tobias Wimmer. Die tolle Vorplanung und ständige Hilfe bei Fragen und im Labor, sowie die netten Gespräche bei Musik oder Frischluft haben sehr geholfen und diese Arbeit deutlich erleichtert.

Ein weiterer Dank geht an Frau Annabella Janise-Libawski für die regelmäßige Hilfe vor allem im Labor und die interessanten Diskussionen.

Weiterhin möchte ich Herrn PD Dr. Markus Preising, Frau Dr. Brigitte Müller und Frau Constanze Stumpf für die Unterstützung und die Beantwortung vieler Fragen danken.

Vielen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter:innen im Labor und Büro. Vor allem an meine beiden direkten Mitstreiter Christian und David, sowie dem Büround Mensateam Maria, Malte, Julia, Astrid, Mia und Annabelle. Mit netten Leuten, die mithelfen und mitdenken arbeitet es sich gleich leichter.

Für die Rechtschreibkorrektur und die vielen Anmerkungen einen herzlichen Dank an Lukas Engelke.

Schließlich geht mein Dank an meine Eltern, die mich auch nach dem Studium weiter unterstützten und mir diese "Freizeit" vor dem ärztlichen Arbeitsleben erst ermöglicht haben.