

Etablierung eines Testsystems zum Studium der Mutationsreparatur von XLRP *in vitro*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereiches Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Eva Moennig

(geb. Naumann)

aus Gießen

Gießen, 2016

Aus dem Labor für molekulare Ophthalmologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Abteilung Augenheilkunde

Leiter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Stieger

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Dettmeyer

Tag der Disputation: 10. Februar 2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Auge	1
1.1.1	Die Netzhaut	1
1.1.2	Die Photorezeptoren	2
1.2	Retinitis pigmentosa	4
1.3	XLRP	6
1.4	RPGR	7
1.5	Tiermodelle	10
1.5.1	Mausmodell	10
1.5.2	Hundemodell	11
1.6	Therapie	12
1.6.1	Genaddition bei autosomal rezessiv vererbter RP	12
1.6.2	<i>Gene silencing</i> Therapie bei autosomal dominanter RP	12
1.6.3	<i>Targeted Gene Alteration</i>	14
1.7	Zellzyklusphasen	14
1.8	DNA-Reparaturmechanismen	15
1.9	Endonukleasen	18
1.9.1	Homing-Endonukleasen	18
1.9.2	Zinkfinger-Nukleasen	19
1.9.3	TALEN	20
1.9.4	CRISPR/Cas9	21
1.10	Ziel der Arbeit	24
2	Material.....	25
2.1	Chemikalien	25
2.2	Enzyme	26
2.3	Puffer	26
2.4	Kits	26
2.5	DNA- Größenstandards	27
2.6	Verwendete Medien, Puffer und Lösungen	28
2.7	Geräte	30
2.8	Biologische Materialien	31
2.8.1	Vektoren und Plasmide.....	31
2.8.2	Primer	37

2.8.3	Zelllinien.....	37
2.8.4	<i>E. coli</i> -Stämme	37
3	Methoden.....	39
3.1	Zellbiologische Methoden	39
3.1.1	Zellkultur	39
3.1.2	Kryokonservierung von Zellen.....	40
3.1.3	Auftauen von Zellen	40
3.1.4	Auszählen von Zellen	41
3.2	Immortalisierung primärer Zellen	41
3.2.1	Spontane Immortalisierung	41
3.2.2	Benzo[a]pyren	41
3.2.3	Large-T-Antigen.....	42
3.2.4	UV-Licht.....	42
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	42
3.3.1	Die Polymerase-Kettenreaktion PCR.....	42
3.3.2	T7 Assay.....	44
3.3.3	Übernachtskulturen	47
3.3.4	Isolierung von Plasmid-DNA	47
3.3.5	Isolierung von Plasmid-DNA mit Maxi-Prep.....	47
3.3.6	Agarosegelelektrophorese	47
3.3.7	DNA-Extraktion aus Agarosegel.....	48
3.3.8	Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentration.....	48
3.3.9	Enzymatische Hydrolyse (Restriktion).....	49
3.3.10	Dephosphorylieren von DNA.....	49
3.3.11	Ligation mit T4-Ligase.....	49
3.3.12	InFusion-Klonierung	50
3.3.13	DNA-Sequenzierung	52
3.3.14	Herstellung von Glycerin-Stocks	52
3.3.15	Herstellung elektrokompenter Zellen	52
3.3.16	Transformation elektrokompenter Zellen.....	53
3.3.17	Transfektion.....	53
3.4	Legende zum Ergebnisteil.....	54
4	Ergebnisse.....	55
4.1	Immortalisierung	55
4.1.1	Lymphozyten	55
4.2	KM-Zellen	65
4.2.1	Entnahme	65
4.2.2	Behandlung.....	65
4.3	Generierung des murinen RPGR-Modells in humaner Standardzelllinie... 68	
4.4	Klonierung.....	71

4.5	Zellkultur.....	73
4.6	Charakterisierung/Morphologie	75
4.7	Nachweis der Integration.....	77
4.7.1	PCR und Sequenzierung.....	77
4.7.2	T7 Assay	80
5	Diskussion	83
5.1	Herstellung einer primären Zelllinie	84
5.2	Herstellung HEK Flp-In-RPGR^{ORF15}-Zelllinie	86
5.3	Ausblick	90
6	Zusammenfassung	91
7	Summary.....	92
8	Anhang	93
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	93
8.2	Abbildungsverzeichnis	94
8.3	Tabellenverzeichnis	96
9	Literaturteil	97
10	Erklärung	102
11	Danksagung	103

1 Einleitung

1.1 Das Auge

Das menschliche Auge ist ein Sinnesorgan zur Wahrnehmung von optischen Reizen. Es ist aufgebaut aus einem optischen Apparat, der optische Reize aufnimmt und einem sensorischen Teil, der die optischen Reize in eine Sinneswahrnehmung umwandelt.

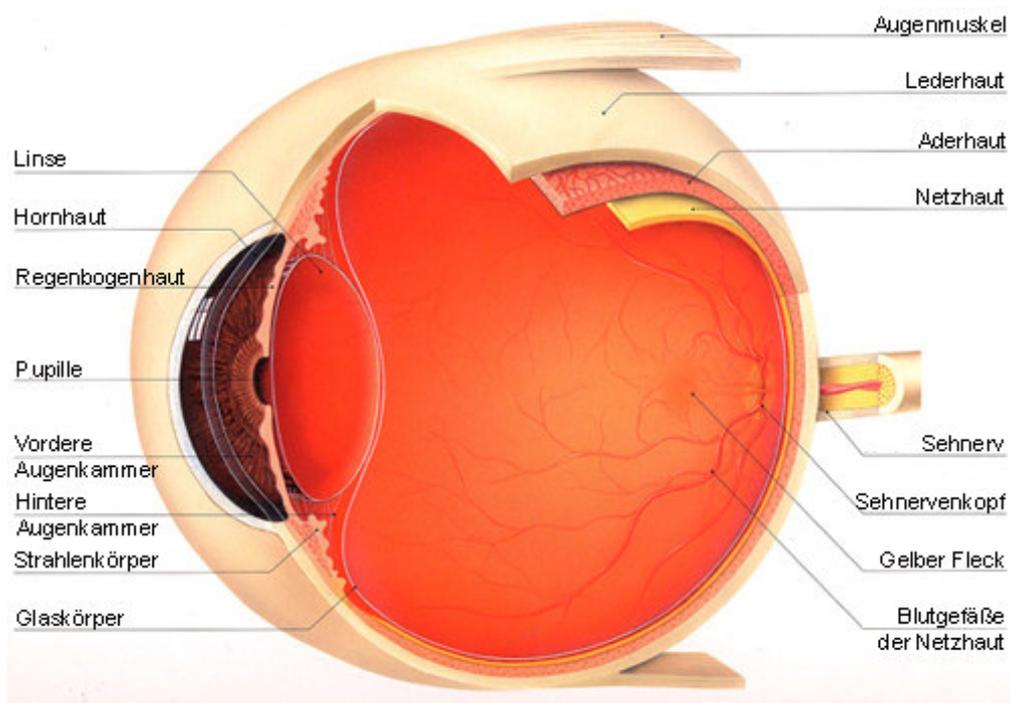


Abb. 1 Aufbau des Auges

(Quelle Augenteam.de)

1.1.1 Die Netzhaut

Die Netzhaut des menschlichen Auges gehört entwicklungs geschichtlich zusammen mit dem Nervus opticus zum Diencephalon. Sie besteht aus zwei Teilen, der lichtunempfindlichen Pars caeca retinae und der lichtempfindlichen Pars optica retinae. Beide gehen an der Ora serrata, dem gezackten Rand ineinander über. Die Pars optica retinae liegt dem Pigmentepithel und der Uvea auf und wird durch den Innendruck des Auges an diesen fixiert. Die Pars optica retinae enthält die Sinnes-, Nerven- und Stützzellen

und ist entwicklungsgeschichtlich ein vorgelagerter Hirnteil. Sie ist an unterschiedlichen Stellen unterschiedlich dick. So ist sie in der Fovea centralis retinae, der Stelle des schärfsten Sehen besonders dünn, an der Lamina cribrosa, dem Sehnerveneintritt, hingegen besonders dick. (Vergleiche M. Schünke: Lernatlas der Anatomie Prometheus Kopf und Neuroanatomie, Thieme, Stuttgart 2006; Pschyrembel 259. Auflage, de Gruyter, Berlin, September 2001)

Die Netzhaut wird aus unterschiedlichen Zellschichten aufgebaut. Im Einzelnen handelt es sich um die Ganglienzellen, die innere plexiforme Zone, die Bipolarzellen, die Horizontalzellen und die amakrinen Zellen, sowie die äußere plexiforme Zone, die Photorezeptoren und das Retinale Pigmentepithel. Eine Übersicht hierüber gibt Abb. 2.

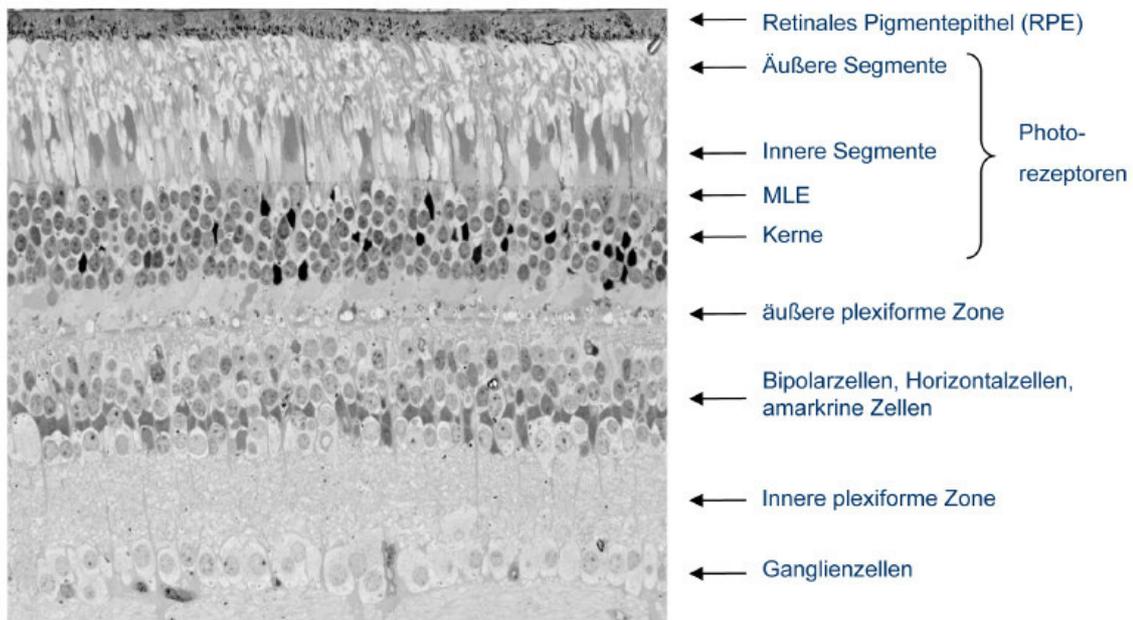


Abb. 2 Histologischer Schnitt durch die Retina

(Prof Stieger, Augenklinik Gießen)

1.1.2 Die Photorezeptoren

Das menschliche Auge besitzt zwei Typen Photorezeptoren. Man unterscheidet zwischen Stäbchen (Rod) und Zapfen (Cone), die sowohl in der Rezeptordichte, ihrer Lokalisation und in ihrer Funktion stark voneinander abweichen. So gibt es ca. 120 Millionen Stäbchen, jedoch nur ca. 6 Millionen Zapfen. Die Stäbchen sind bis auf den Bereich der zentralen Retina in der gesamten Netzhaut zu finden. Die höchste Dichte an Stäbchen findet man bei 5 und 10 Grad Entfernung vom Zentrum und ihre Funktion ist das farb-

lose Sehen bei schlechten Lichtverhältnissen, wie z.B. beim Nachtsehen [1]. Die Zapfen hingegen sind für das chromatische Sehen verantwortlich. Es wird zwischen drei Zapfentypen unterschieden (S-, M-, und L-Zapfen) abhängig von ihrem Chromophor. Zapfen kommen als einzige Photorezeptoren in der Fovea, dem Punkt des schärfsten Sehens, vor und ihre Zahl nimmt zur Peripherie hin ab [1, 2].

Beide Photorezeptoren sind aus einem Außen (OS)- und einem Innensegment (IS) aufgebaut, welche durch das *Connecting Cilium* (CC) miteinander verbunden sind. Das OS der Stäbchen besteht aus Membranscheiben (Discs), in deren Lipiddoppelschichten der Sehfärbstoff Rhodopsin eingelagert ist. Die Zapfen hingegen zeigen Membraneinfaltungen, in welche jeweils eines der drei Zapfenopsine eingelagert ist. Die Außensegmente stehen mit dem Pigmentepithel in Kontakt. Das IS enthält die Mitochondrien und ist wichtig für den Intraflagellaren Transport. (Vergleiche Physiologie des Menschen, Schmidt, Lang, Thews, Springer-Verlag, Heidelberg 2004)

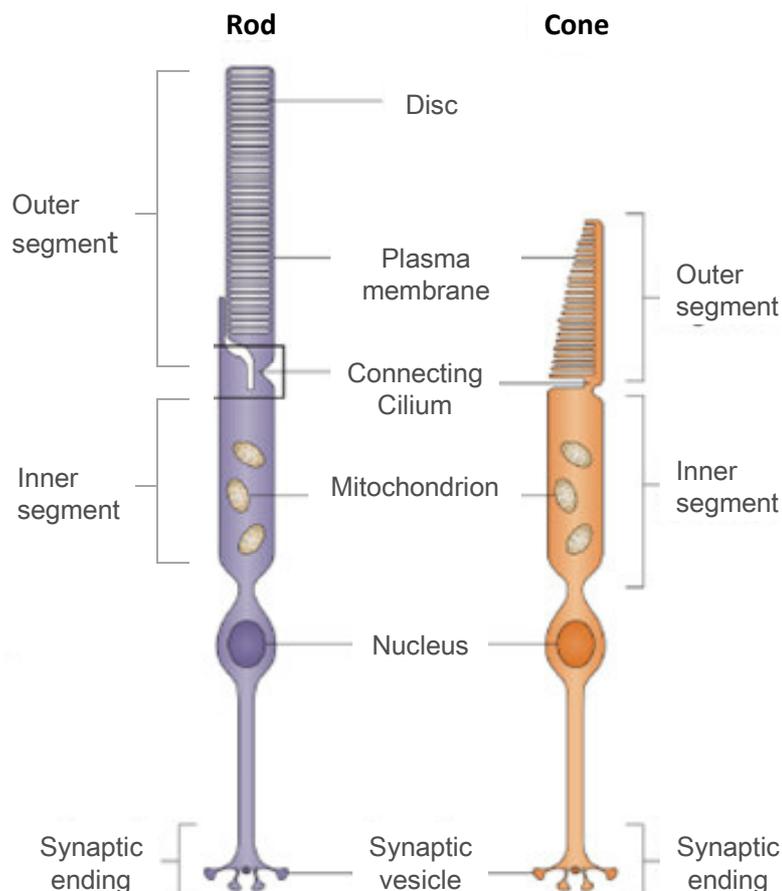


Abb. 3 Schematische Darstellung der Photorezeptoren
(modifiziert nach [3])

1.2 Retinitis pigmentosa

Der Begriff Retinitis Pigmentosa steht für eine Gruppe erblicher Erkrankungen der Retina und zählt zu einer Untergruppe der Retinalen Dystrophien.

Der Überbegriff Retinale Dystrophien schließt die Retinitis pigmentosa, die Zapfen-Stäbchen-Dystrophie, die Zapfen-Dystrophie und die Syndromalen Dystrophien ein (Vergleiche Abb. 4). All diese Dystrophien führen charakteristischerweise zur Degeneration und Funktionsverlust von Photorezeptoren und retinalem Pigmentepithel (RPE) [4].

Die Einteilung erfolgt danach, welche Photorezeptoren primär betroffen sind [5] und in welchem Alter (*Age of Onset*) die Patienten symptomatisch werden.

Die Retinitis pigmentosa tritt mit einer Prävalenz von 1:4000 auf und ist damit die häufigste Ursache für eine vererbte visuelle Beeinträchtigung [5]. Sie kann autosomal rezessiv (AR), autosomal dominant (AD) oder x-chromosomal rezessiv (XL) vererbt werden.

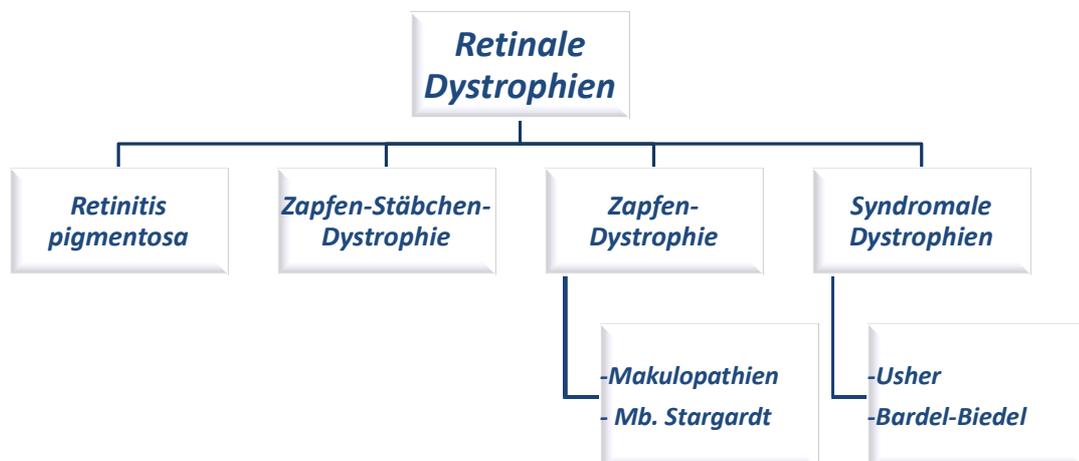


Abb. 4 Übersicht über die Retinalen Dystrophien mit Beispielen

Diese Einteilung dient zur Übersicht, ist aber keinesfalls bindend. Die einzelnen Dystrophien können überlappen.

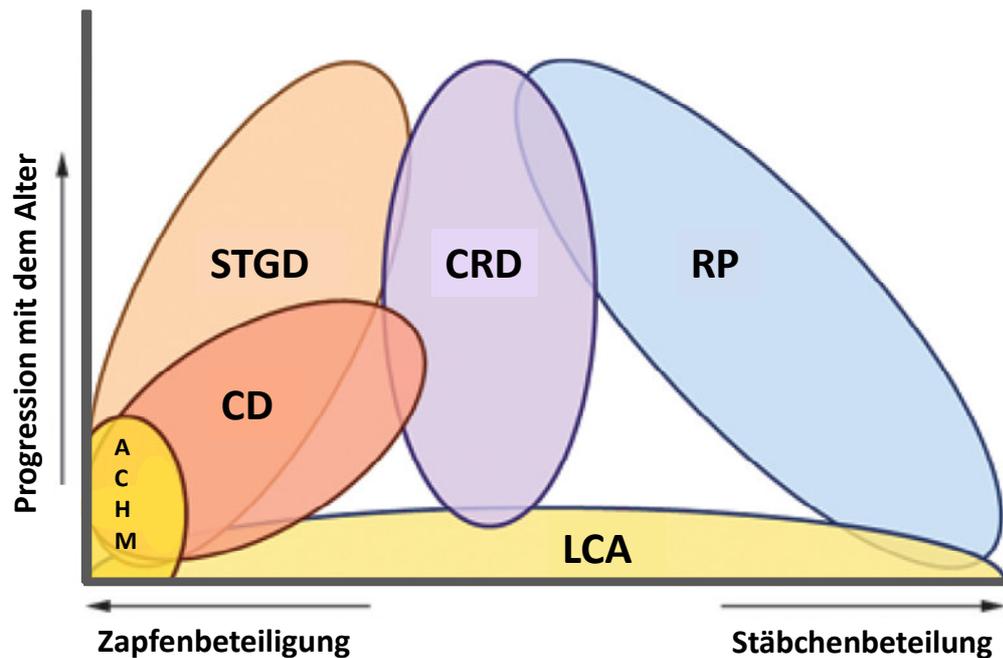


Abb. 5 Phänotypisches Überlappen von autosomal rezessiven Netzhautdystrophien in Bezug auf das Lebensalter

STGD: Mb. Stargardt, CRD: *Cone-Rod-Dystrophy*, RP: Retinitis pigmentosa; CD: *Cone-Dystrophy*, ACHM: Achromatopsie, LCA: Lebersche Kongenitale Amaurose (geändert nach Den Hollander 2010)

Die typischen Symptome der RP sind durch den Stäbchenverlust bedingt. Hierzu zählen Schwierigkeiten bei der Dunkeladaptation, Nachtblindheit und Gesichtsfeldeinschränkung bis hin zu Tunnelblick und Erblindung [6]. Zeitpunkt und Ausmaß der Krankheit sind sehr variabel [6, 7]. So klagten einige Patienten bereits in der 2. und 3. Lebensdekade über Sehverlust während andere erste Symptome im mittleren Lebensalter feststellen [1, 6]. Viele Betroffene klagten erst dann über eine Reduktion der Sehschärfe, wenn bereits bis zu 90% der Zapfen verloren sind [8]. Im späteren Krankheitsverlauf der RP kommt es dann auch zur Degeneration der Zapfen [6].

Typisch für die RP in einer späten Krankheitsphase sind die sogenannten „Knochenbälkchen“, die man bei der Funduskopie in der Peripherie sehen kann [1]. Hierbei handelt es sich um migrierte RPE-Zellen, die sich entlang von retinalen Gefäßen angesiedelt haben und dort extrazelluläre Matrix absondern [9].



Abb. 6 Funduskopiebilder

A Normalbefund einer Funduskopie bei einem 27-jährigen Probanden.

(Geändert nach Lorenz et al. 2010)

B Pathologisch veränderter Augenhintergrund bei einer 17-jährigen Patientin mit x-chromosomaler RP durch Mutation im RPGR-Gen. In der Peripherie sind deutlich Knochenbälkchen zu erkennen, die durch migrierte RPE-Zellen und deren Proteinablagerungen entstanden sind.

(Geändert nach Hosch et al. 2011)

1.3 XLRP

Die x-chromosomale Form der Retinitis Pigmentosa (XLRP) ist klinisch eine der schwersten Formen der RP mit einsetzender Blindheit bereits in der ersten Lebensdekade. Es kommt frühzeitig zu einem Verlust der Stäbchen- und Zapfenfunktion, sodass bereits in jungem Alter die Sehschärfe, das Gesichtsfeld und das Nachtsehen reduziert sind. Im Elektretinogramm (ERG) betroffener Menschen lassen sich hier nur ca. 10 % der Normalaktivität von Stäbchen und Zapfen messen [10]. Die XLRP wird am häufigsten durch Mutationen im RPGR-Gen verursacht. Diese Mutationen sind in 80 % der Fälle in der ORF15-Region des RPGR-Gens lokalisiert [11]. Da es sich um einen x-chromosomalen Erbgang handelt, sind fast ausschließlich männliche Patienten betroffen, von denen etwa 50 % im Alter von 35 Jahren nur noch eine Sehschärfe von 50 % zeigen und von denen 75 % im Alter von 60 Jahren bereits vollständig erblindet sind [12].

1.4 RPGR

RPGR steht für Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator Protein [13]. Dieses Protein ist ein integraler Bestandteil des *Connecting Cilium* (CC), welches wiederum eine wichtige Funktion im directionalen Transport von Proteinen in Photorezeptoren hat. Das CC zählt zu den spezialisierten nicht-motilen sensorischen Cilien mit der typischen 9 + 0-Struktur und transportiert Proteine in einem hochkomplizierten Mechanismus vom inneren zum äußeren Segment der Photorezeptoren [1]. Wahrscheinlich spielt das RPGR auch eine Rolle in dieser ciliären Funktion [13]. RPGR interagiert mit einer Vielzahl an ciliären Proteinen und den intraflagellaren Transportproteinen (IFT), seine genaue Funktion ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. [1, 14]

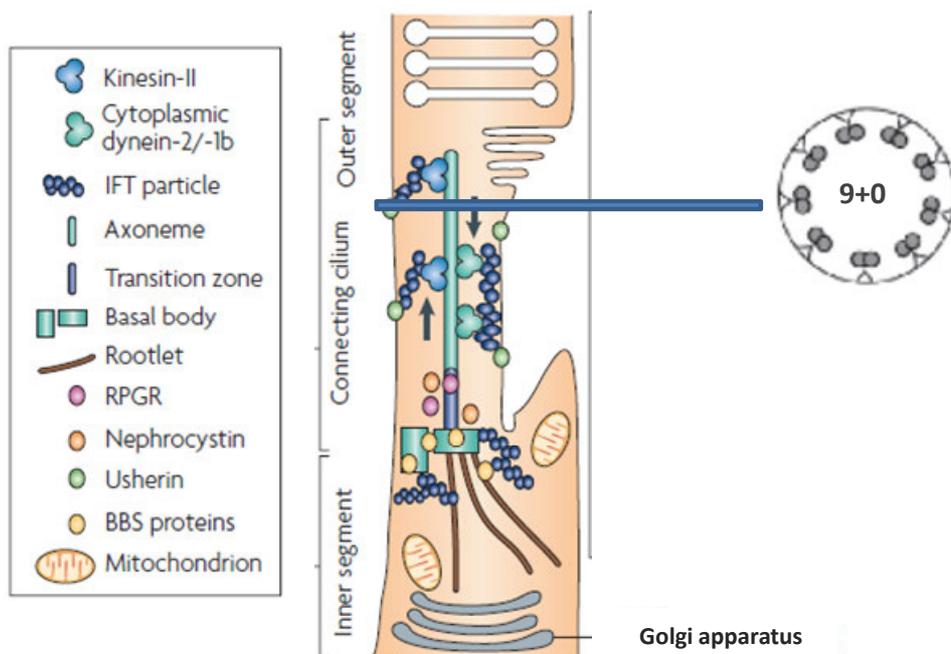


Abb. 7 Schematische Darstellung eines Photorezeptors mit dem CC

Das CC enthält das Axonem und das RPGR. Der Querschnitt durch das CC zeigt zudem die typische 9 + 0-Struktur. (Geändert nach [15])

Das RPGR-Gen umfasst 172 Kilobasen und liegt auf Chromosom Xp21.1 [16, 17]. Neben vielen alternativen Splicevarianten gibt es zwei Hauptsplicevarianten des RPGR: RPGR^{ex1-19} und RPGR^{ORF15} (ORF steht für *open reading frame*) [17, 18]. Während das kodierte Protein von RPGR^{ex1-19} in verschiedenen Zellen im gesamten Körper vorkommt, ist die RPGR^{ORF15}-Variante photorezeptorspezifisch [1, 17, 18].

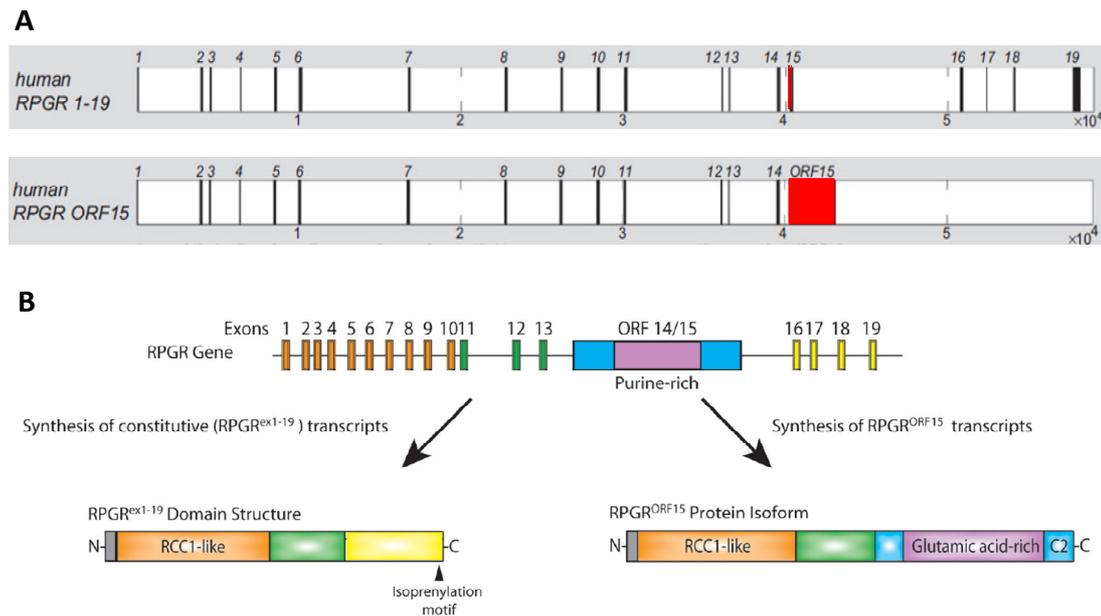


Abb. 8 Schematische Darstellung der genomischen Struktur der RPGR Hauptsplizevarianten

A Anteil des ORF 15 Exons in RPGR^{ex1-19} und RPGR^{ORF15} (geändert nach Hosch et al. 2011)

B Alternatives Splicing (geändert nach Wright et al. 2011)

Etwa 80 % der zur RP führenden Mutationen liegen in der ORF15-Region des RPGR-Gens, weshalb diese auch als „*mutational hot-spot*“ bezeichnet wird [11] [17].

Die Wildtyp-Sequenz der ORF15-Domäne ist reich an Glutaminsäure im Wechsel mit Glycin als repetitives Motiv, welches spezieübergreifend erhalten ist [17]. Da dieses Exon das letzte Exon des Gens ist, führen hier Nonsense-Mutationen nicht zu einem Abbruch der Gensequenz (*nonsense mediated decay*). Es kommt vielmehr zu teilweise großen Alterationen im C-terminalen Ende durch *frame-shift* und oder kleinen *out-of frame* Deletionen.

Die Alterationen des C-terminalen Endes korrelieren mit der Schwere der Pathologie [11].

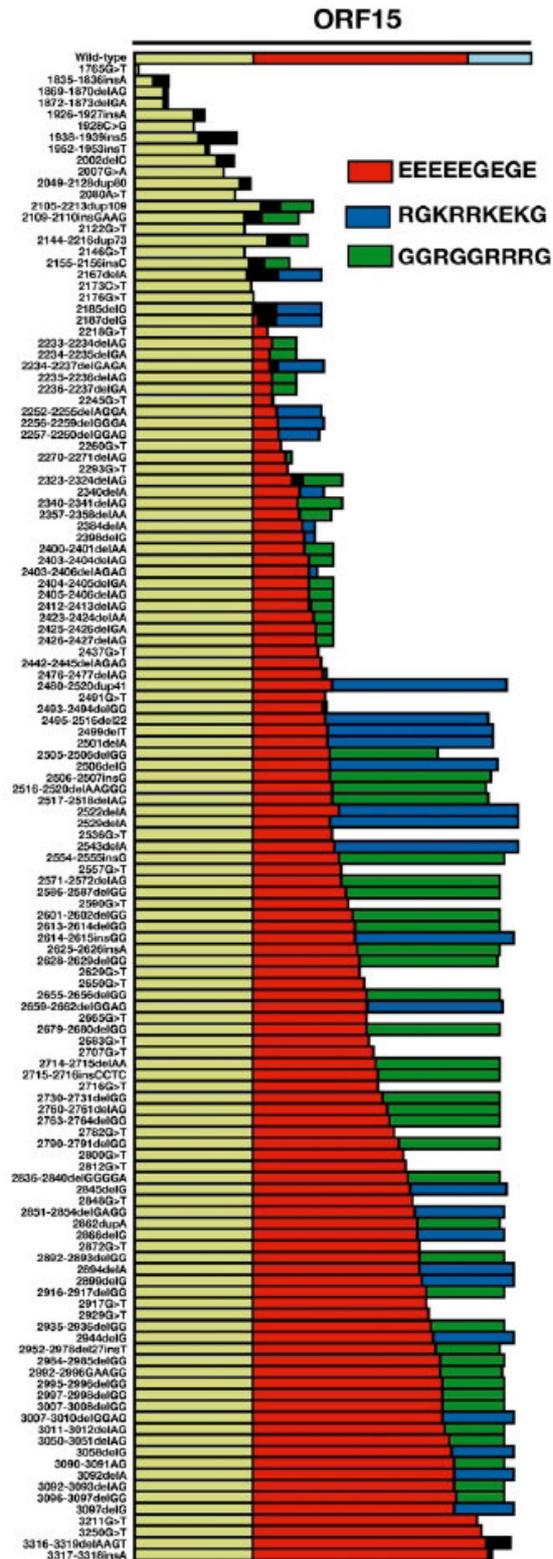


Abb. 9 Darstellung des C-terminalen Bereichs bei Patienten mit Mutationen im ORF 15

Der rote Balken steht für die Normalsequenz, der blaue Balken für den 1-Basen-Shift und der grüne Balken für den 2-Basen-Shift. Es wird vermutet, dass die unterschiedlichen Längen des terminalen Endes Einfluss auf den Phänotyp haben.

(Übernommen aus [11])

1.5 Tiermodelle

1.5.1 Mausmodell

Es gibt bereits einige Mausmodelle zur RP aufgrund von Mutationen im RPGR-Gen. So entwickelten Hong et al. in 2000 eine RPGR-defiziente Knock-out-Maus. Diese Mäuse zeigten in den Zapfen ein ektopisches Vorkommen von Rhodopsin in Zellkörper und Zellsynapsen und die Stäbchen wiesen ein reduziertes Rhodopsinlevel auf. Dies ist ein Ausdruck dafür, dass das RPGR eine wichtige Funktion im gerichteten Transport im CC hat und essentiell für die Viabilität der Photorezeptoren ist [19]. In den Jahren 2004 und 2005 entwickelte dieselbe Arbeitsgruppe zwei weitere Mausmodelle. Zunächst 2004 ein Mausmodell, welches ein verkürztes RPGR^{ORF15} exprimiert und 2005 wurde dieses verkürzte RPGR^{ORF15} genutzt, um bei einem Knock-out-Modell die Proteinfunktion wieder herzustellen [20].

Eine andere Arbeitsgruppe um Brunner entwickelte 2008 ein Mausmodell, bei dem das Wildtyp-RPGR-Gen überexprimiert wird [21]. Bei dem Mausmodell 2010 gelang es, Exon 4 zu deletieren ohne das Leseraster zu verschieben und auch hier konnte die Mislokation von Rhodopsin gezeigt werden [22].

Die Mausmodelle wurden designt, um die Eigenschaften des betroffenen Proteins zu erforschen, konnten aber die reale Situation der Genmutation nicht zufriedenstellend simulieren [14].

Die Arbeitsgruppe um Prof. Stieger entwickelte 2010 ebenfalls ein Mausmodell B6J.Sv129-Rpgr^{tm1Sti}. Es wurden drei Mutationen in die ORF15-Region integriert, die bei den Mäusen klinisch zur Ausprägung einer retinalen Dystrophie führte, die der RP beim Menschen entspricht. Es handelt sich hierbei um eine Adenin-Deletion an Position 2793, und zwei Substitutionen an Position 2650 eines Cytosins und an Position 3071 eines Thymins. Zusätzlich wurde eine I-SceI-Schnittstelle in unmittelbarer Nähe zu den drei Mutationen geschaffen, um hier eine von extern ansteuerbare Schnittstelle für spätere Therapie-Konzepte zu haben [14].

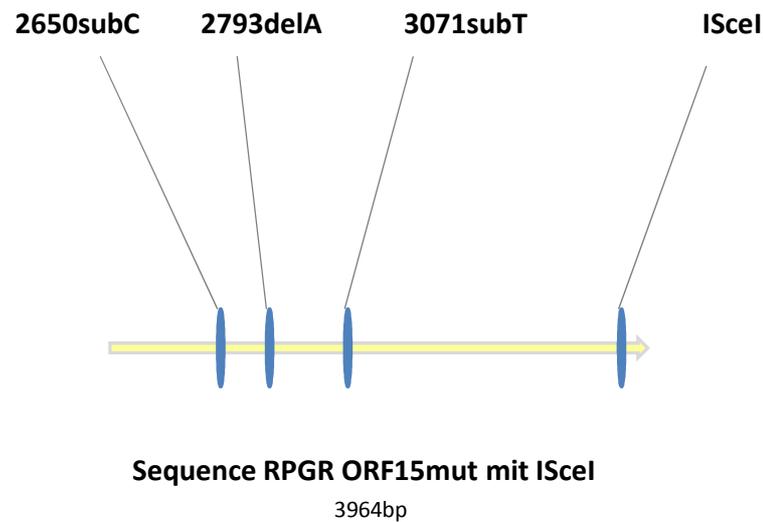


Abb. 10 RPGR ORF15-Sequenz im Mausmodell

RPGR ORF15-Sequenz mit den 3 zur Ausprägung der RP führenden Mutationen und der zusätzlichen I-SceI-Schnittstelle im Mausmodell B6J Sv129-Rpgr^{tm1Sti}

1.5.2 Hundemodell

Für die x-chromosomale RP ist zurzeit der Hund das einzig bekannte und natürlich vorkommende Tiermodell. Die der X-chromosomalen RP beim Hund entsprechende Krankheit heißt x-chromosomale progressive Retinaatrophie (XLPRA) und wird nach 2 Phentypen unterschieden: XLPRA 1 und XLPRA 2 [23, 24].

XLPRA 1 wurde beim Sibirischen Husky und bei dem Samojuden gefunden und wird durch die Deletion von 5 Nukleotiden im RPGR^{ORF15} verursacht [23, 25]. Dies führt zu einem vorzeitigen Stopcodon und damit zu einem fehlerhaften Protein [24, 25]. Trotz des fehlerhaften Proteins entwickeln sich die Stäbchen zunächst normal. Erst im jungen Erwachsenenalter der Tiere zeigen sich erste Anomalien und Degenerationen der Stäbchen. Die Zapfen sind auch im späteren Krankheitsverlauf nur gering mitbetroffen [24].

Bei der XLPRA 2 hingegen kommt es durch eine Deletion von zwei Nukleotiden zu einer „toxic gain of function“. Das hier hergestellte Protein hat einen toxischen Einfluss auf die Zelle. Die Degeneration der Photorezeptoren beginnt hier sehr früh im Alter von 4 Monaten und das Endstadium ist bereits im Alter von zwei Jahren erreicht. Im Gegensatz zu der XLPRA 1 ist hier auch die Morphologie der Photorezeptoren gestört [24, 26].

1.6 Therapie

Bis zum heutigen Tag gibt es keine kausale Behandlung der RP. Verschiedene Maßnahmen wie z. B. Elektrostimulation der Retina, biogene Stimulatoren wie Frischzellen oder Placenta-Implantationen, durchblutungssteigernde Methoden, aber auch Operationen zum Stoppen der progredient verlaufenden Krankheit blieben bis jetzt erfolglos (siehe www.pro-retina.de, Bisherige Therapie). Vielversprechend erscheinen hier die gentherapeutischen Ansätze. So konnten z.B. für die LCA 2, die durch Mutationen im RPE65-Gen verursacht wird, Therapieerfolge im Mausmodell [27, 28], Hundemodell [29, 30] und bereits in klinischen Versuchen am Menschen [31] erzielt werden. Wird eine Gentherapie in Betracht gezogen, muss man sich zunächst vor Augen führen, ob eine Mutation vorliegt, die zur Folge hat, dass z. B. ein Protein fehlt oder funktionslos geworden ist, oder ob ein toxisches Genprodukt entstanden ist. Für beide Varianten werden im Folgenden zwei Prinzipien erläutert.

1.6.1 Genaddition bei autosomal rezessiv vererbter RP

Wird bei einer hereditären Erkrankung wie z. B. bei der autosomal rezessiven RP ein Protein gar nicht, gering oder nur fehlerhaft hergestellt und seine eigentliche Funktion nicht erfüllt, so ist es möglich, eine so genannte Genadditions-Therapie durchzuführen [32]. Bei der Genaddition wird eine cDNA und ein Promotor in die Zelle eingebracht. Die cDNA, welche für die gesunde Wildtyp-Sequenz kodiert, kann dann abgelesen und mit Hilfe der zellinternen Mechanismen ein funktionsfähiges Protein hergestellt werden. Um die entsprechend benötigten Sequenzen in die Zelle einzubringen, wird ein Vektor benötigt. Gute Ergebnisse ließen sich mit dem nicht humanpathogenen rekombinanten Adeno-Assoziierten Virus (rAAV) Typ 2 erzielen. Klinische Versuche zu dieser Therapieform liefen und laufen bereits für RPE65-Patienten [31].

Beltran et al. konnten 2012 zeigen, dass diese Therapieform ebenfalls im Hundemodell für XLRP möglich ist. Hier konnte bei 3 von 4 Hunden eine verbesserte Funktion der Stäbchen und Zapfen des behandelten Auges im Vergleich zum nicht behandelten Auge gezeigt werden [33].

1.6.2 *Gene silencing* Therapie bei autosomal dominanter RP

Einen anderen Ansatz bietet die *Gene silencing* Therapie. Sie eignet sich für Erkrankungen wie zum Beispiel die autosomal dominante RP. Bei der autosomal dominanten

RP wird ein fehlerhaftes Protein hergestellt, welches zur Degeneration der Photorezeptorzellen führt. Die Intention der *Gene silencing* Therapie ist es, die Herstellung des fehlerhaften Proteins zu unterbrechen [34].

Gene silencing oder auch RNA Interferenz (RNAi) ist ein zelleigener Mechanismus, um Gene „abzuschalten“. Dies ist ein Schutzmechanismus der meisten eukaryotischen Zellen, um sich vor Fremd-DNA, meist viraler doppelsträngiger RNA, zu schützen [35]

Bei diesem Mechanismus induzieren doppelsträngige RNA-Moleküle das Schneiden einer ausgewählten RNA-Sequenz. Nach der ersten Beschreibung von Fire et al. ist die RNAi in den letzten Jahren als Möglichkeit der Genregulation in den Fokus der Wissenschaft geraten [36]. So konnte bereits in mehreren Tierstudien der Benefit von *small interfering RNAs* (siRNA) gezeigt werden [35, 37]. SiRNAs sind 21 bzw. 22 Nukleotide lang und lagern sich an der homologen Sequenz des Gens an, bilden den sogenannten *Gene silencing complex* und verhindern das Ablesen des Gens. Es handelt sich also um eine posttranskriptionelle Genregulation auf RNA-Ebene [34].

Bei der autosomal dominanten RP sind über 100 verschiedene Mutationen des RHO-Gens bekannt. Durch fehlerhafte Faltung oder veränderte Aktivität können die durch Mutation entstandenen Genprodukte schädigende Wirkung auf die Zelle haben [32]. Dies kann so weit gehen, dass die Zelle in die Apoptose, den programmierten Zelltod, geht [38].

Da die Suppression genlokalisationsabhängig aber mutationsunabhängig ist, wird sowohl das mutierte Gen als auch die Wildtyp-Kopie „abgeschaltet“ [39]. Sowohl das fehlerhafte als auch das gesunde Protein werden nicht mehr hergestellt. Dies macht neben dem *Gene silencing* auch ein *Gene replacement* im Sinne einer Genaddition erforderlich (Siehe 1.4.1.) [39]. In vitro-Studien konnten zeigen, dass eine 90 %ige Suppression bei gleichzeitiger Expression eines *Replacement*-Transkripts möglich ist [40].

Demnach wäre eine *Gene silencing* Therapie auch bei der XLRP möglich, indem die veränderte Kopie runterreguliert werden könnte. Um eine für den Patienten erfolgreiche Therapie zu erreichen, müsste zusätzlich noch eine Genaddition wie in 1.6.1 besprochen, erfolgen.

1.6.3 Targeted Gene Alteration

Die *Targeted Gene Alteration* (TGA) ist ein molekularer Ansatz, um Punktmutationen, die genetische Erkrankungen hervorrufen, zu korrigieren. Ziel ist es, einen Nukleotid-austausch an der Mutationsstelle im Genom zu provozieren. Als „Nukleotid-Tauschpartner“ werden einzelsträngige DNA-Oligonukleotide eingesetzt [41].

Die TGA zur Genreparatur an der Retina wurde unter anderem auch von Andrieu-Soler und Kollegen untersucht [42]. Im Fokus stand hier die rd1-Punktmutation in dem Gen, welches normalerweise die β -Subunit der cGMP-Phosphodiesterase (β -PDE) in den Stäbchen kodiert. Als Versuchstiere wurden Mäuse eingesetzt.

Es wurden Oligonukleotide (ON) von 25 Nukleotidlänge verwendet, die bis auf eine Wildtypbase anstelle der Punktmutation komplementär zu dieser Gensequenz waren. Die Aufnahme der ONs in die Photorezeptoren wurde vor dem neunten Tag postnatal durch transpalpebrale Iontophorese und anschließender intravitrealer Injektion von ONs stimuliert. Der Therapieerfolg wurde anhand der Photorezeptorzellzahl gemessen, die Zahl der erfolgten „Genreparatur“ mittels quantitativer PCR bestimmt. Zudem wurden auf β -PDE immunreaktive Photorezeptoren detektiert.

Es konnte gezeigt werden, dass zwar in geringer Zahl aber doch sichtbar eine Konversion von mutierter zu Wildtyp-Sequenz erzielt werden konnte. Diese Ergebnisse lassen hoffen, dass TGA in den retinalen Zellen grundsätzlich möglich ist [42].

Ob und wann es zu einer Alteration der DNA-Sequenz kommt, ist nicht zuletzt von der Zellzyklusphase abhängig.

1.7 Zellzyklusphasen

Der Zellzyklus dient zur DNA-Vermehrung, bzw. deren Replikation und zur anschließenden Zellteilung. Er läuft in einer streng kontrollierten Reihenfolge ab und umfasst insgesamt 4 Phasen: G₁-Phase, S-Phase, G₂-Phase und die M-Phase. Die G₀-Phase ist die sogenannte Ruhephase, in die eine Zelle aus der G₁-Phase heraus eintreten kann. In der G₀-Phase nimmt die Zelle nicht am Zellzyklus teil.

In der G₁-Phase kommt es zunächst zu Zellwachstum und zur Synthese von Proteinen, die für die DNA-Replikation von der Zelle benötigt werden. Sie dauert etwa 12 Stunden. In der anschließenden S-Phase wird die DNA repliziert, damit zu Beginn der G₂-Phase die Zelle tetraploid ist. Dies dauert ca. 6 Stunden. In der G₂-Phase wird die DNA-

Replikation kontrolliert (Dauer 6 Stunden) und in der M-Phase (Mitosephase) kommt es dann zur eigentlichen Zellteilung. Diese benötigt nur rund 30 Minuten.

(Vergleiche Löffler, Petrides: Biochemie und Pathobiochemie; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2003)

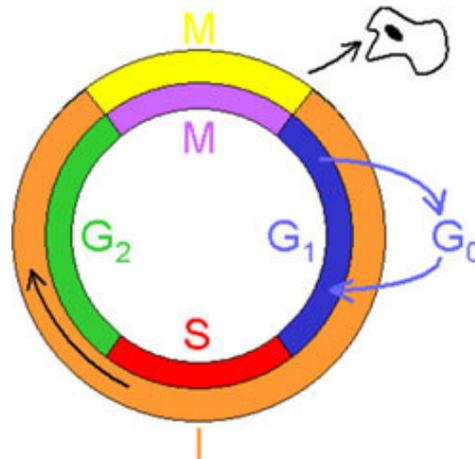


Abb. 11 Zellzyklusphasen

(www.zytologie-online.net)

Der Zellzyklus kann in zwei Phasen geteilt werden: Mitose (M) und Interphase (I). Die Interphase lässt sich wiederum in drei Unterphasen gliedern: G₁-, S- und G₂-Phase. Sind die Zellen ausdifferenziert, verbleiben sie in der G₁-Phase, die dann, weil nicht mehr am Zellzyklus teilnehmend, auch als G₀-Phase bezeichnet wird.

Ist eine Zelle in die G₀-Phase eingetreten, scheint sie also für einen gentherapeutischen Ansatz nicht mehr erreichbar. Die meisten unserer ausdifferenzierten Zellen befinden sich aber genau in dieser G₀-Phase. Um diese für die Gentherapie erreichbar zu machen, bedarf es einer Provokation, damit die Zelle ihre DNA-Reparaturmechanismen wieder aktiviert. Eine solche Provokation ist zum Beispiel die Schädigung der DNA und im Speziellen der Doppelstrangbruch, auf den im Weiteren eingegangen werden soll.

1.8 DNA-Reparaturmechanismen

Die DNA ist permanent endogenen und exogenen Schädigungen und Modifizierungen ausgesetzt. Hierfür hat die Zelle ein ganzes Netzwerk an Reparaturmechanismen entwickelt [43]. Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die verschiedenen DNA-Schäden und die jeweils möglichen Reparaturmechanismen.

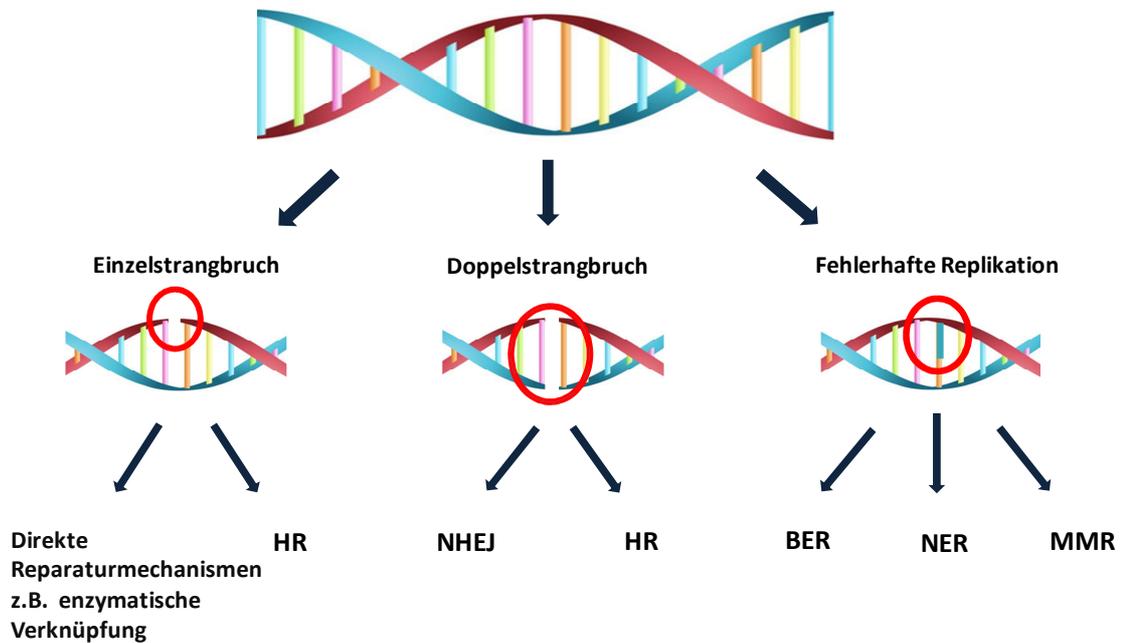


Abb. 12 DNA-Reparaturmechanismen

Je nach DNA-Schädigung stehen verschiedene Reparaturmechanismen zur Verfügung.

NHEJ: Nicht-Homologes-End-Joining, HR: Homologe Rekombination, BER: Basen-Exzisions-Reparatur, NER: Nukleotid-Exzisions-Reparatur, MMR: Mismatch-Reparatur (geändert nach Tabelle DNA-Schaden, Ursachen, Reparatur und beteiligte Enzyme, Hans-Peter Rihs, Thomas Brüning, BGFA-Info 03/08)

Der Doppelstrangbruch (DSB) ist eine ernsthafte Schädigung der DNA, welcher die Funktion und die Genomstabilität der Zelle gefährdet [44]. Die beiden Hauptreparaturmechanismen Nicht-Homologes-End-Joining (NHEJ) und Homologe Rekombination (HR) konkurrieren in der Zelle um die Reparatur des DSB und sind u. a. davon abhängig in welchem Stadium des Zellzyklus sich die Zelle befindet [44]. Für die Gentherapie sind die Reparaturwege bei DSB sehr interessant und besonders die HR, weil sie eine Möglichkeit zur gerichteten Genreparatur bietet [45].

Kommt es in der Zelle z. B zu einem Doppelstrangbruch eines Chromatids, so wird das unbeschädigte Chromatid als Matrize genutzt. Anschließend kommt es dann durch „*crossing-over*“ zu einem Austauschen der fehlerhaften Sequenz gegen die unbeschädigte Sequenz zwischen beiden Chromatiden. Abb. 14 gibt hierüber einen Überblick.

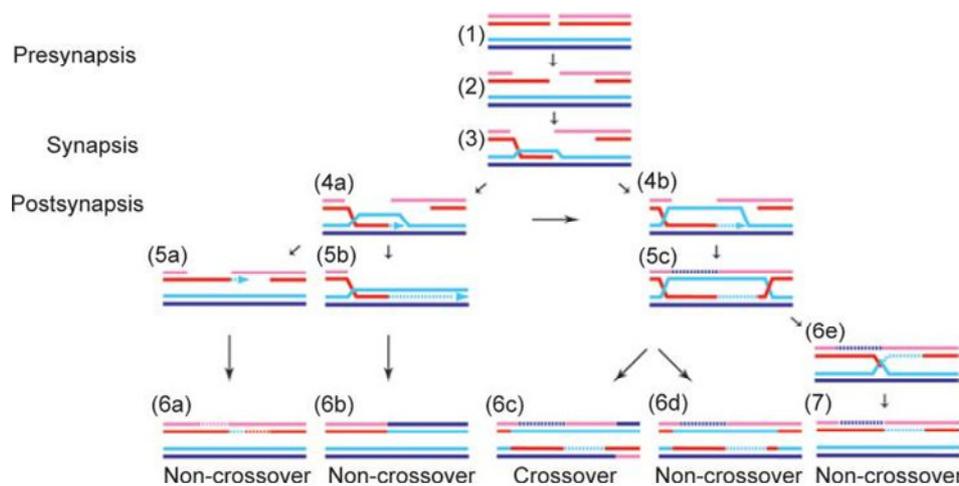


Abb. 13 Homologe Rekombination

(geändert aus Li, X. and W.D. Heyer, *Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance*. Cell Res, 2008.)

Um diesen Reparaturmechanismus nutzen zu können, muss man gegebenenfalls einen Doppelstrangbruch induzieren. Durch einen Doppelstrangbruch lässt sich die Effizienz der HR von einer Frequenz von ca. 10^{-6} um ein Vielfaches steigern [46]. Dies ist z. B. durch DNA-schneidende Enzyme möglich, die in den folgenden Kapiteln besprochen werden.

Sogenannte „saubere“ DSB, wie sie z. B. durch Nukleasen verursacht werden, können durch NHEJ wieder präzise repariert werden. Hierbei werden die DNA-Enden einfach wieder miteinander verbunden, nicht aber bei „unsauberen“ DSB, bei welchen die Enden nicht mehr komplementär zueinander sind. In einem solchen Fall ist die Reparatur durch HR genauer, da sie ein homologes Template als Vorlage verwendet [44].

Beim Nicking kommt es nicht zu einem Doppelstrangbruch, sondern lediglich zu einem Einzelstrangbruch. Die Folge ist, dass das unerwünschte NHEJ, wie es häufig bei einem Doppelstrangbruch auftritt, minimiert wird und die Wahrscheinlichkeit der HR erhöht werden kann. So kann mit einem Einzelstrangbruch eine 70 mal höhere Effizienz bei der Genreparatur erzielt werden [47]. Zudem wird die durch Doppelstrangbrüche provozierte genomische Instabilität und die damit verbundene lokale Mutagenese vermindert [47].

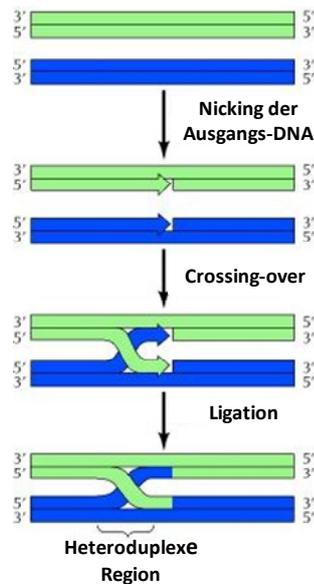


Abb. 14 Homologe Rekombination nach Einzelstrangbruch

(Geändert aus Geoffrey M Cooper, *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition)

Durch das Nicking wird ein DNA-Einzelstrangbruch erzeugt. Anschließend kann der nichtgeschädigte Strang als Matrize genutzt werden und durch Crossing-over und anschließender Ligation kommt es zur Reparatur der DNA mit einer heteroduplexen Region.

1.9 Endonukleasen

Endonukleasen sind Nukleasen, die Phosphodiesterbindungen spalten und damit DNA bzw. RNA abbauen können. Im Gegensatz zu Exonukleasen können Endonukleasen nicht endständig spalten und es entstehen immer Mehrfachnukleotide.

Beispiele für Endonukleasen sind Homing Endonukleasen, Restriktionsenzyme und die im Weiteren besprochenen Zink-Finger-Nukleasen sowie die TALEN.

1.9.1 Homing-Endonukleasen

Homing-Endonukleasen (HE) sind DNAsen, die Erkennungssequenzen von bis zu 20-30 Basenpaaren erkennen können [48]. Die HEs, die zur LAGLIDADG-Familie zählen, sind die größten bekannten HE und wurden am besten erforscht. Sie tragen alle die LAGLIDADG-Sequenz, die sowohl eine strukturelle als auch eine katalytische Funktion besitzt [49]. Im Gegensatz zu anderen Restriktionsenzymen tolerieren HEs Sequenzveränderungen in ihrer Erkennungssequenz [50]. So ist z.B. eine Basensubstitution an den meisten ihrer Positionen in ihrer Erkennungssequenz möglich, was zur Etablierung der I-SceI genutzt wurde [51]. Die I-SceI ist eine der ersten und am genauesten charak-

terisierte HE [52]. Sie erkennt eine 18bp-DNA-Sequenz und schneidet mit großer Effizienz und Spezifität. Sie wird daher häufig als Goldstandard genutzt.

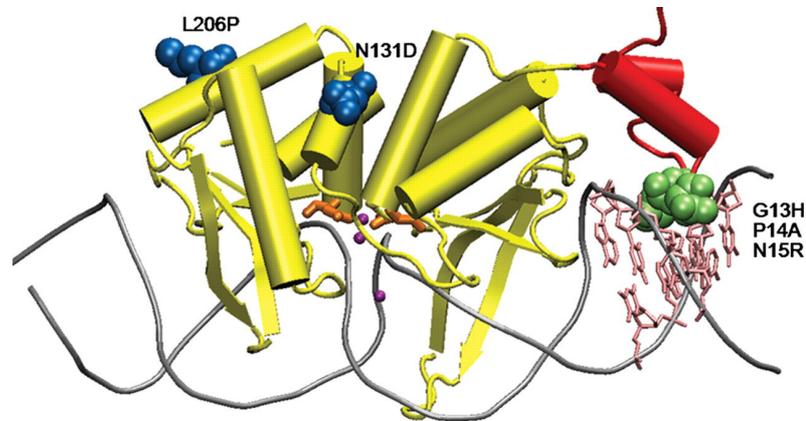


Abb. 15 Kristallstruktur der Homing-Endonuklease I-SceI

Hier dargestellt in einem Komplex mit dem passenden DNA-Substrat
(Quelle: Chen Z et al. Protein Engineering, Design and Selection 2009;22:249-256)

HEs können durch ihre Aktivität punktuelle Rekombinationsereignisse induzieren, die wiederum Genmutationen hervorbringen aber auch zu Genreparatur führen können [48].

1.9.2 Zinkfinger-Nukleasen

Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) sind künstlich hergestellte Nukleasen und bestehen aus Cys₂-His₂-Zinkfingerdomänen und einer Nukleasedomäne, häufig werden hier Restriktionsenzyme wie z.B. FokI verwendet [53].

Restriktionsenzyme sind sehr zuverlässig aber unspezifisch spaltende Enzyme. Erst durch die Verbindung mit Zinkfingern kann die Zuverlässigkeit der Restriktionsenzyme auch zur spezifischen DNA-Spaltung genutzt werden, da Zinkfinger beliebige DNA-Sequenzen erkennen und daran binden können [53].

Zink-Finger-Nuklease

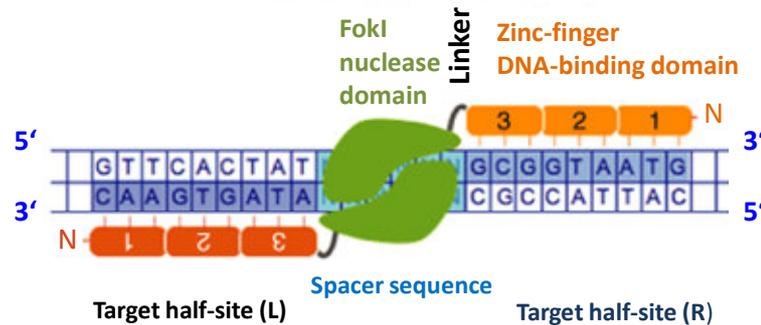


Abb. 16 Schematische Darstellung einer Zink-Finger-Nuklease

Um einen DNA-Doppelstrangbruch zu erzeugen, benötigt man zwei monomere Untereinheiten. Jede Untereinheit umfasst die FokI-Nuklease-Domäne und je drei Zinkfinger (orange 1-2-3 dargestellt), die wiederum Basenpaare in der Zielsequenz erkennen können. Der Linker, hier grau dargestellt verbindet Nuklease mit Zinkfinger. Die ZFN ist aktiv, wenn beide Monomere dimerisieren. Die DNA wird dann im Bereich der Spacersequenz gespalten. (Geändert nach Cathomen; Zinc-Finger nucleases: the next generation emerges, 2008)

Ein Zinkfinger kann spezifisch ein DNA-Triplet erkennen und durch Kombination mehrerer Zinkfinger ist eine große Variation zur Erkennung von DNA-Sequenzen möglich [46]. So können vier Zinkfinger an eine FokI-Domäne gekoppelt eine 24 Basenpaar lange DNA-Sequenz erkennen. Statistisch sind Erkennungssequenzen zwischen 18 und 24 Basenpaaren so lang, dass sie nur einmal im menschlichen Genom vorkommen [53]. Ein möglicher Nachteil von ZFN ist die mit ihnen assoziierte Zelltoxizität. Man nimmt an, dass dies Folge von exzessivem Schneiden an *Off-target*-Sequenzen ist, was wiederum ein Zeichen von unzureichender DNA-Sequenzerkennung und -bindung ist [53]. Die Spezifität von ZFN ist sogar invers korreliert mit ihrer Toxizität [54].

1.9.3 TALEN

TALE steht für „*transcription activatorlike effectors*“. Es handelt sich hierbei um Proteine des pathogenen Bakteriums *Xanthomonas*. *Xanthomonaden* injizieren TALEs in Pflanzen, wo diese in den Nukleolus wandern, an Promotoren von bestimmten Genen binden und deren Transkription aktivieren [55, 56].

Sie bestehen aus einer sogenannten zentralen Tandemdomäne, bestehend aus 34 fast identischen Aminosäure-Wiederholungen. In diesen Wiederholungen sind 2 Aminosäu-

ren an Position 12 und 13 variabel (auch genannt: *Repeat-Variable-Diresidues*, RVDs). Jede TALE-Sequenz ist in der Lage, ein einzelnes Basenpaar in der DNA-Sequenz zu erkennen, da die Sequenz der RVDs eines TALE exakt der Sequenz des Nukleotids an der Bindungsstelle entspricht [55, 57, 58]. Durch beliebiges Aneinanderreihen von TALEs ist es möglich, eine neuartige Spezifität in der DNA-Bindung zu erhalten.

Kombiniert man TALEs mit einer Endonuklease (TALEN) wie z. B. mit der FokI, so ist es möglich sehr spezifisch DNA zu schneiden. Miller et al. nutzten eine solche TALEN zum Erzeugen von kleinen Schnittstellen und Deletionen in humanen Genen und konnten zeigen, dass dies mit einer Effizienz von bis zu 25 % möglich war.

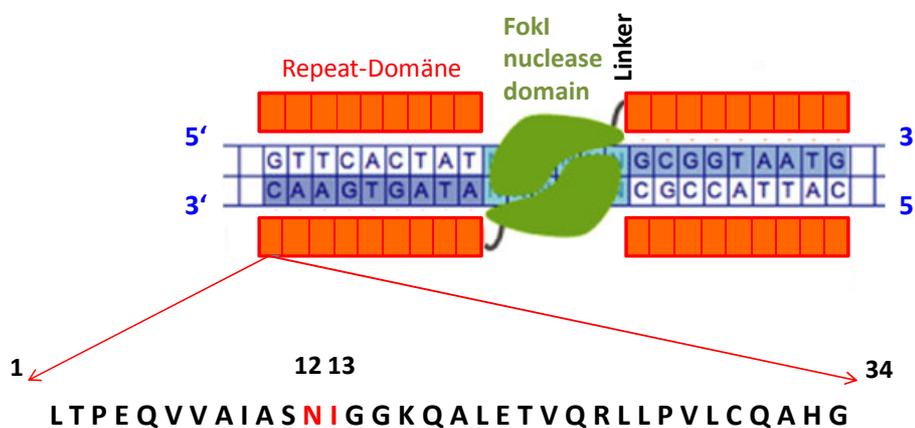


Abb. 17 Schematische Darstellung einer TALE-Nuklease

Dargestellt ist eine TALE-Nuklease, bestehend aus 4 Repeat-Domänen, die an eine FokI-Nuklease gebunden sind. Jede Repeat-Domäne enthält mehrere Wiederholungen von 34 fast identischen Aminosäuren. Die Aminosäuren an Position 12 und 13 sind hochvariabel und dadurch hoch spezifisch für die DNA-Bindung. (Geändert nach Cathomen; Zinc-Finger nucleases: the next generation emerges, 2008)

Ein weiterer großer Vorteil von TALEN ist die Möglichkeit des Nickings, wie bereits in Kapitel 1.8 erwähnt.

1.9.4 CRISPR/Cas9

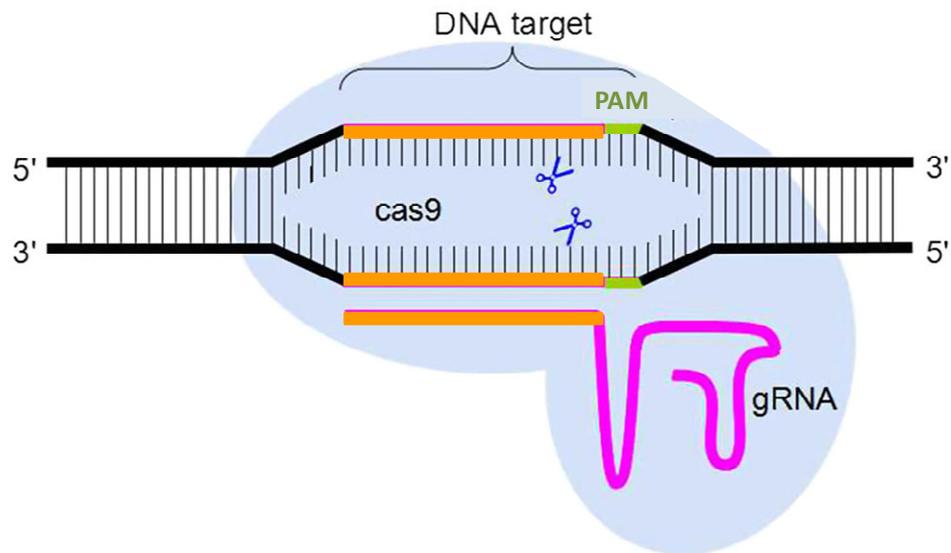
CRISPR/Cas steht für *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* und für das *CRISPR associated system*. Sie zählen zu den Abwehrmechanismen von Bakterien und Archaeen gegen fremde Nukleinsäuren [59]. Dringt fremde DNA (Virus

oder Plasmid) in den Nukleus ein, werden zunächst kurze Sequenzen dieser Fremd-DNA in eine Genomregion integriert, die durch die CRISPR unterbrochen wird. Diese Genomregion wird anschließend abgelesen und sRNAs gebildet, die wiederum dem Proteincomplex Cas helfen, fremde DNA zu erkennen und durch Doppelstrangbruch unschädlich zu machen [60, 61]. Es gibt drei verschiedene Typen des CRISPR/Cas-Systems [60] und speziell Typ II konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen, wie z.B. Hwang et al 2013 und Mali et al 2013, zu gezielten Doppelstrangbrüchen weiterentwickelt und genutzt werden.

Typ II (CRISPR/Cas9) beinhaltet eine CRISPR RNA (crRNA), eine *trans-activating* CRISPR RNA (tracrRNA) und eine Doppelsträngige DNA-Endonuklease -das Cas9-Protein. Die crRNA und die tracrRNA bilden zusammen eine Zwei-RNA-Struktur, die an beiden DNA-Strängen, neben einem sogenannten *protospacer adjacent motif* (PAM) binden. Das PAM spielt eine entscheidende Rolle für die korrekte Bindung und das effektive Schneiden des Cas9-Proteins [62].

Dieser Mechanismus zum Provozieren eines Doppelstrangbruchs wurde für die Gentherapie interessant, da sich durch Herstellung von crRNAs jede beliebige DNA-Sequenz erkennen und schneiden lässt. Zudem konnte chimerische RNA hergestellt werden, die sowohl aus crRNA als auch aus tracrRNA besteht und als *guide* RNA (gRNA) bezeichnet wird. Die gRNA leitet die DNA-Endonuklease zum spezifischen Doppelstrangbruch [62] (siehe Abb. 18).

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen TALEN haben die CRISPR nur eine Erkennungssequenz von circa 20bp und führen daher im Vergleich etwas häufiger zu unerwünschtem *Off-Target*-Schneiden der DNA [63]. Der Vorteil des CRISPR/Cas9-Systems liegt in der höheren Effektivität, wie die Arbeitsgruppe um Ding 2013 im Vergleich von TALEN und CRISPR/Cas9 zur Genombearbeitung von humanen pluripotenten Stammzellen zeigen konnte [64]. Hinzu kommt die einfache Herstellung und Anwendbarkeit [61, 64].

**Abb. 18 Schematische Darstellung von CRISPR/Cas9**

Die gRNA bindet an einem der beiden DNA-Stränge in unmittelbarer Nähe zur PAM-Sequenz und leitet damit das Cas9-Protein (Endonuklease) zum gezielten Schneiden und damit zum Doppelstrangbruch der DNA. (Geändert nach Jingwen Niu, 2014)

1.10 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines *in vitro* Modellsystems zum Studium von HR als Therapiemethode für die XLRP.

Hierzu werden 2 Ansätze verfolgt. Zum einen ein murines Modell aus Lymphozyten und Knochenmarkzellen, die dem XLRP-Mausmodell (B6J.Sv129-Rpgr^{tm1Sti}) unserer Arbeitsgruppe entnommen werden sollen. Und zum anderen eine HEK-Zelllinie, in die durch ein Flp-in-System die murine ORF15-Sequenz mit den 3 Mutationen und der zusätzlichen I-SceI-Schnittstelle (ebenfalls aus dem Mausmodell unserer Arbeitsgruppe), integriert wird.

2 Material

2.1 Chemikalien

Agarose	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (10%)	Merck (Darmstadt)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Hepes	Carl Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
L-Glutamin	Biochrom AG (Berlin)
Lipofectamine LTX™ Reagents	Invitrogen (Karlsruhe)
Luria Broth Base	Invitrogen (Karlsruhe)
Magermilchpulver Sucofin	TSI GmbH
Methanol	Sigma-Aldrich (Seelzen)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumthiosulfat	Merck (Darmstadt)
Page Blue-Protein	Fermentas (St. Leon-Rot)
Ponceau S Solution	Sigma (Seelzen)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
SDS ultra pure	Carl Roth (Karlsruhe)
Select Agar	Invitrogen (Karlsruhe)
Silbernitrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Stickstoff (flüssig)	Linde (Pullach)
TEMED	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris (hydroxymethyl)aminomethan	Merck (Darmstadt)
Triton X	Carl Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe)

2.2 Enzyme

Antarktische Phosphatase	New England BioLabs (Schwalbach)
EcoRI	Fermentas (St. Leon-Rot)
HindIII	New England BioLabs (Schwalbach)
NcoI	New England BioLabs (Schwalbach)
NdeI	New England BioLabs (Schwalbach)
Pst I	Fermentas (St. Leon-Rot)
Pvu I	Fermentas (St. Leon-Rot)
Sal I	New England BioLabs (Schwalbach)
T4-DNA Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
Takara/Prime Star	Takara Bio Inc. (Otsu, Shiga, Japan)
Taq Polymerase	Promega (Madison Wi, USA)
XbaI	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.3 Puffer

Antarktische Phosphatase Puffer	New England BioLabs (Schwalbach)
EcoRI-Puffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
Ladepuffer 6x Loading Dye	Fermentas (St. Leon-Rot)
NEB2 2 Puffer	New England BioLabs (Schwalbach)
NEB 3+ Puffer	New England BioLabs (Schwalbach)
NE-Puffer	Macherey-Nagel (Düren)
Orange-Puffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
S1 (Resuspensions)-Puffer	Macherey-Nagel (Düren)
S2 (Lyse)-Puffer	Macherey-Nagel (Düren)
S3 (Neutralisations)-Puffer	Macherey-Nagel (Düren)
SDS Probenpuffer Roti Load1 (reduziert)	Carl Roth (Karlsruhe)
SDS Probenpuffer Roti Load2 (nicht reduziert)	Carl Roth (Karlsruhe)
Taq-Puffer	Pomega (Madison Wi USA)
T4-DNA-Ligase 5x Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Tango-Puffer	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.4 Kits

Pure Link Genomic DNA Mini Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
InFusion™ Cloning Kit	BD Clontech (Heidelberg)
Nucleo Spin® Plasmid Kit	Machery Nagel (Düren)
Plasmid Mini Kit	
Plasmid Maxi Kit	Quiagen (Hilden)

2.5 DNA- Größenstandards

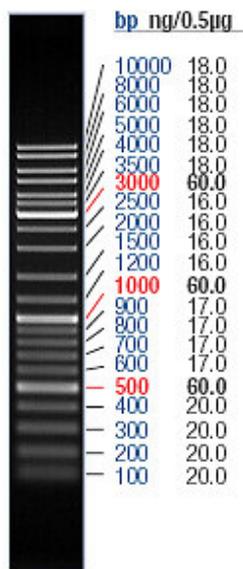


Abb. 19 DNA-Größenstandard Gene Ruler DNA-Ladder Mix
(Fermentas, St. Leon-Rot)

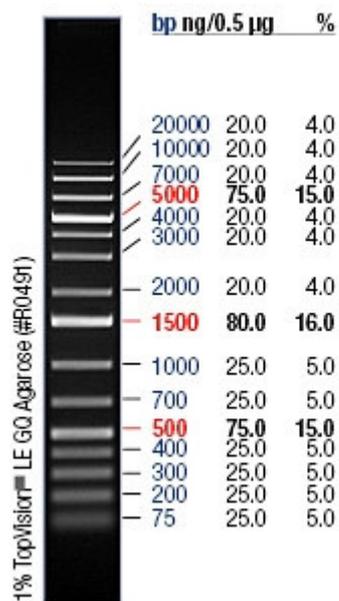


Abb. 20 DNA Größenstandard Gene Ruler 1 kb DNA Ladder
(Fermentas, St. Leon-Rot)

2.6 Verwendete Medien, Puffer und Lösungen

DMEM (Dubelcco's modified Eagle medium), PAA the Cell Culture Company (Cölbe, Deutschland) Dieses Medium wurde für die Kultivierung von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293) verwendet.

DMEM wurde mit: 1% Pen/Strep (v/v)
10% FKS (v/v)
200 mg/l Penicillin/Streptomycin
4 mM L-Glutamin

angesetzt.

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Lymphozytenmedium:

RMPI wurde mit: 10% FKS (v/v)
Ampicillin/Streptomycin
Aminosäuren
mM L-Glutamin

angesetzt.

Complete MSC expansion medium:

MesenCult Basal Medium (Stem Cell Technologies,) wurde mit: 400ml
100ml Mouse Mesenchymal Stem Cell Stimulatory
Supplements (Stem Cell Technologies,)
5ml Penicillin/Streptomycin

Bei 4°C lagern, 4 Wochen verwendbar.

PBS (phosphate buffered saline):

8,0 g/l Natriumchlorid
0,2 g/l Kaliumchlorid
1,44 g/l Dinatriumhydrogenphosphat
0,24 g/l Kaliumdihydrogenphosphat
(pH-Wert 7,4; autoklaviert; bei RT gelagert)

Einfrierlösung:

(steril gefiltert, bei -20°C gelagert)
10% DMSO
90% FKS

LB-Medium:

25 g/l Luria Broth Base

SOC-Medium:

20,0 g/L Trypton

autoklavieren
5,0 g/L Hefeextrakt
0,5 g/L NaCl
HEPES-Lösung
0,19 g/L KCl
1mM HEPES
2,0 g/L MgCl₂
3,9 g/L Glukose
pH 7,0 mit NaOH autoklavieren.

TE-Puffer:
1,21 g/l Tris
1,86 g/l EDTA
pH 8,0

Ethidiumbromidlösung:
0,1 g/ml Ethidiumbromid

Ampicillin-Stammlösung:
349,4 mg/ml Ampicillin (1M)

Hygromycin-Stammlösung:
50mg/ml Hygromycin

10x SDS-Laufpuffer:
30 g/L Tris
144 g/L Glycin
100 ml SDS (10%)
pH 8,3

10 x TBS:
12,11 g/L Tris
87,75 g/L NaCl
pH 7,5 mit HCl

LB-Agar:

LB-Medium + 1,5% (w/v) Select Agar

(autoklavieren, Zugabe von Ampicillin unter 50°C, gießen der Platten mit jeweils ca. 15 ml LB-Agar, bei 4°C sind die Platten etwa 6 Monate verwendbar)

1x TBE-Puffer

121,14g/L Tris
51,33g/L Borsäure
2,92g/L EDTA*2Na*2H₂O

2.7 Geräte

Zellkultur Sterilbank	Heraeus Instrument, Hanau
Zentrifuge 5416	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank für Zellen	Forma Scientific, USA
Kühlzentrifuge	Sigma, Taufkirchen
Kühlzentrifuge Avanti J-25	Beckma, Palo Alto, CA,USA
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Olympus Ck40	Olympus, Hamburg
Neubauerzählkammer	Brand, Wertheim
PCR Sterilbank	Herolab, Wiesloch
PTC-100tm programmierter thermal controller	MJ research, USA
Spektrophotometer Unkon 931	Kontron Instrument, Schweiz
Spektrophotometer	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
HL-2000 HybriLinker	UVP, USA
Wasserbad	Grant Instrument, UK

2.8 Biologische Materialien

2.8.1 Vektoren und Plasmide

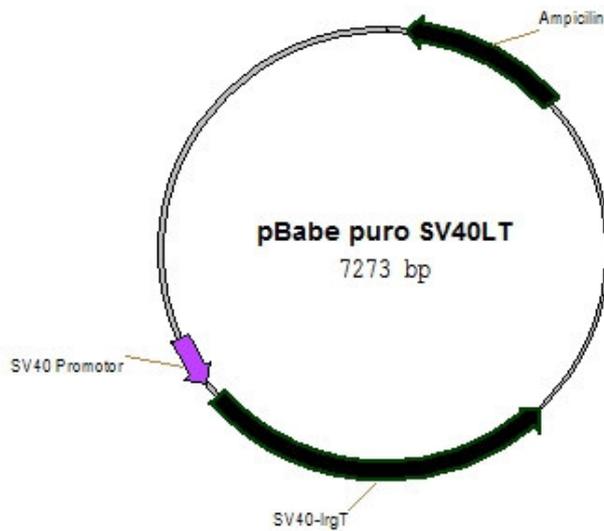


Abb. 21 pBABE-puro SV40 LT von Addgene

Tabelle 1 pBabe puro SV40LT Vektor-Informationen

Abkürzung	Name	Nukleotid Position
Ampicillin	Ampicillin resistance gene	101-961
SV40-lrgT	Large T-Antigen	2743-4611
SV40 Promoter	Promoter	4710-4978

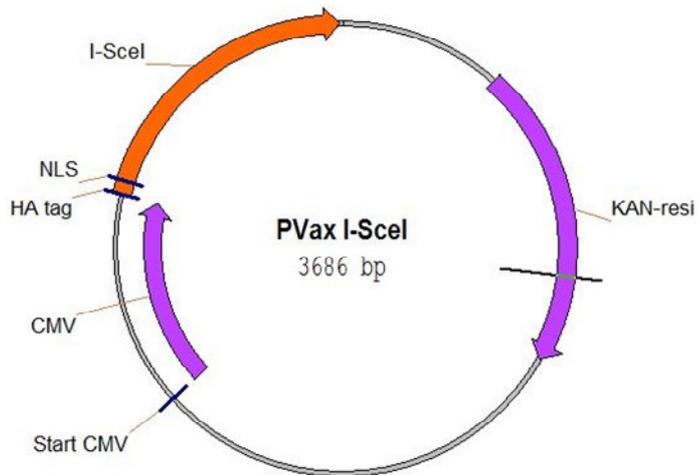


Abb. 22 PVax I-SceI

Tabelle 2 PVax I-SceI Vektor-Informationen

Abkürzung	Name	Nukleotid Position
CMV	CMV promoter	137-724
KAN-resi	Kanamycin resistance gene	1226-2020

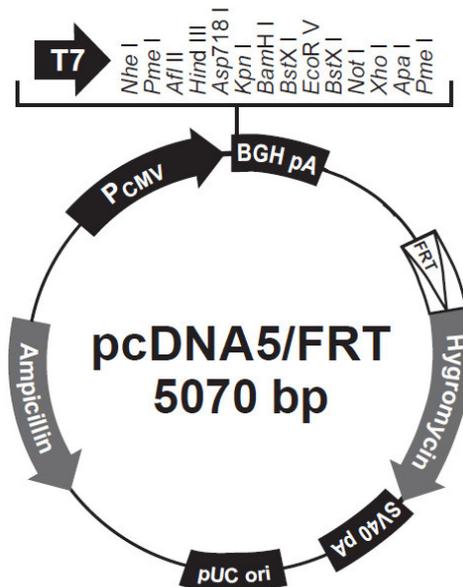


Abb. 23 pcDNA/FRT von Invitrogen

Tabelle 3 pcDNA5/FRT Vektor-Informationen

Abkürzung	Name	Nukleotid Position
PCMV	CMV Promoter	232-819
CMV	Forward priming site	769-789
T7	Promoter/priming site	863-882
MCS	Multiple cloning site	895-1010
BGH	Reverse priming site	1022-1039
BGH pA	Polyadenylation signal	1028-1252
FRT	FRT site	1536-1583
HRT	Hygromycin resistance gene (no ATP)	1591-2611
SV40 pA	Early polyadenylation signal	2743-2873
pUC ori	pUC origin of replication	3256-3929
Bla	Bla promoter	4935-5033
Ampicillin	Ampicillin resistance gene	4074-4934

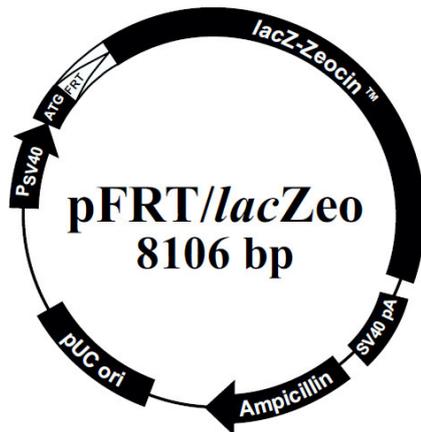


Abb. 24 pFRT/lacZeo

Tabelle 4 pFRT/lacZeo Vektor-Informationen

Abkürzung	Name	Nukleotid Position
P SV40	Early promoter and origin	278-604
ATG	Initiation codon	609-611
FRT	FRT site	614-661
lacZ-Zeocin fusion gene	LacZ ORF	675-3722
	Zeocin resistance gene	3810-4181
SV40 pA	SV40 early polyadenylation signal	5102-5425
Bla	Bla promoter	6201-6299
Ampicillin	Ampicillin resistance gene	6300-7160
pUC ori	pUC origin of replication	7305-7978

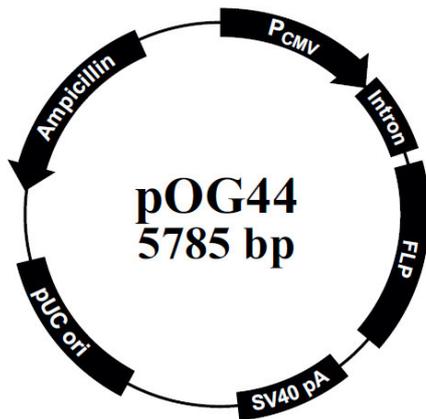


Abb. 25 pOG44-Vektor

Tabelle 5 pOG44 Vektor-Informationen

Abkürzung	Name	Nukleotid Position
P CMV	CMV promoter	1-821
Intron	Syntetic intron	871-1175
FLP	FLP ORF	1202-2473
SV40 pA	SV 40 late polyadenylation signal	2759-2732
pUC ori	pUC origin	3327-3993
Bla	Bla promoter	4999-5097
Ampicillin	Ampicillin resistance gene	6300-7160

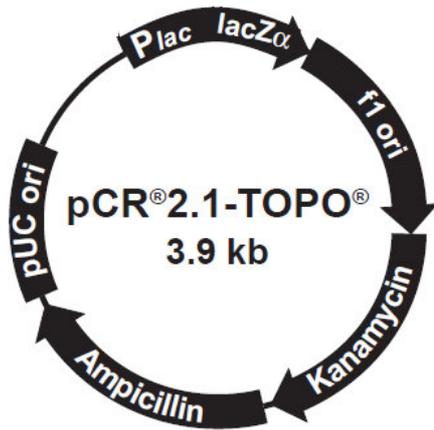


Abb. 26 Topo-Vektor

Tabelle 6 Topo-Vektor-Informationen

Abkürzung	Name	Nukleotid Position
LacZa	LacZa fragment	1-547
M13	M13 reverse priming site	205-221
MCS	Multiple cloning site	234-357
T7	T7 promotor/priming site	364-383
M13 Forward	M13 Forward (-20) priming site	391-406
f1 ori	f1 origin	548-985
Kanamycin	Kanamycin resistance ORF	1319-2113
Ampicillin	Ampicillin resistance gene	2131-2991
pUC ori	pUC origin	3136-3809

2.8.2 Primer

Tabelle 7 verwendete Primer

Sequenzierung	
BGH reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG
T7 forward	TAATACGACTCACTATAGGG
CMV1 forward	GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATT
1523 RPGR-14	GGAAATGTAGTAGTGGAGCA
1524 RPGR-14	TTGATCCTCTGATGTGCCTT
2509 Pyr-I1a	TTGGAAAAGTTGCTGATAATGAAAGT
2510 Pyr-I1b	biotin-AACAGATGAGTTGAATGAAATGTAA

2.8.3 Zelllinien

2.8.3.1 HEK-Flp-InTM

Die HEK-Flp-InTM-293-Zelllinie wurde zur Herstellung von stabilen Zelllinien designed. Diese Zellen sichern ein hohes Level an Expression eines gewünschten Proteins durch einen Flp-In-Expressionsvektor. Die Zellen enthalten eine stabile und einmalige FRT-site an einer transkriptionell inaktiven Genomstelle. Gezielte Integration des Flp-In-Expressionsvektors ermöglicht eine hohe Expression eines gewünschten Gens.

Die Zellen wurden hergestellt, indem die Ausgangszelllinie mit pFRT/lacZeo transfiziert und anschließend mit Zeocin die resistenten Klone selektiert wurden.

2.8.4 *E. coli*-Stämme

Der *E. coli* XL-1 Blue Stamm wurde aus dem *E. coli*-K12-Sicherheitsstamm abgeleitet und zeichnet sich durch eine hohe Transformationseffizienz aus.

Die Bakterien wurden als Suspensionsschüttelkultur (200 rpm und 37 °C) in LB-Medium über Nacht angezüchtet [Sambrook 1989]. Durch Zugabe von Ampicillin erfolgte die Selektion auf resistenzvermittelnde Plasmide.

Stamm	Phenotyp
<i>E. coli</i> XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla CA)	NaIS, StrS, RifS, Thi-, Lac-, Ara+, Gal+, Mtl-, F-RecA+, Uvr+, Lon+

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultur

3.1.1.1 HEK-Flp-in-Zellen

Die Zellen wurden hergestellt, indem die Ausgangszelllinie mit pFRT/lacZeo transfiziert und anschließend mit Zeocin die resistenten Klone selektiert wurden. Freundlicherweise wurden uns die Zellen von Prof. Wolfrum und seiner Arbeitsgruppe aus Mainz zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden in DMEM mit Zusatz von 1 % PenStrep, 4 mM L-Glutamin und 10 % FKS kultiviert.

3.1.1.2 Gewinnung von murinen Lymphozyten

Die Entnahme aller murinen Zellen erfolgte im Rahmen des Tierversuchsantrags RP Darmstadt und nur im Rahmen der Generierung und Typisierung RP Gießen.

Die Mäuse wurden mittels Genickbruch getötet, die Milz wurde frei präpariert und nach der Entnahme in PBS-Lösung gelegt. Die Milz wurde im ganzen mit PBS gewaschen und anschließend in Lymphozytenmedium aufgenommen, mechanisch in drei Teile zerkleinert und anschließend mit einer sterilen Pinzette ausgequetscht.

Die Zellsuspension wurde in einen 50 ml Falcon-Tube gegeben und 2-3 min. gewartet, bis sich die festen Bestandteile am Boden absetzen konnten. Anschließend wurden 1,7 ml Überstand abgenommen und in einen frischen Falcon-Tube gegeben und bei 200 g für 7 min. bei Raumtemperatur abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, die Zellen in 2 ml DMEM resuspendiert.

Die Suspension wurde erneut bei 200 g für 7 min. bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Nachdem die Zellen gründlich gevortext wurden, wurden 400 µl Lysispuffer (pH 7,4) zugegeben und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Durch die Lyse der Erythrozyten färbte sich die Suspension rot und anschließend wurden 400 µl DMEM dazugegeben und erneut bei 200 g für 5 min. bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und 400 µl Lymphozytenmedium hinzugegeben und in 10 cm² Zellkultur-Flachröhrchen gefüllt.

3.1.1.3 Gewinnung von murinen Knochenmarkzellen

Die Mäuse wurden mittels Genickbruch getötet und Femora und Tibiae frei präpariert und entnommen. Die Knochen wurden mit grünem Papier so gut es ging von Muskel- und Sehngewebe befreit und anschließend in PBS-Lsg. gelegt.

Die Enden der Knochen wurden mit einer Schere abgeschnitten und die Knochenmarkhöhle mit 1,5 ml Lymphozytenmedium mit Hilfe einer 5 ml Spritze und einer 27G Nadel ausgespült. Das Knochenmark und das Medium wurden in einen 5 ml Tube aufgenommen und bei 380 g für 5 min. bei 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, die Zellen in 1 ml *Complete MSC Expansion Medium* (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) resuspendiert und mit weiteren 5 ml Medium in eine 25 cm² Zellkulturflasche gegeben.

3.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen bei -196 °C eingefroren.

Das Medium wurde mit einer sterilen Glaspipette abgenommen und die Zellen nach Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA für 2-5 min. im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 8 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben und in 15 ml Falcon-Tubes überführt und bei 125 g und 21°C für 10 min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit einer Konzentration von ca. 1×10^6 Zellen in Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in Kryotubes mit 1 ml aliquotiert. Zunächst wurden die Kryotubes für 24 h in kaltem Isopropanol zwischen- und danach bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.3 Auftauen von Zellen

Die bei -196 °C gelagerten Kryotubes wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und mit 9 ml DMEM-Medium resuspendiert, bevor die Suspension in eine Petrischale über-

führt wurde. Zur Verteilung der Zellen auf der gesamten Oberfläche wurde die Suspension in der Petrischale vorsichtig geschwenkt.

3.1.4 Auszählen von Zellen

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer-*improved* bestimmt. Die Teilchenzahl wird hierbei pro Volumeneinheit einer Flüssigkeit bestimmt.

Die Grundplatte der Zählkammer hat eine Kammertiefe von 0,1 mm und in den Kammerboden ist ein Zählnetz integriert. Dieses Zählnetz besteht aus 4 (L-) Quadranten mit jeweils 4 x 4 kleinen Quadranten. Jedes 4 (L-) Quadrant hat eine Größe von 1 x 1mm und entspricht damit einem Volumen von 1 μ l

3.2 Immortalisierung primärer Zellen

3.2.1 Spontane Immortalisierung

Die gewonnenen murinen Zellen wurden bis zum Erreichen der Seneszenz kultiviert und die Zellen lichtmikroskopisch beurteilt. Das Medium wurde je nach Wachstum aber in der Regel zwei Mal wöchentlich, gewechselt. Eine äußere Noxe wurde nicht hinzugegeben.

Nach Erlangen der Seneszenz wurde auf eine spontane Immortalisierung gehofft, bei Eintreten der Apoptose aller Zellen wurde die Kultur verworfen.

3.2.2 Benzo[a]pyren

Die murinen Zellen wurden kultiviert und je nach Wachstum aber in der Regel nach der 3. Passage, mit 5 μ M Benzo[a]pyren versetzt. Hierzu wurde das alte verbrauchte Medium durch frisches Medium ersetzt. Anschließend wurde eine Stocklösung aus 0,0025 g Benzo[a]pyren und 1 ml DMSO hergestellt und jeweils 2,5 μ l davon zu den Zellen gegeben.

Das Benzo[a]pyren konnte 48 Stunden auf die Zellen einwirken und wurde danach abgenommen. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und mit frischem Medium versetzt, welches im Verlauf alle 3 Tage gewechselt wurde.

3.2.3 Large-T-Antigen

Die murinen Zellen wurden nach konfluentem Wachstum, in der Regel nach der 3. Passage, nach folgendem Transfektions-Protokoll mit dem Large-T-Antigen transfiziert.

Für eine 6-Well-Platte wurden 500 μl RPMI mit 4 μg SV-40-Plasmid und 3,75 μl PLUS-Reagent versetzt. Es wurden 11,25 μl Lipofectamin LTX hinzugefügt und die Lösung für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der DNA-Lipid-Komplex tropfenweise zu den Zellen gegeben und das Ganze erneut bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Positiv-Kontrolle wurde peGFP transfiziert und die Transfektion nach 24-48 Stunden kontrolliert. Bei erfolgreicher Transfektion wurde das Medium erneuert und die Zellen gewohnt weiter kultiviert.

3.2.4 UV-Licht

Zur Behandlung mit UV-Licht wurden die Zellen konfluent kultiviert und auf 6-Well-Platten gegeben. Direkt vor der Bestrahlung wurde das Medium abgenommen und die Oberfläche mit PBS benetzt. Anschließend erfolgte die empirische Bestrahlung über 3 Minuten mit unterschiedlicher Intensität zwischen 10 und 1000 J/m³ mit dem UVP HL-2000 HybriLinker UV-Crosslinker.

Nach der Bestrahlung wurde das PBS abgenommen und frisches Medium zu den Zellen gegeben.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Die Polymerase-Kettenreaktion PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die in-vitro-Amplifikation auch kleinster DNA-Mengen [65]. Die PCR erfolgt im Wesentlichen in drei Schritten. Der erste Schritt, die Denaturierung, ist wichtig, um aus der doppelsträngigen Template-DNA zwei zueinander komplementäre Einzelstränge zu erhalten. Damit dann im zweiten Schritt, dem *Annealing*, die Primer an den jeweiligen Einzelstrang binden können. Im dritten Schritt, der Elongation, kann dann die Polymerase die komplementären Stränge herstellen, sodass man nach zyklischer Wiederholung dieser drei Schritte eine exponentielle Amplifikation des Ausgangs-Templates erhält.

Möglich wurde diese Methode der Amplifikation nach Entdeckung der thermostabilen Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *thermus aquaticus*.

Die Polymerase benötigt zum Amplifizieren freie dNTPs die zugesetzt werden müssen.

3.3.1.1 Standard-PCR

Für die Standard-PCR zur Amplifizierung des genetisch veränderten RPGR-Gens wurde die Go-Taq verwendet.

Komponenten	Endkonzentration
5x Go Taq-Puffer	
dNTP (1,5 mM)	
MgCl ₂ (7,5 mM)	
Primer forward	
Primer reverse	
Go Taq-DNA-Polymerase (5U/μl)	1,25 U
Template DNA	10 ng

Standardprotokoll:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min.	1 x
Denaturierung	95 °C	1 min.	25-35 x
Annealing	42-65 °C	1 min.	
Extension	72 °C	1 min.	
Final Extension	72 °C	5 min.	1 x
Hold	4° C	10 min.	1 x

3.3.1.2 Long-Range-PCR

Zur Amplifizierung von DNA-Templates >1000 bp wurde die Phusion-Polymerase von Finnzymes benutzt, da diese die sogenannte *proof-reading*-Aktivität besitzt und so fehlerhaft eingebaute Basenpaare erkannt und richtig ersetzt werden.

Da die Phusion *blunt-end*-DNA erzeugt, musste vor der TA-Klonierung noch ein A-Überhang angehängt werden.

Komponenten	Endkonzentration
5x Go Taq-Puffer	
dNTP (1,5 mM)	
MgCl ₂ (7,5 mM)	
Primer forward	
Primer reverse	
Go Taq-DNA-Polymerase (5U/ µl)	1,25 U
Template DNA	10 ng

Standard-Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1 x
Denaturierung	98 °C	5 -10 s	25 -35 x
Annealing	42 -72 °C	10 -30 s	
Extension	72 °C	15 -30 s/kb	
Final Extension	72 °C	5 -10 min.	1 x
Hold	4 °C	∞	1 x

3.3.2 T7 Assay

Das T7 Assay wird zur Bestimmung der Effizienz einer Genomreparatur mit Hilfe der T7 Endonuklease I genutzt.

Die T7 Endonuklease I erkennt und schneidet DNA, deren Stränge nicht zu hundert Prozent kompatibel zueinander sind. In einem ersten Schritt werden PCR-Produkte von DNA, die durch z.B. Homing-Endonukleasen, Zinkfinger oder TALEN geschädigt wurden, gewonnen. Die PCR-Produkte lagern sich in einem zweiten Schritt neu aneinander, sodass sich 3 mögliche neue Paarungen bilden können u.a. auch Duplizierungen, die ein Mismatch beinhalten. Diese Mismatch-Duplizierungen werden durch die T7 Endonuklease I erkannt und verdaut.

Im letzten Schritt wird die DNA gelelektrophoretisch getrennt und durch die Analyse der Fragmente kann die Effektivität der DNA-Reparatur-Events gemessen werden. Abbildung 27 gibt hierüber einen schematischen Überblick.

Der T7 Assay wurde nach dem Protokoll aus CRISPR/Cas9 and Targeted Genome Editing: A New Era in Molecular Biology durchgeführt.

PCR:

Komponenten	Endkonzentration
5x Puffer	4,5 µl
dNTP (1,5 mM)	2,0 µl
Primer forward (10 µM)	20
Primer reverse (10 µM)	20
DNA-Polymerase (5U/µl)	1,25 U
Template DNA	50 ng
H ₂ O dest.	ad 25 µl

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1 x
Denaturierung	98 °C	10 s	35 x
Annealing	60 °C	15 s	
Extension	72 °C	60 s	
	98 °C	10 s.	1 x
	60 °C	15 s	1 x
Final Extension	72 °C	5 min.	1 x
Hold	10 °C	∞	1 x

T7 Endonuklease I Verdau:1. Schritt:

DNA	200 ng
10 x NEB Buffer 2	2 µl x
H ₂ O destilliert	ad 20 µl

2. Schritt: Annealing der PCR-Produkte unter den folgenden Konditionen

Schritt	Temperatur	Zeit	Ramp Rate
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min.	
Annealing	95 – 85 °C		-2 °C/s
	85-25 °C		-0,1 °C/s
Hold	4 °C	∞	

3. Schritt: Zugabe der T7 Endonuklease zu den neu gepaarten PCR-Produkten

Annealed PCR-Produkt	19 µl
T7 Endonuklease I	1 µl
Inkubationszeit	15 min.

Inkubationstemperatur

37 °C

4. Schritt: Beenden der Reaktion durch Zugabe von 1,5 µl 0,25M EDTA

5. Schritt: Aufreinigen der Reaktion (optional)

6. Schritt: Die DNA-Fragmente in 20 µl H₂O aufnehmen

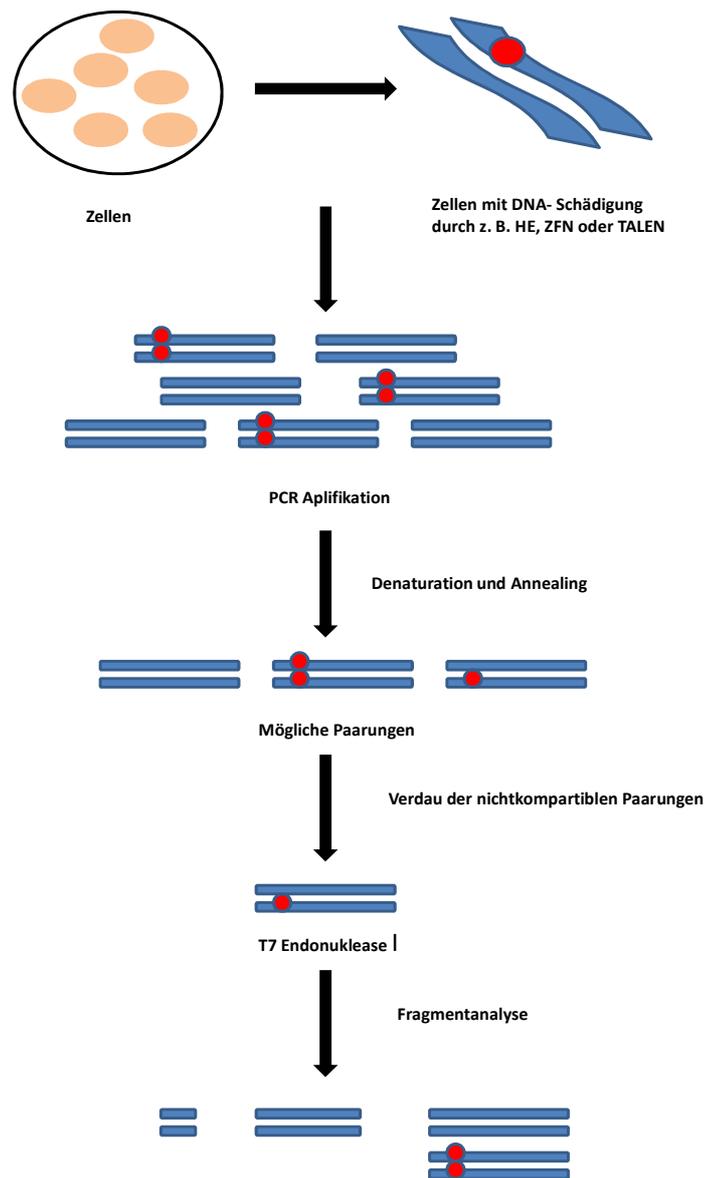


Abb. 27 Schematische Darstellung eines T7 Assays (geändert nach CRISPR/Cas9 und Targeted Genome Editing: A New Era in Molecular Biology)

Die DNA bestimmter Zellen, die z. B. durch eine Homing-Endonuklease (HE), eine Zinkfinger-Nuklease (ZFN) oder durch TALEN geschädigt wurden (hier rot dargestellt) werden mittels PCR amplifiziert.

Die PCR-Produkte werden in einem nächsten Schritt denaturiert und lagern sich anschließend neu zusammen (Annealing), dabei können 3 mögliche Paarungen entstehen. Die Paarung, deren Stränge nicht kompatibel sind, können anschließend durch die T7 Endonuklease I verdaut werden.

Die Fragmente, die bei diesem Verdau entstehen, können dann analysiert werden.

3.3.3 Übernachtkulturen

Für Übernachtkulturen wurden 5 ml LB-Medium mit 5 µl Ampicillin versetzt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde ein Klon gepickt und in das Medium gegeben. Anschließend wurde die Suspension bei 37 °C über Nacht auf den Schüttler gestellt.

3.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-Isolierung erfolgte aus Übernachtkulturen (siehe Kapitel 3.3.3)

Es wurden 2 ml der Suspension abgenommen und bei 5000 rpm für 5 min. bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl S1-Puffer (siehe Plasmid Mini Kit) resuspendiert. Es wurden 100 µl S2-Puffer zur Zelllyse zugegeben und der Tube einmalig invertiert. Die Neutralisation erfolgte mit 100 µl S3-Puffer und einmaligem Invertieren. Die Zelltrümmer wurden bei 10.000 rpm für 10 min. bei RT abzentrifugiert und der Überstand möglichst zelltrümmerfrei in ein neues 1,5 ml Tube aufgenommen. Das Waschen erfolgte mit 700 µl -20 °C kaltem 100 %-igem Ethanol bei 14.000 rpm für 30 min. bei 4 °C. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet nochmal mit 200 µl 70 %-igem Ethanol bei 14.000 rpm für 5 min. bei 4 °C gewaschen. Das Pellet wurde bei 50 °C für 20 min. im Heizblock getrocknet und anschließend in 20 µl H₂O aufgenommen.

3.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA mit Maxi-Prep

Zur Gewinnung von großen Mengen Plasmid wurden 2 ml der Übernachtkulturen (siehe Kapitel 3.3.3) zu 200 ml LB-Medium und 200 µl Ampicillin gegeben und ebenfalls bei 37 °C über Nacht kultiviert.

Zur Isolation wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit genutzt, es wurden ausschließlich die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet. Das Hersteller-Protokoll wurde befolgt, die gewonnene DNA in 500 µl H₂O aufgenommen.

3.3.6 Agarosegelelektrophorese

Mit der Agarosegelelektrophorese wurden die PCR-Produkte gescreent und die DNA-Fragmente der Restriktionsansätze der Größe nach aufgetrennt.

Es wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet. Hierzu wurden 0,5 g Agarose mit 50 ml 1 x TBE-Puffer erhitzt und das verdampfte Wasser anschließend durch destilliertes H₂O

ersetzt. Nach Abkühlen auf ca. 42 °C wurden 3,5 µl 1 %-ige Ethidiumpromidlösung hinzugegeben, gemischt und das Gel in eine Elektrophoresekammer gegossen.

Nach ca.15 min. war das Gel ausgehärtet, der Kamm konnte entfernt werden und das Gel mit 1 x TBE überschichtet werden.

Die Proben wurden mit 6-fach-Ladepuffer versetzt und mit einem entsprechenden DNA-Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V über 45 min. laufen gelassen und die DNA anschließend auf einem UV-Lichttisch mit einer Anregungswellenlänge von 360 nm sichtbar gemacht.

3.3.7 DNA-Extraktion aus Agarosegel

Die gewünschte Bande wurde unter dem UV-Lichttisch sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Mit Hilfe des Gel-Extraktions-Kits wurde die DNA nach Herstellerprotokoll aus dem Gel isoliert und anschließend in 25 µl H₂O aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde anschließend mittels Photometer bestimmt.

3.3.8 Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentration

Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ist es möglich, die DNA-Konzentration photometrisch zu bestimmen. Da die Absorption (bzw. Extinktion) nach diesem Gesetz proportional zur Konzentration einer Lösung ist, lassen sich durch Messung der Absorption durch ein Photometer Rückschlüsse auf deren Konzentration ziehen.

Hierzu wurde die Absorption einer Lösung in Quarzglasküvetten bei 260 nm mit dem Photometer gemessen. Um geeignete Konzentrationen zu erhalten, wurde die Ausgangslösung gegebenenfalls 1:10 oder 1:100 verdünnt.

Lambert-Beer'sches Gesetz: $E = \log I_0/I = \epsilon \cdot c \cdot d$

E gemessene Extinktion (Absorption)

I₀ Intensität des eintretenden Lichtstrahls

I Intensität des nach Durchgang durch die Probe austretenden Lichtes

c Konzentration der absorbierenden Substanz

d Schichtdicke der Küvette

ε molarer Extinktionskoeffizient

3.3.9 Enzymatische Hydrolyse (Restriktion)

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden in Kapitel 2.2 aufgelistet und mit den vom Hersteller empfohlenen Puffern, Temperaturen und Zeiten eingesetzt.

Bei einem Doppelverdau wurde darauf geachtet, dass beide Enzyme wenn möglich vollständige Aktivität entwickeln konnten. Die Restriktionsansätze wurden entsprechend hitzeinaktiviert, wenn sie danach weiterverwendet wurden.

Plasmid	100 – 300 ng
Enzym	20 U
Enzym	20 U
10 x Puffer	1 x
H ₂ O destilliert	ad 10 µl

3.3.10 Dephosphorylieren von DNA

Mit der Antarktischen Phosphatase wurde die 5'-Phosphat-Gruppe der DNA vor einer Ligation entfernt. Dies verhindert eine Religation des geschnittenen Vektors.

Die Dephosphorylierung erfolgte bei 37 °C mit einer Inkubationszeit von 15 min. Anschließend wurde die Phosphatase bei 65 °C hitzeinaktiviert.

DNA (hydrolisiert)	1 µg
Antarctic Phosphatase	5 U
10 x Puffer	1 x
H ₂ O destilliert	ad 20 µl

3.3.11 Ligation mit T4-Ligase

Vor der Ligation wurden Vektor und Insert jeweils mit HindIII verdaut und anschließend aufgereinigt. Die Konzentration wurde bei Bedarf photometrisch bestimmt.

Vektor und Insert wurden mit dem molaren Verhältnis 1:5 nach der Formel:

$$\text{Insert [ng]} = 3 \cdot \text{Vektor[ng]} \cdot \text{Länge Insert [bp]} / \text{Länge Vektor [bp]}$$

eingesetzt. Zu 20 µl wurden außerdem 2 µl 10 x Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (400 U) gegeben.

Die Inaktivierung der Ligase fand bei 65 °C für 10 min. statt.

3.3.12 InFusion-Klonierung

Die InFusion™-Klonierung wurde genutzt um die RPGR^{ORF15}-Gensequenz in den pcDNA5-frt-Vektor zu klonieren.

Hierzu wurde der FRT-Vektor mit HindIII und NotI im Doppelverdau über Nacht linearisiert. Der geschnittene Vektor wurde anschließend über eine Plasmid-Isolationssäule nach Angaben des Herstellers gereinigt. Zur Kontrolle wurden 2 µl auf ein Agarosegel aufgetragen.

Das Insert wurde aus dem RPGR-4-Vektor amplifiziert. Die hierfür benötigten Primer wurden nach Protokoll mit der Schnittstelle HindIII, der Sequenz homolog zum linearisierten Vektor am 5'-Ende und den zum Insert komplementären Sequenzen am 3'-Ende designt. Die Amplifizierung fand mit der Phusion und dem Long-Range-Protokoll (siehe Kapitel 3.3.1.2) statt. Das PCR-Produkt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und die entsprechende Bande ausgeschnitten und mit einem Gelextraktionskit (siehe Kapitel 3.3.7) aus dem Gel aufgereinigt.

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde dann mit einem *Cloning Enhancer* bei 37 °C für 15 min. inkubiert und anschließend bei 80 °C für 15 min. inaktiviert.

Vektor und Insert wurden dann in einem molaren Verhältnis von 2:1 in einem 10 µl-Ansatz mit H₂O destilliert gemischt. Dieser Ansatz wurde mit dem lyophilisierten InFusion™-Reaktionsansatz bei 37 °C für 15 min. inkubiert und bei 50 °C für 15 min. inaktiviert.

Die kompetenten Zellen von Clontech wurden auf Eis aufgetaut und mit 2,5 µl des Reaktionsansatzes versetzt und 30 min. auf Eis inkubiert.

Der „Hitzeschock“ wurde im Wasserbad bei 42 °C für 45 Sek. durchgeführt. Sofort danach wurden die *E. coli* für 1 min. auf Eis gelagert und anschließend mit 450 µl SOC-Medium versetzt und bei 37 °C für 45 min. auf dem Schüttler kultiviert.

Es wurden 100 µl der Transformationslösung auf eine leicht angetrocknete LB-Amp-Agar-Platte ausplattiert, die Restlösung wurde bei 5000 rpm für 5 min. abzentrifugiert. Es wurden 200 µl Überstand abgenommen und das Pellet in den restlichen 100 µl re-suspendiert und anschließend auf eine zweite Agar-Platte ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

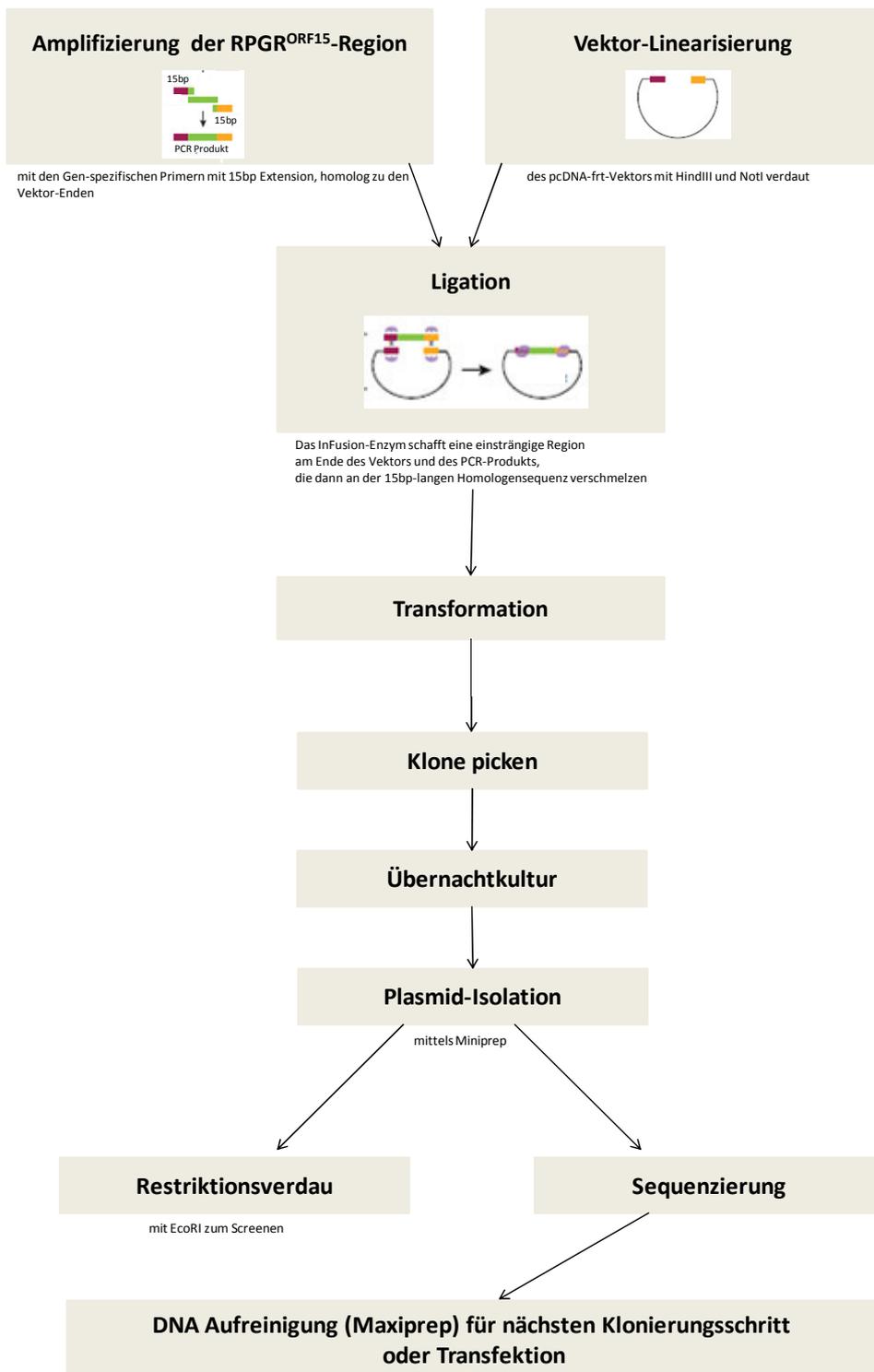


Abb. 28 InFusion-Klonierung

Zunächst wurde die RPGR ORF 15 Region amplifiziert mit den genspezifischen Primern mit 15 bp Extension, homolog zu den Vektorenden. Anschließend wurde der pcDNA-frt-Vektor durch einen Verdau mit HindIII und NotI linearisiert. Mit Hilfe des InFusion-Enzyms wurde dann eine Ligation erreicht und anschließend erfolgte die Transformation in die kompetenten *E. coli*. Dann mussten die Klone gepickt werden und nach einer Übernachtskultur konnte die Plasmid-Isolation mittels Miniprep erfolgen. Durch einen Restriktionsverdau wurden die geeigneten Klone detektiert und durch eine Sequenzierung bestätigt. Durch die DNA-Isolierung mittels Maxiprep konnte anschließend eine ausreichend große Menge des pcDNAfrt RPGR genom Vektors gewonnen werden. (geändert nach InFusion[®]HD Clonig Kit User Manual)

3.3.13 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Proben wurden zur Sequenzierung nach Göttingen zu der Firma SeqLab geschickt.

Sequenzierungsansatz:

Plasmid	700 ng
Primer	20 ng
H ₂ O destilliert	x µl
gesamt	7 µl

3.3.14 Herstellung von Glycerin-Stocks

Um *E. coli*-Klone über längere Zeit lagern zu können, wurden Glycerin-Stocks hergestellt. Hierzu wurden je 1 ml der Übernachtskultur mit 1 ml Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Glycerin-Stocks wurden bei -80 °C gelagert.

3.3.15 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde eine Übernachtskultur (siehe Kapitel 3.3.3) angesetzt. Am nächsten Tag wurden 2 ml dieser Übernachtskultur in 100 ml auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium mit 250 µl Ampicillin (Endkonzentration 1 mM) überimpft. Diese Hauptkultur wurde dann für zwei Stunden bei 37 °C auf dem Schüttler (180 rpm) bis zu einer Optischen Dichte OD₆₀₀ = 0,5–0,7 inkubiert. Danach wurde die Kultur für 30 min. auf Eis gelagert und anschließend für 5 min. bei 5100 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 50 ml kalter 1 mM HEPES-Lösung (0,23 g/L) resuspendiert. Die Lösung erneut für 5 min. bei 5100 g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und der ganze Schritt mit 25 ml kalter 1 mM HEPES-Lösung wiederholt. Dann wurde das Pellet zunächst in 10 ml und anschließend in 5 ml 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert und jeweils für 5 min. bei 5100 g und 4 °C abzentrifugiert. Beide Male wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert und frisch für die anschließende Transformation eingesetzt. Die restlichen *E. coli* wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach bei -80 °C gelagert.

3.3.16 Transformation elektrokompenter Zellen

3.3.16.1 mit Hitzeschock

Für die Transformation mit Hitzeschock wurden 50 µl kompetente Zellen mit 2,5 µl der verdünnten Reaktionslösung versetzt, vorsichtig hoch- und runterpipettiert und 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für genau 45 Sek. in einem 42 °C warmen Wasserbad dem Hitzeschock ausgesetzt und direkt danach nochmal für 1 min. auf Eis gelagert. Die Zellen wurden dann in 450 µl SOC-Medium aufgenommen und für 60 min. bei 37 ° und 250 rpm auf dem Schüttler inkubiert.

100 µl dieser Zellsuspension wurden nach 60 min. auf eine leicht angetrocknete LB-Amp-Agar-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.16.2 mit Elektroporation

Für die Transformation mittels Elektroporation wurden 50 µl elektrokompenter Zellen auf Eis gelagert und mit 1,5 µl Ligationsansatz versetzt. Die Zellsuspension wurde dann in vorgekühlte Elektroporationsküvetten gegeben, wobei darauf zu achten war, dass sich keine Luftblasen bildeten. Die Küvetten wurden in den Elektroporator gestellt und mit 2000 V über 5 ms elektroporiert. Die Küvetten wurden unmittelbar nach der Transformation mit 1 ml vorgewärmtem LB-Medium ausgespült und die Zellsuspension in einem Eppendorf-Tube aufgefangen. Die *E. coli* wurden dann für 45 min. bei 37 °C auf dem Schüttler kultiviert und anschließend 100 µl des Transformationsansatzes auf eine leicht angetrocknete LB-Amp-Agar-Platte ausplattiert. Der Rest der Zellsuspension wurde bei 5000 rpm für 5 min. abzentrifugiert, 800 µl Überstand abgenommen und das Pellet in den übrigen 100 µl resuspendiert und anschließend auf eine zweite LB-Amp-Agar-Platte ausplattiert.

Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.17 Transfektion

3.3.17.1 mit Lipofectamin

Mit Hilfe des Lipofectamins können sich Liposomen-DNA-Komplexe bilden und durch Fusion dieser Komplexe mit der Zellmembran kann DNA ins Zytoplasma transportiert werden [66]. Zur Vorbereitung wurden die HEK-Zellen 24 Stunden vor Transfektion mit einer Zellzahl von 1×10^6 auf eine 24-Well-Platte überführt und jedes Well wurde auf 1 ml mit DMEM aufgefüllt und bis zum nächsten Tag inkubiert.

Zur Co-Transfektion von pOG44 und pFRT/RPGR wurden 1600 ng DNA im Verhältnis 9:1 verwendet. Die DNA wurde mit 100 µl DMEM (ohne FKS), 1,5 µl PLUS-Reagent und 4,5 µl Lipofectamin LTX™ Reagent verdünnt und die Lösung anschließend für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung tröpfchenweise auf die Zellen gegeben.

3.4 Legende zum Ergebnisteil



Abb. 29 Legende zu dem Ergebnisteil Zellkultur

Der Zeitstrahl zeigt das Wachstum der murinen Zellen in Kultur über beliebig viele Wochen (x Wochen), das Wachstum der Zellen wurde lichtmikroskopisch beurteilt und nach Zellwachstum und Morphologie bewertet: sehr gutes Wachstum, Zellen morphologisch unauffällig (+++); gutes Wachstum, vereinzelte Zellen morphologisch auffällig (++); mäßiges Wachstum, Zellen überwiegend morphologisch auffällig (+); Zellen in Apoptose (†).

4 Ergebnisse

4.1 Immortalisierung

Zur Herstellung eines in vitro Testsystems wurde zu Anfang die Idee verfolgt, aus den Zellen der genetisch veränderten Mäuse unserer Arbeitsgruppe sowie parallel aus Zellen von heterozygot betroffenen und gesunden Mäusen jeweils eine Zelllinie zu generieren.

Zunächst wurden ausschließlich Lymphozyten in Kultur genommen. Im Verlauf entschieden wir uns, zusätzlich noch Knochenmarkzellen zu kultivieren. Im Vergleich zu den Lymphozyten erschienen die pluripotenten und wachstumsfreudigen Knochenmarkzellen etwas geeigneter.

Um eine Immortalisierung zu erreichen, wurden vier unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum einen wurde auf eine spontane Immortalisierung gehofft. Und zum anderen sollte die Immortalisierung durch die Verwendung eines aromatischen Kohlenwasserstoffs, durch UV-Bestrahlung und durch Einsatz eines viralen Onkogens provoziert werden.

Die verschiedenen Ansätze werden im Folgenden mit den jeweiligen Ergebnissen dargestellt.

4.1.1 Lymphozyten

4.1.1.1 Entnahme

Die Lymphozyten wurden aus den zum Todeszeitpunkt unterschiedlich alten Mäusemilzen wie folgt gewonnen.

Versuch 1 (V1): 31.01.2011 ➡ 6 Wochen alt

Versuch 2 (V2): 14.02.2011 ➡ 8 Wochen alt

Versuch 3 (V3): 22.03.2011 ➡ 12 Wochen alt

Versuch 4 (V4): 18.04.2011 ➡ 4 Wochen alt

Zu jedem Entnahmezeitpunkt standen „gesunde“, genetisch veränderte (im Folgenden als „transgen“ bezeichnete) und „heterozygote“ Mäuse zu Verfügung.

4.1.1.2 Spontane Mutation

Wie bereits 1963 von Todaro und Green im T3T-Protokoll beschrieben, kann es bei jeder Zelle zu einer Spontanmutation kommen, bei der der Phänotyp nicht transformiert wird (siehe auch Kapitel 3.2.1).

Daher wurde jeweils ein Ansatz bewusst nicht behandelt. Die Lymphozyten wurden ohne eine äußere Noxe hinzuzugeben kultiviert. Bei V1, V2 und V4 war jeweils nach 6 Wochen lichtmikroskopisch keine intakte Zelle mehr zu sehen. Die Zellen zeigten zunächst ein gutes Zellwachstum, welches dann kontinuierlich abnahm.

Bei V2 zeigte sich ähnlich wie bei den anderen Zellen zunächst ein gutes Wachstum. Nach nur wenigen Tagen kam es jedoch zu einem massiven Zellzerfall, der auch nach mehrfachem Mediumwechsel nicht gestoppt werden konnte. Es ist daher von einer Kontamination dieser Zellkulturen auszugehen.

Bei keiner der entnommenen Zellen kam es zu einer Spontanmutation, die ein ungehindertes Wachstum zur Folge gehabt hätte. Abb. 30 gibt hierüber eine Übersicht.

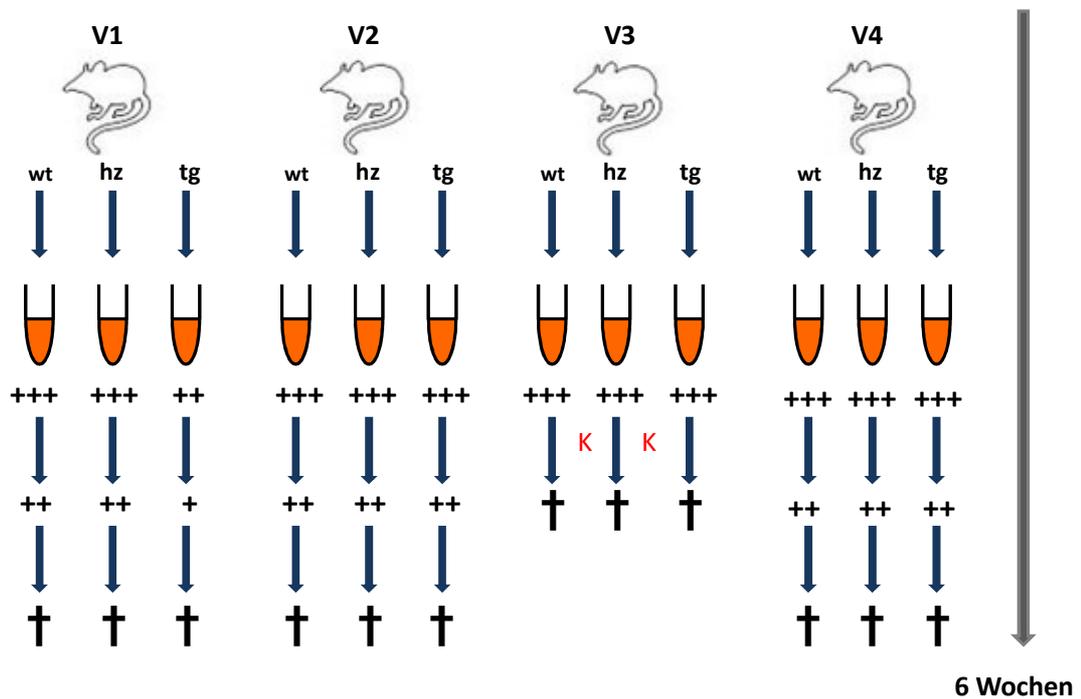


Abb. 30 Lymphozyten: Spontane Mutation

Bei jeder Entnahme (V1, V2, V3 und V4) wurde je ein Ansatz der Wildtyp-Maus (wt), der heterozygoten (hz) und der transgenen (tg) Mäuse kultiviert ohne eine Noxe von außen hinzuzufügen. Die Kulturen vom 22.03.2011 waren kontaminiert (K) und mussten frühzeitig verworfen werden.

4.1.1.3 Benzo[a]pyren

Eine Möglichkeit der provozierten Immortalisierung liegt in der Verwendung von Benzo[a]pyren. Benzo[a]pyren ist ein aromatischer Kohlenwasserstoff und eine der am längsten bekannten und am besten untersuchten karzinogenen Substanzen. Belharazem et al. gelang es 2006, embryonale Fibroblasten mittels Benzo[a]pyren zu immortalisieren.

Da aufgrund der noch geringen Wurfzahlen keine embryonalen Fibroblasten zur Verfügung standen, wurden versuchsweise die gewonnenen murinen Lymphozyten mit Benzo[a]pyren behandelt. Die Lymphozyten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Entnahme mit Benzo[a]pyren versetzt, welches über 48 Stunden auf die Zellen einwirken konnte (siehe auch Kapitel 3.2.2).

Unter dem Lichtmikroskop zeigte sich, dass die Zellen nach der Einwirkung teilweise verformt und häufig auch unmittelbar nach den 48 Stunden in Zelllyse gegangen waren. Die Zellen, die nach 48 Stunden noch intakt waren, wurden weiter kultiviert und täglich mit dem Lichtmikroskop überprüft.

Bei V1 konnte mittels FACS-Analyse nach 58 Tagen keine intakte Zelle mehr nachgewiesen werden. Bereits 13 Tage zuvor war es nicht möglich gewesen, mittels PCR das ORF15-Produkt zu amplifizieren, sodass davon auszugehen ist, dass die Lymphozyten zu diesem Zeitpunkt bereits in Apoptose waren.

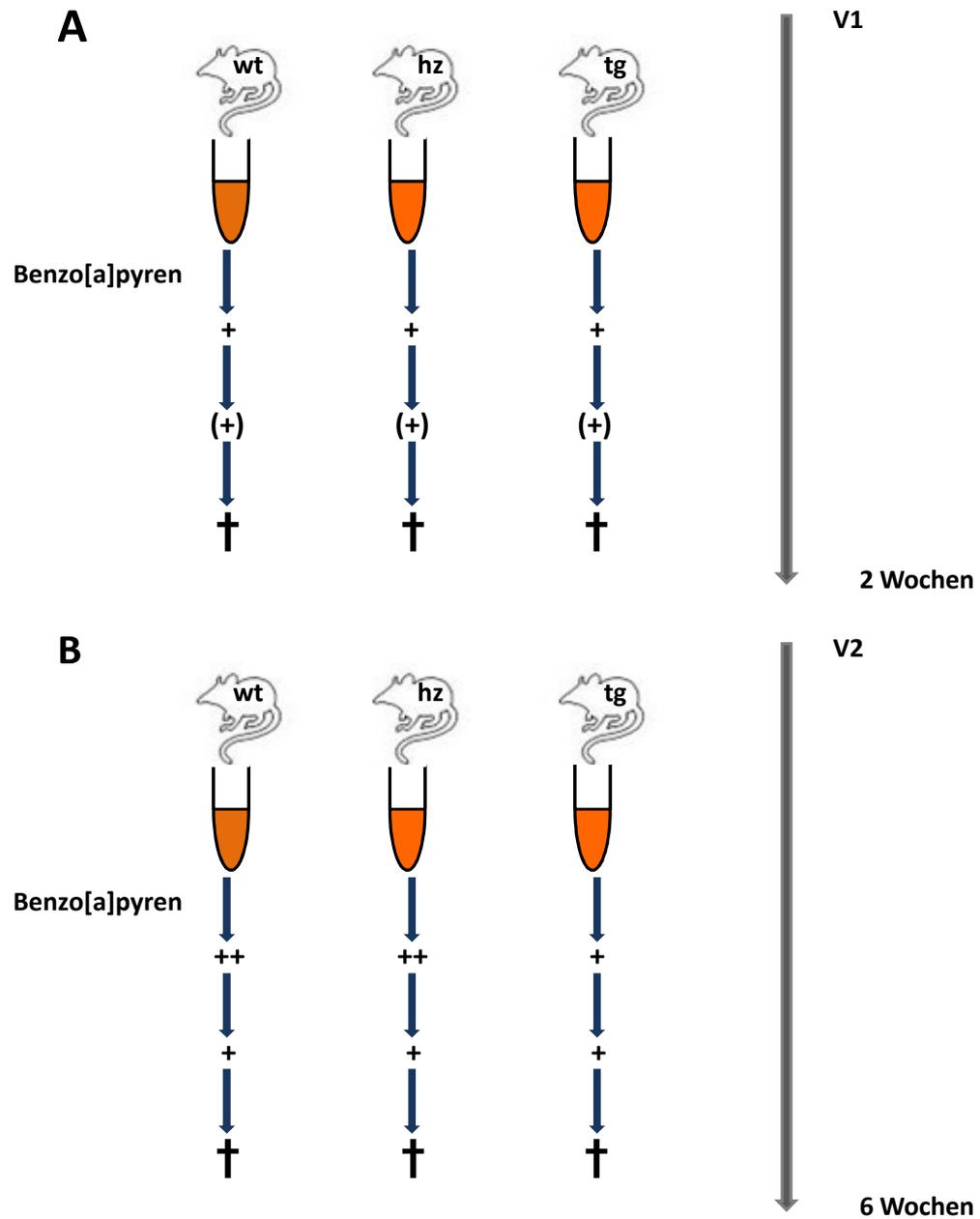
Bei V2 zeigte sich ebenfalls nach der Behandlung mit Benzo[a]pyren ein gutes bis mäßiges Wachstum, wobei die Zellen der Wildtyp-Mäuse und die der heterozygoten Mäuse ein deutlich besseres Wachstum hatten als die Zellen der transgenen Mäuse.

Im Verlauf kam es jedoch auch hier zu einem abnehmenden Wachstum, sodass bei allen Zellen nach ca. 6 Wochen keine intakte Zelle mehr gesehen werden konnte.

Bei V3 konnte bereits am Folgetag lichtmikroskopisch keine einzige intakte Zelle mehr gesehen werden. Hier waren alle Zellen einen Tag nach der Behandlung mit Benzo[a]pyren in Apoptose gegangen.

Bei den zuletzt behandelten Zellen von V4 zeigte sich zunächst bei allen Proben ein gutes Wachstum, welches kontinuierlich abnahm. Nach ca. 8 Wochen konnte auch hier keine intakte Zelle mehr gesehen werden.

Es gelang leider nicht mittels Benzo[a]pyren die Lymphozyten von gesunden, heterozygoten oder transgenen Mäusen zu immortalisieren.



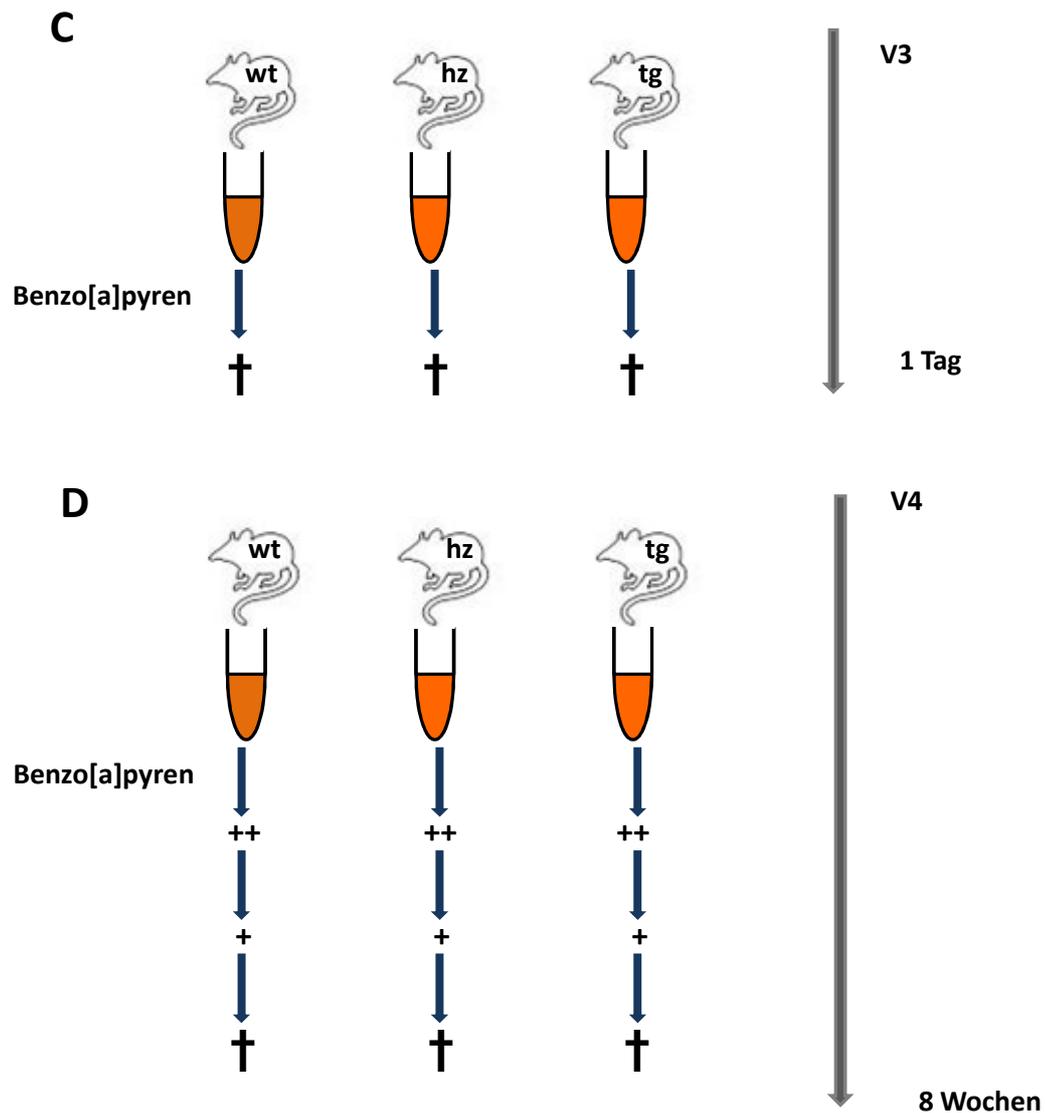


Abb. 31 Lymphozyten mit Benzo[a]pyren behandelt

Es wurde jeweils ein Ansatz der Wildtyp-Maus (wt), der heterozygoten (hz) und der transgenen (tg) Mäuse kultiviert und nach konfluentem Wachstum die Proben mit Benzo[a]pyren für 48 Stunden versetzt. A: Bei V1 zeigten alle 3 Proben nach den 48 Stunden nur noch ein mäßiges Wachstum und überwiegend morphologisch veränderte Zellen, nach 2 Wochen konnte bei keiner Probe mehr eine intakte Zelle gesehen werden.

B: Bei V2 zeigten die wt- und hz-Proben nach den 48 Stunden ein noch gutes Wachstum, die tg-Probe nur noch ein mäßiges Wachstum. Nach 6 Wochen konnte in keiner Probe mehr eine intakte Zelle gesehen werden.

C: Bei V3 zeigten alle 3 Proben bereits einen Tag später nur noch Zellen in Apoptose.

D: Bei V4 zeigten alle 3 Proben nach den 48 Stunden noch ein gutes Wachstum und überwiegend morphologisch veränderte Zellen, nach 8 Wochen konnte bei keiner Probe mehr eine intakte Zelle gesehen werden.

4.1.1.4 Large-T-Antigen

Des Weiteren wurde eine Immortalisierung durch das Large-T-Antigen versucht. Das Large-T-Antigen ist ein virales Onkogen des Simian-Virus 40, welches an die Tumorsuppressorproteine Rb und p53 der T-Lymphozyten bindet und zu einer Immortalisierung durch Inaktivierung dieser zelleigenen DNA-Schadenskontrolle führen kann.

Die Lymphozyten wurden nach der ersten Passage mittels Elektroporation mit pBABE-puro SV 40 LT versetzt und anschließend täglich mittels Lichtmikroskop beurteilt und weiter kultiviert

Bei den Lymphozyten der transgenen Mäuse aus V1 und V2 konnte am Folgetag mittels Fluoreszenz-Mikroskop in der Transfektionskontrolle mit GFP keine positive Transfektion festgestellt werden. Es ist daher davon auszugehen, dass die Transfektion von Large-T-Antigen in die Lymphozyten ebenfalls nicht effektiv war.

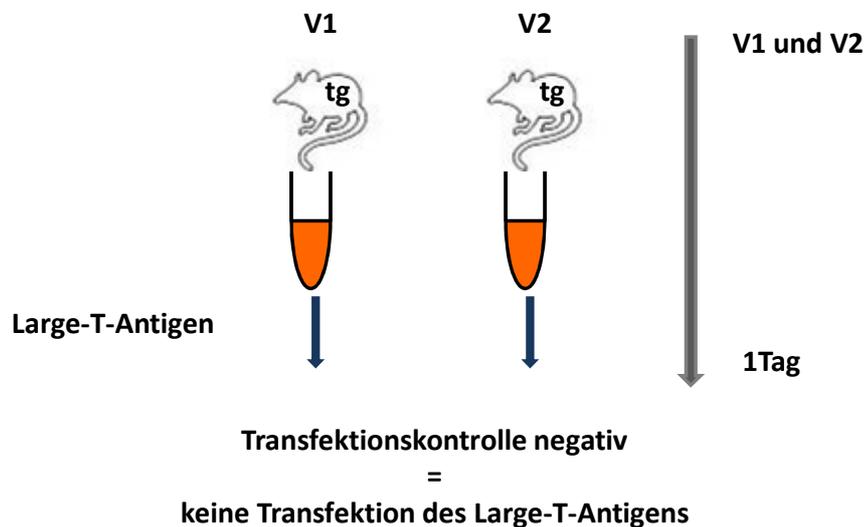


Abb. 32 Lymphozyten V1 und V2 mit Large-T-Antigen

Bei V1 und V2 wurde bei je einem Ansatz der transgenen (tg) Mäuse, nach konfluentem Wachstum, eine Transfektion mit Large-T-Antigen durchgeführt.

Da sich die Transfektionskontrolle negativ zeigte, ist davon auszugehen, dass auch die Transfektion von Large-T-Antigen in die murinen Zellen nicht stattgefunden hat.

4.1.1.5 UV-Licht

Die Lymphozyten wurden versuchsweise mit verschiedenen Intensitäten über jeweils drei Minuten bestrahlt. Die gewählte Bestrahlungszeit sowie die Intensitäten wurden in Anlehnung an die Arbeit von Smith et al von 2000 empirisch gewählt. Die Lymphozyten aus 1 wurden zunächst mit den Intensitäten 4, 8 und 12 J/m² bestrahlt. Hiernach ergaben sich keinerlei Auswirkungen im Zellwachstum, weshalb die gleichen Zellen erneut mit höheren Intensitäten (10/50 und 100 J/m²) bestrahlt wurden.

Auch nach der zweiten Bestrahlung zeigten alle Proben ein gleichmäßig gutes Wachstum mit kontinuierlicher Abnahme bis hin zur Apoptose nach 8 Wochen in Kultur (siehe Abb. 30). Je ein Ansatz der Lymphozyten der Wildtyp-Maus, der heterozygoten und der transgenen Mäuse aus V2 wurden direkt mit den Intensitäten 10 J/m², 50 J/m² und 100 J/m² bestrahlt. Hier zeigte sich ähnlich wie bei den Lymphozyten vom V1 zunächst ein durchweg gutes Zellwachstum mit kontinuierlicher Abnahme. Die vollständige Apoptose aller Zellen zeigte sich hier jedoch bereits nach 6 Wochen.

Da es insgesamt zu keiner eindeutigen Beeinflussung der Zellen durch die UV-Licht-Bestrahlung kam, wurde dieser Ansatz zur provozierten Immortalisierung nicht weiter verfolgt.

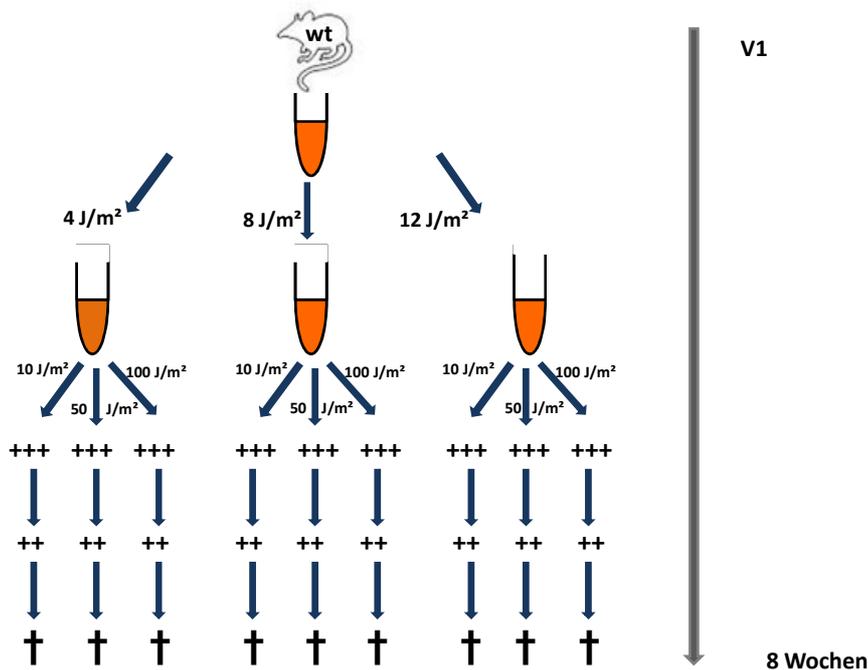


Abb. 33 Lymphozyten aus V1 mit UV-Licht

Bei V1 wurde je ein Ansatz der Wildtyp-Maus (wt), der heterozygoten (hz) und der transgenen (tg) Mäuse kultiviert und nach konfluentem Wachstum in 3 Proben geteilt und die Proben zunächst mit UV-Licht der Intensität 4, 8 und 12 J/m² bestrahlt. Da die Zellen nach diesen Intensitäten keinerlei Veränderung in ihrem Wachstum zeigten, wurden alle Proben erneut geteilt, sodass aus jeder Probe 3 neue Ansätze gewonnen wurden. Alle Proben wurden nun erneut mit Intensitäten von 10, 50 und 100 J/m² bestrahlt. Da das Zellwachstum von wt-, hz- und tg-Zellen nach der Bestrahlung fast identisch waren, wird hier stellvertretend für alle 3 Proben das Wachstum der wt-Zellen dargestellt.

Nach 8 Wochen konnte bei keiner Probe mehr eine intakte Zelle gesehen werden.

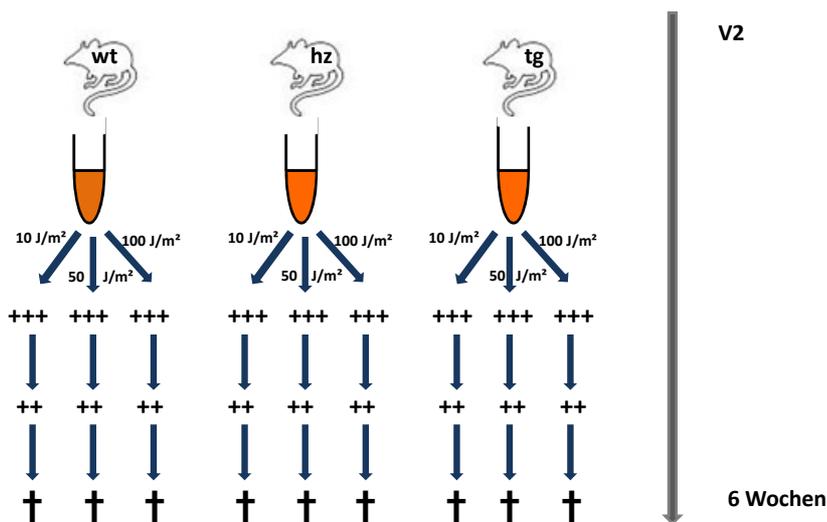


Abb. 34 Lymphozyten aus V2 mit UV-Licht

Bei V2 wurde je ein Ansatz der Wildtyp-Maus (wt), der heterozygoten (hz) und der mutierten (tg) Mäuse kultiviert, nach konfluentem Wachstum in 3 Proben geteilt und die Proben mit UV-Licht der Intensität

10, 50 und 100 J/m² bestrahlt. Nach 6 Wochen konnte bei keiner Probe mehr eine intakte Zelle gesehen werden.

4.2 KM-Zellen

Als Alternative zu den Lymphozyten wurde parallel noch versucht, Knochenmarkzellen zu immortalisieren.

Knochenmarkzellen sind pluripotente Zellen, die noch sehr teilungsfreudig sind. Eine hohe Teilungsrate erhöht auch die Wahrscheinlichkeit für eine Mutation, die zur Immortalisierung führen könnte.

Ähnlich wie bei den Lymphozyten wurden auch hier verschiedene Ansätze verfolgt.

Auf die Behandlung mit UV-Licht und Benzo[a]pyren wurde bewusst verzichtet, da die Versuche mit den Lymphozyten nicht effektiv waren.

4.2.1 Entnahme

Die Knochenmarkzellen wurden wie folgt aus unterschiedlich alten Tieren gewonnen.

Versuch 2 (V2): 14.02.2011 ➡ 8 Wochen alt

Versuch 3 (V3): 22.03.2011 ➡ 12 Wochen alt

Versuch 4 (V4): 18.04.2011 ➡ 4 Wochen alt

Zu jedem Entnahmezeitpunkt standen uns gesunde, genetisch veränderte, im Folgenden weiterhin als „transgen“ bezeichnete und heterozygote Mäuse zur Verfügung.

4.2.2 Behandlung

4.2.2.1 Spontane Mutation

Auch von den Knochenmarkzellen wurde je ein Ansatz der gesunden, der heterozygoten und der transgenen Zellen kultiviert ohne eine äußere Noxe hinzuzufügen. Wie bereits in Kapitel 3.2.1 erwähnt, wurde von Todaro und Green bereits 1963 die Spontanmutation beschrieben.

Die Zellen der gesunden und transgenen Mäuse aus V2 zeigten zunächst ein gutes Wachstum, wohingegen die Zellen der heterozygoten Tiere von Anfang an eher mäßig wuchsen. Im Verlauf gingen die transgenen Zellen früh in Apoptose, sodass diese Zellen schon weit vor allen anderen verworfen werden mussten. Die gesunden Zellen

wuchsen weiterhin gut, die heterozygoten eher mäßig. Beide Ansätze zeigten jedoch nach ca. 10 Wochen keine intakte Zelle mehr.

Die Knochenmarkszellen aus V3 zeigten zunächst ein gutes Wachstum in allen drei Ansätzen (gesund, heterozygot, transgen), mussten jedoch ähnlich wie die Lymphozyten dieser Mäuse frühzeitig verworfen werden, sodass wir auch hier eine Kontamination vermuten.

Die zuletzt gewonnenen Knochenmarkszellen aus V4 zeigten im Ansatz der gesunden und heterozygoten Zellen zu Anfang ein sehr gutes, die Zellen der transgenen Tiere ein gutes Wachstum. Im Verlauf wuchsen jedoch nur noch die Zellen der gesunden Tiere gut, die heterozygoten nur noch mäßig und bei den transgenen Knochenmarkszellen waren nur noch vereinzelt intakte Zellen zu sehen. Alle Ansätze mussten nach ca. 12 Wochen verworfen werden.

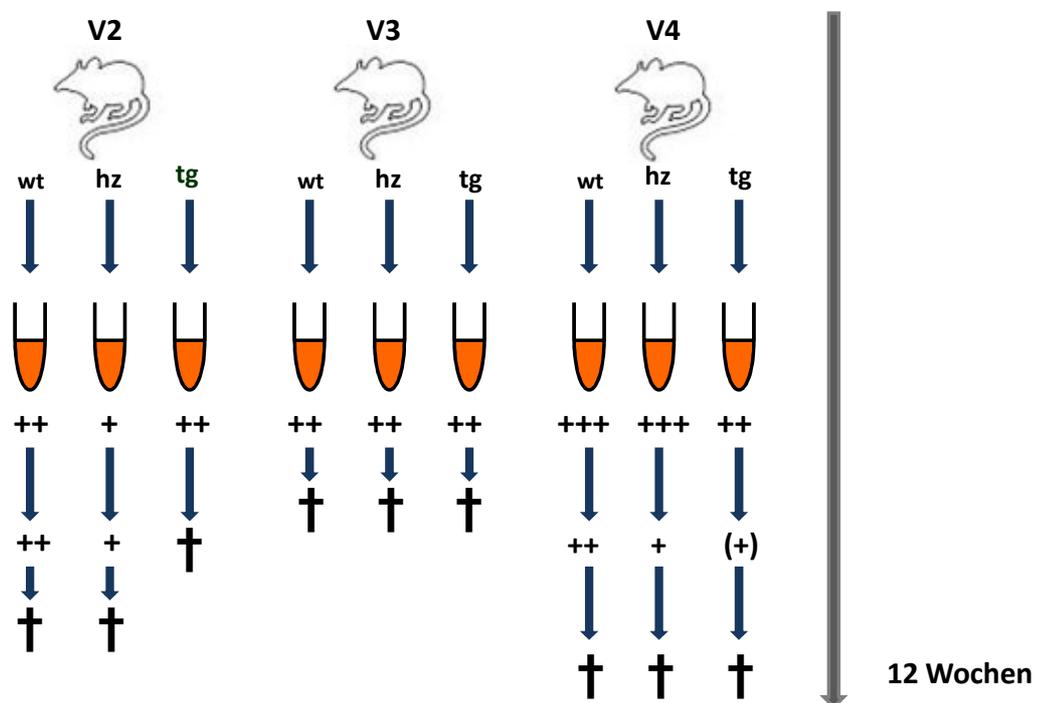


Abb. 35 Knochenmarkszellen (KM): spontane Mutation

Bei jeder Entnahme V1, V2 und V3 wurde je ein Ansatz der Wildtyp-Maus (wt), der heterozygoten (hz) und der transgenen (tg) Mäuse kultiviert ohne eine Noxe von außen hinzuzufügen.

4.2.2.2 Large-T-Antigen

Auch bei den Knochenmarkszellen wurde, wie bereits bei den Lymphozyten in Kapitel 4.1.1.4 beschrieben, das virale Onkogen „Large-T-Antigen“ des Simian Virus 40 eingesetzt.

Anders als bei den Lymphozyten gelang bei den Knochenmarkszellen V 4 eine positive Transfektionskontrolle mit GFP, weshalb wir auch von einer Transfektion des Large-T-Antigens in die Knochenmarkszellen ausgehen konnten.

Die Zellen wuchsen jedoch in allen drei Ansätzen (gesund, heterozygot und transgen) nach der Transfektion nur noch mäßig und nach 6 Wochen war leider keine intakte Zelle mehr zu sehen.

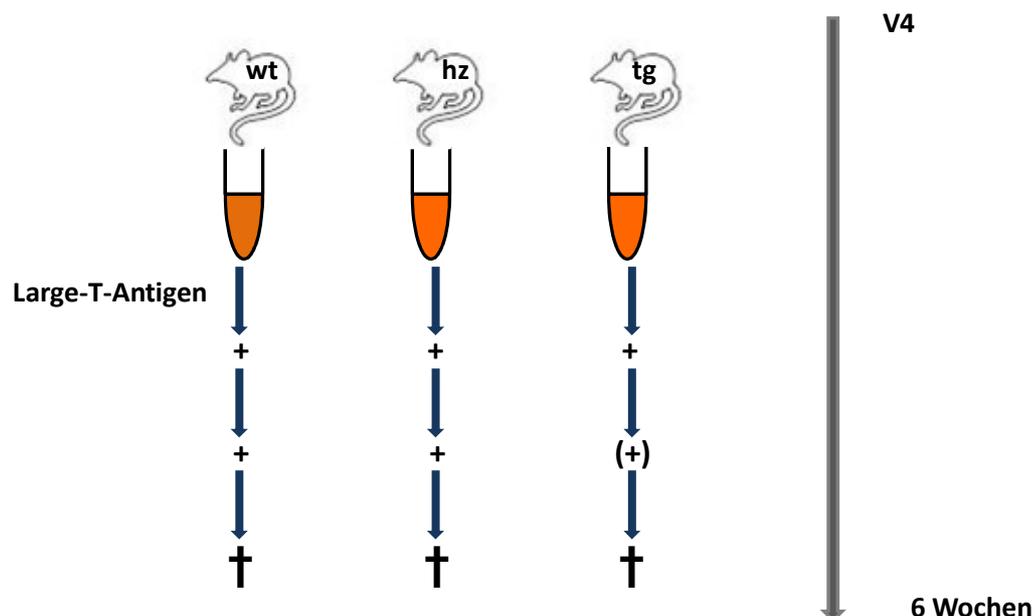


Abb. 36 Knochenmarkszellen aus V4 mit Large-T-Antigen

Bei V4 wurde je ein Ansatz der Wildtyp-Maus (wt), der heterozygoten (hz) und der transgenen (tg) Mäuse kultiviert und nach konfluentem Wachstum eine Transfektion mit Large-T-Antigen durchgeführt. Die Transfektionskontrolle zeigte sich positiv, daher konnte auch von einer positiven Transfektion des Large-T-Antigens ausgegangen werden.

Nach 6 Wochen konnte leider in keiner Probe mehr eine intakte Zelle gesehen werden.

4.3 Generierung des murinen RPGR-Modells in humaner Standardzelllinie

Da die Versuche der Immortalisierung einer murinen Zelle keine positiven Ergebnisse erbracht haben, war als Alternative zur Generierung einer primären murinen Zelllinie das HEK-Flp-InTM-System interessant. Hiermit lässt sich das murine RPGR-Genom in eine humane Standardzelllinie integrieren. Das System ist aus verschiedenen Schritten aufgebaut. Zunächst wird aus einer HEK-Zelllinie durch Transfektion des pFRT/lacZEO eine HEK-Flp-InTM-Zelllinie erzeugt. Freundlicherweise wurde uns diese HEK-Flp-InTM-Zelllinie von Prof. Wolfrum und seiner Arbeitsgruppe aus Mainz zur Verfügung gestellt.

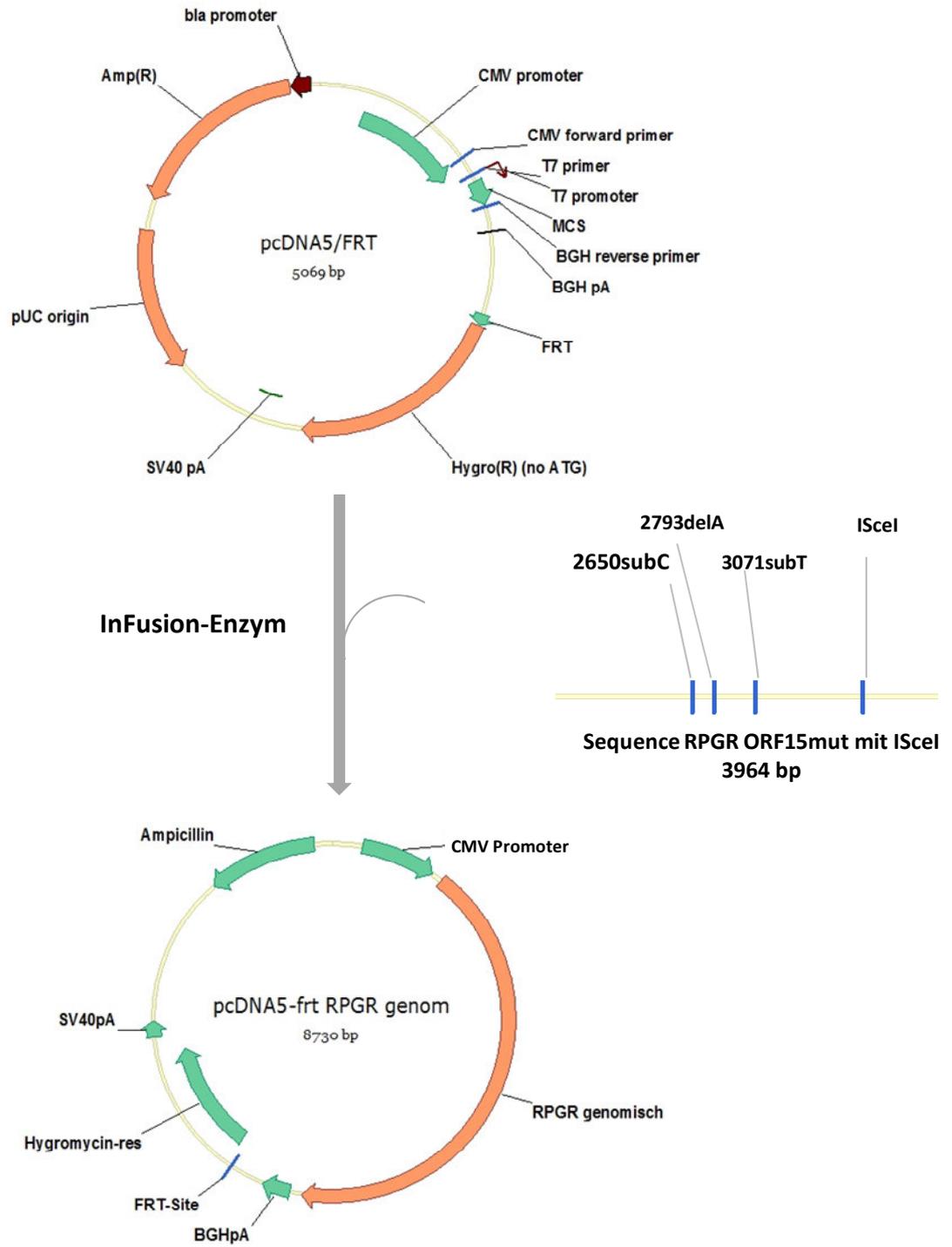
In einem weiteren Schritt wird in den pcDNA5-frt-Vektor, der die gleiche Erkennungsregion (FRT) trägt wie die HEK-Flp-InTM-Zellen, eine beliebige Gensequenz, in unserem Fall die RPGR^{ORF15}-Region, kloniert.

Anschließend kann dann der rekombinante Vektor in einer Co-Transfektion mit pOG44, welches für eine Rekombinase kodiert, in die HEK-Flp-InTM-Zellen eingebracht werden.

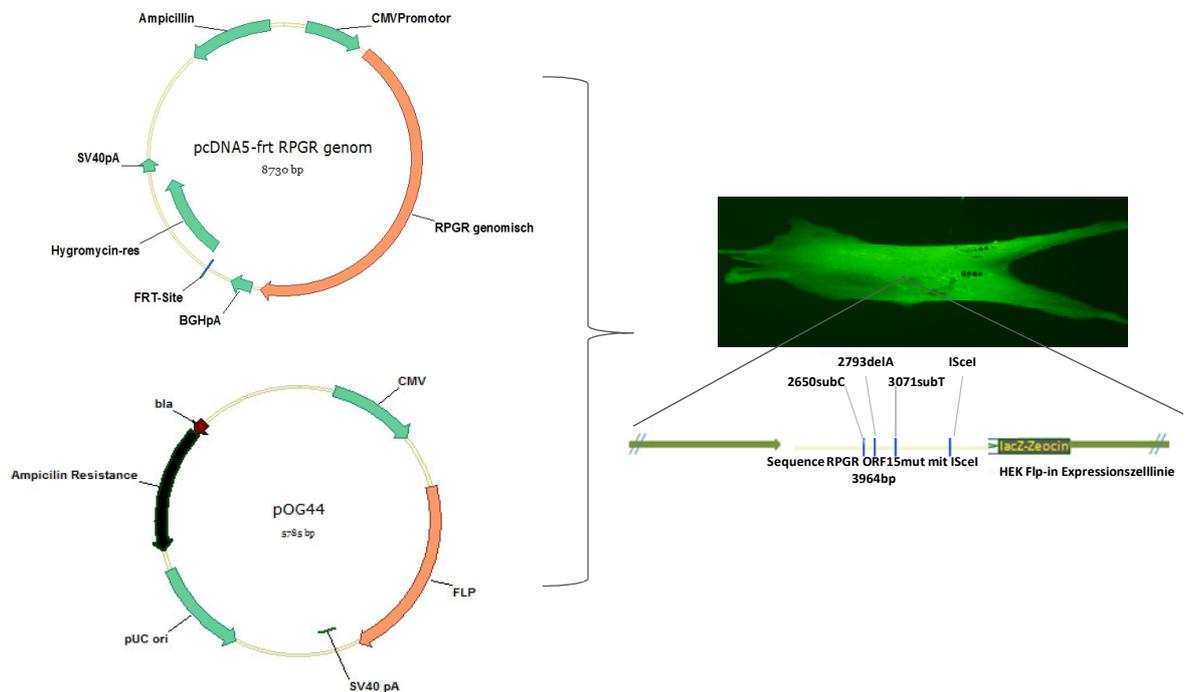
Bei erfolgreicher Transfektion und Integration der RPGR^{ORF15}-Region kann dann durch die HEK-Expressionszelllinie RPGR^{ORF15} exprimiert und anschließend analytisch auf DNA-, mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden.

Die folgende Darstellung soll eine kurze Übersicht über die einzelnen Schritte geben, die im weiteren Verlauf noch ausführlich besprochen werden.

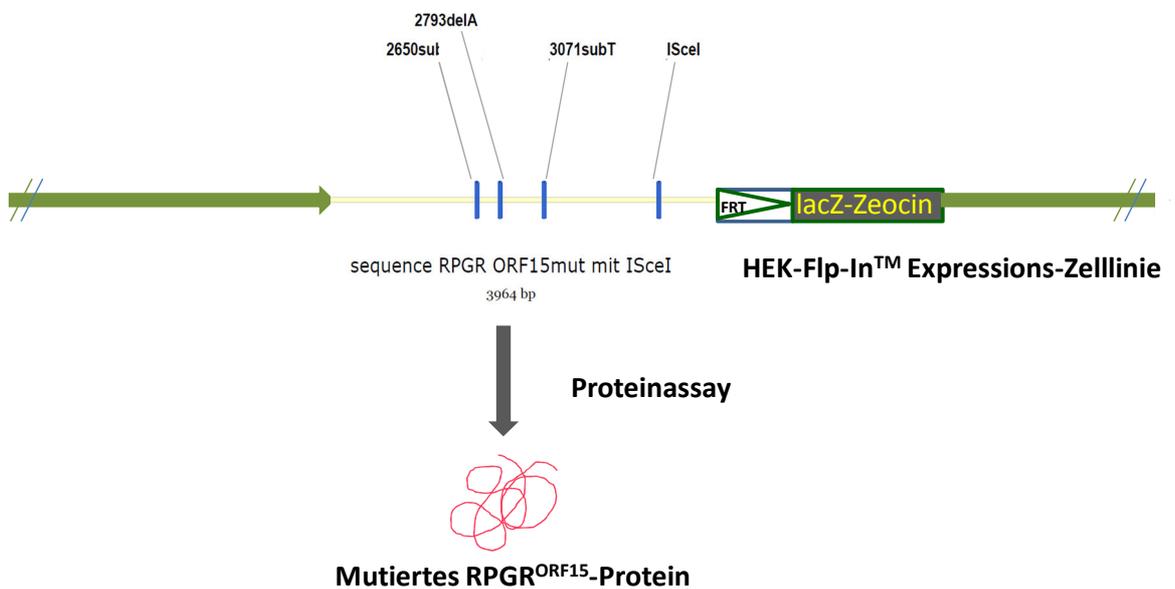
1



2



3

**Abb. 37 Das HEK-Flp-In System**

(1) Die mutierte RPGR^{ORF15}-Region wird mit Hilfe des InFusion-Enzyms in den pcDNA/FRT-Expression-Vektor kloniert. (2) Danach erfolgt eine Kotransfektion des pcDNA/FRT RPGR^{ORF15} mit dem pOG44. pOG44 kodiert für die Rekombinase, welche die RPGR^{ORF15}-Sequenz an der FRT-Erkennungsregion einmalig in das Genom der HEK 293 Flp-In-Zellen integriert. (3) Sobald die RPGR^{ORF15}-Sequenz in das Genom der HEK-293 Flp-In-Zellen erfolgreich integriert wurde, kann die Zelle das mutierte RPGR^{ORF15}-Protein bilden, welches man z.B. durch ein Proteinassay nachweisen kann.

4.4 Klonierung

Der erste Schritt in der Herstellung der stabilen HEK-Flp-In-Expressionszelle mit der gewünschten RPGR^{ORF15}-Region, ist die Klonierung dieser Sequenz in den pcDNA5-frt-Vektor. Unter Klonierung versteht man das Einbringen einer DNA-Sequenz in einen Expressionsvektor, um diese dann anschließend als rekombinante DNA in einem geeigneten Wirtssystem exprimieren und vervielfältigen zu können.

Für die Klonierung wurde das InFusion-System verwendet. Hier wurden zunächst zwei Primer designt, mit der Schnittstelle HindIII, der Sequenz homolog zum linearisierten Vektor am 5'-Ende und den zum Insert komplementären Sequenzen am 3'-Ende. Der pcDNA5-frt-Vektor wurde mit HindIII und NotI linearisiert, das PCR-Produkt wurde mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend ausgeschnitten und mit einem Gelextraktionskit (siehe Kapitel 2.4) aufgereinigt. Zur Integration des PCR-Fragments in den Vektor wurde das InFusion-Enzym genutzt.

Zur Vermehrung der nun rekombinanten DNA wurde diese in Bakterienzellen transformiert (Transformation). Die Transformation fand durch „Hitzeschock“ statt und als kompetente Zellen wurden XL-1 *E. coli* verwendet. Der Transformationsansatz wurde auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Die sichtbaren Kolonien wurden gepickt und eine Übernachtskultur (siehe Kapitel 3.3.3) angelegt. Diese Plasmid-DNA wurde mit einem Miniprep-Protokoll aus den *E. coli* isoliert (DNA-Isolierung). Um die positiven Klone detektieren zu können, wurde ein Restriktionsverdau sowie anschließend noch ein Kontrollrestriktionsverdau gemacht und die Proben auf ein Elektrophoresegel aufgetragen (Abb. 38 und 39).

Die abschließende Kontrolle wurde durch die Sequenzierung erreicht, die durch eine externe Firma durchgeführt wurde (siehe Kapitel 3.3.13).

Es wurde ein Maxiprep gemacht, um große Mengen an reiner Plasmid-DNA für die anschließende Transfektion in die HEK-Flp-InTM-Zellen zu erhalten.

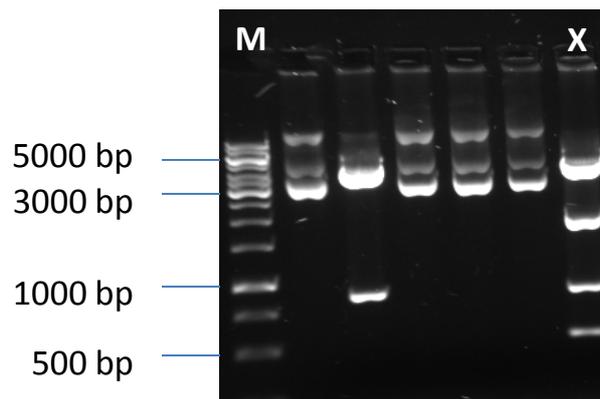


Abb. 38 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA zur Detektion eines positiven Klones

Die Plasmid-DNA wurde mit EcoRI verdaut. Zu erwarten war bei einem positivem Klon die Fragmentgrößen 4633bp, 2635bp, 879bp, 505bp, 54bp. Hier ist eine positive und damit geeignete Plasmid-DNA mit x gekennzeichnet. M: Marker 1kb DNA-Ladder (vergleiche Abb. 20). Die anderen Banden zeigen negative Befunde, d.h. der pcDNA-frt-RPGR-genom-Vektor wurde nicht erfolgreich ligiert bzw. in diese Zellen transformiert.

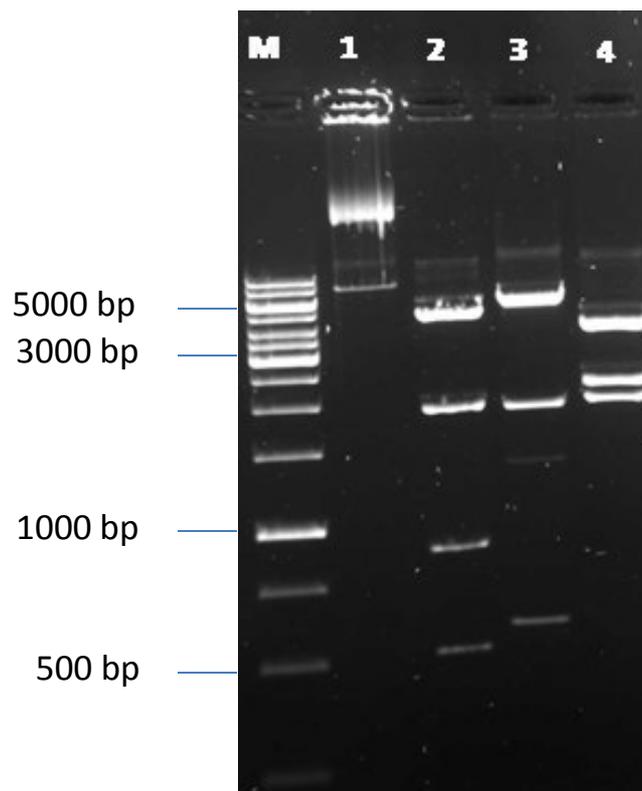


Abb. 39 Kontrollrestriktionsverdau zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung

M: Marker 1kb DNA-Ladder (vergleiche Abb.20), 1: pcDNA5-frt RPGR genom unverdaut, 2 EcoRI-Verdau: Fragmente 4633bp, 2635bp, 879bp, 505bp, 54bp und 24bp, 3: XbaI-Verdau: Fragmente 5474bp, 2684bp und 572bp, 4: Sall-Verdau: Fragmente 4507bp, 2188bp und 2035 bp

4.5 Zellkultur

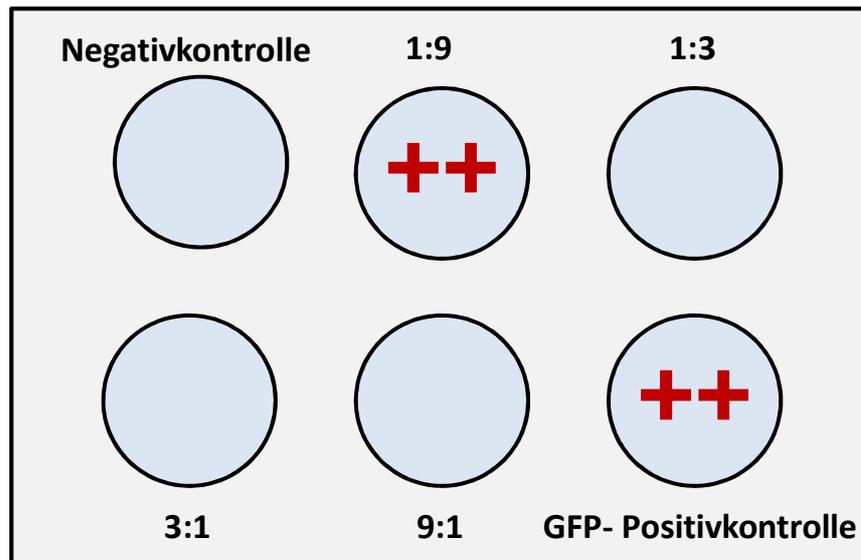
Der zweite Schritt in der Herstellung der HEK-Expressionszelllinie war die Integration des zuvor hergestellten pcDNA5-frt-RPGR-Plasmids in die HEK-Flp-InTM-Zellen.

Dies erfolgte mittels Co-Transfektion von pcDNA5-frt-RPGR-genom und des die Rekombinase pOG44 enthaltenden Plasmids.

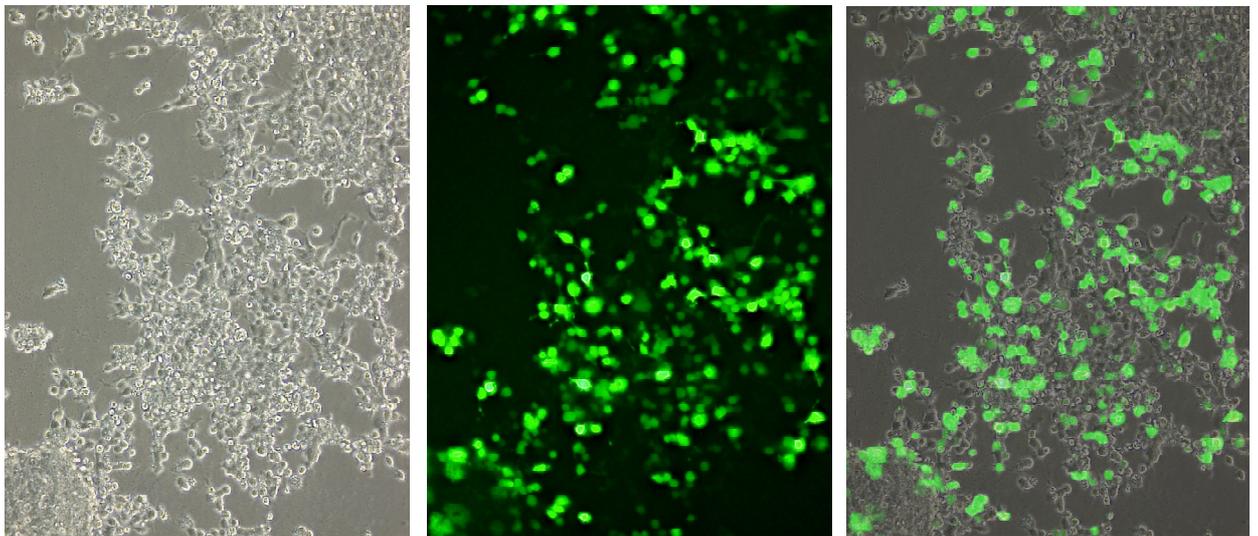
Die Transfektion wurde mit Lipofecatmin durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.17.1) Es wurde eine Transfektion im Verhältnis 1:9 pcDNA5-frt-RPGR-genom zu pOG44 gewählt, es gab eine Negativkontrolle ohne DNA und eine Positivkontrolle mit pGFP (Abb. 40). Der Ligationsansatz wurde über Nacht auf die HEK-Flp-InTM-Zellen gegeben und am nächsten Tag das alte Medium abgenommen und gegen frisches Medium ersetzt. Die Zellen, die als Positivkontrolle mit pGFP transfiziert wurden, zeigten 24 Stunden nach Transfektion im Fluoreszenzmikroskop ein Fluoreszenzsignal, was für eine erfolgreiche Transfektion spricht. Diese Zellen konnten das pGFP erfolgreich aufnehmen und exprimieren nun GFP, welches fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar ist. Die erfolgreiche Transfektion von pGFP lässt auf eine ebenso erfolgreiche Transfektion von pcDNA5-frt RPGR genom und der Rekombinase pOG44 schließen, so dass wir von einer Transfektionseffizienz von schätzungsweise 50-60 % ausgehen konnten (Abb. 41).

Um die positiv transfizierten Zellen von den nicht transfizierten Zellen zu trennen, wurde zur Selektion Hygromycin eingesetzt. Dies ist möglich, da pcDNA5-frt-RPGR-Plasmid zusätzlich das Hygromycinresistenz-Gen trägt, welches die exprimierende Zelle gegen Hygromycin resistent macht. Die Zellen, die nicht transfiziert werden konnten, können folglich auch das entsprechende Protein nicht exprimieren, das gegen Hygromycin schützt und werden dadurch in Apoptose gehen. Nach einigen Tagen werden also nur noch die Zellen überleben, die positiv transfiziert werden konnten.

Daher wurde 48 Stunden nach Transfektion frisches Kulturmedium mit Hygromycin (100 ng/μl) versetzt und gegen das alte Medium ersetzt. Anschließend wurde das Medium alle 3-4 Tage gewechselt, bis sich Zellfoci aus positiv transfizierten Zellen gebildet hatten. Diese Foci wurden isoliert und die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70 % gezogen.

**Abb. 40 Transfektionsansatz**

Die Transfektion von pcDNA5-frt-RPGR-genom und pOG44 wurde im Verhältnis 1:9, 1:3, 3:1 und 9:1 mit Lipofektamin durchgeführt. Die Negativkontrolle enthielt keine DNA, die Positivkontrolle wurde mit pGFP durchgeführt. Die Positiv-Kontrolle zeigte wie das Mischverhältnis 1:9 eine erfolgreiche Transfektion (hier mit den roten + dargestellt).

**Abb. 41 Transfektionseffizienz**

HEK Flp-In-Zellen im Phasenkontrast vor der Co-Transfektion mit GFP (links) und nach der Transfektion im Fluoreszenzmikroskop (Mitte), im Vergleich als Overlay (rechts) (Vergrößerung 200fach)

4.6 Charakterisierung/Morphologie

Durch das Einbringen von Fremd-DNA kann die Viabilität einer Zelle entscheidend beeinflusst werden. So hat die Arbeitsgruppe von Prazzoli 2013 HEK293-Zellen verwendet um murine Proteine in Wildtyp und mutierter Form exprimieren zu lassen und konnte feststellen, dass sowohl die Zelladhäsion, die Zellproliferation und Zellausbreitung sowie auch die Zellmigration stark verändert wurden [67].

Da wir eine Expressionszelllinie hergestellt haben, könnten durch die Expression des RPGR-Proteins zum Beispiel die Morphologie oder auch die Teilungseigenschaften der HEK-Flp-In-Zellen verändert werden.

Die Zellmorphologie wurde lichtmikroskopisch beurteilt. Die HEK-Zellen mit integriertem RPGR^{ORF15} zeigten das gewohnte Bild der HEK-Zellen mit schönen Ausläufern.

Im direkten Vergleich zu den normalen HEK-Zellen zeigten sie jedoch einen etwas kugeligern Zellkörper mit etwas weniger Ausläufern.

Ihr Wachstum ist im Vergleich zu normalen HEK-Zellen jedoch unverändert. Die Zellen wachsen gewohnt schnell und konfluent. Abbildung 42 zeigt die normalen HEK-Zellen im Vergleich zu den HEK-Zellen mit integriertem RPGR^{ORF15}. Es lässt sich erkennen, dass die Zellen in A eher langgestreckte Körper mit vielen und langen Ausläufern haben, entsprechend den HEK-Zellen. Die Zellen in B, die das RPGR^{ORF15} integriert haben, wirken dagegen eher etwas plumper mit weniger und kürzeren Ausläufern. Das Wachstum schien im Vergleich zunächst eventuell etwas weniger schnell, was sich jedoch in der weiteren Beobachtung nicht bestätigte.

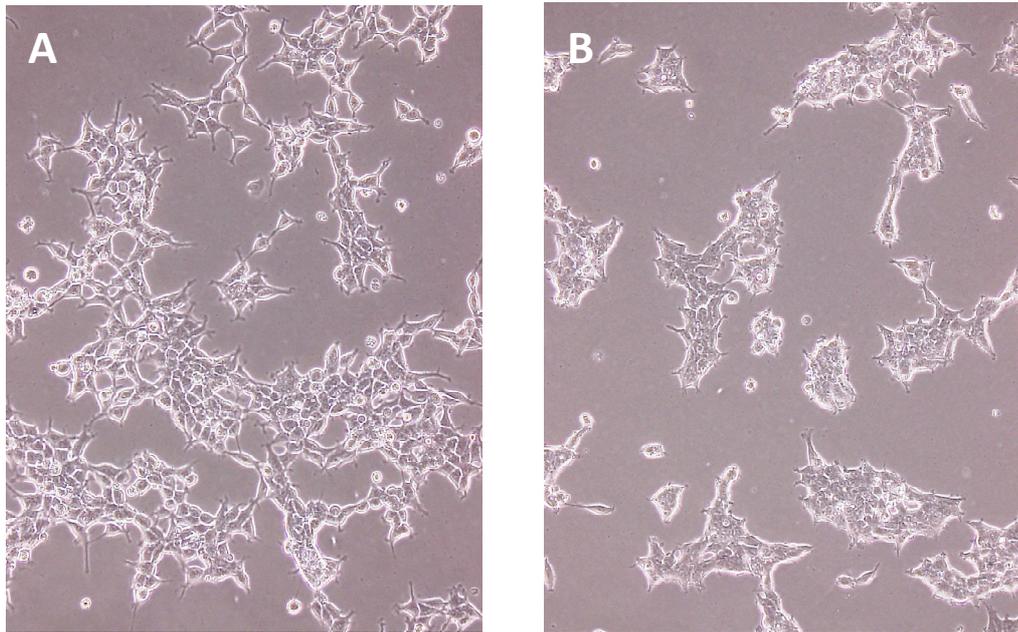


Abb. 42 Morphologie der HEK-Flp-In und der HEK-Flp-In RPGR^{ORF15}-Zellen

(A) HEK-293 Flp-In Zellen mit typischem konfluentem Wachstum. Die Zellen bilden verzweigte Ausläufer.
(B) HEK-293 Flp-In-RPGR^{ORF15} Zellen. Der Zellkörper wirkt im Vergleich etwas kugelig und es werden deutlich weniger Ausläufer gebildet als bei den HEK-293 Flp-In-Zellen in (A).

4.7 Nachweis der Integration

4.7.1 PCR und Sequenzierung

Zum Nachweis, ob das murine RPGR^{ORF15} erfolgreich in die HEK-DNA integriert werden konnte, wurde nach entsprechend gutem Wachstum der HEK-Flp-In-RPGR^{ORF15}-Zellen bis zu einer Konfluenz von 70 %, die DNA isoliert und aufgereinigt.

Für die anschließenden PCR wurden zwei Primerpaare gewählt, die nur in dem murinen RPGR^{ORF15} binden können. Das erste Primerpaar wurde zur Amplifizierung einer 500 bp großen Sequenz genutzt, die eine XbaI-Schnittstelle enthält. Das zweite Primerpaar amplifiziert eine 308 bp große Sequenz, welche die I-SceI-Schnittstelle enthält. Abbildung 43 zeigt eine Übersicht über die ORF15-Region mit den passenden Primern und den Schnittstellen für XbaI und I-SceI, sowie die entsprechenden Gelelektrophoresebilder der PCR-Produkte.

Die XbaI-Schnittstelle konnte zufällig gewählt werden, wohingegen die I-SceI-Schnittstelle wie bereits in Kapitel 1.5.1 erwähnt, artifiziell in das murine RPGR^{ORF15} integriert wurde, um eine von extern ansteuerbare Schnittstelle für spätere Therapiekonzepte zu haben (siehe auch Abbildung 10).

Beide Primerpaare können demnach nur dann binden, wenn das murine RPGR^{ORF15} zuvor erfolgreich in die HEK-Flp-in-Zellen integriert werden konnte. Ein PCR-Produkt gilt damit als Nachweis für dieses Ereignis.

Zusätzlich konnten die Sequenzen für die Schnittstellen von XbaI (TCTAGA) und I-SceI (TAGGGATAACAGGGTAAT) sequenziert werden (siehe auch Kapitel 3.3.13). Dies ist ebenfalls in der Abbildung 43 B und C dargestellt.

Abb. 43 Nachweis der erfolgreichen Integration

A zeigt schematisch die mutierte ORF 15-Region mit den Schnittstellen für XbaI und I-SceI mit den jeweiligen Primerpaaren. Die erste Sequenz, die die XbaI-Schnittstelle enthält, ist 500 bp lang, die zweite Sequenz mit der I-SceI-Schnittstelle ist 308 bp lang.

B zeigt oben das PCR-Produkt mit der XbaI-Schnittstelle aus den HEK-Flp-In RPGR^{ORF15}-Zellen (Klon 1h-1). Als Positivkontrolle wurde die reine murine RPGR-Sequenz verwendet (Pos. Kontrolle pRPGR-4). Als Negativkontrolle (Neg. Kontrolle HEK) wurden normale HEK-Zellen und als Marker wurde der DNA Größenstandard Gene Ruler 1 kb DNA Ladder verwendet. Der rote Pfeil zeigt auf das erwartete Fragment von 500 bp. Unten ist die entsprechende Sequenzierung (vergleiche auch Kapitel 3.3.13) mit der XbaI Basenabfolge TCTAGA (orange eingekreist) gezeigt.

C zeigt entsprechend oben das PCR-Produkt mit der I-SceI-Schnittstelle aus den HEK-Flp-In-RPGR^{ORF15}-Zellen, die hier als Klon 1h-1 bezeichnet wurden. Als Positivkontrolle lief die reine murine RPGR-Sequenz, hier mit Pos. Kontrolle pRPGR-4 gekennzeichnet. Als Negativkontrolle (Neg. Kontrolle HEK) wurden normale HEK-Zellen und als Marker wurde der DNA Größenstandard Gene Ruler 1 kb DNA Ladder verwendet. Der rote Pfeil zeigt auf das erwartete Fragment von 308 bp. Unten ist die entsprechende Sequenzierung (vergleiche auch Kapitel 3.3.13) mit der I-SceI Basenabfolge TAGGGATAACAGGGTAAT (gelb eingekreist) gezeigt.

4.7.2 T7 Assay

Mit dem T7 Assay konnte eine Positivkontrolle für einen Doppelstrandbruch etabliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die artifiziell eingefügte I-SceI-Schnittstelle in unmittelbarer Nähe zu den drei Punktmutationen genutzt werden kann, um Doppelstrangbrüche zu induzieren. Dies ist besonders für spätere Tests wichtig, wenn die DNA durch andere Nukleasen, wie z. B. die in Kapitel 1.9 ausführlich besprochenen ZFN, TALEN oder auch das CRISPR/ Cas-System geschädigt werden soll.

Für den T7 Assay wurden die HEK-Flp-In-RPGR^{ORF15}-Zellen mittels Lipofectamin mit pVax I-SceI in den Konzentrationen 1µg, 2µg und 4µg sowie mit pGFP als positiver Transfektionskontrolle transfiziert. Der pVax I-SceI wurde uns freundlicherweise vom Institut für Biochemie, Fachbereich Biologie, JLU Gießen überlassen. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurden die DNA der verschiedenen Ansätze isoliert und aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine PCR. Die PCR-Produkte variierten minimal (um circa 10 bp) in ihrer Größe, je nachdem ob der Doppelstrangbruch durch NHEJ repariert wurde oder ob die I-SceI nicht exprimiert werden und dadurch kein Doppelstrangbruch induziert werden konnte.

Durch das Annealing lagern sich unter anderem auch nicht kompatible Stränge aneinander, sodass sich Loops bilden, die durch die T7-Endonuklease erkannt und herausgeschnitten werden (siehe auch Abb.44 B). Hierdurch entstehen noch kleinere Fragmente, die als Schatten unter den eigentlich zu erwartenden Banden sichtbar werden.

Dies konnten wir in der Abbildung 44 C zeigen. Hier lässt sich in dem Gelelektrophoresebild deutlich die nach dem Verdau mit der T7-Endonuklease zu erwartenden Banden von 300 bp erkennen und darunter ein leichter Schatten (Abb. 44 C, Schatten durch rote Pfeile gekennzeichnet).

Der Schatten ist somit der Beweis, dass die I-SceI nach der Transfektion in den HEK-Flp-In-RPGR^{ORF15}-Zellen exprimiert werden konnte und die Homing Endonuklease auch an der artifiziell eingebrachten I-SceI-Schnittstelle binden und schneiden konnte.

In Abbildung 44 sind die verschiedenen Schritte schematisch dargestellt und zudem ist das entsprechende Gelelektrophoresebild der PCR-Produkte und des anschließenden Verdau mit der T7-Endonuklease gezeigt.

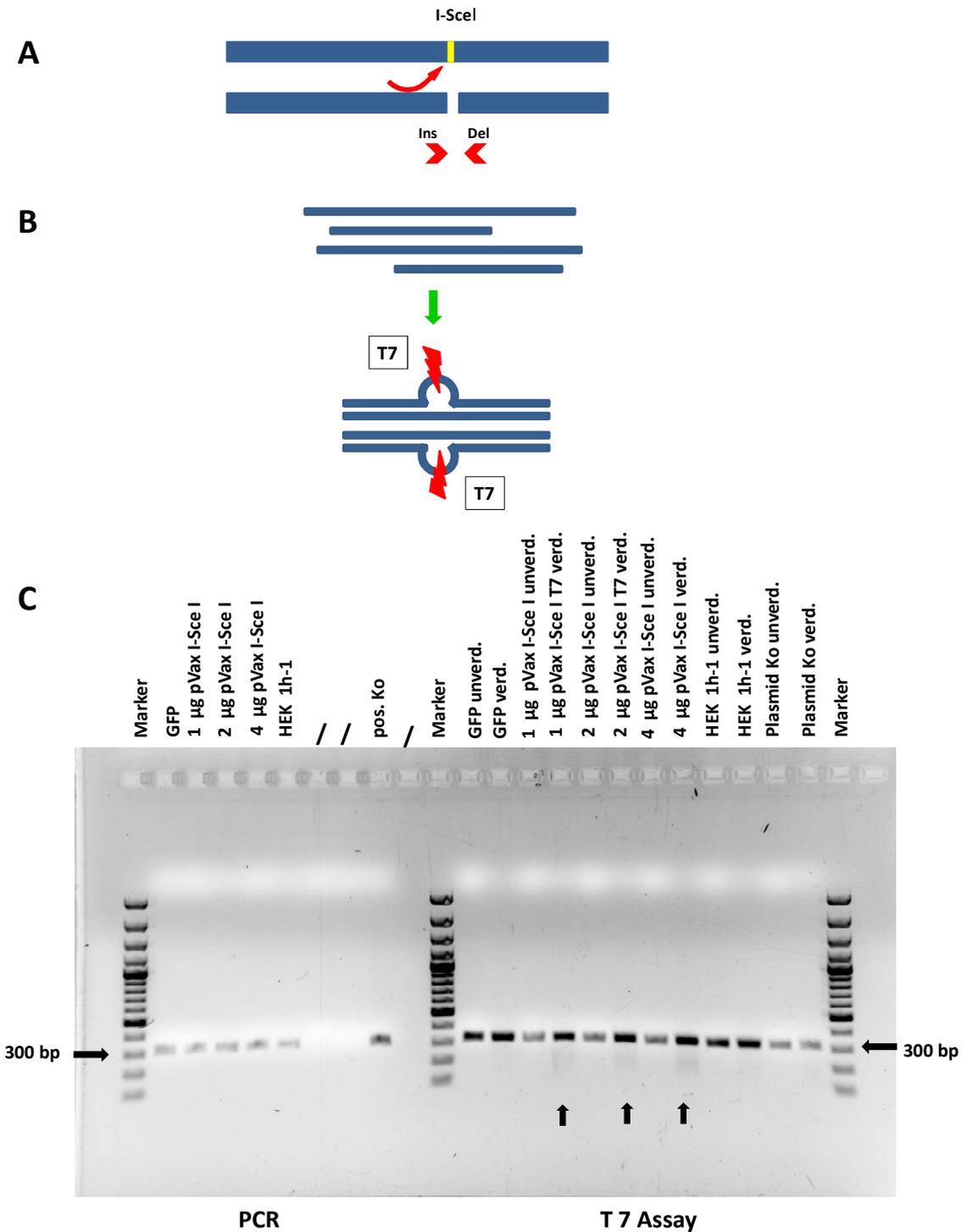


Abb. 44 T7 Assay zum Nachweis der stattgefundenen Reparatur durch Homologe Rekombination nach DNA-Schädigung durch I-Sce I

A zeigt schematisch die ORF 15-Region mit der I-SceI-Schnittstelle (hier gelb markiert). Durch Schneiden der Homing Endonuklease kommt es zu einem Doppelstrangbruch, der anschließend durch NHEJ repariert wird. Das NHEJ findet durch Insertion oder Deletion einzelner Basenpaare statt (hier durch die zwei roten Pfeile und Ins und Del gezeigt), sodass die Stränge nicht mehr zu hundert Prozent kompatibel zu dem Ausgangsstrang sind. Entsprechend entstehen hier unterschiedlich große PCR-Produkte.

B zeigt das *Annealing* der minimal unterschiedlich großen PCR-Produkte. Dort, wo sich zwei nicht kompatible Stränge aneinander angelagert haben, entstehen Loops. Diese Loops werden von der T7-Endonuklease erkannt und herausgeschnitten (hier mit rotem Blitz und T7 dargestellt), sodass zusätzlich

noch kleinere Fragmente entstehen. In der anschließenden Gelelektrophorese können diese zusätzlichen kleinen Fragmente als Schatten sichtbar gemacht werden.

C zeigt die entsprechenden Bilder der Gelelektrophorese. Links die initiale PCR von drei Ansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen (1, 2 und 4 μ l) an zugegebener pVax I-SceI. pGFP und die HEK-Flp-In-RPGR^{ORF15}-Zellen gelten als Positivkontrollen, da hier keine I-SceI transfiziert wurde. Desweiteren ist das Plasmid pRPGR4, welches die Ausgangssequenz ORF15 für die Generierung der Zelllinie enthält, als Positivkontrolle genutzt (Plasmid Ko). Der schwarze Pfeil zeigt auf die zu erwartenden Bande bei 300 bp. Marker: DNA-Größenstandard GeneRuler DNA-Ladder Mix.

Rechts ist der Verdau mit der T7- Endonuklease gezeigt. Die aufgereinigte DNA der PCR wurde jeweils einmal unverdaut (hier mit unverd. abgekürzt) und einmal mit T7 verdaut (hier mit T7 verd. abgekürzt) aufgetragen. Der schwarze Pfeil zeigt auch hier auf die zu erwartenden Banden bei 300 bp. Zusätzlich zeigen die drei roten Pfeile auf die Schatten unterhalb der Banden von pVax 1 μ l I-SceI T7 verd., 2 μ l pVax I-SceI T7 verd. und 4 μ l pVax I-SceI T7 verd. Hier wurden die Loops aus nicht kompatiblen DNA-Strängen herausgeschnitten. Dies setzt ein Schneiden der I-SceI an der artifizialen Schnittstelle in der ORF 15-Region voraus.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine Zelllinie hergestellt, die den DNA-Sequenzbereich des murinen terminalen RPGR Exons ORF15 mit definierten Punktmutationen enthält. Zum Ersten sind dies mehrere intraexonische Punktmutationen, von denen eine zu einem *Frameshift* des Leserahmens führt, zum Zweiten eine Modifikation der DNA-Sequenz unmittelbar 3 prime des Stop-Codons, wodurch eine Schnittstelle für die Homingendonuklease ISce-I entsteht. Mit dieser Zelllinie sollen die Spezifität und die Effizienz der Doppelstrangbruchinduktion durch sequenzspezifische Endonukleasen getestet werden. Hierfür sind sowohl die pathologische Mutation (*Frameshift* Mutation) als auch die Positivkontrolle (ISce-I Schnittstelle) notwendig. Die I-SceI-Endonuklease wurde gewählt, da sie den Goldstandard für Spezifität und Effizienz darstellt. Bereits 1998 beschrieb Cohen-Tannoudji den Einsatz der I-SceI-Endonuklease zum Genaustausch in murinen Stammzellen und sie wird seither von vielen Arbeitsgruppen erfolgreich in murinen und bakteriellen Zellen zur Induktion von Doppelstrangbrüchen und zum anschließenden Genaustausch genutzt [68-70]. Durch den T7 Assay, wie in Kapitel 4.7.2 gezeigt, gelang der positive Nachweis dafür dass die I-SceI in den HEK-Flp-In-RPGR^{ORF15}-Zellen exprimiert werden, an der artifiziell eingefügten Schnittstelle schneiden und damit Doppelstrangbrüche induzieren kann. Die I-SceI konnte somit auch in unseren Testverfahren als Goldstandard etabliert werden und kann in weiteren Tests als Referenz für Effizienz und Spezifität anderer Enzyme wie z. B. der ZFN oder der TALEN aber auch des CRISPR/Cas9-Systems gelten. Da im humanen Genom jedoch keine I-SceI-Schnittstellen vorkommen, kann die I-SceI ausschließlich für die Versuche an der murinen Sequenz genutzt werden und eignet sich nicht zur Entwicklung von Therapiemethoden, welche auf HR beruhen. Umso wichtiger sind weiterführende Tests mit den oben genannten Nukleasen im Vergleich zur I-SceI, um Wissen über deren Effizienz und Spezifität, insbesondere in Bezug auf spätere Tests an nicht murinen Sequenzen zu erlangen.

Die HR ist für gentherapeutische Ansätze essentiell, da durch ihre Nutzung ein Gendefekt durch einmalige Intervention mittels Gentherapie repariert werden könnte. Zu bedenken bleibt, dass durch die hierfür erforderliche Einbringung von einer „gesunden“ Template-DNA sowie der I-SceI unter Nutzung von Vektoren in den Zellen durch diese

„Fremd-DNA“ eine Immunreaktion ausgelöst werden könnte. Zweifelhaft ist auch, ob die Vektor-DNA eventuell in die genomische DNA integriert wird und hier Schaden anrichten kann und wie lange die Vektor-DNA im Körper verbleibt [71, 72]. So konnten intakte rAAV-Partikel in einem Primaten und vier Hunden noch sechs Jahre nach erfolgreichem Gentransfer mit verschiedenen Serotypen des rAAV in den Netzhautzellen nachgewiesen werden [72]. Zudem konnte der Verdacht bestätigt werden, dass die Vektorpartikel via transsynaptischem Transport auch in andere Nervenzellen übertragen werden können, da Viruspartikel auch in Horizontal- und Bipolarzellen nachgewiesen werden konnten [71].

Um die HR als Therapiealternative zu den aktuell im klinischen Versuch angewandten Gentherapien testen zu können, benötigt man ein adäquates Testsystem auf Zellkulturebene.

Ein solches ist unumgänglich um die erfolgreiche DNA-Reparatur auf DNA-, RNA- und Proteinebene zu studieren und die möglichen Fehlerquellen wie z. B. fehlerhaftes Schneiden der DNA und die damit verbundene erhebliche Schädigung dieser zu erkennen und zu optimieren. Erst bei erfolgreicher „Gentherapie“ auf Zellkulturebene können weitere klinische Tests angeschlossen werden.

5.1 Herstellung einer primären Zelllinie

Initial sollte eine primäre Zelllinie zur Testung der Genreparatur aus dem Gewebe von mutierten Mäusen hergestellt werden. Solche Zelllinien bieten die idealen Bedingungen, um gentherapeutische Interventionen und deren Folgen wie z. B. die Toxizität einer möglichen Reparatur *in vitro* zu testen.

Zur Generierung einer Zelllinie ist die Immortalisierung einer einzelnen Zelle und deren anschließende Kultivierung und Typisierung notwendig. Wie bereits in Kapitel 1.8. ausführlich beschrieben, ist das ungehemmte Wachstum einer Zelle nur dann möglich, wenn die zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen zuvor ausgeschaltet wurden.

Dies kann durch verschiedene externe Noxen aber auch durch eine spontane Immortalisierung geschehen, sodass die Zelle anschließend als Zelllinie genutzt werden kann.

Die Schutzmechanismen der Zelle, die ein ungehemmtes Wachstum verhindern sollen, führten in unserem Fall jedoch jeweils zur Apoptose, dem programmierten Zelltod, bevor eine Zelle immortalisieren konnte.

Es wurden Lymphozyten aus der Milz und Knochenmarkzellen aus den Femora der Mäuse isoliert. Verschiedene Protokolle wurden ausprobiert. Eine Möglichkeit zur Immortalisierung besteht immer darin, dass die Zelle spontan nach Erreichen der Seneszenz immortalisiert. Ein anderer Ansatz ist die Nutzung von Benzo[a]pyren, das als bereits sehr gut erforschtes Zellgift die Potenz besitzt, Zellen zu immortalisieren. Belharazem konnte durch die Nutzung von Benzo[a]pyren erfolgreich embryonale Mäusefibroblasten immortalisieren. Gleiches gelang Deng et al., um die Effekte von durch benzo[a]pyren-induzierte maligne Transformationen auf die DNA-Methyltransferasen zu studieren [73]. Des Weiteren gibt es Arbeitsgruppen, die lebende Mäuse, zumeist die Schweizer Albinomaus, mit Benzo[a]pyren behandeln um Lungenkrebs zu erzeugen [74, 75].

Ebenso besteht die Möglichkeit durch das onkogene Large T-Antigen des Simian-Virus 40 die zelleigenen Reparaturmechanismen so zu blocken, dass die Zelle bei dem Versuch der Teilung entartet [76]. So konnten Zhu et al. zeigen, dass das Large-T-Antigen in embryonalen Mäusefibroblasten mit p53 einen Komplex bildet und dessen Funktion so gehemmt wird [76], dass die Zellen immortalisieren. Dies gelang auch der Arbeitsgruppe um Wang, die zeigen konnte, dass durch eine piggyBac Transposon-vermittelte Expression von SV 40 T-Antigen embryonale Mäusefibroblasten immortalisiert werden können [77]. Dies ist jedoch jeweils nur in wenigen Fällen möglich.

Eine große Schwierigkeit besteht in der Wahl der Dosierung der möglichen Noxen, um die Zelle zur Immortalisierung zu provozieren. So konnten wir beobachten, dass bei zu geringer Dosierung der Noxe, wie z.B. bei unserem Versuch mit UV-Licht ($4/8/12 \text{ J/m}^2$) (siehe Abb. 33 und 34.), die Zellen in keiner Weise in ihrem natürlichen Wachstums- und Teilungsverhalten gestört wurden. Wohingegen bei zu hoher Dosierung der Noxe, wie bei unserem Versuch mit Benzo[a]pyren (siehe Abb 31), alle Zellen sofort in die Apoptose gingen.

Hinzu kam, dass wir im Gegensatz zu den oben genannten Arbeitsgruppen leider nicht die Möglichkeit hatten, embryonale Zellen oder auch lebende Tiere zu nutzen, da wir zum einen auf die post mortem-Genotypisierung angewiesen waren und zum anderen noch keine großen Wurfzahlen erreicht werden konnten. Es standen uns unterschiedlich alte Mäuse zwischen 4 und 12 Wochen zur Verfügung, deren Zellen wir entnehmen und kultivieren konnten. Obwohl bei den Versuchen kein eindeutiger Unterschied in der Überlebenszeit der Zellen auszumachen war, ist nicht auszuschließen, dass auch das

Alter der Mäuse eine wesentliche Rolle für die Immortalisierung spielt. So ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle immortalisiert, in noch teilungsfreudigen Zellen höher als in bereits ausdifferenzierten Zellen, die keine Zellteilung mehr durchlaufen. Dies konnten wir besonders an den kultivierten Lymphozyten beobachten, die nur noch ein geringes Teilungsverhalten zeigten. Die Kultivierung der murinen Knochenmarkzellen bot daher für uns die einzige Möglichkeit, mit noch pluripotenten und damit teilungsfreudigen Zellen zu arbeiten. Allerdings bleibt auch deren Potential weit hinter dem von embryonalen Zellen zurück.

Trotz dieser vielversprechenden Ansätze zur Herstellung einer primären Zelllinie war neben den geringen Erfolgszahlen vor allem der Zeitfaktor zu bedenken. Um dies zu umgehen, wurde parallel zu den Versuchen, durch Immortalisierung eine murine Zelllinie zu generieren nach Alternativen gesucht. Eine Möglichkeit bot die Methode des HEK Flp-in-Systems.

Schlussendlich stellte sich heraus, dass die Herstellung eines artifiziellen Systems, der modifizierten HEK-Expressionszelllinie, schneller vonstatten ging und damit für die initialen Versuche zur Spezifität und Effizienz von Endonukleasen ein adäquates und leicht zu kultivierendes Zellsystem zur Verfügung stand.

5.2 Herstellung HEK Flp-In-RPGR^{ORF15}-Zelllinie

Das HEK-Flp-InTM-System von Invitrogen ist ein System zur Herstellung von stabilen humanen Expressionszelllinien durch Integration eines gewünschten Gens mittels einer Flp-Rekombinase. (Invitrogen Flp-InTM-System Manual). So lässt sich ein beliebiges Gen an einer spezifischen Genomstelle (FRT-Erkennungsstelle) integrieren. Zudem wird durch die FRT-Erkennungsstelle und die Rekombinase sichergestellt, dass das gewünschte Gen nur einmalig in die Zelle integriert wird. Es kann relativ schnell und effizient eine Expressionszelllinie hergestellt und für Versuche genutzt werden. Zur Selektion der positiv integrierten Zellen wird Hygromycin genutzt, da die Hygromycinresistenz an die erfolgreiche Integration des gewünschten Gens an der FRT-Erkennungsstelle gekoppelt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine murine Gensequenz von 3964bp in eine humane Zelllinie integriert und dadurch ein Zellmodell entwickelt, das stabil und teilungsfreudig ist und an dem erste Versuche der Genreparatur durch HR und zur Spezifität und Effizienz von Endonukleasen durchgeführt werden können. Hinzu kommt, dass die Trans-

fektionseffizienz von HEK293-Zelllinien sehr gut ist, während dies für primäre Zelllinien häufig nicht der Fall ist. Eine solche limitierte Transfektionseffizienz wäre für das Studium von Doppelstrangbrüchen nach Endonukleasenexpression und deren Reparatur durch zelleigene Mechanismen nicht förderlich.

Die HEK-Zellen sind *Human Embryonic Kidney*-Zellen und wurden um 1972 von van der Eb hergestellt. Seither werden die HEK-Zelllinien in der Zellbiologie eingesetzt, da sie als einfach zu handhabende Zellen gelten [78]. Die positiven Eigenschaften der HEK-Zellen lassen sich durch das Flp-InTM-System für Zellmodelle nutzen. Auch andere Arbeitsgruppen konnten mit diesem System bereits erfolgreich eigene HEK-Expressionslinien herstellen und mit diesen arbeiten [79, 80].

Dadurch, dass bei den HEK Flp-In RPGR^{ORF15}-Zellen die eingeführte DNA-Sequenz eine komplette Expressionskassette darstellt, kann die Produktion des Wildtyp-Proteins später zum Nachweis einer erfolgreichen Reparatur genutzt werden, da sich das Verhältnis von mutiertem Protein zu gesundem Protein von 1:0 bei erfolgreicher Reparatur zu Gunsten des gesunden Proteins verschieben müsste.

Zu bedenken bleibt, dass es sich hier um eine humane Zelllinie handelt, in die artifiziell eine murine Gensequenz eingebracht wurde. Es lässt sich mit diesem Zellmodell keine Aussage über die eventuelle *Off-target*-Toxizität der zukünftig eingesetzten Endonukleasen treffen. Obwohl die DNA-Doppelstrangbrüche durch Endonukleasen zurzeit noch eine wesentliche Voraussetzung für die Steigerung von Rekombinationsevents sind, bergen sie auch die Gefahr der *Off-Target*-Toxizität, durch ihre relativ schlechte Spezifität [81].

Des Weiteren ist zu bedenken, dass in unserem Expressionszelllinien-Modell die mutierte RPGR^{ORF15}-Region an einer „willkürlichen“ Stelle in der HEK-Zelle integriert wurde. Sie kann daher nur isoliert und nicht im Zusammenhang mit dem RPGR^{ex1-19} betrachtet werden. Aber genau diese Betrachtung des gesamten Genoms ist wichtig, um den Nutzen einer Gentherapie beurteilen zu können. So wäre ein denkbare Szenario, dass durch den Doppelstrangbruch, den Genaustausch oder auch durch die Vektoren die Funktionen der Zelle gestört werden könnten. Um hierüber abschließende Informationen und Ergebnisse zu erhalten, wird es unumgänglich sein eine immortalisierte Mauszelllinie herzustellen, die die mutierte RPGR^{ORF15}-Region enthält. Erste Versuche eine Mauszelllinie zu immortalisieren liefen wie bereits oben beschrieben parallel zu dem HEK Flp-InTM-System.

Die HR und das NHEJ sind die zwei Hauptreparaturwege der Zelle bei einem Doppelstrangbruch (siehe Kapitel 1.8, Abb. 12). Ob und wann welcher Reparaturweg genutzt wird, variiert je nach Spezies, Zelltyp und Zellzyklusphase [35].

Während das NHEJ hauptsächlich in der G_1 -Phase und damit bei Abwesenheit eines Schwesterchromatids stattfindet, kommt es gehäuft in der späten S- und in der G_2 -Phase zur Reparatur eines Doppelstrangbruchs mittels HR [82, 83]. Das bedeutet, dass ein Doppelstrangbruch nicht zwangsläufig zu einem Austausch des erkrankten Gens durch HR führt. Die Effizienz der Genreparatur ist aber essentiell für deren Erfolg.

Die HEK-Flp-InTM-Zellen sind eine teilungsfreudige Zelllinie, das heißt, die Zellen durchlaufen permanent alle Phasen des Zellzyklus (Siehe auch Abb. 11). Im Gegensatz hierzu sind ausdifferenzierte Zellen wie z.B. die Photorezeptoren in der G_0 -Phase arretiert.

Die ausdifferenzierten Zellen in der G_0 -Phase treten in der Regel nicht wieder in den Zellzyklus ein. Das bedeutet, dass die Zellreparaturmechanismen in diesen Zellen nicht aktiv sind. Da die Wahrscheinlichkeit der HR von der Zellzyklusphase abhängt und die HEK-Flp-InTM-Zellen im Gegensatz zu den ausdifferenzierten Photorezeptoren diesen permanent durchlaufen, könnte die Effizienz des Gentransfers in den HEK-Zellen von der in den Photorezeptoren möglicherweise stark variieren.

Zu Bedenken bleibt außerdem, dass die ORF15-Sequenz, wie bereits in der Einleitung erwähnt, eine glutaminsäure- und glycinreiche Region ist. Dieser Umstand führt dazu, dass die Entwicklung von Primern und Enzymen, die die spezifischen Gensequenzen in dieser Region erkennen sollen, sehr schwierig ist. Es scheint fast nicht vermeidbar, dass es zu Fehlbindungen von Primern oder auch Enzymen kommt. Besonders das fehlerhafte Binden und Schneiden der Enzyme, wie in Kapitel 1.9 beschrieben, könnte für die Gentherapie in dieser Region ein großer Störfaktor sein.

Trotz allem konnte hier ein Testmodell etabliert werden, das die Genreparaturevents sowie die Spezifität und die Effizienz von Endonukleasen im Zellmodell zeigen kann. Anders als andere Arbeitsgruppen, die dies nur auf Plasmidebene zeigen konnten, ist es uns nun möglich, die genomische Integration eines Gens zu provozieren. Hierzu ist die I-SceI-Schnittstelle zur Induktion eines Doppelstrangbruchs in der unmittelbaren Nähe der Mutationen essentiell. Ein weiterer großer Vorteil unseres Testmodells ist der Nachweis des erfolgreichen Genaustauschs mittels HR durch die Expression eines nun

„gesunden“ Proteins, welches die HEK-Flp-InTM-Zellen anschließend herstellen können und was entsprechend gemessen werden kann.

5.3 Ausblick

Nach Etablierung des In-vitro-Testsystems kann dieses nun zum Studium der Genreparatur genutzt werden.

Durch Einbringen einer „gesunden“ Templet-DNA in die Zelle kann die Reparatur der drei Mutationen Adenin-Deletion (an Position 2793), Cytosin-Substitution (an Position 2650) und Thymin-Substitution (an Position 3071) durch HR gemessen werden. Hier können nach erfolgreicher Integration der murinen RPGR^{ORF 15}-Sequenz Analyseverfahren auf DNA-, mRNA- und Proteinebene genutzt werden. Kann das Protein nachgewiesen werden, muss HR stattgefunden haben. Die Häufigkeit von HR und NHEJ kann somit indirekt gemessen werden.

Mit der I-SceI als Referenz für Doppelstrangbrüche können TALEN oder auch das CRISPR/Cas9-System getestet werden. Diese könnten durch ihre Möglichkeit des „Nickings“ der DNA die Wahrscheinlichkeit für einen Genaustausch durch HR möglicherweise erhöhen. Auch Versuche zur Erhöhung der Wahrscheinlichkeit von HR durch Beeinflussung der an der Zellreparatur beteiligten Proteine, wie z. B. p53 können an diesem Testmodell durchgeführt werden.

Sollte sich die Genreparatur auf Zellkulturebene beweisen, sind im Weiteren klinische Studien anzustreben. So wären im nächsten Schritt Tierversuche und bei erfolgreichen Ergebnissen in Zukunft auch erste klinische Studien mit betroffenen Patienten denkbar.

6 Zusammenfassung

Die x-chromosomale Form der Retinitis pigmentosa wird in 80 % der Fälle durch eine Mutation in der ORF15-Region des *RPGR* (Retinitis pigmentosa GTPase regulator)-Gens verursacht. Eine kausale Behandlung für die XLRP gibt es bisher nicht, eine Reparatur der krankheitsauslösenden Mutation stellt jedoch eine Therapiemöglichkeit dar. Ein Mausmodell, welches Punktmutationen im ORF15-Exon sowie eine I-Sce-I-Schnittstelle in unmittelbarer Nähe aufweist (B6J.Sv129-Rpgr^{tm1Sti}), steht für die Therapieentwicklung zur Verfügung. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines *in-vitro*-Modellsystems basierend auf dem Mausmodell zum Studium von homologer Reparatur als Therapiemethode für die XLRP.

Lymphozyten und Knochenmarkszellen wurden aus 4, 6, 8 und 12 Wochen alten Mäusen isoliert, kultiviert und neben der spontanen Immortalisierung diese durch folgende Versuche zur Immortalisierung provoziert: Bestrahlung mit UV-Strahlen in den Intensitäten von 4-100 J/m², Versetzen der Zellen mit 5 µM aromatischen Kohlenwasserstoffs Benzo[a]pyren über 48 Stunden, und Transfektion der Zellen mit dem onkogenen Large-T-Antigen des Simian Virus 40. Parallel wurde die mutierte *RPGR*^{ORF15}-Sequenz in den pcDNA5-frt-Vektor kloniert. Anschließend erfolgte eine Co-Transfektion mit dem Recombinase-Expressions-Vektor pOG44 zur Integration in das Genom von HEK293-Flp-In-Zellen. PCR und Sequenzierung wurden zum Nachweis einer erfolgten Integration genutzt. Die HEK-Flp-In-*RPGR*^{ORF15}-Zellen wurden mit einem I-Sce-I-Expressionsplasmid transfiziert und die Aktivität der I-Sce-I-Endonuklease mit dem T7 Assay geprüft.

Es gelang nicht, eine primäre Zelllinie aus dem XLRP-Mausmodell zu generieren. Die Provokation der Immortalisierung durch die verschiedenen Methoden führte jeweils zur Apoptose der Zellen. Die HEK-Flp-In-*RPGR*^{ORF15}-Zelllinie konnte erfolgreich hergestellt werden. Im T7 Assay konnte gezeigt werden, dass die Zellen die I-Sce-I-Endonuklease exprimieren und diese einen Doppelstrangbruch induzieren kann, welcher durch endogene Mechanismen repariert wird.

Die HEK-Flp-In-*RPGR*^{ORF15}-Zelllinie kann zum Studium der Effizienz und Spezifität verschiedener Nukleasen genutzt werden und als initiales Modell für Homologievermittelte Reparatur in HEK-Zellen gelten. Somit konnte erfolgreich ein *in-vitro*-Testsystem zum Studium der Mutationsreparatur von XLRP etabliert werden.

7 Summary

In 80% of all cases the x-chromosomal form of retinitis pigmentosa is caused by a mutation within the ORF 15 region of the *RPGR* (Retinitis pigmentosa GTPase regulator) gene. Currently there is no known causal therapy for XLRP existent. However gene replacement therapy could prove to be a feasible therapeutic option. The B6J.Sv129-Rpgr^{tm1Sti} mouse model was created through three point mutations within the ORF 15 exon and the insertion of a neighbouring I-SceI-restriction site. It is available for design and development of therapeutic options. The aim of this thesis was to establish a cell culture system based on the mouse model for further studies of homologous repair as a therapeutic option for XLRP.

Lymphocytes and bone marrow cells were isolated and cultivated from 4, 6, 8 and 12 weeks old mice. Attempts to provoke immortalization included exposure to UV radiation with an intensity of 4-100 J/m², exposure to 5µM polycyclic aromatic hydrocarbon (Benzoapyrene) over 48 hours and transfection of the cells with the oncogenic large T Antigen of the Simian virus 40. In addition, the mutated *RPGR* ORF 15 sequence was cloned into the pcDNA5-*frt*-Vector simultaneously. Subsequently the vector was co-transfected with the Recombinase-Expression-Vector pOG44 for integration into the genome of HEK293 Flp-in cells. The successful integration was verified by PCR and sequencing. The HEK Flp-In *RPGR*^{ORF15} cells were transfected with I-SceI expression plasmid and the activity of the I-SceI endonuclease was tested using a T7 assay.

The attempts to generate an immortalized cell from the XLRP mouse model failed since the cells always died through apoptosis. However, the generation of the HEK Flp-In *RPGR*^{ORF15} cell line was successful. The T7 assay demonstrated that the cells were able to express I-SceI endonuclease, which in turn resulted in specific double-strand breaks. Furthermore the DNA damage was repaired by endogenous mechanisms.

The HEK Flp-In *RPGR*^{ORF15} cell line can be used for studies concerning efficiency and specificity of other nucleases and can be applied as an initial test system for homology-mediated repair in HEK cells. Thus, an in vitro test system has been established for further studies of repair mechanisms for disease causing mutations in XLRP.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-Assoziiertes Virus
ACHM	Achromatopsie
AD	autosomal dominant
AR	autosomal rezessiv
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
bp	Basenpaare
Cas	CRISPR associated system
CC	Connecting Cilium
CD	Cone-Dystrophy
CRD	Cone-Rod-Dystrophy
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR RNA
DSB	Doppelstrangbruch
ERG	Elektroretinogramm
FST	dark-adapted full-field sensitivity testing
gRNA	guide RNA
HE	Homing Endonuklease
HEK	Human Embryonic Kidney
HR	Homologe Rekombination
hz	heterozygot
IFT	intraflagellare Transportproteine
IS	Inner Segment /Innensegment
KM	Knochenmark
LCA	Lebersche Kongenitale Amaurose
MMR	Mismatch-Reparatur
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NHEJ	Nicht Homologes End Joining
OCT	Optische Kohärenz-Tomographie
ON	Oligonukleotide
ORF	Open Reading Frame
OS	Outer Segment /Außensegment
PAM	Protospacer adjacent motif
rAAV	rekombinantes Adeno-Assoziiertes Virus
rAAV	rekombinantes Adeno-Assoziiertes Virus
RHO	Rhodopsin-Gen
RNAi	RNA Interferenz
RP	Retinitis pigmentosa
RPE	Retinales Pigmentepithel
RPGR	Retinitis pigmentosa GTPase Regulator Protein

RVDs	Repeat-Variable-Diresiudes
siRNA	smal interfering RNAs
STGD	Mb. Stargardt
TALE	transcription activatorlike effectors
TALEN	TALE-Nuklease
tg	transgen
TGA	Targeted Gene Alteration
tracrRNA	transactivating CRISPR RNA
V1	Versuch vom 31.01.2011, Mäuse 6 Wochen alt
V2	Versuch vom 14.02.2011, Mäuse 8 Wochen alt
V3	Versuch vom 22.03.2011, Mäuse 12 Wochen alt
V4	Versuch vom 18.04.2011, Mäuse 4 Wochen alt
wt	Wildtyp
XL	x-chromosomal rezessiv
XLPRA	x-chromosomale progressive Retinaatrophie
ZFN	Zinkfinger-Nukleasen
β -PDE	β -Subunit der cGMP-Phophodiesterase

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Aufbau des Auges.....	1
Abb. 2 Histologischer Schnitt durch die Retina.....	2
Abb. 3 Schematische Darstellung der Photorezeptoren.....	3
Abb. 4 Übersicht über die Retinalen Dystrophien mit Beispielen.....	4
Abb. 5 Phenotypisches Überlappen von autosomal rezessiven Netzhautdystrophien in Bezug auf das Lebensalter	5
Abb. 6 Funduskopiebilder	6
Abb. 7 Schematische Darstellung eines Photorezeptors mit dem CC	7
Abb. 8 Schematische Darstellung der genomischen Struktur der RPGR Hauptsplicevarianten	8
Abb. 9 Darstellung des C-terminalen Bereichs bei Patienten mit Mutaionen im ORF15	9
Abb. 10 RPGR ORF15-Sequenz im Mausmodell	11
Abb. 11 Zellzyklusphasen	15
Abb. 12 DNA-Reparaturmechanismen	16
Abb. 13 Homologe Rekombination	17
Abb. 14 Homologe Rekombination nach Einzelstrangbruch.....	18
Abb. 15 Kristallstruktur der Homing-Endonuklease I-SceI.....	19
Abb. 16 Schematische Darstellung einer Zink-Finger-Nuklease.....	20
Abb. 17 Schematische Darstellung einer TALE-Nuklease	21

Abb. 18 Schematische Darstellung von CRISPR/Cas9.....	23
Abb. 19 DNA-Größenstandard Gene Ruler DNA–Ladder Mix.....	27
Abb. 20 DNA Größenstandard Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder	27
Abb. 21 pBABE-puro SV40 LT von Addgene.....	31
Abb. 22 PVAX I-SceI.....	32
Abb. 23 pcDNA/FRT von Invitrogen	33
Abb. 24 pFRT/lacZeo	34
Abb. 25 pOG44-Vektor	35
Abb. 26 Topo-Vektor	36
Abb. 27 Schematische Darstellung eines T7 Assays (geändert nach CRISPR/Cas9 and Targeted Genome Editing: A New Era in Molecular Biology).....	46
Abb. 28 InFusion-Klonierung	51
Abb. 29 Legende zu dem Ergebnisteil Zellkultur.....	54
Abb. 30 Lymphozyten: Spontane Mutation.....	57
Abb. 31 Lymphozyten mit Benzo[a]pyren behandelt.....	60
Abb. 32 Lymphozyten V1 und V2 mit Large-T-Antigen.....	61
Abb. 33 Lymphozyten aus V1 mit UV-Licht.....	63
Abb. 34 Lymphozyten aus V2 mit UV-Licht.....	63
Abb. 35 Knochenmarkzellen (KM): spontane Mutation.....	66
Abb. 36 Knochenmarkzellen aus V4 mit Large-T-Antigen.....	67
Abb. 37 Das HEK-Flp-In-System	70
Abb. 38 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA zur Detektion eines positiven Klones.....	72
Abb. 39 Kontrollrestriktionsverdau zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung.....	72
Abb. 40 Transfektionsansatz	74
Abb. 41 Transfektionseffizienz.....	74
Abb. 42 Morphologie der HEK-Flp-In und der HEK-Flp-In-RPGR^{ORF15}-Zellen	76
Abb. 43 Nachweis der erfolgreichen Integration	79
Abb. 44 T7 Assay zum Nachweis der stattgefundenen Reparatur durch Homologe Rekombination nach DNA-Schädigung durch I-Sce I	81

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 pBabe puro SV40LT Vektor-Informationen.....	31
Tabelle 2 PVax I-SceI Vektor-Informationen.....	32
Tabelle 3 pcDNA5/FRT Vektor-Informationen.....	33
Tabelle 4 pFRT/<i>lacZeo</i> Vektor-Informationen	34
Tabelle 5 pOG44 Vektor-Informationen.....	35
Tabelle 6 Topo-Vektor-Informationen	36
Tabelle 7 verwendete Primer	37

9 Literaturteil

1. Lorenz, B., M. Preising, and K. Stieger, *Retinal blinding disorders and gene therapy-molecular and clinical aspects*. *Curr Gene Ther*, 2010. **10**(5): p. 350-70.
2. Merbs, S.L. and J. Nathans, *Absorption spectra of human cone pigments*. *Nature*, 1992. **356**(6368): p. 433-5.
3. Wright, A.F., et al., *Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait*. *Nat Rev Genet*, 2010. **11**(4): p. 273-84.
4. den Hollander, A.I., et al., *Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(9): p. 3042-53.
5. Heckenlively, J.R., *RP cone-rod degeneration*. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1987. **85**: p. 438-70.
6. Hartong, D.T., E.L. Berson, and T.P. Dryja, *Retinitis pigmentosa*. *Lancet*, 2006. **368**(9549): p. 1795-809.
7. den Hollander, A.I., et al., *Mutations in LCA5, encoding the ciliary protein lebercilin, cause Leber congenital amaurosis. Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 3*. *Nat Genet*, 2007. **39**(7): p. 889-95.
8. Geller, A.M. and P.A. Sieving, *Assessment of foveal cone photoreceptors in Stargardt's macular dystrophy using a small dot detection task*. *Vision Res*, 1993. **33**(11): p. 1509-24.
9. Jaissle, G.B., et al., *Bone spicule pigment formation in retinitis pigmentosa: insights from a mouse model*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2009. **248**(8): p. 1063-70.
10. Lorenz, B., et al., *Phenotype in two families with RP3 associated with RPGR mutations*. *Ophthalmic Genet*, 2003. **24**(2): p. 89-101.
11. Shu, X., et al., *RPGR mutation analysis and disease: an update*. *Hum Mutat*, 2007. **28**(4): p. 322-8.
12. Thiadens, A.A., et al., *Clinical course of cone dystrophy caused by mutations in the RPGR gene*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2011.
13. Hong, D.H., et al., *Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGRr)-interacting protein is stably associated with the photoreceptor ciliary axoneme and anchors RPGR to the connecting cilium*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(15): p. 12091-9.
14. Hosch, J., B. Lorenz, and K. Stieger, *RPGR: role in the photoreceptor cilium, human retinal disease, and gene therapy*. *Ophthalmic Genet*, 2011. **32**(1): p. 1-11.
15. Fliegauf, M., T. Benzing, and H. Omran, *When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(11): p. 880-93.

16. Meindl, A., et al., *A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3)*. Nat Genet, 1996. **13**(1): p. 35-42.
17. Vervoort, R., et al., *Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa*. Nat Genet, 2000. **25**(4): p. 462-6.
18. Hong, D.H. and T. Li, *Complex expression pattern of RPGR reveals a role for purine-rich exonic splicing enhancers*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(11): p. 3373-82.
19. Hong, D.H., et al., *A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3)*. Proc Natl Acad Sci USA, 2000. **97**(7): p. 3649-54.
20. Hong, D.H., et al., *A single, abbreviated RPGR-ORF15 variant reconstitutes RPGR function in vivo*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(2): p. 435-41.
21. Brunner, S., et al., *Overexpression of RPGR leads to male infertility in mice due to defects in flagellar assembly*. Biol Reprod, 2008. **79**(4): p. 608-17.
22. Brunner, S., et al., *Cone versus rod disease in a mutant Rpgr mouse caused by different genetic backgrounds*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(2): p. 1106-15.
23. Acland, G.M., et al., *XLPR: a canine retinal degeneration inherited as an X-linked trait*. Am J Med Genet, 1994. **52**(1): p. 27-33.
24. Zhang, Q., et al., *Fine mapping of canine XLPR establishes homology of the human and canine RP3 intervals*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(11): p. 2466-71.
25. Zeiss, C.J., et al., *Mapping of X-linked progressive retinal atrophy (XLPR), the canine homolog of retinitis pigmentosa 3 (RP3)*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(4): p. 531-7.
26. Beltran, W.A., et al., *A frameshift mutation in RPGR exon ORF15 causes photoreceptor degeneration and inner retina remodeling in a model of X-linked retinitis pigmentosa*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(4): p. 1669-81.
27. Kostic, C., et al., *Gene therapy regenerates protein expression in cone photoreceptors in Rpe65(R91W/R91W) mice*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16588.
28. Li, X., et al., *Gene therapy rescues cone structure and function in the 3-month-old rd12 mouse: a model for midcourse RPE65 leber congenital amaurosis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(1): p. 7-15.
29. Acland, G.M., et al., *Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness*. Nat Genet, 2001. **28**(1): p. 92-5.
30. Le Meur, G., et al., *Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium*. Gene Ther, 2007. **14**(4): p. 292-303.
31. Jacobson, S.G., et al., *Gene Therapy for Leber Congenital Amaurosis Caused by RPE65 Mutations: Safety and Efficacy in 15 Children and Adults Followed Up to 3 Years*. Arch Ophthalmol, 2011.

32. Stieger, K. and B. Lorenz, [*The treatment of inherited dystrophies and neovascular disorders of the retina by rAAV-mediated gene therapy*]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2008. **225**(12): p. 1009-23.
33. Beltran, W.A., et al., *Gene therapy rescues photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating human X-linked retinitis pigmentosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(6): p. 2132-7.
34. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. *Nature*, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
35. Shrivastava, N. and A. Srivastava, *RNA interference: an emerging generation of biologicals*. *Biotechnol J*, 2008. **3**(3): p. 339-53.
36. Fire, A.Z., *Gene silencing by double-stranded RNA*. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(12): p. 1998-2012.
37. Kurreck, J., *RNA interference: from basic research to therapeutic applications*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009. **48**(8): p. 1378-98.
38. Marigo, V., *Programmed cell death in retinal degeneration: targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(6): p. 652-5.
39. O'Reilly, M., et al., *RNA interference-mediated suppression and replacement of human rhodopsin in vivo*. *Am J Hum Genet*, 2007. **81**(1): p. 127-35.
40. Kiang, A.S., et al., *Toward a gene therapy for dominant disease: validation of an RNA interference-based mutation-independent approach*. *Mol Ther*, 2005. **12**(3): p. 555-61.
41. Parekh-Olmedo, H. and E.B. Kmiec, *Progress and prospects: targeted gene alteration (TGA)*. *Gene Ther*, 2007. **14**(24): p. 1675-80.
42. Andrieu-Soler, C., et al., *Single-stranded oligonucleotide-mediated in vivo gene repair in the rd1 retina*. *Mol Vis*, 2007. **13**: p. 692-706.
43. Altieri, F., et al., *DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications*. *Antioxid Redox Signal*, 2008. **10**(5): p. 891-937.
44. Shrivastav, M., L.P. De Haro, and J.A. Nickoloff, *Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice*. *Cell Res*, 2008. **18**(1): p. 134-47.
45. Li, X. and W.D. Heyer, *Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance*. *Cell Res*, 2008. **18**(1): p. 99-113.
46. Pingoud, A. and G.H. Silva, *Precision genome surgery*. *Nat Biotechnol*, 2007. **25**(7): p. 743-4.
47. Davis, L. and N. Maizels, *DNA nicks promote efficient and safe targeted gene correction*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e23981.
48. Stoddard, B.L., *Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification*. *Structure*, 2011. **19**(1): p. 7-15.
49. Stoddard, B.L., *Homing endonuclease structure and function*. *Q Rev Biophys*, 2005. **38**(1): p. 49-95.
50. Marcaida, M.J., et al., *Homing endonucleases: from basics to therapeutic applications*. *Cell Mol Life Sci*, 2010. **67**(5): p. 727-48.

51. Doyon, J.B., et al., *Directed evolution and substrate specificity profile of homing endonuclease I-SceI*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(7): p. 2477-84.
52. Silva, G., et al., *Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy*. Curr Gene Ther, 2011. **11**(1): p. 11-27.
53. Cathomen, T. and J.K. Joung, *Zinc-finger nucleases: the next generation emerges*. Mol Ther, 2008. **16**(7): p. 1200-7.
54. Cornu, T.I., et al., *DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases*. Mol Ther, 2008. **16**(2): p. 352-8.
55. Boch, J., *TALEs of genome targeting*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(2): p. 135-6.
56. Geissler, R., et al., *Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19509.
57. Moscou, M.J. and A.J. Bogdanove, *A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors*. Science, 2009. **326**(5959): p. 1501.
58. Miller, J.C., et al., *A TALE nuclease architecture for efficient genome editing*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(2): p. 143-8.
59. Makarova, K.S., et al., *Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(6): p. 467-77.
60. Bhaya, D., M. Davison, and R. Barrangou, *CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation*. Annu Rev Genet, 2011. **45**: p. 273-97.
61. Niu, J., B. Zhang, and H. Chen, *Applications of TALENs and CRISPR/Cas9 in Human Cells and Their Potentials for Gene Therapy*. Mol Biotechnol, 2014.
62. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 2010. **337**(6096): p. 816-21.
63. Ran, F.A., et al., *Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity*. Cell, 2013. **154**(6): p. 1380-9.
64. Ding, Q., et al., *Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(4): p. 393-4.
65. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986*. Biotechnology, 1992. **24**: p. 17-27.
66. Felgner, P.L., et al., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7413-7.
67. Pirazzoli, V., G.M. Ferraris, and N. Sidenius, *Direct evidence of the importance of vitronectin and its interaction with the urokinase receptor in tumor growth*. Blood, 2013. **121**(12): p. 2316-23.
68. Cohen-Tannoudji, M., et al., *I-SceI-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(3): p. 1444-8.
69. Kuijpers, N.G., et al., *One-step assembly and targeted integration of multigene constructs assisted by the I-SceI meganuclease in Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res, 2013. **13**(8): p. 769-81.

70. Yang, J., et al., *High-efficiency scarless genetic modification in Escherichia coli by using lambda red recombination and I-SceI cleavage*. Appl Environ Microbiol, 2014. **80**(13): p. 3826-34.
71. Stieger, K., et al., *Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain*. Mol Ther, 2008. **16**(5): p. 916-23.
72. Stieger, K., et al., *Detection of intact rAAV particles up to 6 years after successful gene transfer in the retina of dogs and primates*. Mol Ther, 2009. **17**(3): p. 516-23.
73. Deng, W., et al., *[Effects of cell malignant transformation induced by benzo[a]pyrene on DNA methylation transferases]*. Wei Sheng Yan Jiu, 2013. **42**(6): p. 915-9, 924.
74. Rajendran, P., et al., *Immunomodulatory Effect of Mangiferin in Experimental Animals with Benzo(a)Pyrene-induced Lung Carcinogenesis*. Int J Biomed Sci, 2013. **9**(2): p. 68-74.
75. Nair, P., A. Malhotra, and D.K. Dhawan, *Curcumin and quercetin trigger apoptosis during benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis*. Mol Cell Biochem, 2015. **400**(1-2): p. 51-6.
76. Zhu, J.Y., et al., *The ability of simian virus 40 large T antigen to immortalize primary mouse embryo fibroblasts cosegregates with its ability to bind to p53*. J Virol, 1991. **65**(12): p. 6872-80.
77. Wang, N., et al., *The piggyBac transposon-mediated expression of SV40 T antigen efficiently immortalizes mouse embryonic fibroblasts (MEFs)*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97316.
78. Thomas, P. and T.G. Smart, *HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2005. **51**(3): p. 187-200.
79. Han, Y.H., et al., *Transporter studies with the 3-O-sulfate conjugate of 17alpha-ethinylestradiol: assessment of human liver drug transporters*. Drug Metab Dispos, 2010. **38**(7): p. 1072-82.
80. Coopman, K., et al., *Comparative effects of the endogenous agonist glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide and the small-molecule ago-allosteric agent "compound 2" at the GLP-1 receptor*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **334**(3): p. 795-808.
81. Petek, L.M., D.W. Russell, and D.G. Miller, *Frequent endonuclease cleavage at off-target locations in vivo*. Mol Ther, 2010. **18**(5): p. 983-6.
82. Yun, M.H. and K. Hiom, *CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle*. Nature, 2009. **459**(7245): p. 460-3.
83. Takata, M., et al., *Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells*. Embo J, 1998. **17**(18): p. 5497-508.

10 Erklärung

„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 Schritten entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die 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 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 oder 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

11 Danksagung

Hier nun möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während meiner Zeit im Labor der molekularen Ophthalmologie so herzlich aufgenommen, unterstützt und begleitet haben.

Frau Prof. Dr. med. Birgit Lorenz danke ich für ihre wissenschaftliche Unterstützung, das Interesse an meiner Arbeit und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. Dr. med. vet. Knut Stieger danke ich für die umfassende und engagierte Betreuung als mein Doktorvater, die Überlassung des spannenden Themas und die mitreißende Begeisterung bei der Supervision.

Herrn Tobias Wimmer danke ich für das Einarbeiten in die Laborarbeit und die stetige Unterstützung bei der Umsetzung neuer Ideen und anregenden Diskussionen bei aufkommenden Fragen. Du bist ein Grund, warum ich immer gerne ins Labor komme und gekommen bin.

Frau Annabella Janise bewundere und danke ich für ihre Arbeit, die sie mit Herz und vollem Einsatz Tag für Tag im Labor leistet. Ich habe ihre warme und kompetente Hilfe bei allen wissenschaftlichen Fragen und in allen anderen Lebenslagen immer geschätzt.

Zum Schluss danke ich von Herzen meiner Familie, dafür dass sie mich während meines gesamten Studiums, der Zeit meiner Promotionsarbeit und auch sonst im Leben immer unterstützt und gefördert hat.