

**Entwicklung eines Krankheitsmodells für die autosomal-rezessive  
Osteopetrose und neuer CRISPR/Cas9-basierter  
gentherapeutischer Ansätze in humanen Stammzellen**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**ANNA FLORIANE HENNIG**

März 2020



Diese Arbeit wurde angefertigt im Zeitraum  
vom 01.10.2015 bis 13.03.2020  
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Kornak  
am Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik und  
Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien,  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

**1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Kornak**

Institut für Humangenetik  
Universitätsmedizin Göttingen  
Heinrich-Düker-Weg 12  
37073 Göttingen  
E-Mail: uwe.kornak@med.uni-goettingen.de

**2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Petra Knaus**

Institut für Chemie und Biochemie - Biochemie  
Freie Universität Berlin  
Thielallee 63  
14195 Berlin  
E-Mail: knaus@chemie.fu-berlin.de

Eingereicht am: 20.03.2020

Disputation am: 07.08.2020





# Zusammenfassung

Die autosomal-rezessive Osteopetrose (ARO) ist eine schwere, erblich bedingte Knochenerkrankung, die auf den Verlust der osteoklastenvermittelten Knochenresorption zurückzuführen ist. Eine Ursache dieses Osteoklastendefekts sind Mutationen im *CLCN7*-Gen, das für den  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher ClC-7 codiert. Da Osteoklasten von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs) abstammen, kann ARO mittels allogener Stammzelltransplantation geheilt werden. Jedoch ist diese Therapie mit einer hohen Mortalitätsrate assoziiert und oftmals sind keine passenden Spender verfügbar. Die autologe Transplantation von mittels Genomeditierung korrigierten HSPCs könnte die Therapie der ARO verbessern. Für die Etablierung eines solchen Behandlungsansatzes wurde hier zunächst ein ARO-Krankheitsmodell entwickelt, da aufgrund der Seltenheit der Erkrankung und des jungen Alters der Patienten die HSPCs nicht in ausreichendem Maß für Forschungszwecke zur Verfügung stehen. Hierfür wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes eines Patienten mit *CLCN7*-bedingter ARO zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) reprogrammiert, die anschließend zu Osteoklasten differenziert wurden. Diese waren nicht in der Lage Knochen zu resorbieren und spiegelten so den zellulären Phänotyp der Osteopetrose wider. Mithilfe dieses iPS-basierten Krankheitsmodells als auch mit HSPCs gesunder Kontrollspender wurden neue CRISPR/Cas9-basierte gentherapeutische Strategien für ARO entwickelt und getestet. Durch die Anwendung optimierter Protokolle zur CRISPR/Cas9-Genomeditierung konnten sowohl iPS als auch HSPCs selektionsfrei hocheffizient gezielt genetisch verändert werden. Darüber hinaus konnte durch die heterozygote Korrektur der pathogenen Mutation der Patienten-iPS die Knochenresorptionsfunktion der Osteoklasten partiell wiederhergestellt werden. In dieser Arbeit wurden die Grundlagen für eine somatische Gentherapie der *CLCN7*-bedingten ARO geschaffen, die es in Zukunft weiterzuentwickeln gilt.



## Abstract

Autosomal recessive osteopetrosis (ARO) is a severe hereditary bone disease caused by lacking osteoclast-mediated bone resorption. One reason for this osteoclast defect are mutations in the *CLCN7* gene coding for the Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger ClC-7. Since osteoclasts develop from hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs), allogeneic HSPC transplantation is a curative treatment for ARO. However, HSPC transplantation is associated with high mortality and often no suitable donors are available. Autologous transplantation of HSPCs corrected by genome editing could improve the treatment of ARO. Due to the rarity of the disease and the patient's young age, HSPCs are not sufficiently available for research. Therefore, an ARO disease model was developed. Peripheral blood mononuclear cells of a patient with *CLCN7*-related ARO were reprogrammed into induced-pluripotent stem cells (iPSCs) and differentiated into osteoclasts. These patient osteoclasts lost their bone resorption capacity, thus recapitulating the cellular ARO phenotype. Patient-derived iPSCs and HSPCs from healthy control donors were used to develop and test novel CRISPR/Cas9-based gene therapeutic approaches for ARO. Highly efficient targeted genome editing was achieved in both iPSCs and HSPCs using optimized protocols for CRISPR/Cas9-based genome editing. Heterozygous correction of the pathogenic mutation in patient-derived iPSCs partially restored bone resorption of the iPSC-derived osteoclasts. Taken together, this work lays the foundation for a somatic gene therapy for *CLCN7*-related ARO, which is to be developed further in future.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Knochen	1
1.1.1	Osteoblasten und Osteozyten	1
1.1.2	Osteoklasten	3
1.1.3	Knochenumbau	8
1.2	Osteopetrose	9
1.2.1	Heterogene Krankheitsbilder der Osteopetrose	10
1.2.2	Pathogenese der osteoklastenreichen Osteopetrose	12
1.2.2.1	<i>TCIRG1</i> - und <i>CLCN7</i> -bedingte ARO	12
1.2.3	Behandlung der Osteopetrose	16
1.3	CRISPR/Cas9-System	17
1.4	Rekombinante Vektoren des adenoassoziierten Virus	21
1.5	Gentherapie in hämatopoetischen Stammzellen	22
1.6	Induzierte pluripotente Stammzellen	24
1.7	Zielsetzung der Arbeit	26
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>27</b>
2.1	Materialien	27
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	27
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	29
2.1.3	Enzyme	29
2.1.4	Antikörper und Farbstoffe	30
2.1.5	Kits	32
2.1.6	Oligonukleotide	33
2.1.7	CRISPR gRNAs und ssODN-Donoren	35
2.1.8	Rekombinante Vektoren	36
2.1.9	Medien, Puffer und Lösungen	37
2.1.10	Zelllinien	39
2.1.11	Software	40

2.2	Zellbiologische Methoden . . . . .	40
2.2.1	iPS-Reprogrammierung . . . . .	40
2.2.2	Kultivierung von iPS . . . . .	41
2.2.3	Transfektion und klonale Expansion von iPS . . . . .	41
2.2.4	Differenzierung von iPS in Osteoklasten . . . . .	42
2.2.5	Isolierung und Osteoklastendifferenzierung primärer Monozyten . . . . .	42
2.2.6	Resorptionsassay mit PBMC- und iPS-Osteoklasten . . . . .	43
2.2.7	Isolierung und Kultivierung primärer CD34 <sup>+</sup> HSPCs . . . . .	43
2.2.8	Transfektion und Transduktion primärer HSPCs . . . . .	44
2.2.9	Differenzierung von HSPCs in Osteoklasten . . . . .	44
2.2.10	Resorptionsassay mit HSPC-Osteoklasten . . . . .	44
2.2.11	Differenzierung von iPS in die drei Keimblätter . . . . .	45
2.3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	45
2.3.1	Aufreinigung von Nukleinsäuren . . . . .	45
2.3.1.1	Plasmide . . . . .	45
2.3.1.2	Desoxyribonukleinsäuren . . . . .	45
2.3.1.3	Ribonukleinsäuren . . . . .	45
2.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) . . . . .	46
2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	46
2.3.4	Sanger-Sequenzierung . . . . .	47
2.3.5	Mikrosatellitenanalyse . . . . .	47
2.3.6	Hochdurchsatz-Genomsequenzierung . . . . .	47
2.3.7	Umklonierung des Donorkonstruktes . . . . .	48
2.3.8	TIDE- und TIDER-Analyse . . . . .	48
2.3.9	Genotypisierung . . . . .	49
2.3.10	Nachweis der HDR-vermittelten Genaddition . . . . .	49
2.3.11	Quantitative RT-PCR . . . . .	50
2.3.12	Kopienzahlanalyse mittels quantitativer PCR . . . . .	50
2.3.13	Amplifikation und Sequenzierung der <i>CLCN7</i> -cDNA . . . . .	51
2.3.14	Nachweis des Verlustes der Reprogrammierungsvektoren . . . . .	51
2.3.15	PluriTest Microarray . . . . .	51
2.4	Zytogenetik . . . . .	52
2.5	Immunbiologische und zytochemische Methoden . . . . .	52
2.5.1	Osteoklastenfärbung und -quantifizierung . . . . .	52
2.5.2	Immunfluoreszenzfärbung von Pluripotenzmarkern . . . . .	53
2.5.3	Immunfluoreszenzfärbung für Durchflusszytometrie . . . . .	53

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
3.1	Generierung und Charakterisierung der humanen Zelllinie ARO-iPS . . .	55
3.1.1	Compound-heterozygote Mutation im <i>CLCN7</i> -Gen führt zu ARO	55
3.1.2	ARO-iPS haben normale Stammzellmorphologie und patienten-spezifische <i>CLCN7</i> -Mutationen . . . . .	56
3.1.3	Die generierte iPS-Zelllinie ARO-iPS ist frei von Re-programmierungsvektoren . . . . .	58
3.1.4	ARO-iPS haben einen normalen Karyotyp . . . . .	58
3.1.5	ARO-iPS sind pluripotent . . . . .	59
3.2	Etablierung eines iPS-basierten Krankheitsmodells für osteoklasten-reiche ARO . . . . .	62
3.2.1	Entwicklung eines Protokolls zur Differenzierung von iPS in Os-teoklasten . . . . .	62
3.2.2	Vergleichbare Morphologie von iPS- und primären PBMC-Osteoklasten . . . . .	64
3.2.3	Resorptionsdefekt der ARO-iPS-Osteoklasten und vergleichbare Resorptionsfunktion der iPS- und PBMC-Kontrollosteoklasten . . . . .	66
3.3	CRISPR/Cas9-basierte Mutationskorrektur in ARO-iPS . . . . .	68
3.3.1	Effiziente Genomeditierung in ARO-iPS . . . . .	69
3.3.2	Genomintegrität der korrigierten iPS-Klone . . . . .	73
3.3.3	Erhaltene Pluripotenz in korrigierten iPS-Klonen . . . . .	74
3.3.4	Erfolgreiche Osteoklastendifferenzierung der korrigierten iPS-Klone . . . . .	75
3.3.5	Eingeschränkte Wiederherstellung der Resorptionsfunktion in Osteoklasten der korrigierten iPS-Klone . . . . .	76
3.3.6	Keine Auffälligkeiten in der <i>CLCN7</i> -mRNA von Osteoklasten der korrigierten iPS-Klone . . . . .	78
3.3.7	Normale Induktion der osteoklastenspezifischen Genexpression in differenzierten Osteoklasten korrigierter iPS-Klone . . . . .	79
3.4	Additiver Gentransfer in den <i>AAVS1</i> -Lokus mittels CRISPR/Cas9 . . . . .	80
3.4.1	Stilllegung der Transgene in ARO-iPS . . . . .	82
3.4.2	Effiziente Transgenaddition in den <i>AAVS1</i> -Lokus in HSPCs . . . . .	86
3.4.3	Erfolgreiche Transgenexpression in differenzierten funktionel-len Osteoklasten editierter HSPCs . . . . .	89

<b>4 Diskussion</b>	<b>91</b>
4.1 Patientenspezifische iPS als In-vitro-Krankheitsmodell für ARO . . . . .	91
4.1.1 Generierung der iPS-Linie BIHi002-A (ARO-iPS) aus PBMCs eines Patienten mit <i>CLCN7</i> -bedingter ARO . . . . .	92
4.1.2 Etablierung eines Protokolls zur Differenzierung von iPS in Osteoklasten . . . . .	92
4.1.3 iPS-basiertes ARO-Krankheitsmodell . . . . .	95
4.2 CRISPR/Cas9-basierte gentherapeutische Strategien für Osteopetrose .	98
4.2.1 Effiziente HDR-vermittelte Mutationskorrektur in ARO-iPS . . .	98
4.2.2 Allelspezifische gRNAs und Cas9-RNPs ermöglichen hoch spezifische Genomeditierung . . . . .	101
4.2.3 Partielle Wiederherstellung der Osteoklastenfunktion in korrigierten ARO-iPS . . . . .	103
4.2.4 Additiver Gentransfer in einen genomischen „sicheren Hafen“ . .	106
4.3 Fazit und Ausblick . . . . .	110
<b>Anhang</b>	<b>115</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>125</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>143</b>
<b>Danksagung</b>	<b>147</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>149</b>



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Osteoklastogenese. . . . .	4
1.2	Schematische Darstellung eines aktiven Osteoklasten. . . . .	5
1.3	Fluoreszenzaufnahme eines zytochemisch gefärbten Osteoklasten. . . . .	6
1.4	Formen der osteoklastenvermittelten Resorption. . . . .	7
1.5	Schematische Darstellung des Knochenbaus. . . . .	8
1.6	Röntgenaufnahmen des sklerosierten Skeletts von Patienten mit Osteopetrose. . . . .	10
1.7	Modelle der V-ATPase und des ClC-7/OSTM1-Transporters. . . . .	13
1.8	Membrantopologiemodell von ClC-7. . . . .	14
1.9	Schematische Darstellung des Cas9-gRNA-Komplexes am Ziellokus. . . . .	18
1.10	Generierung genomischer Modifikationen mittels Cas9-induzierter DNA-Reparatur. . . . .	20
1.11	HSPC-Gentherapiestrategie für Osteopetrose. . . . .	23
3.1	Stammbaum und Klinik des Patienten mit ARO. . . . .	56
3.2	Morphologie und Zellidentität der patientenspezifischen iPS-Linie BIHi002-A. . . . .	57
3.3	RT-PCR zum Nachweis der Sendai-Reprogrammierungsvektoren. . . . .	58
3.4	Zytogenetische Analyse der ARO-iPS. . . . .	59
3.5	Pluripotenznachweise der ARO-iPS. . . . .	60
3.6	Keimblattendifferenzierung der ARO-iPS. . . . .	61
3.7	Schematisches Protokoll zur Differenzierung von iPS in Osteoklasten. . . . .	62
3.8	Phasenkontrastaufnahmen von PBMC- und iPS-Osteoklastenkulturen. . . . .	63
3.9	Quantitative Analyse von differenzierten PBMC- und iPS-Osteoklasten. . . . .	65
3.10	Analyse der Knochenresorption von PBMC- und iPS-Osteoklasten. . . . .	67
3.11	Strategie zur CRISPR/Cas9-basierten Korrektur der <i>CLCN7</i> -Mutationen. . . . .	68
3.12	TIDER-Analyse der <i>CLCN7</i> -Mutationskorrektur in editierten ARO-iPS. . . . .	69
3.13	DNA-Sequenzen editierter iPS-Klone von <i>CLCN7</i> Exon 10 und 14. . . . .	70
3.14	Kopienzahlanalyse editierter iPS-Klone. . . . .	71

3.15	Verteilung der <i>CLCN7</i> -Genotypen der editierten iPS-Klone. . . . .	72
3.16	Zytogenetische Analyse der korrigierten iPS-Klone 2 und 37. . . . .	73
3.17	FACS-Analyse der pluripotenzspezifischen Proteinexpression in den iPS-Klonen 2 und 37. . . . .	74
3.18	Osteoklastendifferenzierung der korrigierten iPS-Klone. . . . .	75
3.19	Analyse der Knochenresorption von Osteoklasten der korrigierten iPS- Klone. . . . .	77
3.20	Sequenzen der <i>CLCN7</i> -cDNA in Osteoklasten der korrigierten iPS- Klone. . . . .	78
3.21	qRT-PCR-Analyse der osteoklastenspezifischen Genexpression in diffe- renzierten iPS. . . . .	79
3.22	Schema der Transgenaddition in den <i>AAVS1</i> -Lokus und der Donorvek- toren. . . . .	81
3.23	FACS-Analyse der Transgenexpression in editierten ARO-iPS . . . . .	82
3.24	TIDE-Analyse des <i>AAVS1</i> -Lokus in editierten ARO-iPS. . . . .	84
3.25	PCR-Nachweis der Transgenaddition in den <i>AAVS1</i> -Lokus editierter ARO-iPS. . . . .	85
3.26	Bestimmung der Editierungseffizienz des <i>AAVS1</i> -Lokus in HSPCs. . . . .	87
3.27	PCR-Nachweis der Transgenaddition in den <i>AAVS1</i> -Lokus editierter HSPCs. . . . .	88
3.28	Differenzierung und Resorptionsanalyse von Osteoklasten editierter HSPCs. . . . .	89
A.1	Zelltrümmer- und Dublettenausschluss für die FACS-Analyse. . . . .	115
A.2	Verteilung der Größe und Anzahl der Nuklei von PBMC- und iPS- Osteoklasten. . . . .	115
A.3	TIDER-Analyse des Exons 10 von <i>CLCN7</i> in editierten ARO-iPS. . . . .	116
A.4	TIDER-Analyse des Exons 14 von <i>CLCN7</i> in editierten ARO-iPS. . . . .	117
A.5	Verteilung der Größe und Anzahl der Nuklei von nicht editierten und korrigierten iPS-Osteoklasten. . . . .	121
A.6	Gelelektrophorese-Aufnahme der <i>CLCN7</i> -PCR von cDNA differenzier- ter iPS-Osteoklasten. . . . .	121
A.7	Anzahl der Resorptionsvertiefungen von Osteoklasten korrigierter iPS- Klone. . . . .	122
A.8	Transiente Proteinexpression des GFP-Transgens in editierten iPS. . . . .	123
A.9	Beispielhafte TIDE-Analyse des <i>AAVS1</i> -Lokus in editierten HSPCs. . . . .	124

# Tabellenverzeichnis

2.1	Geräte. . . . .	27
2.2	Verbrauchsmaterialien. . . . .	28
2.3	Chemikalien und Reagenzien. . . . .	29
2.4	Enzyme und Enzymmischungen. . . . .	29
2.5	Fluorochrom-gekoppelte Antikörper und Farbstoffe. . . . .	30
2.6	Kits. . . . .	32
2.7	PCR- und Sequenzierungsprimer. . . . .	33
2.8	Primer für RT-PCR. . . . .	34
2.9	CRISPR gRNAs. . . . .	35
2.10	Sequenzen der ssODN-Donoren für die <i>CLCN7</i> -Mutationskorrektur. . .	36
2.11	Plasmide und virale Vektoren. . . . .	36
2.12	Supplementierte Medien. . . . .	37
2.13	Puffer und Lösungen. . . . .	39
2.14	Zelllinien. . . . .	39
2.15	Software. . . . .	40
2.16	Standard-PCR-Programm. . . . .	46
3.1	Mikrosatellitenanalyse von ARO-PBMCs und generierten ARO-iPS. . .	57
A.1	<i>CLCN7</i> -Genotypen der editierten ARO-iPS-Klone (Exon 10). . . . .	118
A.2	<i>CLCN7</i> -Genotypen der editierten ARO-iPS-Klone (Exon 14). . . . .	119
A.3	Entstandene genetische Varianten in korrigierten iPS-Klonen. . . . .	120



# 1 Einleitung

## 1.1 Knochen

Die Knochen des menschlichen Skeletts dienen als formgebendes und stabilisierendes Stützgerüst des Körpers. Sie ermöglichen die Fortbewegung, indem sie als Verankerungspunkt und damit als Hebel für die Skelettmuskulatur dienen. Darüber hinaus übernehmen Knochen eine wichtige Schutzfunktion für innere Organe und Weichteile, wie das Gehirn, und bilden den Ort der Hämatopoese, das Knochenmark in der Knochenmarkshöhle. Knochengewebe besteht zum Großteil aus mineralisierter Extrazellulärmatrix, die sich vorwiegend aus Kollagenfibrillen (Kollagen Typ I) und mikrokristallinem Hydroxyapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) zusammensetzt. Somit sind die Knochen außerdem ein wichtiger Mineralspeicher, insbesondere für Calcium- und Phosphationen (Seeman und Delmas 2006; Standring 2015).

Makroskopisch liegt Knochengewebe entweder in kompakter oder spongiöser Form vor. Kompakter Knochen befindet sich meist nur in der äußeren Schicht der Knochenrinde (Kortex), in der die Kollagenfibrillen in Schichten (Lamellen) konzentrisch in Form von Osteonen um sogenannte Havers-Kanäle angeordnet sind. In der Spongiosa des Knocheninneren liegen die Lamellen flächig in Knochenbälkchen (Trabekeln) vor. Zwischen den Trabekeln befinden sich Hohlräume, die mit Fett und dem blutbildenden Knochenmark gefüllt sind (Lüllmann-Rauch 2009; Standring 2015).

### 1.1.1 Osteoblasten und Osteozyten

Die knochenbildenden Zellen des Knochengewebes sind quaderförmige Osteoblasten. Gemäß ihrer Funktion finden sich die Osteoblasten vor allem auf freien knöchernen Oberflächen im Inneren des Knochens oder außen unter der knochenumgebenden Kollagenschicht, dem Periost. Wie die meisten Zellen des Knochengewebes stammen Osteoblasten von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) ab, die sich unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren (z. B. „bone morphogenetic protein 2“, BMP-2) in Osteoprogenitorzellen und dann zu Osteoblasten entwickeln. Die Aufgabe der

Osteoblasten besteht in der Kollagensynthese sowie der Steuerung der Knochenmineralisation zur Knochenbildung (Neve et al. 2011; Katsimbri 2017). Die in den Osteoblasten gebildeten Kollagene werden zusammen mit einer Vielzahl von Proteoglykanen und anderen Proteinen, wie z. B. dem calciumbindenden Osteocalcin, in die Extrazellulärmatrix des neu entstehenden Knochengewebes sezerniert. Für die Mineralisation werden Osteoblastenausläufer (Matrixvesikel) in die Extrazellulärmatrix abgeschnürt, die reich an alkalischer Phosphatase und calciumbindenden Molekülen sind. Dadurch kommt es zur lokalen Anreicherung von Calcium- und Phosphationen, die wiederum zur Bildung kleiner, wachsender Kristallisationskerne führt. Größer gewordene Hydroxyapatitkristalle zerreißen die Membran der Matrixvesikel schließlich und lagern sich an die Kollagenfibrillen der Extrazellulärmatrix an, wo sie weiter wachsen und somit die gesamte neu gebildete Knochenmatrix (Osteoid) mineralisieren (Kornak 2011; Florencio-Silva et al. 2015; Katsimbri 2017).

Neben der Knochenbildung regulieren Osteoblasten auch den Knochenabbau, indem sie die Differenzierung und Aktivierung der knochenabbauenden Osteoklasten (siehe Abschnitt 1.1.2) über die Wachstumsfaktoren M-CSF („macrophage colony-stimulating factor“), RANKL („receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand“) und Osteoprotegrin steuern (Kornak und Mundlos 2003; Standring 2015).

Der Großteil der Osteoblasten geht nach der Bildung des Osteoids durch Apoptose zugrunde. Einige Osteoblasten können der Apoptose allerdings entgehen und in einen inaktiven Zustand übergehen. Diese deutlich flacheren Zellen werden Knochenraumzellen („bone lining cells“) genannt und können bei erneuter Aktivierung der Knochenbildung wieder in den aktiven, knochenbildenden Osteoblastenzustand zurückkehren (Lüllmann-Rauch 2009).

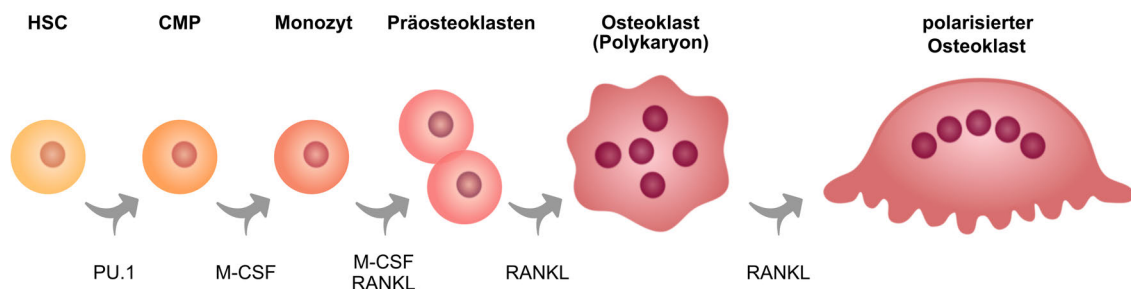
Wenn Osteoblasten in der neugebildeten Knochenmatrix verbleiben und dort durch die Mineralisation des Osteoids schließlich eingemauert werden, können sie sich aber auch zu Osteozyten entwickeln. Osteozyten sind die langlebigsten und häufigsten Knochenzellen. Der Osteozyt ist vollständig von mineralisierter Knochenmatrix umgeben, liegt jedoch in einer mit Kollagenfibrillen und interstitieller Flüssigkeit gefüllten, nicht mineralisierten Knochenhöhle, die er fast vollständig ausfüllt. Osteozyten haben eine dendritische Morphologie und bilden lange Ausläufer, die über Gap Junctions mit benachbarten Osteozyten oder Zellen auf der Knochenoberfläche (Osteoblasten, Knochenraumzellen) verbunden sind, wodurch ein dichtes Netzwerk aus Osteozyten- und Knochenkanälchen (Canaliculi) entsteht (Clarke 2008; Xiao et al. 2016). Dieses Netzwerk erlaubt den Nährstoffaustausch, den Kontakt und die Kommunikation zu benachbarten Osteozyten sowie zu Zellen auf der Knochenoberfläche. Aus Osteoblasten entwickelte Osteozyten können nur in sehr kleinem Umfang neue

Knochenmatrix bilden. Vielmehr detektieren sie Druck und Belastung, die auf den Knochen wirken, und regulieren den Knochenumbau zur Anpassung der Knochenstruktur an die mechanische Beanspruchung (Florencio-Silva et al. 2015).

### 1.1.2 Osteoklasten

Osteoklasten (OKs) sind mehrkernige große Zellen, die die einzigen bekannten knochenabbauenden Zellen des Körpers sind. Osteoklasten entwickeln sich aus der Monozyten-/Makrophagen-Linie der hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) durch Fusion mononukleärer Präosteoklasten (siehe Schema der Osteoklastogenese in Abb. 1.1). HSCs differenzieren zunächst unter Einfluss des Transkriptionsfaktors PU.1 zu myeloiden Vorläuferzellen (CMPs, „common myeloid progenitors“), die sich weiter zu CD14<sup>+</sup> Monozyten entwickeln. Unter Einfluss des Wachstumsfaktors M-CSF, der unter anderem von Knochenmarkstromazellen und Osteoblasten sezerniert wird, differenzieren Monozyten zu Osteoklastenvorläufern (Shalhoub et al. 2000; Kornak und Mundlos 2003; Boyle et al. 2003). M-CSF bindet an den Rezeptor c-FMS auf der Zelloberfläche der Monozyten und Osteoklastenvorläuferzellen, wodurch die Proliferation, die weitere Differenzierung und das Überleben dieser gefördert wird. Des Weiteren induziert M-CSF die Expression des Rezeptors RANK („receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B“) auf der Zelloberfläche sich entwickelnder Osteoklastenvorläufer (Arai et al. 1999; Edwards und Mundy 2011). Der Ligand von RANK (RANKL) ist neben M-CSF der zweite essenzielle Wachstumsfaktor für die Osteoklastendifferenzierung und -funktion. Er wird als membranständiges Protein hauptsächlich von Osteoblasten, Osteozyten, Stromazellen und Lymphozyten gebildet (Kawai et al. 2006; Nakashima und Takayanagi 2011; Florencio-Silva et al. 2015), mithilfe von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) kann jedoch auch eine lösliche Form von RANKL abgespalten werden (Ono und Nakashima 2018). Durch die Aktivierung von RANK wird die für die Osteoklastogenese notwendige Fusion der Präosteoklasten zu Polykaryons sowie die Expression osteoklastenspezifischer Proteine induziert. Für einen funktionstüchtigen Osteoklasten ist außerdem die Reorganisation des Zytoskeletts und die Anheftung des Osteoklasten an die Knochenoberfläche notwendig. Diese Aktivierung und Polarisierung des Osteoklasten wird ebenfalls von M-CSF und RANKL gesteuert (Boyle et al. 2003; Mellis et al. 2011). Neben M-CSF und RANKL produzieren Osteoblasten aber auch Osteoprotegerin (OPG), der ein sogenannter Decoy-Rezeptor für RANKL ist und damit die Bindung von RANKL an RANK verhindert. Während der osteoklastenvermittelten Knochenresorption werden Wachstumsfaktoren und Calciumionen aus der Knochenmatrix freigesetzt, die

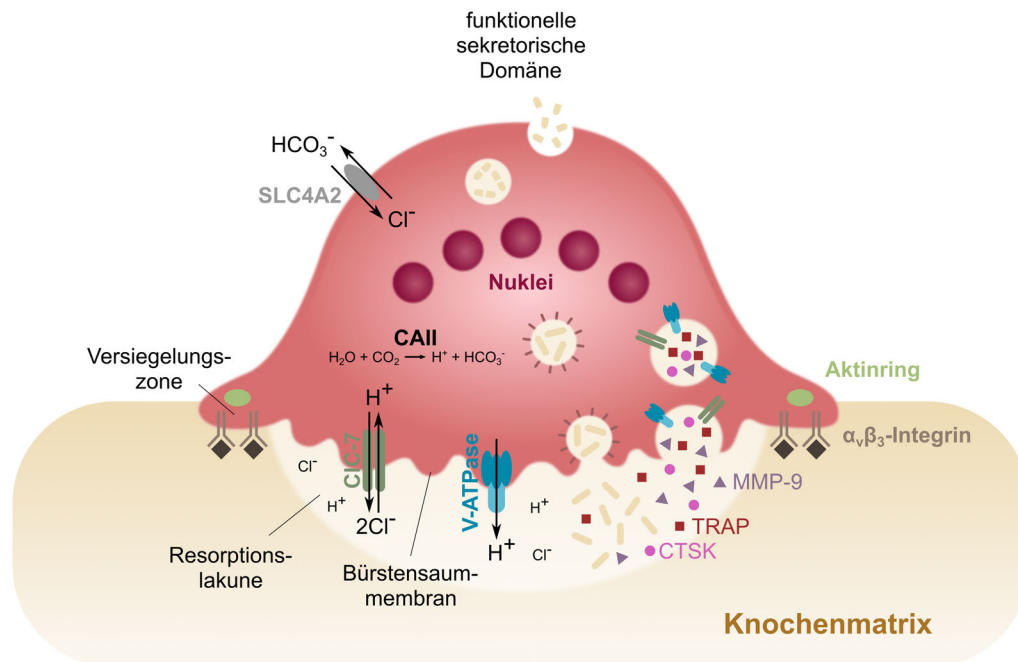
wiederum die OPG-Produktion der Osteoblasten stimulieren. Auf diese Weise hat das RANKL-OPG-System einen negativen Rückkopplungsmechanismus, der die Regulierung der Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung ermöglicht (Boyce und Xing 2008; Kornak 2011).



**Abbildung 1.1: Osteoklastogenese.** Unter Einfluss des Transkriptionsfaktors PU.1 und der Wachstumsfaktoren M-CSF und RANKL entwickeln sich HSCs über myeloide Vorläufer (CMPs), Monozyten und Präosteoklasten zu multinukleären Osteoklasten. Die Polarisation des aktiven Osteoklasten bei Anheftung an die Knochenoberfläche erfolgt durch die Reorganisation des Zytoskeletts. Adaptiert von Boyle et al. 2003.

Ein aktiver, polarisierter Osteoklast, der auf der Knochenoberfläche aufsitzt und die Knochenmatrix abbaut, ist in Abb. 1.2 schematisch dargestellt. Durch die Umstrukturierung des Zytoskeletts wird das Anheften des Osteoklasten an die Knochenoberfläche ermöglicht. Dabei formen Integrine (hauptsächlich Integrin  $\alpha_v\beta_3$ ) Komplexe mit Aktinfilamenten und bilden Podosomen aus. Die Integrine der Podosomen können an RGD-Aminosäuremotive von Proteinen der extrazellulären Knochenmatrix binden und den Osteoklasten somit verankern (Edwards und Mundy 2011). Diese Podosomen sind als punktförmige phalloidingefärbte Aktinstrukturen (grün) im Vergrößerungsausschnitt der Fluoreszenzaufnahme eines *in vitro* differenzierten und gefärbten Osteoklasten in Abb. 1.3 erkennbar. In polarisierten Osteoklasten ordnen sich die Podosomen als Aktinring an, der die Verbindung zwischen Osteoklast und Knochenmatrix stabilisiert (ebenfalls sichtbar in Abb. 1.3). Durch die Ausbildung des Aktinrings entsteht die sogenannte Versiegelungszone (siehe Abb. 1.2), die die zu resorbierende Knochenmatrix unterhalb (apikal) des Osteoklasten von der Umgebung abdichtet, um benachbarte Zellen und Matrix von dem säure- und proteasehaltigen Resorptionssekret der Osteoklasten zu schützen (Mellis et al. 2011). Darüber hinaus ermöglicht die Reorganisation des Zytoskeletts auch die Fortbewegung des Osteoklasten über die Knochenoberfläche (Søe und Delaissé 2017). Für die

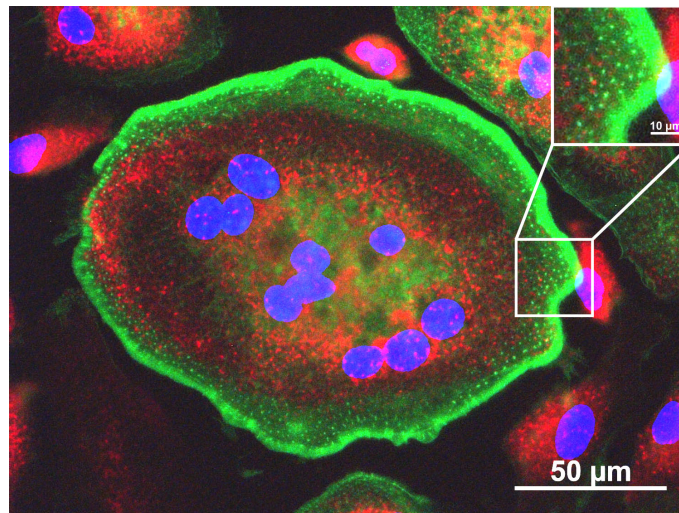




**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines aktiven Osteoklasten.** Der aktive Osteoklast heftet sich über  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine an die Knochenoberfläche und bildet eine Versiegelungszone. Durch Fusion von Lysosomen mit der apikalen Plasmamembran entsteht die Bürstensaummembran, und knochenabbauende Enzyme wie MMP-9, TRAP, Cathepsin K (CTSK) werden in die entstehende Resorptionslakune freigesetzt. Über die V-ATPase und den Chloridtransporter ClC-7 wird Salzsäure zur Auflösung des Hydroxyapatits in die Lakune sezerniert. Protonen werden von der Carboanhydrase II (CAII) bereitgestellt, Chloridionen gelangen über den  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (SLC4A2) in den Osteoklasten. Abgebaute Knochenmatrix wird an der Bürstensaummembran über Endozytose aufgenommen und mittels Transzytose basal an der sekretorischen Domäne abgegeben. Adaptiert von Kornak und Mundlos 2003 und Coudert et al. 2015.

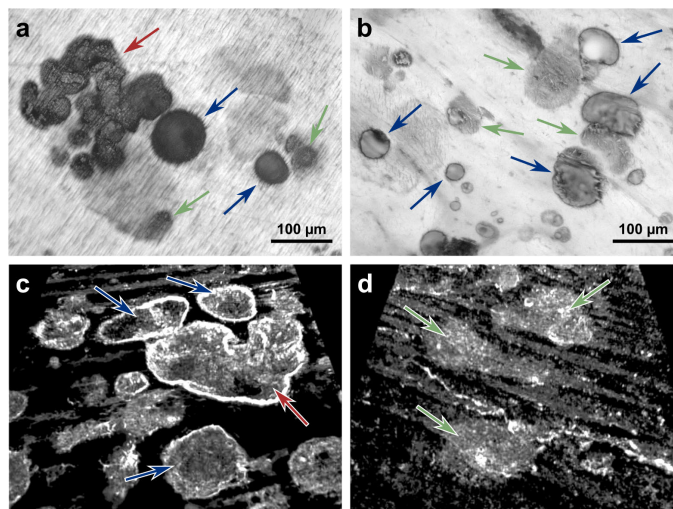
Knochenresorption vergrößert der Osteoklast nach Anheften an die Knochenoberfläche apikal seine Zelloberfläche durch Fusion von lysosomalen Vesikeln mit der Plasmamembran, wodurch die für Osteoklasten typische dichte Bürstensaummembran („ruffled border“) entsteht. Dort befinden sich viele vakuoläre  $\text{H}^+$ -Adenosintriphosphatasen (V-ATPasen) und ClC-7-Chlorid-Protonen-Austauscher, sodass die Knochenmatrix unterhalb des Osteoklasten durch den Transport von Protonen und Chloridionen aus dem Zellinneren in den Extrazellulärraum stark angesäuert wird (pH 4,5) und die anorganischen Hydroxyapatitkristalle des mineralisierten Knochens aufgelöst werden (siehe Abb.1.2, Väänänen et al. 2000; Supanchart und Kornak 2008). Die Protonen für die V-ATPase werden durch die Carboanhydrase II (CAII)

bereitgestellt, indem dieses Enzym die Reaktion von Wasser und Kohlenstoffdioxid zu Bicarbonaten und Protonen katalysiert (Henriksen et al. 2008). Über einen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (SLC4A2) werden entstandene Bicarbonate aus der Zelle geschleust und gleichzeitig die für die Säureproduktion benötigten Chloridionen in den Osteoklasten transportiert (Teti et al. 1989). Durch die Fusion lysosomaler Vesikel mit der Plasmamembran werden zusätzlich Enzyme wie Cathepsin K (CTSK), Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9) und tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) in die entstehende Resorptionslakune sezerniert, die die organischen Knochenbestandteile wie Kollagen abbauen (Reinholt et al. 1990; Delaissé et al. 2003). Abgebaute Bestandteile der Knochenmatrix, inklusive Calcium- und Phosphationen, werden apikal von Osteoklasten mittels Endozytose aufgenommen und nach dem Prinzip der Transzytose an der basolateralen Seite in der funktionellen sekretorischen Domäne wieder abgegeben (Väänänen et al. 2000). An der weiteren Zerlegung von Abbauprodukten der Knochenmatrix in transzytotischen Vesikeln scheint auch TRAP beteiligt zu sein (Halleen et al. 1999; Hayman 2008). TRAP bildet zusammen mit Naphtol AS MX Phosphat und Fast Red Violet LB Salz einen roten Farbstoff und kann somit für den funktionellen Nachweis dieser Zellen dienen (siehe rote Färbung in Abb. 1.3).



**Abbildung 1.3: Fluoreszenzaufnahme eines zytochemisch gefärbten Osteoklasten.** Gefärbt wurden das an Aktin bindende Phalloidin (grün), TRAP (rot) und Nuklei (DAPI, blau) von *in vitro* differenzierten Osteoklasten. Die Phalloidinfärbung des Osteoklasten zeigt einen Aktinring entlang der Plasmamembran sowie punktförmige Podosomen (siehe Vergrößerungsausschnitt).

Osteoklasten-vermittelte Knochenresorption kann sowohl *in vitro* mithilfe des Resorptionsassays als auch in histologischen Knochenpräparaten untersucht werden. Für Ersteres werden differenzierte Osteoklasten für einige Tage auf Knochen- oder Dentinscheiben kultiviert. Anschließend werden die Osteoklasten abgelöst und die auf der Scheibenoberfläche entstandenen Resorptionsvertiefungen der Osteoklasten können gefärbt und mikroskopisch dokumentiert werden. Beispielhafte Aufnahmen eines solchen Resorptionsassays sind in Abb. 1.4 dargestellt. Es lassen sich verschiedene Formen der Knochenresorption unterscheiden. Bei der stationären Knochenresorption sitzt der Osteoklast auf der Knochenoberfläche auf und baut apikal die von der Versiegelungszone gesäumte Knochenmatrix ab. Auf diese Weise



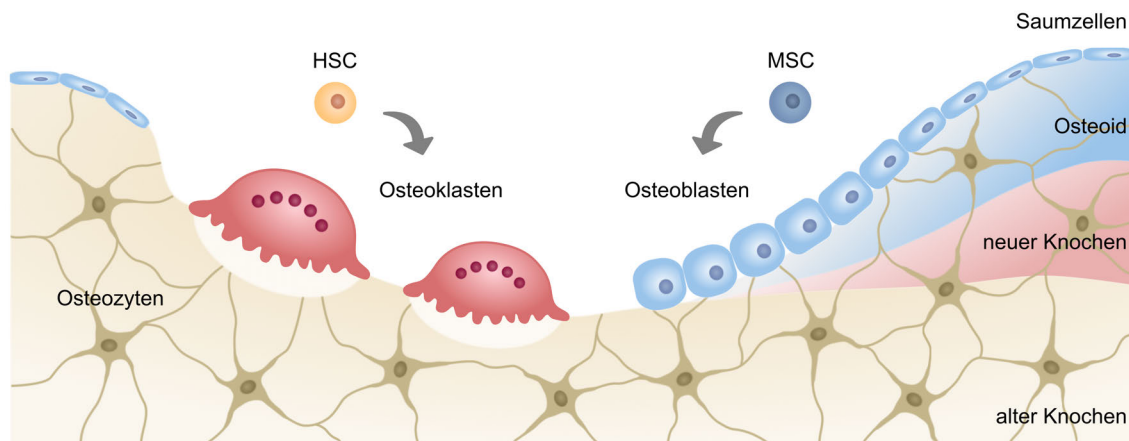
**Abbildung 1.4: Formen der osteoklasten-vermittelten Resorption.** Mikroskopische Aufnahmen (a), (b) und 3D-Rekonstruktionen von Z-Stapeln konfokaler Mikroskopieaufnahmen (c), (d) gefärbter Knochenerosionen *in vitro*: tiefe grubenförmige (blaue Pfeile) und kanalförmige (rote Pfeile) Resorption sowie oberflächige Pseudoresorption (grüne Pfeile). (c), (d) modifiziert von Howaldt et al. 2020.

entstehen runde, grubenförmige Vertiefungen auf der Knochenoberfläche. Durch abwechselnde stationäre Resorption und Migration bzw. Ausbreitung des Zellkörpers kann durch einen einzelnen Osteoklasten eine Ansammlung benachbarter Gruben entstehen. Simultane Knochenresorption und Fortbewegung des Osteoklasten durch ständige Reorganisation der Zytoskeletts, inklusive der Versiegelungszone, lassen

hingegen Resorptionskanäle entstehen. Diese Resorptionsform ist gegenüber des Grubenmodus aggressiver, da die Resorptionsvertiefungen oft tiefer sind, durch erhöhte Cathepsin-K-Expression mehr Kollagenolyse erfolgt und in weniger Zeit mehr Knochenoberfläche erodiert wird (Merrild et al. 2015; Sørensen und Delaissé 2017). Neben diesen beiden Resorptionsformen lässt sich auch eine oberflächige Knochenerosion beobachten, die auch Pseudoresorption genannt wird. Wie in Abb.1.4 zu sehen ist, sind die Resorptionsvertiefungen in diesem Fall weniger tief und weisen oft diffuse Ränder auf (Howaldt et al. 2020).

### 1.1.3 Knochenumbau

Das menschliche Skelett befindet sich zeitlebens im Umbau. Jährlich wird durchschnittlich ca. 10% der gesamten Knochenmatrix des Skeletts abgebaut und durch neue ersetzt. Dadurch ist eine Anpassung der Knochen an veränderte mechanische Beanspruchung sowie die Ausbesserung kleiner Schäden möglich. Dieser Knochenumbau ist streng reguliert und hoch organisiert und wird hauptsächlich von Osteoklasten und Osteoblasten bewerkstelligt. Osteoklasten und Osteoblasten bilden eine funktionelle Einheit („bone multicellular unit“), die eine zeitliche und räumliche Koordination des Knochenumbaus ermöglicht (Lüllmann-Rauch 2009; Kenkre und Bassett 2018).



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Knochenumbaus.** Von HSCs abstammende Osteoklasten bauen alten Knochen ab, von MSCs abstammende Osteoblasten bauen neue, zunächst nicht-mineralisierte Knochenmatrix (Osteoid) auf, die über die Zeit zunehmend mineralisiert. Osteoblasten werden inaktiv (Saumzellen) oder von neuer Knochenmatrix eingemauert und zu Osteozyten. Adaptiert von Bartl und Bartl 2017 und Sebastian und Loots 2018.

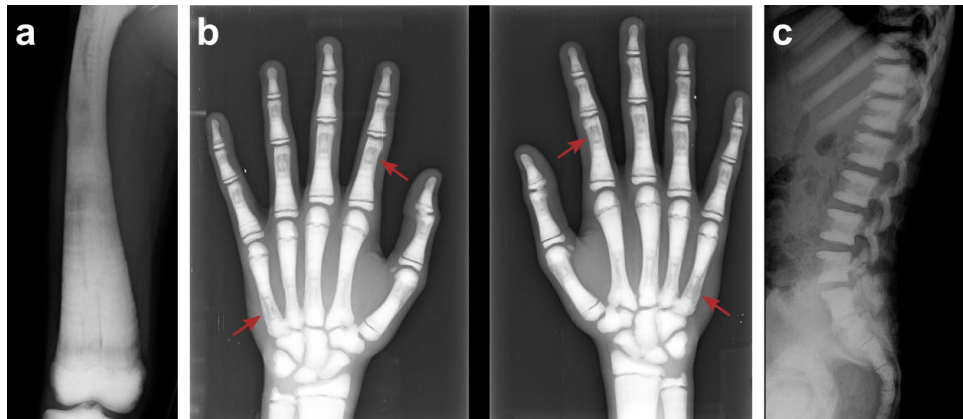
Alle inneren Knochenoberflächen sind mit dem sogenannten Endost bedeckt. Neben nicht-mineralisierten Kollagenfibrillen enthält es eine kontinuierliche Schicht aus ruhenden Zellen (hauptsächlich Saumzellen neben mesenchymalen Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, inaktiven Osteoklasten), die im Zuge des Knochenumbaus beispielsweise durch Osteozyten aktiviert werden können. Eine solche Zellschicht befindet sich auch unterhalb des Periosts, das die äußeren Oberflächen der Knochen ummantelt (Lüllmann-Rauch 2009). Aktivierte Osteoblasten und Knochen-saumzellen regen Osteoklasten zur Differenzierung und Knochenresorption an. Diese fressen Bohrkanäle in kompakten Knochen und flächige Gruben in die Oberfläche von spongiosen Knochen (Parra-Torres et al. 2013). Wie in Abb. 1.5 schematisch dargestellt ist, setzen sich Osteoblasten auf die von Osteoklasten erodierte Knochenoberfläche und beginnen neue Knochenmatrix zu bilden, die zunächst noch nicht mineralisiert ist (Osteoid). Auf die erste Schicht Osteoblasten setzt sich dann eine weitere Schicht neuer osteoidbildender Osteoblasten, sodass die darunter liegenden Osteoblasten vollständig von Knochenmatrix umgeben werden und sich schließlich zu Osteozyten entwickeln können (Sims und Gooi 2008). Im Laufe der folgenden Wochen und Monate nimmt die Mineralisation der einzelnen Osteoidschichten durch die wachsenden Hydroxyapatitkristalle zu. Nach erfolgtem Knochenumbau geht die jüngste Osteoblasten- und Osteoklastengeneration in den inaktiven Zustand über und bildet somit das neue Endost (Lüllmann-Rauch 2009).

## 1.2 Osteopetrose

Osteopetrose ist eine heterogene Gruppe erblich bedingter sklerosierender Knochen-erkrankungen, die auf das Fehlen oder den Funktionsverlust von Osteoklasten zurückzuführen ist. Der deutsche Radiologe Heinrich E. Albers-Schönberg beschrieb diese Erkrankung 1904 erstmals als generalisierte Knochenerkrankung mit Verdichtung und Verdickung der Knochenstruktur anhand von Röntgenaufnahmen eines Patienten (Albers-Schönberg 1904). Seitdem wurde eine Reihe von Patienten mit verschiedenen Osteopetroseformen unterschiedlich starker Ausprägungen beschrieben (El-Tawil und Stoker 1993; Bénichou et al. 2000; Del Fattore et al. 2006; Shamriz et al. 2017). Die schwerste Form der Osteopetrose ist die autosomal-rezessive Osteopetrose (ARO), gefolgt von der intermediär-autosomal-rezessiven Osteopetrose (IARO) bis hin zur autosomal-dominanten Osteopetrose (ADO), die mild oder sogar asymptomatisch verläuft. Alle Osteopetroseformen sind durch eine erhöhte Knochendichte charakterisiert, die zu brüchigem Knochen und damit zu einem erhöhten Frakturrisiko führt (Balemans et al. 2005; Stark und Savarirayan



2009). Wie in Abb.1.6 zu sehen ist, finden sich in Röntgenaufnahmen des Skeletts von Osteopetrosepatienten oft sogenannte Erlenmeyerkolben-Deformitäten, Endknochen („bone-in-bone-signs“) oder „Sandwich-Wirbel“, auch Deformitäten des Schädels können auftreten (Tolar et al. 2004; Kornak et al. 2006; Stark und Savarirayan 2009).



**Abbildung 1.6: Röntgenaufnahmen des sklerosierten Skeletts von Patienten mit Osteopetrose. (a)** Distaler Femur mit Erlenmeyerkolben-Deformität. **(b)** Phalangen der Hand mit Endknochen („bone-in-bone-signs“, siehe rote Pfeile). **(c)** Wirbelsäule mit „Sandwich-Wirbeln“.

### 1.2.1 Heterogene Krankheitsbilder der Osteopetrose

Die schwere autosomal-rezessive Osteopetrose (ARO), auch bekannt als infantile maligne Osteopetrose (IMO), hat eine geschätzte Prävalenz von 1:250.000 (Stark und Savarirayan 2009; Sobacchi et al. 2013). Die ersten Krankheitssymptome treten bereits *in utero* oder in den ersten Lebensmonaten auf (Khazen et al. 1986; Mazzolari et al. 2009). Neben Wachstumsretardierung zeigen Patienten meist eine stark sklerosierte Schädelbasis und eine typische Schädelform mit Makrozephalus (teilweise auch Hydrozephalus), frontalem „Bossing“ und Exophthalmus (Del Fattore et al. 2006; Penna et al. 2019). Es kann zur Verknöcherung der Knochenmarkshöhle sowie von Nervengängen im Schädel kommen. Dadurch geht Ersteres mit einer gestörten Hämatopoese einher, wohingegen Letzteres zu Blindheit, Taubheit und Lähmung verschiedener Hirnnerven in den Patienten führen kann (Wilson und Vellodi 2000; Balemans et al. 2005). Aufgrund der gestörten Hämatopoese kann es zu einer verringerten Immunabwehr und damit zu rezidivierenden Infekten, schweren Anämien bis hin zu inneren Blutungen aufgrund von Thrombozytopenie kommen (Frattini et al.

2003; Wu et al. 2017). Außerdem kann eine kompensatorische extramedulläre Hämatopoese und damit verbunden eine Hepatosplenomegalie beobachtet werden (Mazzolari et al. 2009; Stark und Savarirayan 2009). Im peripheren Blut der ARO-Patienten ist zudem der Anteil der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen oft stark erhöht (Steward et al. 2005). In seltenen Fällen kann es bei ursächlichen *CLCN7*- oder *OSTM1*-Mutationen auch zu einer neurologischen Beteiligung kommen, die von Krampfanfällen und Neurodegeneration geprägt ist (Steward 2003; Kasper et al. 2005; Ott et al. 2013). Unbehandelt führt diese schwere Osteopetroseform bereits in den ersten 10 Lebensjahren zum Tod (Sobacchi et al. 2016; Penna et al. 2019). Die Todesursachen sind meist auf Komplikationen des Knochenmarksversagens wie innere Blutungen, schwere Anämie und lebensbedrohliche Infektionen zurückzuführen (Tolar et al. 2004; De Vernejoul und Kornak 2010).

Bisher wurden nur wenige Fälle mit intermediär-autosomal-rezessiver Osteopetrose (IARO) beschrieben (Campos-Xavier et al. 2003; Balemans et al. 2005; Pangrazio et al. 2010; Pang et al. 2016). Alle sind auf homo- oder heterozygote Mutationen im *CLCN7*-Gen zurückzuführen (siehe Abschnitt 1.2.2.1), die zu milderer Symptomen als bei ARO führen (Balemans et al. 2005; Sobacchi et al. 2016). Neben den radiographischen Auffälligkeiten, wie der erhöhten Knochendichte, und der größeren Frakturempfindlichkeit zeigen die Patienten keine oder nur milde Anämien und hämatologische Einschränkungen (Campos-Xavier et al. 2003; Pangrazio et al. 2010). Im Vergleich zur autosomal-dominanten Osteopetrose (ADO) treten die Symptome jedoch früher, bereits in den ersten Lebensjahren auf, die Patienten haben aber eine normale Lebenserwartung (Frattini et al. 2003; Sobacchi et al. 2016).

Die benigne Form der Osteopetrose ist die autosomal-dominante Osteopetrose Typ II (ADOII, auch Albers-Schönberg-Erkrankung genannt). ADO tritt deutlich häufiger als ARO und IARO auf, die Prävalenz liegt bei 1:20.000 (Palagano et al. 2018; Penna et al. 2019). Die klinische Manifestation dieser Osteopetroseform ist hoch variabel. Die Diagnose der Erkrankung wird meist erst im späten Kindes- oder Jugendalter gestellt, bei einem sehr milden bis asymptomatischen Verlauf kann es jedoch auch deutlich später bei einer Röntgenuntersuchung zu einem zufälligen Befund kommen (Balemans et al. 2005; Kornak et al. 2006; Waguespack et al. 2007). Die Osteosklerose fällt milder aus als bei ARO, charakteristisch sind jedoch eine hohe Frakturrate sowie „Sandwich-Wirbel“ und Endknochen (siehe Abb. 1.6, Bénichou et al. 2000; Cleiren et al. 2001; Kornak et al. 2006). Leichte bis schwere hämatologische Beeinträchtigungen treten bei einigen, aber nicht bei allen ADO-Patienten auf (Del Fattore et al. 2006; Pang et al. 2016). Selten sind Nervenkompressionen und damit einhergehend visuelle Einschränkungen (Sobacchi et al. 2016). Zudem kann

meistens von einer normalen Lebenserwartung ausgegangen werden (Stark und Savarirayan 2009).

Früher wurde eine weitere benigne Form der ADO zugeordnet (ADOI). Da jedoch nachgewiesen werden konnte, dass diese Erkrankung auf eine Gain-of-Function-Mutation des *LRP5*-Gens in Osteoblasten zurückzuführen ist und nicht auf einen Osteoklastendefekt, wird sie seitdem den Hyperostosen anstatt den Osteopetrosen zugeordnet (Van Wesenbeeck et al. 2003; Del Fattore et al. 2008).

### 1.2.2 Pathogenese der osteoklastenreichen Osteopetrose

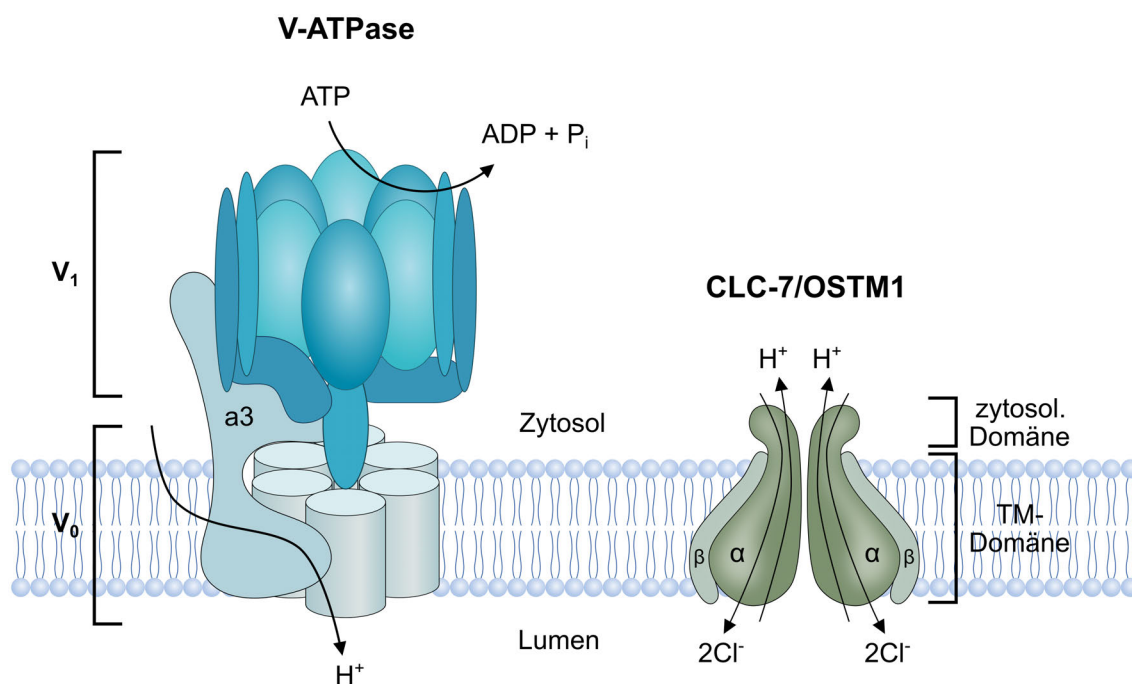
Bisher wurden mindestens 18 betroffene Gene im Zusammenhang mit Osteopetrose beschrieben (Palagano et al. 2018). Pathogene Mutationen in Genen, die für die Differenzierung der Osteoklasten entscheidend sind, wie beispielsweise *RANK*, *RANKL* oder *CSF1R* (M-CSF-Rezeptor), führen zu einer osteoklastenarmen Osteopetrose. Auf diese Osteopetroseform wird im Folgenden jedoch nicht näher eingegangen. Der Großteil der pathogenen Mutationen lässt sich der osteoklastenreichen Osteopetrose zuordnen. Bei dieser Osteopetroseform sind Osteoklasten zwar in ausreichender oder sogar erhöhter Anzahl vorhanden, sie sind jedoch in ihrer Resorptionsfunktion gestört (Del Fattore et al. 2006; Villa et al. 2008). Pathogene Mutationen in bisher 13 beschriebenen Genen können mit einer Beeinträchtigung der Polarisierung des Osteoklasten (Ausbildung der Bürstensaummembran), des vesikulären und lysosomalen Transports und/oder einer Sekretion von knochenabbauenden Substanzen, wie Säure und Enzyme, in Zusammenhang gebracht werden. Dies führt zu einer Störung oder gar einem Verlust der osteoklastenvermittelten Knochenresorption (Villa et al. 2008; Sobacchi et al. 2013; Palagano et al. 2018). Die Mehrheit aller ARO- und ADOII-Erkrankungen beruht auf Mutationen im *TCIRG1* oder *CLCN7*-Gen (siehe Abschnitt 1.2.2.1). Die Hälfte der Patienten mit ARO weist ein mutiertes *TCIRG1*-Gen auf, während 13–17% der Erkrankungen durch Mutationen im *CLCN7*-Gen verursacht werden (Kornak et al. 2000; Frattini et al. 2003; Palagano et al. 2018). Heterozygote Mutationen im *CLCN7*-Gen sind auch der Grund für ADOII-Erkrankungen (Cleiren et al. 2001; Kornak et al. 2006; Butscheidt et al. 2018).

#### 1.2.2.1 *TCIRG1*- und *CLCN7*-bedingte ARO

*TCIRG1* codiert für die  $\alpha 3$ -Untereinheit der V-ATPase und wird besonders hoch in Membranen von Osteoklasten und Parietalzellen des Magens exprimiert (Sobacchi et al. 2013; Palagano et al. 2018). Unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP)



pumpt die V-ATPase Protonen aus dem Zytoplasma in den Extrazellulärraum (z. B. Resorptionslakune der Osteoklasten) sowie in intrazelluläre Kompartimente, wie Endosomen, Lysosomen und sekretorische Vesikel (Kornak et al. 2000; Xu et al. 2007). Im Zusammenspiel mit dem Chloridtransporter CLC-7 (siehe Abb. 1.7 und nächster Abschnitt) wird somit Salzsäure in die intra- und extrazellulären Lumen sekretiert, wodurch dort der pH-Wert reguliert wird. Wie in Abb. 1.7 dargestellt ist, besteht die V-ATPase aus zahlreichen Untereinheiten, die sich in zwei funktionelle Domänen gliedern. Die  $V_1$ -Domäne auf der zytoplasmatischen Seite ist für die Spaltung des ATP zum Zweck der Energieübertragung zuständig, während der eigentliche Protonentransport durch die membranständige  $V_0$ -Domäne bewerkstelligt wird (Forgac 2007). Die Untereinheit TCIRG1 ( $a_3$ ) wird der  $V_0$ -Domäne zugeordnet, verbindet diese mit  $V_1$  und ist unerlässlich für den erfolgreichen Protonentransport (Qin et al. 2012).

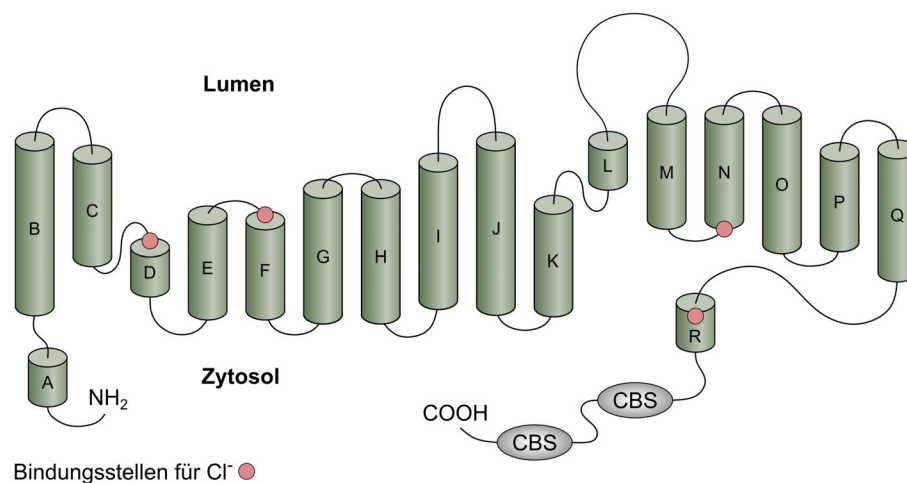


**Abbildung 1.7: Modelle der vakuolären  $H^+$ -ATPase und des CLC-7/OSTM1-Transporters.** Die ATP-getriebene Protonenpumpe gliedert sich in eine zytoplasmatische  $V_1$ -Domäne und eine membranständige  $V_0$ -Domäne. Die Untereinheit  $a_3$ , codiert vom *TCIRG1*-Gen, zählt zur  $V_0$ -Domäne und verbindet diese mit  $V_1$ . ATP wird durch  $V_1$  gespalten, die Protonentranslokation erfolgt durch  $V_0$  unter Beteiligung von  $a_3$ . Adaptiert von Forgac 2007 und Jefferies et al. 2008. Der homodimere CLC-7/OSTM1-Chlorid-Protonen-Antiporter besteht aus zwei CLC-7  $\alpha$ -Untereinheiten, die jeweils die  $\beta$ -Untereinheiten OSTM1 binden. Jede der CLC-7 Untereinheiten hat ein aktives Zentrum für den Austausch von 2 Chloridionen und einem Proton.

## 1 Einleitung

---

Bis heute wurden über 120 verschiedene *TCIRG1*-Mutationen in ARO-Patienten beschrieben, darunter Missense- sowie Stopmutationen, kleine Insertionen oder Deletionen, große genomische Deletionen und Spleißdefekte (Del Fattore et al. 2006; Palagano et al. 2018). Die Osteoklastenanalyse von ARO-Patienten mit *TCIRG1*-Mutationen zeigte, dass die funktionstüchtige V-ATPase in Osteoklasten nicht nur für die Azidifizierung der Resorptionslakune zum Abbau der anorganischen Bestandteile der Knochenmatrix notwendig ist, sondern auch für den Vesikeltransport und damit die Ausbildung der Bürstensaummembran in aktiven Osteoklasten (Sobacchi et al. 2013). *In vitro* differenzierte Osteoklasten von ARO-Patienten mit einem *TCIRG1*-Defekt sind häufig größer und haben mehr Nuklei (Taranta et al. 2003), können sich an die Knochenoberfläche anheften und bilden einen Aktinring aus (Helfrich et al. 1991; Del Fattore et al. 2008), jedoch ist die Ausbildung der Bürstensaummembran gestört. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass *TCIRG1*-defekte Osteoklasten *in vitro* eine reduzierte Resorptionsfähigkeit aufgrund verringerter Protonensekretion aufweisen (Taranta et al. 2003; Del Fattore et al. 2006).



**Abbildung 1.8: Membrantopologiemodell von CIC-7.** CIC-7 besteht aus 18 trans- bzw. intramembranen  $\alpha$ -Helices (A–R, grün) sowie zwei zytosolischen CBS-Domänen (grau). Bindungsstellen für Chloridionen sind in Rot dargestellt. Adaptiert von Dutzler et al. 2002.

CIC-7 ist ein spannungsgesteuerter  $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Antipporter der CIC-Chloridkanal-Genfamilie in Säugetieren und wird vom *CLCN7*-Gen codiert (Brandt und Jentsch 1995; Graves et al. 2008; Leisle et al. 2011). Dieser Chloridtransporter wird ubi-

quitär schwach exprimiert, hohe Proteinlevel konnten jedoch u. a. im Gehirn, im Rückenmark, im Auge, in der Niere sowie in Osteoklasten der Maus indirekt mittels X-Gal- und  $\beta$ -Galaktosidasefärbung nachgewiesen werden (Kornak et al. 2001; Wartosch et al. 2009). Intrazellulär ist ClC-7 in Lysosomen, späten Endosomen und in Osteoklasten ebenfalls in der Bürstensaummembran lokalisiert (Kornak et al. 2001; Stauber et al. 2012). Zusammen mit der vakuolären  $H^+$ -ATPase gewährleistet dieser Chloridtransporter die elektroneutrale Azidifizierung von intrazellulären Vesikeln sowie der extrazellulären Resorptionslakune und ist somit am lysosomalen Proteinabbau sowie der Knochenresorption beteiligt (Jentsch und Pusch 2018). Der Chloridtransporter ist ein Homodimer aus zwei ClC-7-Proteinen (siehe Abb.1.7), die jeweils aus 18 Trans- bzw. Intramembranhelices sowie zwei zytosolischen Cystathionin- $\beta$ -Synthase-ähnlichen CBS-Domänen am Carboxyterminus bestehen (siehe Abb.1.8; Dutzler et al. 2002; Feng et al. 2010). Zudem binden die ClC-7  $\alpha$ -Untereinheiten jeweils die essenzielle  $\beta$ -Untereinheit OSTM1, die aus einer Transmembrandomäne besteht. Es wird davon ausgegangen, dass ClC-7 und OSTM1 sich gegenseitig stabilisieren, da durch den Verlust von ClC-7 oder OSTM1 auch die Proteinexpression des jeweils anderen Bindungspartners stark reduziert ist. ClC-7 weist keine N-Glykosylierung auf, während OSTM1 hoch glykosyliert ist und damit den Proteinkomplex im säure- und proteasereichen lysosomalen Lumen schützt (Lange et al. 2006; Leisle et al. 2011). Wo OSTM1 an ClC-7 bindet und welche Aminosäuren an dieser Bindung beteiligt sind, konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden, weshalb Abb.1.7 nur als eine modellhafte Darstellung des ClC-7/OSTM1-Komplexes verstanden werden sollte.

Das humane *CLCN7*-Gen liegt auf Chromosom 16, enthält eine codierende Region von 2418 bp, die sich in 25 Exons gliedert und die 805 Aminosäuren des ClC-7-Proteins codiert (NM\_001287.6, Kornak et al. 1999). Mutationen entlang des gesamten Gens, die mit einer Störung oder dem Verlust der Funktion von ClC-7 einhergehen, sind mit Osteopetrose aller Schweregrade assoziiert (Del Fattore et al. 2006; Pangrazio et al. 2010; Supanchart et al. 2014). Biallelische Mutationen (Homozygotie oder Compound-Heterozygotie) führen zur schwersten Osteopetroseform (ARO), wohingegen dominant-negative *CLCN7*-Mutationen die Ursache für asymptotische bis milde ADOII sind (Balemans et al. 2005; Kornak et al. 2006; Villa et al. 2008; Butscheidt et al. 2018). Im Gegensatz zu *TCIRG1*-bedingter ARO können Mutationen im *CLCN7*- und *OSTM1*-Gen auch die neurodegenerative Form der ARO in Kombination mit einer lysosomalen Speicherkrankheit hervorrufen, bei der neben den klassischen Symptomen der Osteopetrose auch Retina- und Neurodegeneration auftreten (Steward 2003; Kasper et al. 2005; Ott et al. 2013; Weinert et al. 2014).

Der zelluläre Phänotyp ähnelt dem der *TCIRG1*-bedingten Osteopetrose. Es wurden morphologisch unauffällige, aber auch vergrößerte Osteoklasten beschrieben, die sich an die Knochenoberfläche anheften können und einen Aktinring, jedoch keine Bürstensaummembran ausbilden. Osteoklasten von Patienten mit *CLCN7*-bedingter Osteopetrose zeigen *in vitro* eine verringerte Säuresekretion und eine beeinträchtigte bis fehlende Knochenresorptionsaktivität (Kornak et al. 2001, 2006; Neutzsky-Wulff et al. 2008).

### 1.2.3 Behandlung der Osteopetrose

Bisher ist die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit der Osteopetrose die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT). Da Osteoklasten hämatopoetischen Ursprungs sind, können sich nach erfolgreichem Anwachsen (Engraftment) des allogenen Transplantats funktionelle Osteoklasten aus den hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen des Spenders entwickeln, sodass die Knochenresorptionsfähigkeit und der Knochenumbau wiederhergestellt sind (Penna et al. 2019). Diese Behandlungsmöglichkeit eignet sich jedoch nicht für Osteopetrose, die durch *RANKL*-Mutationen hervorgerufen wird, da ohne den von Osteoblasten produzierten Wachstumsfaktor keine Osteoklasten entstehen können und Osteoblasten sich nicht aus hämatopoetischen, sondern mesenchymalen Stammzellen entwickeln (Lo Iacono et al. 2012). Auch für die *CLCN7*- und *OSTM1*-bedingte neurodegenerative ARO ist diese Therapie kontraindiziert, da die HSCT keinen Einfluss auf osteoklastenunabhängige Schäden des zentralen Nervensystems hat (Steward 2003; Schulz et al. 2016). Für diese Osteopetroseformen gibt es folglich derzeit keine Heilungsmöglichkeit. Ob eine HSCT durchgeführt wird, hängt außerdem vom Schweregrad der Erkrankung ab, da die HSCT mit einem hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko assoziiert ist. Deshalb werden milde Osteopetroseverläufe meist nur symptomatisch behandelt, wie z.B. Frakturbehandlung und Transfusionen bei Anämie. Die häufigsten Komplikationen bei der HSCT sind Transplantatversagen (Engraftment-Komplikationen) und die Graft-versus-Host-Reaktion. In einer Studie von 2015 mit 193 ARO-Patienten lag die Langzeitüberlebensrate nach einer HSCT mit einem humanen Leukozytenantigen (HLA)-identischen Geschwisterspender bei 62%, während Transplantationen mit einem nicht identischen HLA-Spender oder einem HLA-identischen nicht verwandten Spender mit einer Überlebensrate von rund 40% assoziiert war (Orchard et al. 2015). Durch die Verbesserung der Behandlung konnte die Mortalitätsrate in den letzten Jahren jedoch auf unter 20% gesenkt werden. Für den Erfolg der Behandlung mittels

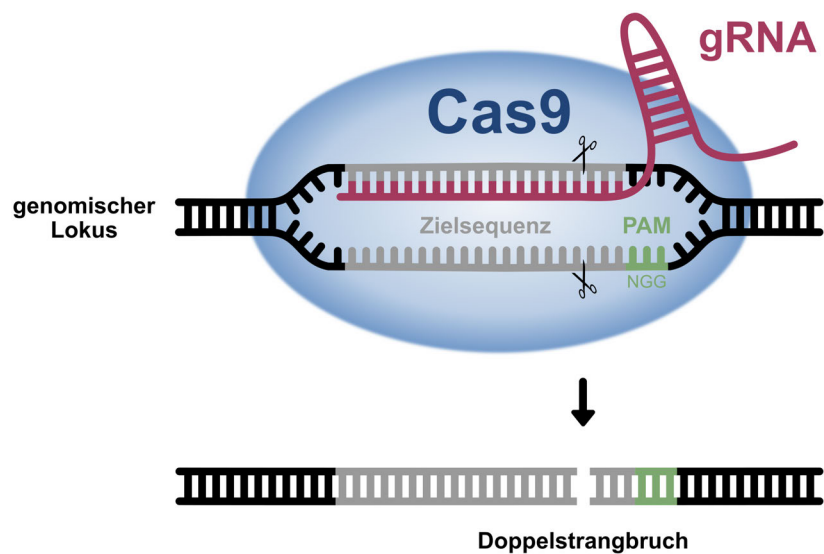
HSCT ist es neben der HLA-Übereinstimmung von Spender und Empfänger außerdem wichtig, die Transplantation so früh wie möglich durchzuführen (bestenfalls in den ersten 12 Lebensmonaten). Zum einen sind Nervenschädigungen, die z. B. mit Blind- und Taubheit einhergehen, irreversibel, zum anderen verschlechtert sich die Chance auf ein erfolgreiches Engraftment mit zunehmendem Alter der Patienten, da die Stammzellnische zunehmend beschädigt wird (Sobacchi et al. 2013). Aufgrund des Mangels an passenden Stammzellspendern sowie den Risiken, die mit einem allogenen Transplantat einhergehen, ist es wichtig auch alternative Behandlungsstrategien zu erforschen und zu entwickeln.

### 1.3 CRISPR/Cas9-System

Das CRISPR/Cas9-System („Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/CRISPR-associated system 9 (Cas9)“) hat seit der erstmaligen Veröffentlichung über dessen Anwendung für Genomeditierung im Jahr 2012 viele Forschungsbereiche revolutioniert (Jinek et al. 2012; Cong et al. 2013; Mali et al. 2013b; Doudna und Charpentier 2014). Im Gegensatz zu klassischen Genmanipulationsmethoden, die ineffizient und zeitaufwendig sind, lassen sich mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems zielgerichtete genetische Modifikationen schnell, effizient und einfach umsetzen (Gaj et al. 2013). Diese Technologie basiert auf der Nuklease Cas9, die am gewünschten Genlokus einen DNA-Doppelstrangbruch (DSB) einfügt. Über eine programmierbare, lokusspezifische RNA, die sogenannte „guide“ RNA (gRNA), wird Cas9 zum Ziellokus geführt und schneidet diesen spezifisch (siehe schematische Darstellung in Abb. 1.9). Endogene DNA-Reparatursysteme der Zelle, die durch den Doppelstrangbruch aktiviert werden, können schließlich genutzt werden, um die gewünschte Genommodifikation einzubringen (Doudna und Charpentier 2014).

CRISPR/Cas9-Systeme stammen von Bakterien ab, in denen sie als Teil der adaptiven Immunabwehr zum Schutz vor fremden Nukleinsäuren dienen. Auch in Archaea und anderen Bakterien wurden weitere CRISPR/Cas-Systeme gefunden (Hsu et al. 2014). Durch das Einbringen der Cas9-Nuklease und einer gewünschten lokusspezifischen gRNA in eukaryotische Zellen lässt sich dieser bakterielle Abwehrmechanismus jedoch für die Editierung nahezu aller genomischen Zielloci nutzen. Die Spezifität des Systems wird durch die gRNA gewährleistet. Sie ist um die 100 Nukleotide lang und besteht aus einem lokusspezifischen (gRNA-Zielsequenz) und einem strukturellen Teil. Der strukturelle Teil weist eine Sekundärstruktur

auf, die die Nuklease Cas9 erkennt und bindet. Über die Basenpaarung der 20 Nukleotide des lokusspezifischen Teils der gRNA mit dem komplementären genomischen Ziellokus wird Cas9 zur gewünschten Stelle geführt. In den ursprünglichen CRISPR/Cas-Systemen der Bakterien und Archea setzt sich die gRNA aus zwei separaten, aneinander bindenden RNAs zusammen, der lokusspezifischen CRISPR-RNA (crRNA) und der trans-aktivierenden crRNA (tracrRNA).



**Abbildung 1.9: Schematische Darstellung des Cas9-gRNA-Komplexes am Ziellokus.** Cas9 (blau) bindet die lokusspezifische gRNA (rot), wodurch sie zum Ziellokus (grau) geführt wird. Die gRNA besteht aus einem strukturellen und einem lokusspezifischen Teil (gRNA-Zielsequenz). Die Sekundärstruktur des strukturellen Teils wird von Cas9 gebunden, die 20 Nukleotide des lokusspezifischen Teils binden mittels Basenpaarung an den Ziellokus. Cas9 fügt 3 bp stromaufwärts der NGG-PAM-Sequenz (grün) einen glatten Doppelstrangbruch ein.

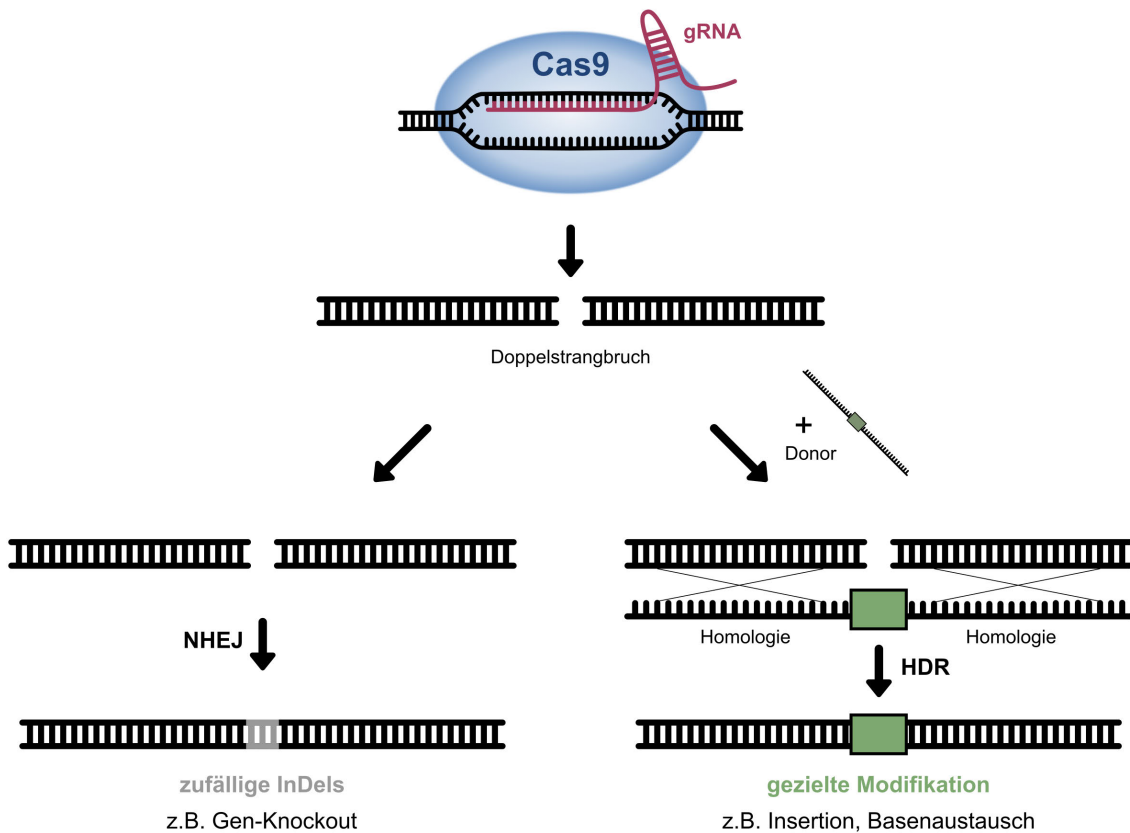
Jinek et al. konnten allerdings zeigen, dass Genomeditierung auch mit einer einzelnen chimären gRNA möglich ist, die die Eigenschaften von crRNA und tracrRNA vereint. In der Laborpraxis werden heute beide gRNA-Typen genutzt, sowohl die einzelne chimäre gRNA als auch die Kombination aus crRNA und tracrRNA. Für die Erkennung des Ziellokus durch Cas9 ist neben der Basenpaarung von gRNA und DNA auch das sogenannte Protospacer-benachbarte Motiv („protospacer adjacent motif“, PAM) essenziell. Diese kurze DNA-Sequenz, die direkt stromabwärts

der gRNA-Bindungsstelle liegt, ist spezifisch für unterschiedliche Cas-Systeme verschiedener Bakterien und Archea. Die am häufigsten angewendete Nuklease Cas9 von *Streptococcus pyogenes* erkennt ein NGG-Motiv (Jinek et al. 2012). Nach erfolgreicher Erkennung und Bindung des Cas9-gRNA-Komplexes an den genomischen Ziellokus fügt Cas9 einen glatten DNA-Doppelstrangbruch drei Basenpaare stromaufwärts der PAM-Sequenz ein (siehe Abb. 1.9).

Allerdings toleriert die Cas9-Nuklease bis zu fünf Basenfehlpaarungen zwischen gRNA und Ziel-DNA, was zu DNA-Doppelstrangbrüchen und Mutagenese abseits des gewünschten Ziellokus führen kann. Diese sogenannten Off-Target-Effekte können durch das Abgleichen der gRNA-Zielsequenz mit dem Genom und damit durch die Auswahl einer gRNA mit möglichst wenigen Off-Targets minimiert werden. Mithilfe von Online-Tools können gRNA-Zielsequenzen ausgewählt sowie potenzielle Off-Targets vorhergesagt werden (Hsu et al. 2013; Doench et al. 2016).

Cas9-vermittelte Doppelstrangbrüche induzieren endogene DNA-Reparaturmechanismen der Zelle, die genutzt werden können, um die gewünschten genetischen Modifikationen zu erzielen. In Eukaryoten ist der vorherrschende Reparaturmechanismus für DNA-Doppelstrangbrüche die nicht-homologe Endverknüpfung („non-homologous end-joining“, NHEJ). Dabei werden freie DNA-Enden mithilfe eines Ligasekomplexes verknüpft, wobei jedoch oft zufällig Nukleotide eingefügt oder entfernt werden. Folglich können diese kleinen Insertionen und Deletionen (InDels) durch eine Leserasterverschiebung und/oder ein verfrühtes Stopcodon zu einem gewünschten Verlust der Genexpression führen (Ran et al. 2013). Ist jedoch ein DNA-Donor vorhanden, der homologe Sequenzen stromauf- und stromabwärts des Doppelstrangbruchs enthält und somit als Reparaturvorlage dienen kann, können mithilfe von homologiegerichteter Reparatur („homology-directed repair“, HDR) gezielte Modifikationen, wie die Insertion eines Transgens oder ein Nukleotid austausch, vorgenommen werden (siehe Abb. 1.10). Da NHEJ jedoch der vorherrschende Reparaturmechanismus in der Zelle ist, ist das Einbringen spezifischer Modifikation mittels HDR weniger effizient (Sander und Joung 2014).

Das Einbringen der CRISPR/Cas9-Komponenten in eukaryotische Zellen kann mittels verschiedener Methoden umgesetzt werden. Die einfachste Möglichkeit ist die ektopische, transiente Expression nach Transfektion von Plasmid-DNA, die Genexpressionskassetten für Cas9 und die gewünschte lokusspezifische gRNA enthält (Ran et al. 2013). Die ektopische Expression kann auch mittels Transduktion (z. B. lentiviral, Sanjana et al. 2014) oder dem Einschleusen von Cas9-mRNA sowie *in vitro* transkribierter oder synthetischer gRNA erreicht werden (Hendel et al. 2015).



**Abbildung 1.10: Generierung genomischer Modifikationen mittels Cas9-induzierter DNA-Reparatur.** Der durch Cas9 eingefügte DNA-Doppelstrangbruch aktiviert die endogenen DNA-Reparaturmechanismen NHEJ und HDR. Durch NHEJ entstandene InDels können zu einem Gen-Knockout führen. Gezielte Modifikationen (z. B. Insertion und Nukleotid-austausch) können mithilfe eines DNA-Donors und HDR erreicht werden.

Darüber hinaus ist auch das Einschleusen eines rekombinanten Cas9-Proteins komplexiert mit *in vitro* transkribierter oder synthetischer gRNA (Cas9-Ribonukleoprotein, RNP) mittels Transfektion in die Zellen möglich (Martin et al. 2019). Auch Donorkonstrukte für HDR-basierte Genomeditierung können über verschiedene Wege in die Zelle eingebracht werden. Neben der Transfektion eines Plasmids, das das Donorkonstrukt enthält, kann der Donor auch mittels Transduktion in die Zellen eingeschleust werden. Effiziente Transgenaddition konnte beispielsweise mittels Transfektion des Cas9-RNPs und anschließender Transduktion mit einem rekombinanten adenoassoziierten Virus des Serotyps 6 (AAV6) in hämatopoetischen Stammzellen erreicht werden (Dever et al. 2016). Anstatt großer Donorkonstrukte mit langen homologen Sequenzen können auch einzelsträngige Oligonukleotide (ssODNs) mit deutlich kürzeren homologen Armen verwendet werden (Yoshimi et al. 2016).



## 1.4 Rekombinante Vektoren des adenoassoziierten Virus

Adenoassoziierte Viren (AAVs) haben einen Durchmesser von 20 nm und werden den Parvoviren zugeordnet. Obwohl ein Großteil der Bevölkerung seropositiv für Antikörper gegen AAVs ist, konnte bisher noch keine humane Pathogenität der AAVs identifiziert werden. Die Replikation der AAVs in der infizierten Wirtszelle ist nur bei gleichzeitiger Koinfektion mit einem anderen Helfervirus (Adeno- oder Herpesvirus) möglich. Das einzelsträngige DNA-Genom der AAVs umfasst ca. 4,7 kb und wird durch die äußere ikosaedrische Proteinhülle (Kapsid) des Virus geschützt (Weitzman und Linden 2011; Brown und Hirsch 2015). Das AAV-Genom enthält die zwei offenen Leserahmen *Rep* (Replikation) und *Cap* (Kapsid), die für mindestens neun verschiedene Genprodukte codieren (Naso et al. 2017). Die codierende Sequenz wird von invertierten terminalen Sequenzwiederholungen („inverted terminal repeats“, ITRs) mit einer Länge von je 145 bp flankiert, die für die Virusreplikation und -verpackung benötigt werden und durch Basenpaarung T-förmige Haarnadelstrukturen ausbilden (Weitzman und Linden 2011; Brown et al. 2017).

In rekombinanten AAV-Vektoren (rAAVs) wird der codierende Bereich des AAV-Genoms mit den enthaltenen *Rep*- und *Cap*-Genen durch die gewünschte Genexpressionskassette oder das gewünschte Donorkonstrukt ersetzt, während die ITRs erhalten bleiben. Die rAAVs können erzeugt werden, indem z. B. das rekombinante Vektorgenom, die Helfergene des Adeno- bzw. Herpesvirus sowie die *Rep*- und *Cap*-Gene transient mittels Plasmid-Transfektion in einer Zelllinie exprimiert werden (Wang et al. 2011). Bisher wurden mindestens 12 verschiedene Serotypen von humanen und nicht-humanen Primaten-AAVs identifiziert (Lisowski et al. 2015). Unterschiedliche AAV-Serotypen nutzen verschiedene Oberflächenmoleküle der Zelle zur Internalisierung über Clathrin-vermittelte Endozytose, wodurch sich verschiedene Gewebetropismen ergeben. AAV6 bindet beispielsweise den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor, Heparansulfat und Sialinsäure (Agbandje-McKenna und Kleinschmidt 2011; Weller et al. 2010) und eignet sich besonders gut für die Transduktion von humanen Muskelzellen sowie hämatopoetischen und pluripotenten Stammzellen (Arnett et al. 2013; Bak et al. 2017; Martin et al. 2019). Nach der Internalisierung des rekombinanten AAVs gelangt dieser in den Nukleus, wo das Virusgenom freigesetzt wird. Diese zunächst noch einzelsträngige DNA liegt in der späten Phase der Transduktion dann hauptsächlich als doppelsträngige episomale DNA in monomerer oder concatemerer Form vor, in selteneren Fällen ist aber auch eine zufällige Integration der rekombinanten AAV6-DNA in das Wirtsgenom möglich (Grimm et al. 2006; Lisowski et al. 2015).

In Abwesenheit der Helferviren können Wildtyp-AAVs unter Beteiligung des *Rep*-Gens ihr Genom spezifisch in eine Region des humanen Chromosoms 19 der infizierten Wirtszelle integrieren (Samulski et al. 1991; Weitzman und Linden 2011). Diese Region wird deshalb auch AAV-Integrationsstelle 1 (*AAVS1*) genannt und liegt im ersten Intron des *PPP1R12C*-Gens, das für die regulatorische Untereinheit 12C der Proteinphosphatase 1 codiert. Da die Integration des AAV-Genoms oder anderer Transgene in diese genomische Region keine Auswirkungen auf die endogene Genexpression der Wirtszelle zu haben scheint, wird der *AAVS1*-Lokus als „sicherer Hafen“ für Transgenadditionen bezeichnet (Papapetrou und Schambach 2016).

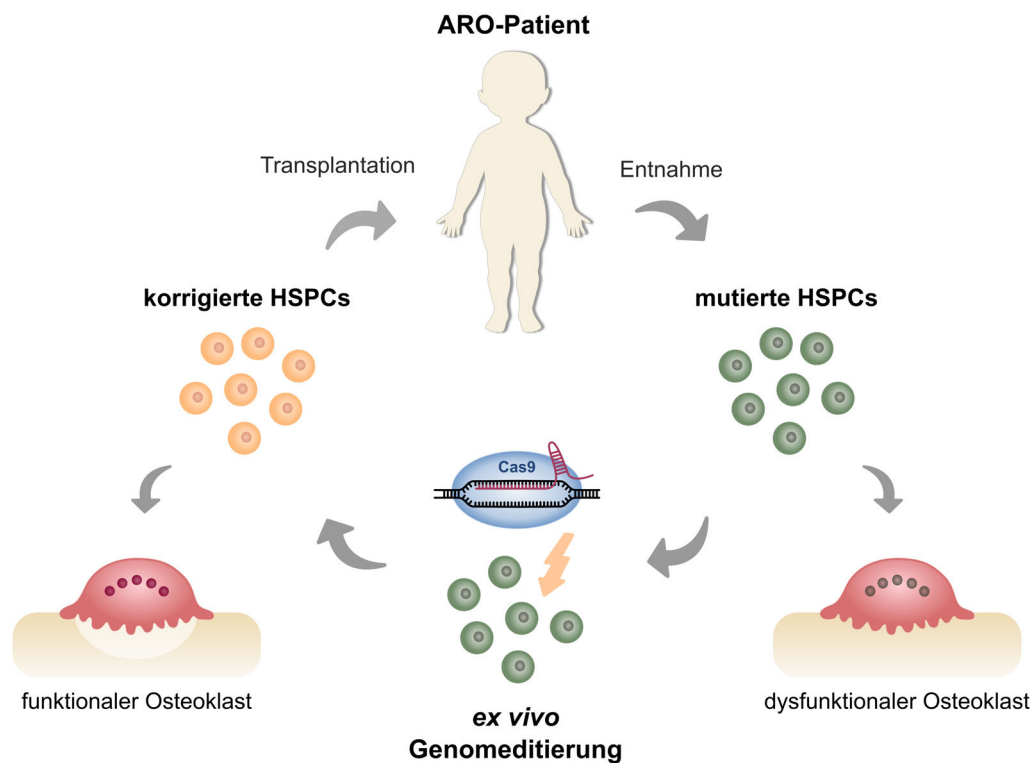
### 1.5 Gentherapie in hämatopoetischen Stammzellen

Somatische Gentherapie ist die gezielte Veränderung des Genoms in erkrankten Körperzellen zur Vorbeugung, Besserung oder Heilung einer Krankheit. Im Gegensatz zu somatischer Gentherapie werden bei der Keimbahntherapie genetische Veränderungen in Keimzellen eingebracht, die an die Nachkommen weitergegeben werden, weshalb die Keimbahntherapie in den meisten Ländern aus ethischen Gründen nicht erlaubt ist. Insbesondere für monogene Erbkrankheiten bietet die somatische Gentherapie die Möglichkeit einer kausalen Therapie, also die Behandlung der Krankheitsursache, z. B. mittels Genkorrektur oder Einfügen einer zusätzlichen intakten Genkopie (Genaddition).

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSPCs) eignen sich besonders gut für den gentherapeutischen Ansatz, da sie dem Körper entnommen, *ex vivo* genetisch manipuliert und dem Patienten dann mittels autologer Stammzelltransplantation wieder zurückgeführt werden können. Nach erfolgreichem Engraftment der korrigierten HSPCs bilden diese idealerweise eine dauerhafte Quelle für intakte Zellen des gesamten hämatopoetischen Systems. Nach anfänglichen Misserfolgen bei der Behandlung von Immundefizienzen mit genetisch manipulierten HSPCs in den 1990er und 2000er Jahren wurden Gentherapien zunächst äußerst kritisch betrachtet (Fischer et al. 2010). Obwohl eine erfolgreiche Gentherapie in Patienten mit schwerer kombinierter Immundefizienz gezeigt werden konnte, entwickelten einige der Behandelten Leukämie, aufgrund der insertionalen Mutagenese des zum Gentransfer verwendeten  $\gamma$ -retroviralen Vektors (Nienhuis et al. 2006). Die Entwicklung von sichereren viralen Gentransfervektoren und die Entdeckung der programmierbaren, lokusspezifischen Nukleasen, wie die Zinkfinger-nukleasen und das CRISPR/Cas9-System, geben nun jedoch Hoffnung auf sichere und effiziente Gen-

therapien und rücken diese Behandlungsstrategie für eine Vielzahl an hämatologischen, aber auch anderen Erkrankungen zurück in den wissenschaftlichen Fokus (Naldini 2015).

Aufgrund des hämatopoetischen Ursprungs der Osteoklasten ist die HSPC-Gentherapie auch eine Möglichkeit für zukünftige kurative Therapien der autosomal-rezessiven Osteopetrose. Wie in Abb.1.11 schematisch dargestellt ist, könnten HSPCs dem Patienten entnommen und *ex vivo* mittels Genomeditierung genetisch korrigiert werden. Anschließend könnte der Patient mit seinen eigenen korrigierten HSPCs, die sich zu funktionalen Osteoklasten entwickeln können, mithilfe der autologen Stammzelltransplantation geheilt werden. Derartige Behandlungsstrategien müssen jedoch erst noch entwickelt und auf ihre Sicherheit überprüft werden.



**Abbildung 1.11: HSPC-Gentherapiestrategie für Osteopetrose.** Entnommene HSPCs des Patienten werden mittels CRISPR/Cas9-Genomeditierung *ex vivo* genetisch korrigiert und durch autologe Stammzelltransplantation zurückgeführt.

## 1.6 Induzierte pluripotente Stammzellen

Pluripotente embryonale Stammzellen der inneren Zellmasse von Säugetierblastozysten können sich unbegrenzt selbst erneuern und in Zelltypen aller Keimblätter (Entoderm, Mesoderm und Ektoderm) differenzieren (Robinton und Daley 2012; Dolatshad et al. 2019). Daher bieten diese Zellen viele Möglichkeiten zur Erforschung von Krankheiten sowie in den Bereichen regenerative Medizin und Medikamentenentwicklung, die aufgrund der Arbeit mit humanen Embryonen allerdings ethische Probleme mit sich bringen. 2006 gelang Takahashi und Yamanaka jedoch der Durchbruch in der Stammzellforschung, indem sie zeigen konnten, dass sich terminal differenzierte somatische Zellen (Fibroblasten der Maus) durch die ektopische Expression der vier Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc in sogenannte induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) reprogrammieren lassen. Diese Stammzellen sind den pluripotenten embryonalen Stammzellen sehr ähnlich und haben das gleiche Differenzierungspotenzial (Takahashi und Yamanaka 2006). Ein Jahr später wurde dann auch die Reprogrammierung humaner somatischer Zellen veröffentlicht (Takahashi et al. 2007; Yu et al. 2007).

Seitdem wurde die Methode zur Reprogrammierung von somatischen Zellen in iPS stetig weiterentwickelt. Während ursprünglich integrierende Retroviren für die ektopische Expression der vier Reprogrammierungsfaktoren verwendet wurden, finden heute bevorzugt integrationsfreie Methoden basierend auf Sendai-viraler Transduktion oder mRNA-Transfektion Anwendung (Shi et al. 2017). Neben Fibroblasten ist zudem auch die Reprogrammierung von anderen somatischen Zelltypen möglich, wie mononukleäre Zellen des peripheren Blutes oder im Urin vorhandene abgelöste Nierenepithelzellen, wodurch die Materialentnahme nicht-invasiv erfolgen kann (Wattanapanitch 2019). In den letzten Jahren wurden zahlreiche iPS reprogrammiert und charakterisiert, insbesondere aus humanen somatischen Zellen gesunder und erkrankter Individuen. Für die Charakterisierung der generierten iPS-Linien wird die Pluripotenz der Zellen in der Regel über den Nachweis von Pluripotenzmarkern, z. B. OCT4, NANOG, TRA1-60 und SSEA4, auf Protein- sowie RNA-Ebene validiert. Darüber hinaus wird das Differenzierungspotenzial über In-vivo-Teratombildung bzw. spontane oder direkte *in vitro* Differenzierung in die drei Keimblätter nachgewiesen. Auch die Untersuchung der genetischen Zellidentität und Integrität, beispielsweise mittels Mikrosatelliten- und Karyotypenanalyse, ist Bestandteil der Charakterisierung der generierten iPS (Martí et al. 2013).

Neben der Generierung von neuen iPS-Linien wurden auch eine Reihe von Differenzierungsprotokollen entwickelt, darunter u. a. Kardiomyozyten, Neuronen und hämatopoetische Zellen (Wu und Hochedlinger 2011; Bellin et al. 2012). Auch wurden bereits erste Protokolle zur Differenzierung von Makrophagen und Osteoklasten aus iPS veröffentlicht (Lachmann et al. 2015; Buchrieser et al. 2017; Jeon et al. 2016; Chen et al. 2017a). Darüber hinaus ist nicht nur die Differenzierung von Monolayern eines bestimmten Zelltyps möglich, sondern auch die Entwicklung selbstorganisierter, organähnlicher dreidimensionaler Strukturen mit mehreren organspezifischen Zelltypen, sogenannten Organoiden (Ho et al. 2018; Lancaster und Huch 2019). So wurden beispielsweise Organoide des Gehirns (Lancaster et al. 2013; Garcez et al. 2016), der Lunge (Dye et al. 2015; Chen et al. 2017c), der Niere (Takasato et al. 2015; Yucer et al. 2017) und des Intestinums (Spence et al. 2011) aus humanen iPS differenziert. Ausgangspunkt vieler Differenzierungen ist die Bildung eines sogenannten embryoiden Körpers („embryoid body“, EB). Dafür werden Einzelzellen gezwungen, dreidimensionale kugelförmige Zellaggregate zu bilden, indem das Anheften der iPS an den Boden der Zellkulturschale, z. B. mittels spezieller Beschichtung, verhindert wird (Brickman und Serup 2017; Lancaster und Huch 2019). In den gebildeten EBs wird spontan die Differenzierung und Morphogenese induziert, die der Bildung der drei Keimblätter im Embryo ähnelt. Durch Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren kann die Differenzierung auch vorwiegend in nur eines der Keimblätter gelenkt werden (Lancaster und Huch 2019).

Ein Problem bei der Arbeit mit iPS ist jedoch die Variabilität zwischen Zelllinien mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen, insbesondere in Bezug auf die Fähigkeit dieser, in spezifische Zelltypen zu differenzieren (Ortmann und Vallier 2017). Dies erschwert vor allem die Untersuchung kleiner phänotypischer Unterschiede zwischen einer krankheitsspezifischen und einer gesunden Kontrollzelllinie. Mithilfe der Genomeditierung lassen sich jedoch auch iPS genetisch manipulieren, sodass isogene Kontrollzelllinien mit dem gleichen genetischen Hintergrund generiert werden können. Krankheitsassoziierte Mutationen können in Zelllinien gesunder Spender eingebracht werden oder die gesunde Kontrollzelllinie kann mittels Mutationskorrektur aus patientenspezifischen iPS gewonnen werden (Ben Jehuda et al. 2018).

Die iPS-Technologie bietet daher eine unbegrenzte Quelle an manipulierbaren gesunden und krankheitsspezifischen humanen Zellen verschiedenster Zelltypen, Gewebe und dreidimensionaler organähnlicher Strukturen, die besonders für die Forschungsbereiche der Krankheitsmodellierung und Therapieentwicklung von herausragender Bedeutung sind.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

*CLCN7*-bedingte autosomal-rezessive Osteopetrose ist eine seltene sklerosierende Knochenerkrankung, die unbehandelt bereits in früher Kindheit zum Tod führt. Osteopetrose kann durch das Fehlen osteoklastenvermittelter Knochenresorption aufgrund von Mutationen im *CLCN7*-Gen des Chloridtransporters *ClC-7* verursacht werden. Da sich Osteoklasten aus hämatopoetischen Stammzellen entwickeln, lässt sich ARO mit allogener Stammzelltransplantation heilen. Diese Therapie ist jedoch mit einem hohen Mortalitäts- sowie Morbiditätsrisiko assoziiert und oftmals ist kein passender Stammzellspender vorhanden. Somatische Gentherapie eröffnet neue Behandlungsmöglichkeiten. *Ex vivo* CRISPR/Cas9-basierte Genomeditierung von Patienten-HSPCs, gefolgt von autologer Stammzelltransplantation, könnte eine neue kurative Therapie für ARO sein.

Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung stehen die therapeutischen Zielzellen (HSPCs) der Patienten jedoch praktisch nicht für Forschungszwecke zur Verfügung. Aus diesem Grund ist die Entwicklung eines ARO-Krankheitsmodells für die Erarbeitung neuer Therapieansätze unerlässlich. Ziel dieser Arbeit ist demnach zunächst die Generierung und Charakterisierung patientenspezifischer iPS. Dazu sollen PBMCs eines ARO-Patienten mithilfe nicht-integrierender Sendai-viraler Vektoren in iPS reprogrammiert werden. Für die Validierung der iPS-Patientenzelllinie gilt es die Zellidentität, die genomische Stabilität, die Pluripotenz, das Differenzierungspotenzial sowie den Verlust der Reprogrammierungsvektoren nachzuweisen. Anschließend soll durch die Etablierung eines Protokolls zur Differenzierung von iPS zu Osteoklasten ein Krankheitsmodell für ARO geschaffen werden. Es gilt zu überprüfen, ob die aus den patientenspezifischen iPS differenzierten Osteoklasten den zellulären Phänotyp der Osteopetrose widerspiegeln. Dazu sollen die Osteoklastenentwicklung, die Zellmorphologie und die Knochenresorptionsfunktion der Osteoklasten analysiert werden. Nach erfolgreicher Entwicklung des ARO-Krankheitsmodells kann dieses genutzt werden, um CRISPR/Cas9-basierte gentherapeutische Strategien für ARO zu entwickeln und zu testen. Neben der patientenspezifischen Mutationskorrektur soll auch der Ansatz des additiven *CLCN7*-Gentransfers in einen genomischen „sicheren Hafen“, den *AAVS1*-Lokus, verfolgt werden. Eine mögliche Wiederherstellung der Resorptionsfunktion der Osteoklasten kann dann in erfolgreich korrigierten Zellen untersucht werden. Abschließend sollen erste Genomeditierungen in den therapeutisch relevanten HSPCs zur Überprüfung der Machbarkeit durchgeführt werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.1: Geräte.**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
3730xl DNA Analyzer	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)	Sanger-Sequenzierung
4D-Nucleofector™ System mit Core, X und Y Einheit	Lonza	Transfektion
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)	qPCR
AxioCam HRc BX-60 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Microscopy Olympus	Mikroskopiedokumentation Licht- und Fluoreszenzmikroskopie
Countess™ II FL	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Zellzählung
DMi8 Fluoreszenzmikroskop	Leica Microsystems	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie
DFC450 C G:BOX HR	Leica Microsystems SynGene	Mikroskopiedokumentation Geldokumentation
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)	PCR
iScan System	Illumina	Microarray

## 2 Materialien und Methoden

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
MACSQuant <sup>®</sup> VYB	Miltenyi Biotec	Durchflusszytometrie
NanoDrop <sup>™</sup> 1000 UV-Vis Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific	DNA- and RNA-Quantifizierung
Neon <sup>®</sup> Transfektionssystem	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Transfektion
Opera <sup>®</sup> Phenix <sup>™</sup> High Content Screening System	PerkinElmer	„High Content“ Fluoreszenzmikroskopie
PerfectBlue Maxi Gel System M	PEQLAB	Agarose-Gelelektrophorese
ProFlex <sup>™</sup> 3 x 32-well PCR System	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)	PCR
QuantStudio <sup>®</sup> 3 Real-Time PCR System	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)	qPCR

**Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien.**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
CellCarrier <sup>™</sup> 96-well Imaging-Platte, schwarz, TC-behandelt	PerkinElmer	„High Content“ Fluoreszenzmikroskopie
Knochenscheiben (∅ 6 mm, Höhe 0,4 mm)	Boneslices.com	Resorptionsassay
Leucosep <sup>™</sup> Röhrchen, 50 mL	Greiner Bio-One	Zellseparation
LS Säulen	Miltenyi Biotec	MACS
Ultra-low attachment 96-well-Platte, Rundboden	Corning Life Sciences	EB-Generierung
Vacutainer <sup>®</sup> CPT <sup>™</sup> , Zellpräparationsröhrchen	BD Biosciences	Zellseparation



### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden von Carl Roth, Sigma-Aldrich oder Merck bezogen, sofern nicht anders angegeben.

**Tabelle 2.3: Chemikalien und Reagenzien.**

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Alt-R <sup>®</sup> Cas9 Electroporation Enhancer	Integrated DNA Technologies
Biocoll, Dichte 1,007 g/ml	Biochrom (Merck)
BSA Stammlösung (10%)	Miltenyi Biotec
DNA-Ladepuffer (6x)	Thermo Fisher Scientific
dNTPs (je 10 mM)	Thermo Fisher Scientific
Genruler <sup>™</sup> DNA-Leiter Mix	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
Gibco <sup>®</sup> Geltrex <sup>™</sup> LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
ROCK Inhibitor (Y-27632)	Wako Chemicals
UltraPure <sup>™</sup> 0,5 M EDTA, pH 8,0	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)

### 2.1.3 Enzyme

**Tabelle 2.4: Enzyme und Enzymmischungen.**

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
Alt-R <sup>®</sup> S.p. Cas9 Nuklease 3 NLS	Integrated DNA Technologies
Exonuklease I (20 U/μl)	New England Biolabs
FastAP <sup>™</sup> thermosensitive alkalische Phosphatase (1 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
FastDigest KpnI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest XhoI	Thermo Fisher Scientific

## 2 Materialien und Methoden

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
FIREPol® Master Mix mit 12,5 mM MgCl <sub>2</sub>	Solis BioDyne
Gibco® StemPro® Accutase® Zeldissoziationsreagenz	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
Gibco® TrypLE™ Select Enzym	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus	Solis BioDyne
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μl)	New England Biolabs
QuickExtract™ DNA-Extraktionslösung	Lucigen
USB® Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, 1 U/μl)	Affymetrix

### 2.1.4 Antikörper und Farbstoffe

**Tabelle 2.5: Fluorochrom-gekoppelte Antikörper und Farbstoffe.**

<b>Antikörper (Klon)</b>	<b>Spender-organismus</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Monoklonale Antikörper für Durchflusszytometrie</b>			
Anti-Nanog-PE (D73G4)	Kaninchen	1:100	Cell Signaling
Anti-HA-FITC (GG8-1F3.3.1)	Maus	1:11	Miltenyi Biotec
Anti-Oct3/4-APC (REA338)	Rekombinant	1:20	Miltenyi Biotec
Anti-PAX-6-APC (REA507)	Rekombinant	1:11	Miltenyi Biotec
Anti-Sox17-Vio515 (REA701)	Rekombinant	1:50	Miltenyi Biotec
Anti-Sox2-PE (REA320)	Rekombinant	1:11	Miltenyi Biotec

<b>Antikörper (Klon)</b>	<b>Spender-organismus</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-SSEA1-PE-Vio770 (REA321)	Rekombinant	1:20	Miltenyi Biotec
Anti-SSEA4-VioBlue (REA101)	Rekombinant	1:20	Miltenyi Biotec
Anti-Tra-1-60-Vio488 (REA157)	Rekombinant	1:700	Miltenyi Biotec
CD140b-APC (REA363)	Rekombinant	1:11	Miltenyi Biotec
CD144 (VE-Cadherin)-FITC (REA199)	Rekombinant	1:11	Miltenyi Biotec
CD184 (CXCR4)-APC (REA649)	Rekombinant	1:11	Miltenyi Biotec
<b>Monoklonale Antikörper für Immunzytochemie</b>			
Anti-Nanog-PE (D73G4)	Kaninchen	1:50	Cell Signaling
Anti-Oct3/4-APC (REA338)	Rekombinant	1:10	Miltenyi Biotec
Anti-SSEA4-PerCP-Vio770 (REA101)	Rekombinant	1:10	Miltenyi Biotec
Anti-Tra-1-60-Vio488 (REA157)	Rekombinant	1:100	Miltenyi Biotec
<b>Fluoreszenzfarbstoffe</b>			
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Phalloidin	–	1:400	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)
Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 Phalloidin	–	1:400	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)
DAPI (1 mg/ml)	–	1:1000	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
Hoechst 33342 (10 mg/ml)	–	1:1000	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)

### 2.1.5 Kits

**Tabelle 2.6: Kits.**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
Agencourt CleanSEQ Kit	Beckman Coulter	Aufreinigung von Sequenzierreaktionen
BigDye <sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)	Sanger-Sequenzierung
CD34 MicroBead Kit, human	Miltenyi Biotec	MACS
Cytofix/Cytoperm <sup>™</sup> Fixation/Permeabilization Kit	BD Biosciences	Zellfixierung und -permeabilisierung
CytoTune <sup>™</sup> -iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	iPS-Reprogrammierung
Direct-zol <sup>™</sup> RNA Mini Prep Kit	Zymo Research	RNA-Isolation
GenePrint <sup>®</sup> 10 System	Promega	Mikrosatellitenanalyse
HumanHT-12 v4 Expression BeadChip Kit	Illumina	Microarray
In-Fusion <sup>®</sup> HD Cloning Kit	Takara Bio	Molekulare Klonierung
Inside Stain Kit	Miltenyi Biotec	Zellfixierung und -permeabilisierung
Invisorb <sup>®</sup> Spin Plasmid Mini Two	Stratec Molecular	Plasmidisolation
KaryoLite BoBs <sup>®</sup> Kit	PerkinElmer	Karyotypisierung
Monocyte Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec	MACS
Neon <sup>®</sup> Transfection System 10 µl Kit	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Transfektion
NucleoBond <sup>®</sup> Xtra Midi Plus EF	Macherey-Nagel	Plasmidisolation
P3 Primary Cell 4D-Nucleofector <sup>™</sup> X Kit S	Lonza	Transfektion
Quick-DNA Microprep Plus Kit	Zymo Research	DNA-Isolation
RevertAid <sup>™</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific	cDNA-Synthese
RNeasy <sup>®</sup> Plus Mini Kit	QIAGEN	RNA-Isolation

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
StemMACS™ Trilineage Differentiation Kit	Miltenyi Biotec	iPS-Differenzierung
TaqMan® Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)	cDNA-Synthese
TotalPrep™-96 RNA Amplification Kit	Illumina	Microarray

### 2.1.6 Oligonukleotide

Primer wurden mit Primer3web (Koressaar und Remm 2007; Untergasser et al. 2012) designt. Lyophilisierte Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics synthetisiert sowie „high purity salt free“ (HPSF)-aufgereinigt und in nukleasefreiem Wasser gelöst.

**Tabelle 2.7: PCR- und Sequenzierungsprimer.**

<b>Name</b>	<b>Sequence (5'→3')</b>	<b>Ziellokus</b>	<b><math>T_{\text{anneal}}</math></b>
<i>AAVS1_F</i> <i>AAVS1_R</i>	ctgccgtctctctcctgagt ccagataaggaatctgcctaacagg	<i>AAVS1</i>	64 °C
<i>AAVS1_R2</i>	ataaagcttacgcgtagagcagagccaggaa cccctg	<i>AAVS1</i>	64 °C
<i>ALBUMIN_F</i> <i>ALBUMIN_R</i>	tgttgcatgagaaaacgcca gtcgcctgttcaccaaggat	<i>ALBUMIN</i>	60 °C
<i>BGH_R</i>	tagaaggcacagtcgagg	BGH-PolyA	50 °C
<i>C7_E5_F</i> <i>C7_E17_R</i>	ctcattgggatcctcacggg gatgagcaggacgggatg	<i>CLCN7</i> (Exons 5-17)	65 °C
<i>C7_E10_F</i> <i>C7_E10_R</i>	cttcgagtacttccgagagac ctccaaacgccgctgaca	<i>CLCN7</i> (Exon 10)	60 °C
<i>C7_E14_F</i> <i>C7_E14_R</i>	cctgttcgcaggcgggtg gctttcaaaggcctgtgt	<i>CLCN7</i> (Exon 14)	60 °C
<i>F8_F</i> <i>F8_R</i>	ctaccatccaggctgaggtttatg caccaacagcatgaagactgaca	<i>F8</i>	60 °C

## 2 Materialien und Methoden

Name	Sequence (5'→3')	Ziellokus	$T_{\text{anneal}}$
GFP_F	tgagcttcagctaccgctac	turboGFP	64 °C
rClcn7_F	gctggtgtcttcatcccatccctgc	Clcn7 (Ratte)	64 °C
rClcn7_F2	cgttgttcatctgtccaattcgg	Clcn7 (Ratte)	50 °C
SFFV_R	accgcagatatcctgtttgg	SFFV-Promoter	64 °C
SFFV-rClcn7 F	gagtcgcccgggggggtaccatggccaacggt tctaagaaagtgt	Clcn7 (Ratte)	68 °C
SFFV-rClcn7 R	cgggcgcgccctcgagttatgcgtagtctggt acgtcgtatgggtacg		
TIDE-AAVS1_F	caagctctccctcccaggat	AAVS1	66 °C
TIDE-AAVS1_R	catcaccgtttttctggacaacc		
TIDE-C7e10_F	cgcttttcgtagaggtagagg	CLCN7 Exon 10	66 °C
TIDE-C7e10_R	accatgcccaccaccaactc		
TIDE-C7e14_F	gggatggatgggatttcctgtaag	CLCN7 Exon 14	66 °C
TIDE-C7e14_R	agagccaggcggtagggtt		

**Tabelle 2.8: Primer für RT-PCR.**

Name	Sequenz (5'→3')	mRNA
ATP6V0A3_F	agcttccaggcatcgtg	ATP6V0A3
ATP6V0A3_R	cgaacatcacagcaaacagg	
CLCN7_F	actgtccttctccctggtgc	CLCN7
CLCN7_R	tgaggaagcacttgatctgg	
CTSK_F	ccactgggagctatggaaga	CTSK
CTSK_R	gcctcaaggttatggatgga	
GAPDH_F	ccatgttcgtcatgggtggaac	GAPDH
GAPDH_R	cggccatcacgccacagttt	
Hu18SRNA_F	gtaaccggtgaacccatt	Human 18S RNA
Hu18SRNA_R	ccatccaatcggtagtagcg	
MMP9_F	gcagtaccacggccaacta	MMP9
MMP9_R	gccttgaagatgaatggaa	
OCT4_F	gacagggggaggaggagctagg	OCT4
OCT4_R	cttcctccaaccagttgccccaaac	

Name	Sequenz (5'→3')	mRNA
SeV_F	ggatcactaggtgatatcgagc	SeV-Vektor
SeV_R	accagacaagagtttaagagatatgtatc	
SeV-Klf4_F	ttcctgcatgccagaggagccc	<i>KLF4</i> -Transgene
SeV-Klf4_R	aatgtatcgaaggtgctcaa	
SeV-cMyc_F	taactgactagcaggcttgctcg	<i>MYC</i> -Transgene
SeV-cMyc_R	tccacatacagtcctggatgatgatg	
SeV-KOS_F	atgcaccgctacgagtgcgcg	<i>KLF4-OCT3/4-SOX2</i> - Transgene
SeV-KOS_R	accttgacaatcctgatgtgg	

### 2.1.7 CRISPR gRNAs und ssODN-Donoren

*CLCN7*-spezifische gRNAs wurden mithilfe des CRISPOR-Webtools ausgewählt (Haeussler et al. 2016, crispor.tefor.net). Chemisch modifizierte synthetische Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNAs wurden in Kombination mit Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA verwendet, beide stammen von Integrated DNA Technologies. Chemisch modifizierte CRISPREvolution sgRNAs wurden von Synthego synthetisiert. Die Phosphorothioat-modifizierten antisense ssODN-Donoren C7e10 und C7e14 für die *CLCN7*-Mutationskorrektur wurden ebenfalls von Integrated DNA Technologies bezogen.

**Tabelle 2.9: CRISPR gRNAs.**

Name, gRNA-Typ	Zielsequenz (PAM)	Ziellokus
ARO C7e10 gRNA, Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA	cactccggccgcagcctctg (cgg)	Mutiertes <i>CLCN7</i> Exon 10
ARO C7e14 gRNA, Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA	tcctcacctgatttgaacaa (tgg)	Mutiertes <i>CLCN7</i> Exon 14
AAVS1 gRNA, CRISPREvolution sgRNA	ggggccactaggacaggat (tgg)	<i>AAVS1</i>

**Tabelle 2.10: Sequenzen der ssODN-Donoren für die *CLCN7*-Mutationskorrektur.** Phosphorothioat-Modifikationen sind mit \* markiert.

Name	Sequenz (5'→3')
<b>antisense C7 E10</b>	c*t*gtccctggtgcagatcttcgagtacttccgcagagacacagagaag cgggacttcgtctccgctggggcggccgcaggagtgtcagcggcgtttgg agccccgtgggtgaggaggccgcaccgggtccaatgctttg*c*c
<b>antisense C7 E14</b>	t*t*tcaaagggcctgtgtggccacgcctgccaacgcgatatgcaatgcg gtttctctcacctgatccggaacatggtcagccagtagttcaaggcatt gaacactgctccaagcacaccgcctgccaacagg*g*g

### 2.1.8 Rekombinante Vektoren

Alle Plasmide enthalten eine Ampicillinresistenz-Genexpressionskassette zur Selektion. Rekombinante AAV6-Vektoren wurden von der Viralen Core Facility der Charité mithilfe der in Tabelle 2.11 gelisteten AAV-Plasmide hergestellt.

**Tabelle 2.11: Plasmide und virale Vektoren.**

Name	Eigenschaft	Ursprung
AAV6-SFFV-turbo-GFP (AAV6-GFP)	rAAV6-Vektor mit SFFV-turboGFP-Donorkonstrukt für <i>AAVS1</i>	Virale Core Facility Charité, Berlin
AAV6-SFFV-r <i>Clcn7</i> (AAV6-C7)	AAV6-Vektor mit SFFV-r <i>Clcn7</i> -Donorkonstrukt für <i>AAVS1</i>	Virale Core Facility Charité, Berlin
pAAV2/6 (p0004)	Helferplasmid für die Herstellung der rAAV6-Vektoren; enthält Replikations- und Capsidgene	PennVector
pCl-Neo-r <i>Clcn7</i> -HA	Expressionsplasmid für die cDNA des <i>Clcn7</i> -Gens der Ratte, markiert mit HA-Tag	Tobias Stauber, Berlin
pSFFV-turbo-GFP-AAV6	Plasmid für die Herstellung des AAV6-GFP-Vektors; enthält rekombinantes Vektorgenom	Matthew Porteus, Stanford



<b>Name</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Ursprung</b>
pSFFV-rClcn7-HA-AAV6	Plasmid für die Herstellung des AAV6-C7-Vektors; enthält rekombinantes Vektorgenom	Dieses Projekt
SeV-Klf4	Sendai-viraler Vektor für die Expression von KLF4	CytoTune™-iPS 2.0 Sendai
SeV-cMyc	Sendai-viraler Vektor für die Expression von MYC	Reprogramming Kit (Invitrogen,
SeV-KOS	Sendai-viraler Vektor für die polycistronische Expression von KLF4, OCT3/4 und SOX2	Thermo Fisher Scientific)

### 2.1.9 Medien, Puffer und Lösungen

Rekombinante humane Zytokine von Peprotech stammen von *E. coli* ab.

**Tabelle 2.12: Supplementierte Medien.**

<b>Medium</b>	<b>Hersteller</b>
<b>EB-Medium</b>	
mTeSR™1	Stemcell Technologies
BMP-4 (50 ng/ml)	PeproTech
SCF (20 ng/ml)	PeproTech
VEGF <sub>165</sub> (50 ng/ml)	PeproTech
ROCK inhibitor (10 µM)	Wako Chemicals
<b>Zytokinreiches HSPC-Medium</b>	
StemSpan™ SFEM II	Stemcell Technologies
Flt3-L (100 ng/ml)	PeproTech
IL-6 (100 ng/ml)	PeproTech
SCF (100 ng/ml)	PeproTech
TPO (100 ng/ml)	PeproTech
StemReginin 1 (500 nM)	Stemcell Technologies
UM171 (35 nM)	Stemcell Technologies
Penicillin-Streptomycin (100 U/ml)	Lonza

## 2 Materialien und Methoden

<b>Medium</b>	<b>Hersteller</b>
<b>HSPC-Expansionsmedium</b>	
StemSpan™ SFEM	Stemcell Technologies
Flt3-L (50 ng/ml)	PeptoTech
IL-6 (10 ng/ml)	PeptoTech
SCF (200 ng/ml)	PeptoTech
Penicillin-Streptomycin (100 U/ml)	Lonza
<b>Monozyten-Differenzierungsmedium</b>	
X-VIVO™ 15	Lonza
Gibco® 2-Mercaptoethanol (55 µM)	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
IL-3 (25 ng/ml)	PeptoTech
M-CSF (100 ng/ml)	R&D Systems
Penicillin-Streptomycin (100 U/ml)	Lonza
<b>Makrophagen-Differenzierungsmedium</b>	
BioWhittaker® MEM Alpha	Lonza
FBS Superior (10% v/v)	Biochrom (Merck)
M-CSF (50 ng/ml)	R&D Systems
Ultraglutamin I (2 mM)	Lonza
Penicillin-Streptomycin (100 U/ml)	Lonza
<b>Osteoklasten-Differenzierungsmedium</b>	
Makrophagen-Differenzierungsmedium	
RANKL (50 ng/ml)	PeptoTech
<b>Osteoklasten-Differenzierungsmedium w/o Phenolrot</b>	
Gibco® MEM α, kein Phenolrot	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
FBS Superior (10% v/v)	Biochrom (Merck)
M-CSF (50 ng/ml)	R&D Systems
RANKL (50 ng/ml)	PeptoTech
Penicillin-Streptomycin (100 U/ml)	Lonza

**Tabelle 2.13: Puffer und Lösungen.**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Agarose-Gelelektrophorese</b>	
TAE (50x)	2 M Tris 50 mM Titriplex® III 5.7% (v/v) Essigsäure
<b>FACS und MACS</b>	
FACS/MACS Puffer (1x)	DPBS w/o MgCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub> 2 mM EDTA 0.5% (v/v) BSA

### 2.1.10 Zelllinien

**Tabelle 2.14: Zelllinien.**

<b>iPS-Linie</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Generierung</b>
BIHi001-A (iPS-1A)	Humane Vorhautfibroblasten, gesunder Neugeborener, Kaukasier, männlich, weiß; bezogen von ATCC	Technologieplattform Stammzellen, Berliner Institut für Gesundheitsforschung (BIH), reprogrammiert mit Sendai-viralen Vektoren ( <i>POU5F1, SOX2, KLF4, MYC</i> )
BIHi004-A (iPS-4A)	Fibroblasten, 35-39 Jahre, gesunde Hispanoamerikanerin, weiblich, weiß; bezogen von Lonza	Technologieplattform Stammzellen, Berliner Institut für Gesundheitsforschung (BIH), reprogrammiert mit episomalen Vektoren ( <i>POU5F1, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC, mp3DD, EBNA1</i> )
BIHi002-A (ARO-iPS)	PBMCs, 1 Jahr, Kaukasier, männlich, weiß, ARO ( <i>CLCN7</i> - Mutationen c.875G>A und c.1208G>A)	Diese Arbeit, reprogrammiert mit Sendai-viralen Vektoren ( <i>OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC</i> )

<b>iPS-Linie</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Generierung</b>
iPS-Klon 2	BIHi002-A (ARO-iPS)	Diese Arbeit, CRISPR/Cas9-basierte Mutationskorrektur von <i>CLCN7</i> Exon 10 (c.875A>G)
iPS-Klon 37	BIHi002-A (ARO-iPS)	Diese Arbeit, CRISPR/Cas9-basierte Mutationskorrektur von <i>CLCN7</i> Exon 14 (c.1208A>G)

### 2.1.11 Software

**Tabelle 2.15: Software.**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
AxioVision 4.8.2.0	Carl Zeiss MicroImaging
BoB™soft 1.0	PerinElmer
CellProfiler 3.1.8	Broad Institut
FlowJo 10.5.3	Tree Star Inc.
Geneious® 9.1.8	Biomatters
Gene Snap 7.12	SynGene
GIMP 2.10	Gimp Community
GraphPad Prism® 8.2.1	GraphPad Software Inc.
Inkscape 0.92.4	Inkscape Community
Leica Application Suite X 3.4.2.18368.1.2	Leica Microsystems
SeqPilot 4.4.0	JSI Medical Systems

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 iPS-Reprogrammierung

Aus PBMCs expandierte Erythroblasten wurden mithilfe des CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kits, wie in Hennig et al. 2019 beschrieben, in iPS reprogrammiert. Dabei wurden die Expressionskassetten der Reprogrammierungsfaktoren KLF4, MYC, OCT3/4 und SOX2 mit nicht-integrierenden Sendai-viralen Vektoren

ren in die Zellen eingebracht. Die generierte Zelllinie BIHi002-A (ARO-iPS) stammt von einer einzelnen Kolonie der Reprogrammierung.

### 2.2.2 Kultivierung von iPS

Induzierte pluripotente Stammzelllinien (siehe Tabelle 2.14) wurden in Essential 8™- (Life Technologies, ThermoFisher Scientific) oder mTeSR™1-Medium (Stemcell Technologies) in Geltrex-beschichteten 6-Well-Kulturschalen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 4–5 Tage wurden sie ca. 1:20 mit 0,5 mM EDTA passagiert.

### 2.2.3 Transfektion und klonale Expansion von iPS

Mindestens eine Woche vor der Transfektion wurden in Essential 8™-Medium kultivierte iPS auf das Cellartis® DEF-CS™ 500 Kultursystem umgestellt. Ein Tag vor der Transfektion wurde mittels TrypLE™ Select Enzym, wie vom Hersteller angegeben, eine Einzelzellpassage durchgeführt und die Zellen wurden mit einer Dichte von  $6 \cdot 10^5$  Zellen pro 6-Well ausgesät. Für die CRISPR/Cas9-basierte Mutationskorrektur wurden ARO-iPS (BIHi002-A) mit Cas9-Ribonukleoproteinen (RNPs) und ssODN-Donoren (siehe Tabelle 2.10) spezifisch für das mutierte Allel in *CLCN7* Exon 10 bzw. Exon 14 transfiziert. Dazu wurden zunächst crRNAs und tracrRNA (siehe Tabelle 2.9) zusammengelagert (5 min 95 °C, abgekühlt bei RT) und dann bei RT für 30 min im äquimolaren Verhältnis mit dem rekombinanten Cas9-Protein assembliert. Mittels Neon® Transfection System 10 µL Kit (1100 V, 20 ms, 2 Pulse, Puffer R) wurden nach Herstellerangaben je  $1 \cdot 10^5$  iPS mit 12 pmol (2 µg Cas9, 400 ng cr-tracrRNA) Cas9-RNP, 50 pmol (2 µg) ssODN-Donor und 30 pmol (1 µg) Elektroporations-Enhancer (Integrated DNA Technologies) transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen in eine 24-Well-Kulturschale in DEF-CS-Medium ausgesät.

Eine Woche nach der Transfektion wurden wie vom Hersteller empfohlen Einzelzellen in 96-Well-Kulturschalen ausgesät und im Cellartis® DEF-CS™ 500 Kultursystem klonal expandiert. Nach Erreichen des 6-Well-Formates wurden die expandierten iPS-Klone auf mTeSR™1-Medium umgestellt.

Die Genaddition in den *AAVS1*-Lokus erfolgte wie oben beschrieben ebenfalls mithilfe des Cellartis® DEF-CS™ 500 Kultursystems und Neon® Transfection System 10 µL Kits. Für die Editierung des *AAVS1*-Lokus wurde jedoch eine chimäre synthetische sgRNA verwendet (siehe Tabelle 2.9), die für 10 min bei RT mit der Cas9-Nuklease assembliert wurde. Donorkonstrukte wurden 10 min nach der Transfektion

durch 24-stündige Transduktion mit 50.000 Vektorgenomen pro Zelle der rekombinanten AAV6-Vektoren (siehe Tabelle 2.11) in die Zellen geschleust.

### 2.2.4 Differenzierung von iPS in Osteoklasten

Mindestens vier Tage vor Beginn der Differenzierung wurden in Essential 8™-Medium kultivierte iPS an mTeSR™1-Medium adaptiert. Für die Bildung embryoider Körper (EBs) sowie die Mesoderminduktion, wurden Einzelzellen mittels TrypLE™ Select Enzym geerntet und pro 96-Well einer Ultra-low-Attachment-Platte mit Rundboden wurden je  $5 \cdot 10^3$  Zellen in 100 µl EB-Medium (siehe Tabelle 2.12) ausgesät. Die Platte wurden für 3 min bei 100xg zentrifugiert. Die Hälfte des Kulturmediums wurde täglich durch frisches EB-Medium ersetzt. Vier Tage nach Bildung der EBs wiesen diese einen Durchmesser von ca. 500 µm auf und je 8 EBs wurden vorsichtig in eine mit 0,1% Gelatinelösung behandelte 6-Well-Kulturschale mit 3 ml Monozyten-Differenzierungsmedium (siehe Tabelle 2.12) transferiert. Damit sich die EBs an den Kulturschalenboden anheften und monozytenbildende Komplexe formen konnten, wurden die transferierten EBs für 1 Woche ohne jegliche Bewegung der Kulturschalen im Inkubator kultiviert. Danach konnten einmal wöchentlich produzierte monozytäre Suspensionszellen mit einem vollständigen Mediumwechsel geerntet werden. Für die terminale Osteoklastendifferenzierung wurden die geernteten Monozyten mit einer Dichte von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Kulturschalen mit Makrophagen-Differenzierungsmedium (siehe Tabelle 2.12) ausgesät. Drei Tage später sowie jeden weiteren zweiten oder dritten Tag wurde die Hälfte des Kulturmediums mit frischem Osteoklasten-Differenzierungsmedium ausgetauscht. Die in Tabelle 2.12 angegebenen Konzentrationen der Zytokine M-CSF und RANKL des Mediums beziehen sich dabei auf das gesamte Kulturvolumen. Zwischen Tag 5 und 8 der terminalen Osteoklastendifferenzierung waren die ersten Osteoklasten sichtbar. Während der gesamten Differenzierung wurden die Zellen in einem Normoxieinkubator bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.2.5 Isolierung und Osteoklastendifferenzierung primärer Monozyten

Mittels Leucosep™-Röhrchen und Biocoll wurden PBMCs aus Blut gemäß dem Herstellerprotokoll gewonnen. Monozyten wurden durch magnetische Zellsortierung (MACS) mit dem humanen Monocyte Isolation Kit II angereichert und anschließend nach dem Protokoll der terminalen Osteoklastendifferenzierung des vorherigen Abschnitts zu Osteoklasten differenziert.

### 2.2.6 Resorptionsassay mit PBMC- und iPS-Osteoklasten

Zwei Tage nach Erscheinen der ersten sichtbaren *in vitro* differenzierten PBMC- oder iPS-Osteoklasten, wenn die Mehrheit der Osteoklasten nicht mehr als 10 Nuklei aufwies, wurden diese von der Zellkulturschale auf Knochenscheiben transferiert. Dazu wurden sie zunächst drei Mal mit DPBS gewaschen, für 10 min bei 37 °C mit Accutase inkubiert und dann vorsichtig mit dem Zellschaber abgelöst. Die Zellen wurden für 5 min bei 400 xg abzentrifugiert und dann mit einer Dichte von  $6,6 \cdot 10^4$  Zellen/Knochenscheibe in 96-Well-Kulturschalen in je 200 µl Osteoklasten-Differenzierungsmedium ohne Phenolrot (siehe Tabelle 2.12) ausgesät. Die Osteoklasten wurde für 5 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator auf den Knochenscheiben kultiviert. Die Hälfte des Kulturmediums wurde zwei Tage nach dem Osteoklastentransfer durch frisches Medium ersetzt. Nach Beendigung der Kultivierung erfolgte die Entfernung der Osteoklasten, indem die Knochenscheiben für mindestens 30 min in destilliertem Wasser inkubiert und mit einem Papiertuch abgerieben wurden. Die Resorptionsvertiefungen wurden durch das Färben der Knochenscheiben mit 0,25%iger Toluidinblaulösung sichtbar gemacht. Unsere Kooperationspartner Jacob Bastholm Olesen und Kent Sjøe des Odense Universitätskrankenhauses der Universität Süddänemark kategorisierten, quantifizierten und dokumentierten die auf den Knochenscheiben entstandenen Resorptionsvertiefungen. Dabei erfolgte die Bestimmung des Anteils der erodierten Knochenoberfläche lichtmikroskopisch anhand eines 100-Punkte-Gitters wie von Boissy et al. 2005 und Sjøe und Delaissé 2010 beschrieben. Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism durchgeführt.

### 2.2.7 Isolierung und Kultivierung primärer CD34<sup>+</sup> HSPCs

PBMCs wurden mittels Leucosep™-Röhrchen und Biocoll aus Nabelschnurblut nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend erfolgte die Anreicherung der CD34<sup>+</sup> HSPCs durch magnetische Zellsortierung (MACS) mithilfe des CD34 MicroBead Kits. Die isolierten HSPCs wurden mit einer Dichte von  $1-2 \cdot 10^5$  Zellen/ml in zytokinreiches HSPC-Medium (siehe Tabelle 2.12) aufgenommen und bei 37 °C in einem Hypoxieinkubator (5% O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>) kultiviert. Bei Erreichen einer Zelldichte von etwa  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml wurden die Zellen durch Zugabe von frischem Medium ca. 1:5 passagiert.

### 2.2.8 Transfektion und Transduktion primärer HSPCs

Die CRISPR/Cas9-basierte Genaddition in den *AAVS1*-Lokus von HSPCs wurde wie von Bak et al. 2018 beschrieben durchgeführt. Dazu erfolgte die Genomeditierung drei Tage nach der Isolierung der HSPCs aus Nabelschnurblut mittels Nukleofektion und rAAV6-Transduktion. Für die Nukleofektion wurde das P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit S nach Herstellerangaben verwendet. Die rekombinante Cas9-Nuklease wurde für 10 min bei RT mit der *AAVS1*-spezifischen sgRNA (siehe Tabelle 2.9) zum Cas9-RNP assembliert. Es wurden  $2 \cdot 10^5$  Zellen mit  $3 \mu\text{g}$  Cas9 und  $1,6 \mu\text{g}$  sgRNA mit dem Programm DZ100 transfiziert. Zehn Minuten nach der Nukleofektion wurden 50.000 Vektorgenome pro Zelle der rekombinanten AAV6-Vektoren (siehe Tabelle 2.11) mit den enthaltenen Donorkonstrukten hinzugefügt. Die Transduktion wurde 24 h später durch einen vollständigen Medienwechsel gestoppt.

### 2.2.9 Differenzierung von HSPCs in Osteoklasten

Editierete HSPCs wurden einen Tag nach der Transfektion (Tag 4 nach der Isolierung) von zytokinreichem HSPC-Medium in HSPC-Expansionsmedium (siehe Tabelle 2.12) überführt und in diesem 8 Tage bei einer Zelldichte von  $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml bei  $37^\circ\text{C}$  in einem Normoxieinkubator ( $5\% \text{CO}_2$ ) kultiviert. Alle 2–3 Tage wurden die Zellen 1:3–1:5 durch Zugabe von frischem Medium passagiert. Im Anschluss an die HSPC-Expansion (Tag 12) wurden für die terminale Osteoklastendifferenzierung je  $3,3 \cdot 10^5$  Zellen in eine 24-Well-Kulturschale in Makrophagen-Differenzierungsmedium mit 50 ng/ml M-CSF (siehe Tabelle 2.12) ausgesät und weiterhin bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$  im Inkubator kultiviert. Ab Tag 15 wurde dem Differenzierungsmedium 50 ng/ml RANKL hinzugefügt (siehe Osteoklastendifferenzierungsmedium in Tabelle 2.12). An Tag 20 der Differenzierung (Tag der terminalen Osteoklastendifferenzierung) wurde die Kultur beendet und die Zellen wurden für die Osteoklastenfärbung (siehe Abschnitt 2.5.1) fixiert. Das Protokoll zur Differenzierung der Osteoklasten aus HSPCs wurde von Moscatelli et al. 2013 adaptiert.

### 2.2.10 Resorptionsassay mit HSPC-Osteoklasten

Um die Resorptionsfähigkeit der aus editierten HSPCs differenzierten Osteoklasten zu beurteilen, wurden HSPCs wie im vorherigen Abschnitt beschrieben zu Osteo-



klasten differenziert. Für die terminale Osteoklastendifferenzierung wurden sie direkt auf Dentinscheiben (Durchmesser 5 mm) in 24-Well-Kulturschalen ausgesät und kultiviert. An Tag 26 (Tag 14 der terminalen Osteoklastendifferenzierung) wurde die Kultur beendet, die Osteoklasten wurden wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben von den Dentinscheiben entfernt und die Resorptionsvertiefungen wurden mit Tinte sichtbar gemacht.

### 2.2.11 Differenzierung von iPS in die drei Keimblätter

ARO-iPS wurden mithilfe des StemMACS™ Trilineage Differentiation Kits dem Herstellerprotokoll folgend direkt in die drei Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm differenziert.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Aufreinigung von Nukleinsäuren

#### 2.3.1.1 Plasmide

*E. coli*-Bakterien wurden in Luria/Miller LB-Medium (Carl Roth) mit 100 µg/ml Ampicillin in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 rpm über Nacht vermehrt. Die Plasmide wurden von den Übernachtskulturen mithilfe der Kits Invisorb® Spin Plasmid Mini Two oder NucleoBond® Xtra Midi Plus EF isoliert.

#### 2.3.1.2 Desoxyribonukleinsäuren

Die genomische DNA von Zellen wurde entweder mithilfe des Quick-DNA Microprep Plus Kits nach Herstellerangaben oder mittels QuickExtract™ DNA-Extraktionslösung nach dem Protokoll von Bak et al. 2018 gewonnen.

#### 2.3.1.3 Ribonukleinsäuren

Mittels Direct-zol™ RNA Mini Prep Kit oder RNeasy® Plus Mini Kit wurde die gesamte RNA von iPS oder *in vitro* differenzierten Osteoklasten wie im Herstellerprotokoll angegeben isoliert. Die Zellen für Osteoklasten-RNA wurden sechs Tage nach Erscheinen der ersten sichtbaren *in vitro* differenzierten Osteoklasten geerntet.

Alle aufgereinigten Nukleinsäuren wurden mithilfe des Spektralphotometers NanoDrop™ quantifiziert.

### 2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Amplifikationen wurden mit dem FIREPol® Master Mix in dem GeneAmp® PCR System 9700 oder ProFlex™ 3 x 32-Well PCR System durchgeführt. Standardmäßig wurden 50–200 ng genomische DNA bzw. 1–10 ng Plasmid oder cDNA mit je 0,25 µM des Vorwärts- und Rückwärtsprimers in 1x FIREPol® Master Mix in einem 20-µl-Ansatz verwendet. PCR-Reaktionen ohne DNA dienten als Negativkontrolle. Es wurde das in folgender Tabelle dargestellte PCR-Programm mit den primerspezifischen Hybridisierungstemperaturen ( $T_{anneal}$ ) aus Tabelle 2.7 genutzt.

**Tabelle 2.16: Standard-PCR-Programm.**

Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	20 sec	
Hybridisierung	primerspezifisch	45 sec	x33
Verlängerung	72 °C	1 min/kb	
Finale Verlängerung	72 °C	10 min	
Abkühlen	4 °C	∞	

### 2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurden mit DNA-Ladepuffer versetzte DNA-Proben und 3 µl der Genuler™ DNA-Leiter auf ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel (0,8–2% in 1x TAE) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90–140 V in 1x TAE Laufpuffer. Die gefärbte DNA wurde mithilfe der Geldokumentation G:BOX HR und Gene Snap detektiert.

### 2.3.4 Sanger-Sequenzierung

Amplifizierte PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierung zunächst mit Exonuklease I und alkalischer Phosphatase (SAP) behandelt. Dazu wurden 8 µl PCR-Produkt mit 1,6 U Exonuklease I und 0,3 U SAP für je 15 min bei 37 °C und 72 °C inkubiert. Für die Sequenzreaktion wurden die Reagenzien des BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits verwendet. Die Kettenabbruchreaktion wurde in einem 10-µl-Ansatz mit 1 µl des aufgereinigten PCR-Produktes oder 100 ng eines Plasmides, 1,7 µl BigDye<sup>®</sup> Terminator Sequencing Buffer, 0,3 µl BigDye<sup>®</sup> Terminator und 0,2 µl eines 10 µM Sequenzierprimers in einem der in Tabelle 2.1 genannten PCR-Cycler durchgeführt (25 Zyklen mit 96 °C für 30 sec, 50 °C für 15 sec und 60 °C für 2 min). Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit dem Agencourt CleanSEQ Kit aufgereinigt. Die Sequenzanalyse der aufgereinigten Nukleinsäuren erfolgte mit dem 3730xl DNA Analyzer. Die Geneious<sup>®</sup> Software wurde für die Analyse der Sequenzierdaten verwendet.

### 2.3.5 Mikrosatellitenanalyse

Zum Nachweis der Identität und Reinheit der generierten Zelllinie ARO-iPS wurde mit dem primären Ausgangsmaterial (PBMCs des Patienten) und der generierten Zelllinie eine Mikrosatellitenanalyse mit dem GenePrint<sup>®</sup> 10 System durchgeführt. Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurden der *D21S11*-Lokus und die 9 ASN-0002-Loci (*TH01*, *TPOX*, *vWA*, *AMEL*, *CSF1PO*, *D16S539*, *D7S820*, *D13S317* und *D5S818*) amplifiziert und mit dem 3730xl DNA Analyzer detektiert.

### 2.3.6 Hochdurchsatz-Genomsequenzierung

Die Genome der mittels CRISPR editierten iPS-Klone 2 und 37 sowie der Ausgangszelllinie ARO-iPS wurden von Macrogen Inc. (Korea) mithilfe des Illumina HiSeq X Ten sequenziert. Die bioinformatische Analyse der Sequenzierdaten führte Manuel Holtgrewe der Technologieplattform Bioinformatik des Berliner Instituts für Gesundheitsforschung (BIH) durch. Die sequenzierten DNA-Abschnitte („reads“) wurden zur GRCh37-Referenzsequenz (hs37d5.fa) mittels BWA-MEM (Li 2013) aligniert, Duplikate wurden mittels SAMBLASTER (Faust und Hall 2014) maskiert und die sequenzierten DNA-Abschnitte wurden mithilfe des Samtools (Li et al. 2009) sortiert und zu einer Binary-Alignment-Map (BAM)-Datei konvertiert. Kleine Sequenzvarianten sowie große strukturelle Varianten in den Genomen der iPS-Klone, die vom

Genom der Ausgangszelllinie ARO-iPS abwichen, wurden mittels GATK Haplotype-Caller v3.7 (DePristo et al. 2011) und Delly2 (Rausch et al. 2012) identifiziert, mit VarFish gefiltert und manuell im IGV-Browser validiert. Die potenzielle Pathogenität der Varianten wurde mittels Mutation Taster (mutationtaster.org) vorhergesagt.

### 2.3.7 Umklonierung des Donorkonstruktes

Das von Matthew Porteus geschenkte Plasmid pSFFV-turbo-GFP-AAV6 enthält das für die Virusproduktion benötigte rekombinante Genom des AAV6-GFP-Donorvektors, bestehend aus einer Expressionskassette für eine verbesserte GFP-Variante (turbo-GFP), die von homologen Sequenzen für den *AAVS1*-Lokus flankiert wird. Mittels In-Fusion-Klonierung wurde das turbo-GFP-Gen des Vektors mit der cDNA des *Cln7*-Gens der Ratte ausgetauscht. Dazu wurde das Plasmid pSFFV-turbo-GFP-AAV6 zunächst mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI verdaut sowie mit Fast-AP™ dephosphoryliert. Dazu wurden 5 µg des Vektors in FastDigest-Puffer mit je 2 µl FastDigest KpnI, FastDigest XhoI und Fast-AP™ in einem 60-µl-Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der verdaute Vektor wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.3.3) der Größe nach aufgetrennt und das gewünschte Fragment (4438 bp) wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Mit je 20 bp flankierenden homologen Sequenzen des Zielvektors wurde r*Cln7* mit den Primern SFFV-r*Cln7*\_F und SFFV-r*Cln7*\_R (siehe Tabelle 2.7) von dem Plasmid pCl-Neo-r*Cln7*-HA mithilfe der Q5®-Polymerase nach den Angaben des Herstellerprotokolls amplifiziert. Dazu wurde das folgende PCR-Programm verwendet: initiale Denaturierung bei 98 °C für 30 sec, 35 Zyklen mit 98 °C für 10 sec, 68 °C für 30 sec sowie 72 °C für 3 min und finale Verlängerung für 2 min bei 72 °C. Die Aufreinigung des verdauten Vektors sowie des PCR-Fragments, die In-Fusion-Klonierungsreaktion und die Transformation der *E. coli* mit den klonierten Vektoren wurden mithilfe des In-Fusion® HD Cloning Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Plasmide wurden wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben präpariert und die korrekte Vektorsequenz wurde durch einen Kontrollverdau mit XhoI und KpnI und die Sequenzierung mit den Primern BGH\_R und r*Cln7*\_F2 (siehe Tabelle 2.7 und Abschnitt 2.3.4) verifiziert.

### 2.3.8 TIDE- und TIDER-Analyse

Mithilfe des Webtools TIDE (Tracking von Insertionen und Deletionen mittels Dekomposition) wurden das Spektrum sowie die Häufigkeit von CRISPR/Cas9-

induzierten Mutationen des editierten Ziellokus in der transfizierten iPS- oder HSPC-Mischkultur bestimmt. Die TIDER (Tracking von Insertionen, Deletionen und Rekombination)-Analyse ermöglichte zudem die Quantifizierung der HDR-vermittelten Mutationskorrektur in editierten iPS. Für die TIDE- und TIDER-Analyse wurde die genomische DNA der editierten Zellen wie in Abschnitt 2.3.1 angegeben, frühestens vier Tage nach der Transfektion isoliert. Der entsprechende editierte Ziellokus (*CLCN7* Exon 10, *CLCN7* Exon 14 oder *AAVS1*) wurde mit den in Tabelle 2.7 angegebenen TIDE-Primern nach dem Standard-PCR-Protokoll (siehe Abschnitt 2.3.2) amplifiziert und anschließend mit denselben Primern wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben sequenziert. Die Analyse der Sequenzierdaten erfolgte mit dem webbasierten TIDE- bzw. TIDER-Algorithmus (Brinkman et al. 2014, 2018, <https://tide.nki.nl>).

### 2.3.9 Genotypisierung

Zur Bestimmung der Genotypen der editierten iPS-Klone wurde die genomische DNA nach dem Protokoll von Bak et al. 2018 mittels der QuickExtract™-Lösung gewonnen. Anschließend wurden die editierten Loci (*CLCN7* Exon 10 bzw. 14) wie in Abschnitt 2.3.8 beschrieben amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzen wurden mit SeqPilot analysiert.

### 2.3.10 Nachweis der HDR-vermittelten Genaddition

Die Spezifität der Genaddition in den *AAVS1*-Lokus in iPS bzw. HSPCs wurde mittels PCR validiert. Dazu wurde zuerst die genomische DNA aus der editierten iPS- oder HSPC-Mischkultur frühestens vier Tage nach der Transfektion wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben gewonnen. Der editierte *AAVS1*-Lokus ohne Transgen sowie die stromauf- und stromabwärts liegenden Grenzen zwischen Genom und Transgen wurden mit den in Abb.3.25-a angegebenen Primern entsprechend der dargestellten PCR-Strategie nach dem Standard-PCR-Protokoll aus Abschnitt 2.3.2 amplifiziert. Die jeweiligen Primersequenzen und primerspezifischen Hybridisierungstemperaturen sind in Tabelle 2.7 aufgelistet. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht (siehe Abschnitt 2.3.3).

### 2.3.11 Quantitative RT-PCR

Die osteoklastenspezifische Genexpression von differenzierten iPS-Osteoklasten wurde mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR) quantifiziert. Die gesamte RNA von undifferenzierten iPS sowie differenzierten iPS-Osteoklasten wurde wie in Abschnitt 2.3.1 angegeben extrahiert und aufgereinigt. Dann wurde 1 µg RNA durch Verwendung des RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits und zufälliger Hexamer-Primer in einem 20-µl-Ansatz in cDNA umgeschrieben. Die qRT-PCR erfolgte im 96-Well-Format im QuantStudio® 3 Real-Time PCR System mit je drei technischen Replikaten. Es wurde die cDNA von den osteoklastenspezifischen mRNAs *ATP6V0A3*, *CLCN7*, *CTSK*, *MMP9* sowie der Kontrollen *GAPDH* (Haushaltsgen) und *OCT4* (Pluripotenzmarker undifferenzierter iPS) der iPS-Linien iPS-4A, ARO-iPS, iPS-Klon 2 und iPS-Klon 37 amplifiziert. Die qRT-PCR wurde mit je 2 ng cDNA, je 1 µM des entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimers (siehe Tabelle 2.8) und dem HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR-Mix Plus in einem 20-µl-Ansatz mit dem folgenden Programm durchgeführt: initiale Denaturierung für 15 min bei 95 °C, 40 Zyklen mit 95 °C für 15 sec, 60 °C für 1 min und 72 °C für 45 min sowie einer Schmelzkurve (95 °C für 1 min, 55 °C für 30 sec und 95 °C für 30 sec). Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte mithilfe der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001), wobei die  $C_T$ -Werte erst zur endogenen Kontrolle *GAPDH* und die *GAPDH*-normalisierten Werte der iPS-Osteoklasten zu denen der undifferenzierten iPS normalisiert wurden. Die Diagramme sowie die statistische Analyse wurden mit GraphPad Prism® erstellt.

### 2.3.12 Kopienzahlanalyse mittels quantitativer PCR

Die quantitative Amplifikation der editierten *CLCN7*-Loci (Exons 10 und 14) von genomischer DNA der editierten iPS-Klone wurde durchgeführt, um zu ermitteln, ob durch die Genomeditierung ein Allelverlust stattgefunden hatte. Die quantitative PCR (qPCR) wurde im 384-Well-Format im 7900HT Fast Real-Time PCR System mit Triplikaten durchgeführt. Es wurden die *CLCN7* Exons 10 und 14, außerdem zu Kontrollzwecken *ALBUMIN* und das X-chromosomale *F8* Gen mit den in Tabelle 2.7 gelisteten Primern von der gDNA der ARO-iPS, der editierten iPS-Klone 2, 4, 12 und 37 sowie der gDNA aus dem Blut eines Mannes amplifiziert. Die PCR erfolgte mit 10 ng gDNA der jeweiligen Probe, je 0,3 µM des entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimers und dem HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR-Mix Plus im 18-µl-Ansatz mit dem folgenden Programm: initiale Denaturierung für 15 min bei 95 °C, 40 Zyklen mit 95 °C für 15 sec, 60 °C für 30 sec und 72 °C für 45 min sowie einer

Schmelzkurve (95 °C für 1 min, 55 °C für 30 sec und 95 °C für 30 sec). Für die relative Quantifizierung wurden die  $C_T$ -Werte von *F8*, *CLCN7* Exon 10 und 14 nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001) zunächst auf die  $C_T$ -Werte der endogenen Kontrolle *ALBUMIN* normalisiert, dann wurden die normalisierten Werte von ARO-iPS und den Klonen zur männlichen Blutkontrolle kalibriert.

### 2.3.13 Amplifikation und Sequenzierung der *CLCN7*-cDNA

Zur Überprüfung der *CLCN7*-mRNA in den korrigierten iPS-Klonen 2 und 37 wurde aus *in vitro* differenzierten Osteoklasten (siehe Abschnitt 2.2.4) dieser Zelllinien sowie der Kontrollen ARO-iPS und iPS-4A wie in Abschnitt 2.3.1 angegeben zunächst die gesamte RNA isoliert. Danach wurde die RNA in cDNA umgeschrieben (siehe Abschnitt 2.3.11) und die Exons 5 bis 17 der *CLCN7*-mRNA wurden mit den Primern *C7\_E5\_F* und *C7\_E17\_R* (siehe Tabelle 2.7) entsprechend dem Standard-PCR-Protokoll aus Abschnitt 2.3.2 amplifiziert. Das einzelne, spezifische PCR-Produkt der *CLCN7*-cDNA wurde mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.3.3) validiert und anschließend mit den eben genannten Primern wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben sequenziert.

### 2.3.14 Nachweis des Verlustes der Reprogrammierungsvektoren

Um zu überprüfen, ob die generierte iPS-Linie BIHi002-A (ARO-iPS) frei von den Sendai-Reprogrammierungsvektoren ist, wurde eine Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) zur Detektion des Sendavirusesgenoms sowie der Transgene durchgeführt. RNA-Gewinnung, cDNA-Synthese und RT-PCR erfolgten wie in Hennig et al. 2019 beschrieben mit dem RNeasy Plus Mini Kit, den TaqMan Reverse Transkriptionsreagenzien und den in Tabelle 2.8 gelisteten Primern des CytoTune-iPS 2.0 Reprogramming Kits.

### 2.3.15 PluriTest Microarray

Isolierte RNA (siehe Abschnitt 2.3.1) wurde mithilfe des Illumina Total Prep-96 RNA Amplification Kits entsprechend dem Herstellerprotokoll amplifiziert sowie biotinyliert und anschließend mit dem HumanHT-12 v4 Expression BeadChip hybridisiert. Der Microarray-Chip wurde mit dem Illumina iScan System gelesen. Die bioinformatische Analyse der Transkriptomdaten erfolgte online mit PluriTest (Müller et al. 2011, [www.pluritest.org](http://www.pluritest.org)). RNA von humanen Vorhautfibroblasten (HFFs) und der

humanen iPS-Linie BIHi001-A (iPS-1A) diente als differenzierte Negativ- und pluripotente Positivkontrolle.

### 2.4 Zytogenetik

Für die Detektion möglicher chromosomaler Aberrationen wurde eine Karyotypisierung der generierten iPS-Linie BIHi002-A (ARO-iPS) mittels KaryoLite™ BoBs™ (PerkinElmer, Lund et al. 2012) durchgeführt. Markierung, Aufreinigung und Hybridisierung von mindestens 240 ng genomischer DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Die Ergebnisse wurden mit der BoBsoft™-Analysesoftware (PerkinElmer) ausgewertet. Weibliche und männliche gDNA (Promega) dienten als Kontrollen. Ein normaler Karyotyp wurde definiert, wenn die Fluoreszenzverhältnisse aller Loci  $\sim 1,0$  betragen.

Die Karyotypanalyse der editierten iPS-Klone erfolgte mithilfe der Giemsa-Färbung (G-Bandentechnik) von präparierten Metaphasenchromosomen mitotischer Zellen. Diese wurde von der Praxis für Humangenetik in Berlin-Mitte durchgeführt.

### 2.5 Immunbiologische und zytochemische Methoden

#### 2.5.1 Osteoklastenfärbung und -quantifizierung

Vier Tage nach Erscheinen der ersten sichtbaren *in vitro* differenzierten Osteoklasten wurden diese mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit 0,1% Saponin permeabilisiert. TRAP wurde für 15 min bei RT mit 0,1 mg/mL Naphtol AS MX Phosphatnatriumsalz und 0,6 mg/mL Fast Red Violet LB Salz in 40 mM Natriumacetat und 10 mM Natriumtartrat gefärbt. Die Färbung von Aktin erfolgte über Nacht bei 4 °C mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (Alexa Fluor™ 488, 1:400). DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) wurde für die Färbung der Nuklei verwendet (15 min, RT, 1 µg/mL). Fluoreszenzaufnahmen gefärbter iPS-Osteoklasten wurden mit dem Opera® Phenix™ High Content Screening System angefertigt, während gefärbte HSPC-Osteoklasten mit dem DMi8-Fluoreszenzmikroskop und der Leica Application Suite X Software dokumentiert wurden.

Die Anzahl, die Größe sowie die Anzahl der Nuklei von gefärbten iPS-Osteoklasten wurden quantifiziert. Die Analyse einer jeden Zelllinie erfolgte anhand von drei terminalen Osteoklastendifferenzierungen einer iPS-Differenzierung mit je drei technischen Replikaten (drei 24-Well-Kulturschalen), mit Ausnahme von iPS-Klon 2, von



dem aufgrund von zu geringer Monozytenproduktion nur vier technische Replikate einer Osteoklastendifferenzierung verwendet werden konnten. Von jedem 24-Well, in dem iPS-Osteoklasten differenziert und gefärbt wurden, wurde repräsentativ je eine Fluoreszenzaufnahme mit einer möglichst hohen und niedrigen Osteoklastendichte für die Analyse ausgewählt, das einer Fläche von insgesamt 13,1 mm<sup>2</sup> pro analysierten Well entspricht. Mittels einer Bildbearbeitungssoftware (GIMP) wurden in diesen Aufnahmen die Zellgrenzen manuell nachgezogen, Zellkörper wurden rot, Hintergründe blau eingefärbt. Diese Zellmaske wurde dann in der Bildanalyse-Software CellProfiler mit der dazugehörigen Fluoreszenzaufnahme der Nuklei überlagert. Zellkerne wurden von CellProfiler detektiert und gezählt und Zellen mit mindestens drei Nuklei wurden als Osteoklasten definiert. Außerdem wurde die Anzahl der Nuklei pro Osteoklast, die jeweilige Fläche der Osteoklasten sowie der Anteil aller Nuklei, die in Osteoklasten liegen, bestimmt. Osteoklasten an der Bildgrenze wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Darstellung als Box-Plots der ermittelten Werte pro Bild, zusammengefasst von allen Experimenten und Replikaten, und die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism.

### 2.5.2 Immunfluoreszenzfärbung von Pluripotenzmarkern

In einer CellCarrier™ 96-Well Imaging-Platte kultivierte adhärenz iPS wurden mittels Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit fixiert sowie permeabilisiert. Die Pluripotenzmarker OCT3/4, TRA-1-60, SSEA4 und NANOG sowie die Nuklei dieser Zellen wurden mit den in Tabelle 2.5 aufgelisteten Antikörpern und Hoechst 33342 wie in Hennig et al. 2019 beschrieben gefärbt.

### 2.5.3 Immunfluoreszenzfärbung für Durchflusszytometrie

Für die FACS-Analyse der Pluripotenz- und Keimblattmarker von nativen und differenzierten iPS wurden diese fixiert, permeabilisiert und mit den in Tabelle 2.5 aufgelisteten Antikörpern wie bereits beschrieben gefärbt (Hennig et al. 2019).

Um den HA-Tag des eingebrachten *Cln7*-Transgens in editierten iPS bzw. HSPCs detektieren zu können, wurden diese Zellen mithilfe des Inside Stain Kits fixiert, permeabilisiert und anschließend entsprechend dem Herstellerprotokoll mit dem Anti-HA-FITC-Antikörper (siehe Tabelle 2.5) gefärbt.

Alle durchflusszytometrischen Daten wurden mit dem MACSQuant® VYB aufgenommen und mit FlowJo analysiert. Für die Analyse wurden Zelltrümmer und -doubletten wie in Abb. A.1 im Anhang dargestellt ausgeschlossen.



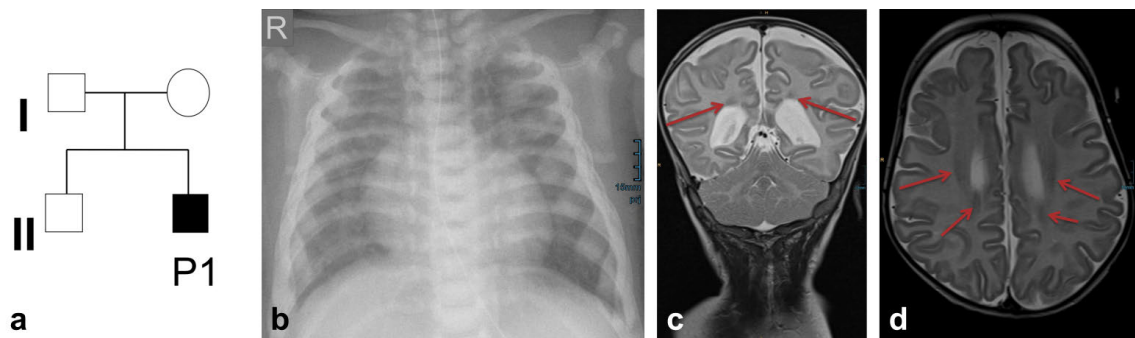
## 3 Ergebnisse

Für die Entwicklung neuer gentherapeutischer Ansätze zur Heilung der autosomal-rezessiven Osteopetrose sollte zunächst ein Krankheitsmodell geschaffen werden. Die Reprogrammierung differenzierter Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen ermöglicht eine unerschöpfliche Quelle patientenspezifischer Zellen, die sich gezielt in verschiedene Zelltypen entwickeln lassen. Ziel dieser Arbeit war es daher, zunächst aus PBMCs eines ARO-Patienten iPS zu generieren, die dann zum Zweck der Krankheitsmodellierung in Osteoklasten differenziert werden sollten. Nach erfolgreicher Etablierung sollte das iPS-basierte ARO-Krankheitsmodell genutzt werden, um gentherapeutische Strategien für ARO, basierend auf der CRISPR/Cas9-Genomeditierung, zu entwickeln und dessen Wirksamkeit zu untersuchen.

### 3.1 Generierung und Charakterisierung der humanen Zelllinie ARO-iPS

#### 3.1.1 Compound-heterozygote Mutation im *CLCN7*-Gen führt zu ARO

In einem Kind gesunder, nicht konsanguiner Eltern (siehe Stammbaum in Abb.3.1-a) wurde nach Verdacht auf Osteopetrose aufgrund vermehrter Knochendichte und angedeutetem „bone-in-bone-sign“ der Schulterblätter (siehe Röntgenthorax in Abb.3.1-b) eine Compound-Heterozygotie des *CLCN7*-Gens identifiziert, bestehend aus zwei Missense-Mutationen: maternal c.875G>A (p.G292E) sowie paternal c.1208G>A (p.R403Q). Letztere wurde bereits in einem ARO-Patienten beschrieben (Pangrazio et al. 2010), wohingegen die andere Mutation in der Literatur noch unbekannt ist. Aufgrund dieses Befundes konnte



**Abbildung 3.1: Stammbaum und Klinik des Patienten mit ARO.** (a) Familienstammbaum des männlichen Indexpatienten P1. (b) Röntgenaufnahme des Thorax im 7. Lebensmonat mit vermehrter Knochendichte und angedeutetem „bone-in-bone-sign“ der Schulterblätter. Schädel-MRT im 4. Lebensmonat ((c) T2w coronal und (d) T2w transversal) zeigt geringe Hirnvolumenminderung und laminäre subependymale Heterotopien (siehe rote Pfeile). Unveröffentlichte Daten von Boiti et al. 2016.

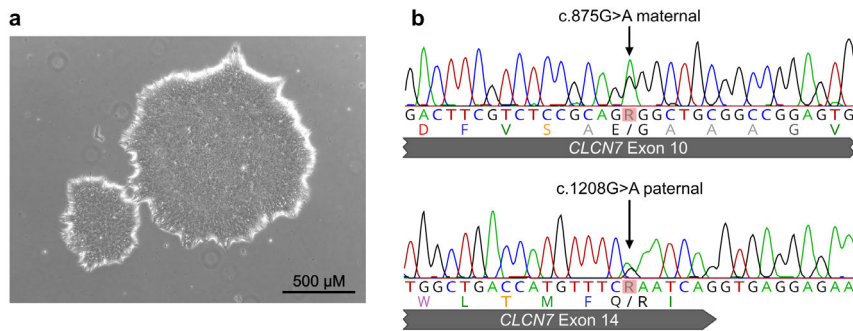
die vermutete Diagnose der ARO bestätigt werden. Da sich die pathogenen Mutationen im *CLCN7*-Gen befinden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine osteoklastenreiche ARO handelt. Untypischerweise zeigte dieser Patient keine Störung der Hämatopoese, jedoch eine schwere neurologische Verlaufsform. Diese war gekennzeichnet durch eine komplexe Entwicklungsstörung, geringe Hirnvolumenminderung und leicht erweiterte äußere Liquorräume sowie laminäre subependymale Heterotopien (Abb. 3.1-c und -d). Außerdem zeigte sich bereits ab dem 3. Lebensmonat eine schwere epileptische Enzephalopathie und im 8. Lebensmonat eine progrediente Hirnatrophie mit zunehmendem Hydrozephalus. Der junge Patient verstarb schließlich im Alter von 14 Monaten (Boiti et al. 2016, unveröffentlichte Daten).

#### 3.1.2 ARO-iPS haben normale Stammzellmorphologie und patientenspezifische *CLCN7*-Mutationen

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes des oben beschriebenen Patienten wurden mithilfe der nicht-integrierenden viralen Sendai-Expressionsvektoren mit den enthaltenen Genen der Yamanaka-Faktoren Oct3/4, Sox2, cMyc und Klf4 reprogrammiert. Die Zelllinie BIHi002-A (im Folgenden ARO-iPS genannt) stammt von einer einzelnen Kolonie, die nach der Reprogrammierung isoliert und expandiert wurde (Hennig et al. 2019). Wie in Abb. 3.2-a zu sehen ist, zeigten kultivierte ARO-iPS die für pluripotente Stammzellen typische Kolonienmorphologie. Die patienten-

### 3.1 Generierung und Charakterisierung der humanen Zelllinie ARO-iPS

spezifischen *CLCN7*-Mutationen konnten mittels Sequenzierung in den generierten ARO-iPS nachgewiesen werden (dargestellt in Abb. 3.2-b).



**Abbildung 3.2: Morphologie und Zellidentität der generierten patientenspezifischen iPS-Linie BIHi002-A (ARO-iPS).** (a) Phasenkontrastaufnahme der morphologisch typischen iPS-Kolonien der ARO-iPS. (b) Sequenzierung der patientenspezifischen Mutationen c.875G>A (p.G292E) in *CLCN7* Exon 10 und c.1208G>A (p.R403Q) in *CLCN7* Exon 14 in ARO-iPS. Modifiziert nach Hennig et al. 2019.

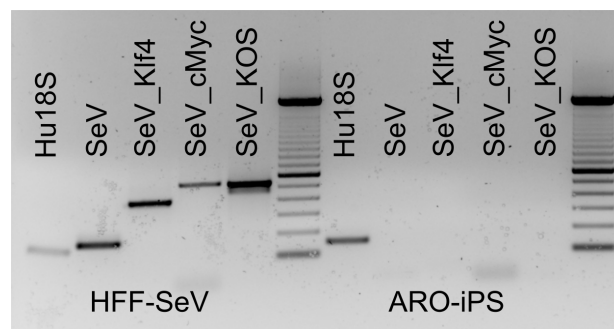
Die Zellidentität wurde außerdem mithilfe einer Mikrosatellitenanalyse von 10 genomischen Loci überprüft. Wie in Tabelle 3.1 zu sehen ist, stimmten beide Allele der generierten ARO-iPS mit denen des Ausgangsmaterials (ARO-PBMCs) in allen 10 getesteten Loci zu 100% überein.

**Tabelle 3.1: Mikrosatellitenanalyse von ARO-PBMCs und generierten ARO-iPS.** Gezeigt sind die Anzahlen der Mikrosatelliten-Wiederholungen der 10 analysierten Loci für beide Allele der getesteten Zellen.

Lokus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	AMEL
ARO-PBMCs	11	8	11	10	6	8	10	29	17	X
	11	10	12	12	9,3	11	12	31,2	18	Y
ARO-iPS	11	8	11	10	6	8	10	29	17	X
	11	10	12	12	9,3	11	12	31,2	18	Y

### 3.1.3 Die generierte iPS-Zelllinie ARO-iPS ist frei von Reprogrammierungsvektoren

In Passage 9 der generierten ARO-iPS wurde mittels RT-PCR nachgewiesen, dass die Zelllinie frei von den verwendeten Sendai-Reprogrammierungsvektoren ist. Wie in Abb. 3.3 zu sehen ist, wurde die humane 18S rRNA als interne Kontrolle amplifiziert und humane Vorhautfibroblasten, die mit den Sendai-Vektoren transduziert wurden, dienten als Positivkontrolle für die Reprogrammierungsvektoren.



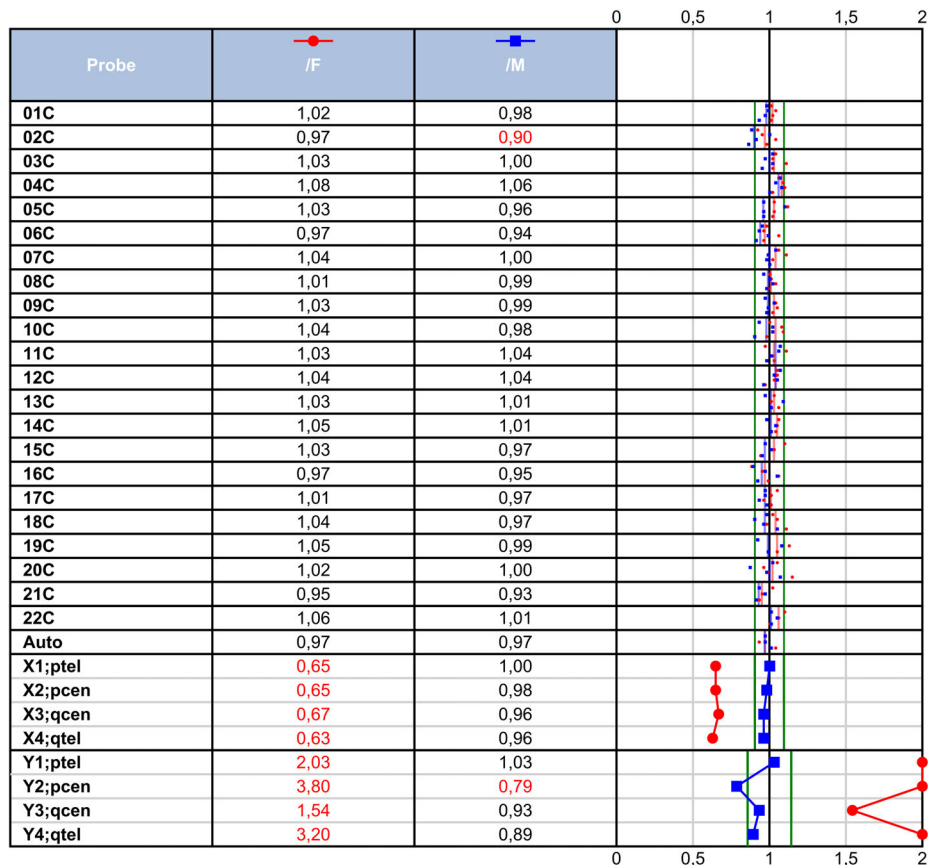
**Abbildung 3.3: RT-PCR zum Nachweis der Sendai-Reprogrammierungsvektoren.** Die Gelelektrophorese-Aufnahme der RT-PCR zeigt keine nachweisbaren Reprogrammierungsvektoren in Passage 9 der generierten ARO-iPS. Positivkontrollen sind humane 18S rRNA (Hu18S) und RNA von humanen Vorhautfibroblasten, die mit den Sendai-Vektoren transduziert wurden (HFF-SeV). Modifiziert nach Hennig et al. 2019.

### 3.1.4 ARO-iPS haben einen normalen Karyotyp

Für die Überprüfung der genomischen Integrität wurden die Chromosomen der Zelllinie ARO-iPS einer Karyotypanalyse mittels KaryoLite™ BoBs™ unterzogen. Dabei werden chromosomale Regionen des zu untersuchenden Genoms an künstliche Bakterienchromosomen (BACs) hybridisiert, die wiederum an Fluorochrom-gekoppelte Beads gebunden sind („BACS-on-Bead™ (BoBs™)“-Technologie, Vialard et al. 2011, Lund et al. 2012). Indem die zu untersuchende DNA (hier die der ARO-iPS) mit weiblicher (rot) und männlicher (blau) Kontroll-DNA mit jeweils normalen Karyotypen verglichen wird, ermöglicht diese fluoreszenzbasierte Methode eine relative Quantifi-

### 3.1 Generierung und Charakterisierung der humanen Zelllinie ARO-iPS

zierung der chromosomalen Bereiche. Wie die Ergebnisse in Abb. 3.4 zeigen, konnten in den ARO-iPS keine chromosomalen Aneuploidien festgestellt werden (Karyotyp 46,XY).

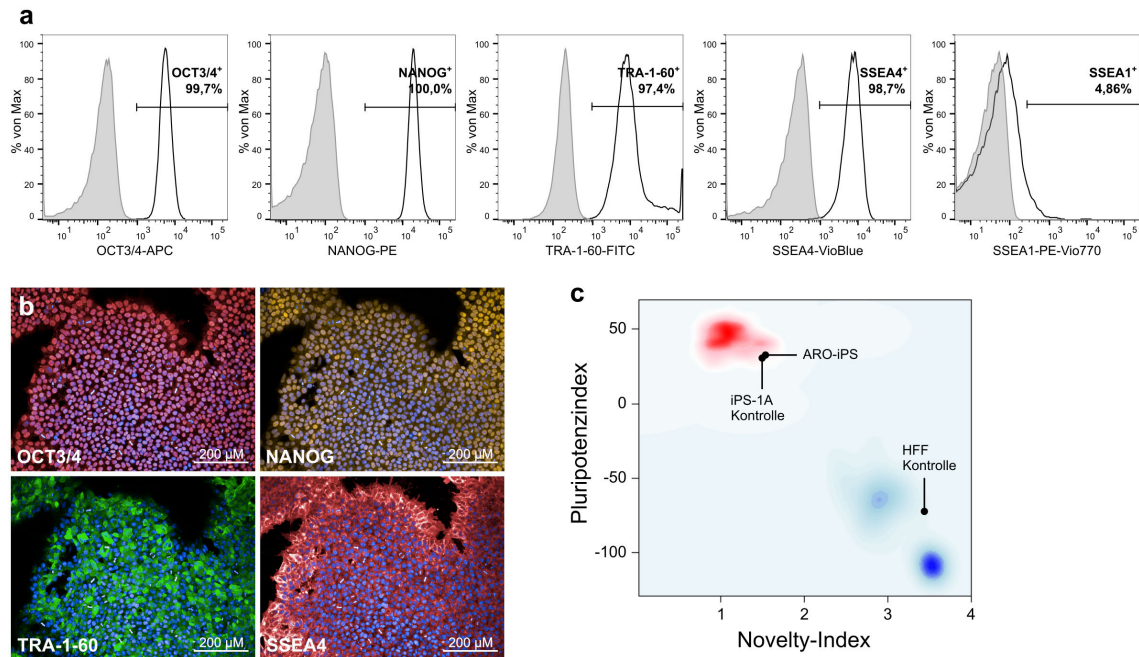


**Abbildung 3.4: Zytogenetische Analyse der ARO-iPS.** Für die Chromosomenanalyse mittels KaryoLite™ BoBs™ wurde DNA von ARO-iPS mit weiblicher (rot) und männlicher (blau) Kontroll-DNA mit normalen Karyotypen verglichen. Karyotyp von ARO-iPS: 46,XY. Modifiziert nach Hennig et al. 2019.

#### 3.1.5 ARO-iPS sind pluripotent

Zur Überprüfung der Pluripotenz der generierten Patientenzelllinie ARO-iPS wurden zunächst Pluripotenzmarker der Zellen immunfluoreszent gefärbt, sowohl in Einzelzellsuspension zur anschließenden quantitativen FACS-Analyse (siehe Abb.3.5-a) als auch in adhärennten Zellverbänden (siehe Abb.3.5-b). Wie

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.5: Pluripotenznachweise der ARO-iPS.** (a) Quantitative Einzelzellanalyse der Proteinexpression von Differenzierungs- (SSEA1) und Pluripotenzmarkern (OCT3/4, NANOG, TRA-1-60 und SSEA4) in ARO-iPS mittels FACS. Zelltrümmern und -dubletten wurden wie in Abb. A.1 gezeigt von der Analyse ausgeschlossen. Dargestellt sind gefärbte (schwarz) und ungefärbte Zellen (grau, Negativkontrolle). (b) Immunfluoreszenzaufnahmen von adhären ARO-iPS. Gefärbt sind Nuklei (blau) sowie die Pluripotenzmarker OCT3/4 (rot), NANOG (gelb), TRA-1-60 (grün) und SSEA4 (rot). (c) Transkriptomanalyse mittels Microarray und PluriTest. Bioinformatische Transkriptomanalyse sowie Grafikerstellung erfolgte mittels PluriTest-Webtool (Müller et al. 2011, <https://pluritest.org>). (a)–(c) modifiziert nach Hennig et al. 2019.

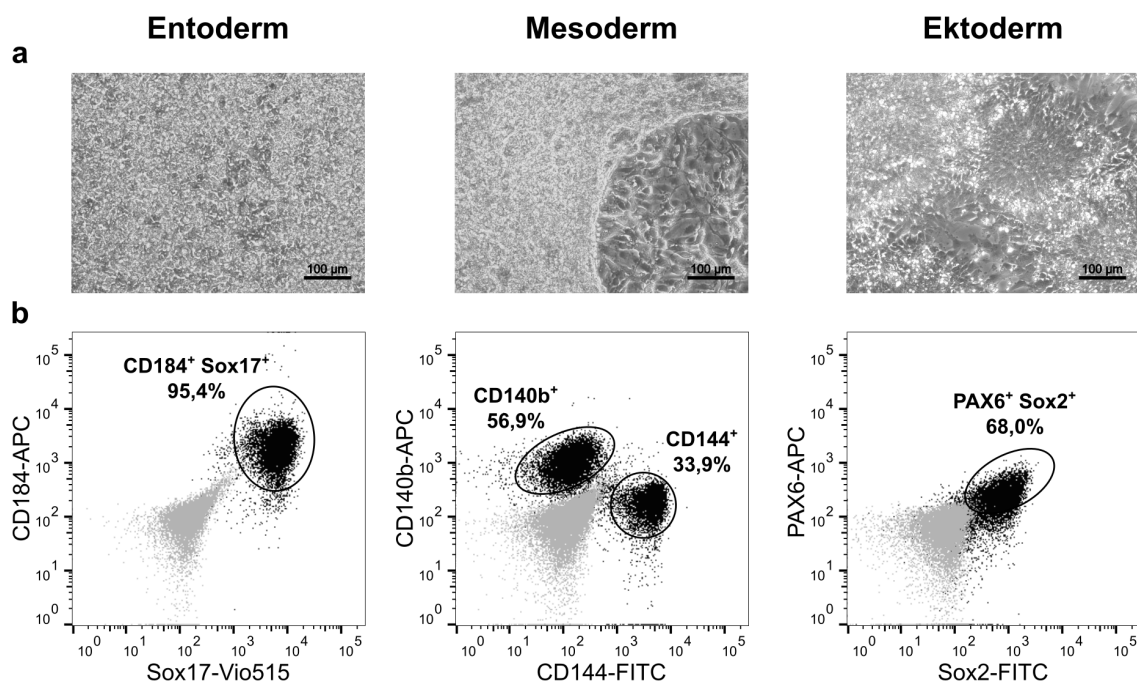
die FACS-Analyse der gefärbten ARO-iPS zeigt, waren nur weniger als 5% der iPS positiv für den Differenzierungsmarker SSEA1, wohingegen nahezu alle Zellen (97–100%) jeweils die pluripotenzspezifischen Marker OCT3/4, NANOG, TRA-1-60 oder SSEA4 exprimierten. Der Nachweis des pluripotenten Status der ARO-iPS anhand dieser Pluripotenzmarker wurde durch die Immunfluoreszenz (Abb. 3.5-b) bestätigt. Für eine detailliertere Beurteilung der pluripotenzspezifischen Genexpression wurde außerdem ein Microarray durchgeführt, dessen Transkriptomdaten mithilfe des PluriTest-Algorithmus (Müller et al. 2011, <https://pluritest.org>) ausgewertet wurden. Bei dieser bioinformatischen Analyse wird das Genexpressionsprofil der zu analysierenden Zelllinie mit einem datenbasierten Pluripotenzmodell verglichen. Dieses Modell wurde anhand einer Vielzahl von analysierten Transkriptomen bereits validierter pluripotenter Stammzellen erstellt. Als Analyseresultat werden der Pluripotenz- und Novelty-Index für die analysierte Zelllinie bestimmt. Der Pluripotenzindex ist



### 3.1 Generierung und Charakterisierung der humanen Zelllinie ARO-iPS

dabei ein Maß für die Hochregulation pluripotenzassoziierter Gene, während der Novelty-Index aussagt, wie stark das analysierte Genexpressionsprofil von dem des Pluripotenzmodells abweicht (Peterson et al. 2011). Wie in Abb. 3.5-c zu sehen ist, bestätigen der hohe Pluripotenz- sowie der niedrige Novelty-Indexwert die Pluripotenz der ARO-iPS.

Das Differenzierungspotenzial der generierten iPS-Zelllinie wurde mittels gezielter Keimblattendifferenzierung überprüft. Dazu wurden ARO-iPS in entodermale, mesodermale sowie ektodermale Zellen differenziert (siehe Phasenkontrastaufnahmen in Abb. 3.6-a). Anschließend wurden keimblattspezifische Proteine der differenzierten Zellen immunfluoreszent gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Wie in Abb. 3.6-b zu sehen ist, konnte die erfolgreiche Keimblattendifferenzierung durch den jeweils hohen Anteil an entodermalen (CD184<sup>+</sup> Sox17<sup>+</sup>), mesodermalen (CD140b<sup>+</sup> oder CD144<sup>+</sup>) bzw. ektodermalen (PAX6<sup>+</sup> Sox2<sup>+</sup>) Zellen bestätigt werden.

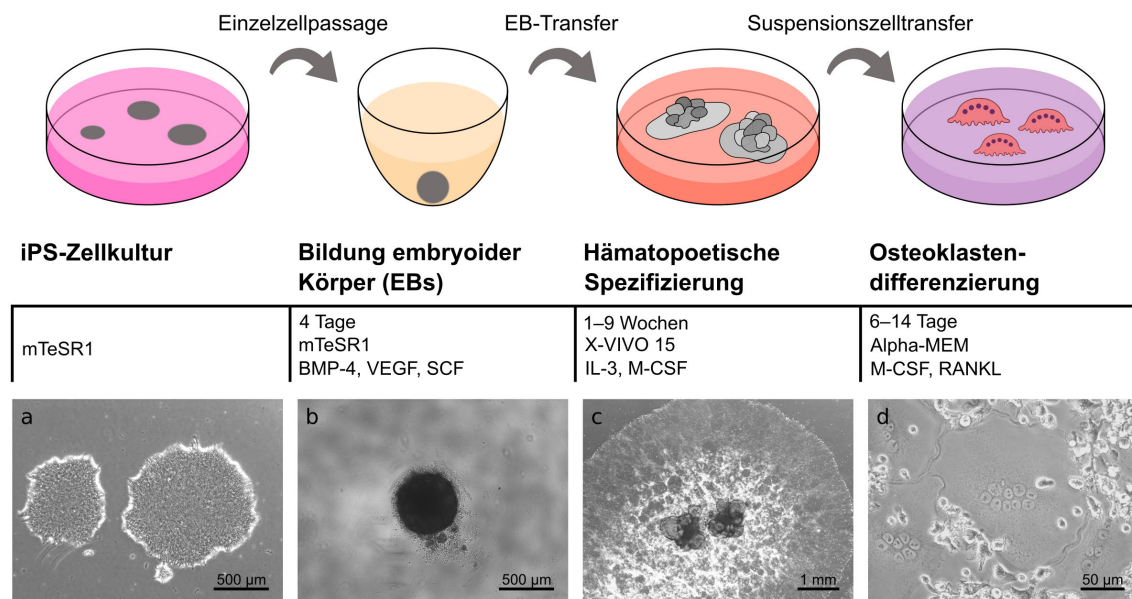


**Abbildung 3.6: Keimblattendifferenzierung der ARO-iPS.** (a) Phasenkontrastaufnahmen der aus den ARO-iPS differenzierten Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm. (b) FACS-Analyse der keimblattspezifischen Proteinexpression der differenzierten ARO-iPS. Zelltrümmer und -dubletten wurden wie in Abb. A.1 gezeigt von der Analyse ausgeschlossen. Dargestellt sind gefärbte (schwarz) und ungefärbte Zellen (grau, Negativkontrolle). Modifiziert nach Hennig et al. 2019.

## 3.2 Etablierung eines iPS-basierten Krankheitsmodells für osteoklastenreiche ARO

### 3.2.1 Entwicklung eines Protokolls zur Differenzierung von iPS in Osteoklasten

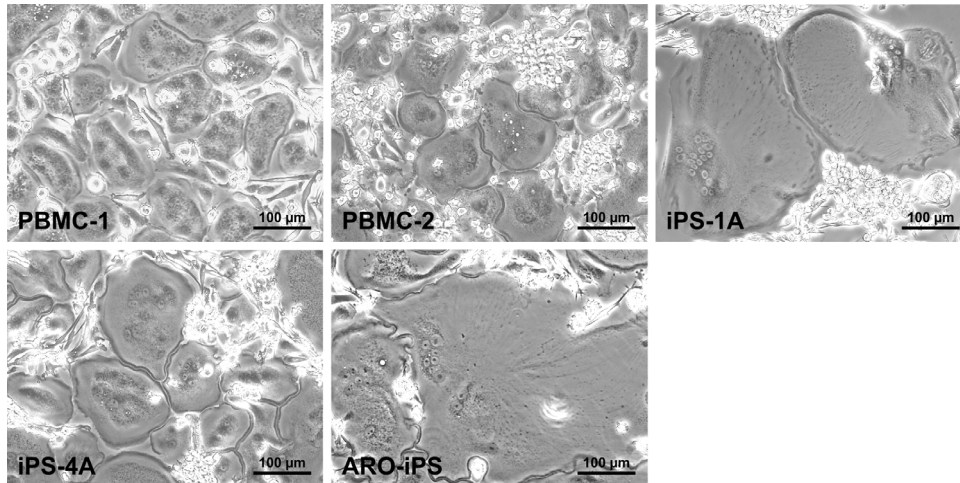
Um die generierte Patientenzelllinie ARO-iPS als Krankheitsmodell für osteoklastenreiche ARO nutzen zu können, ist eine Differenzierung dieser in Osteoklasten nötig. Zu diesem Zweck entwickelte meine Kollegin Uta Rössler ein Differenzierungsprotokoll, das in Abb.3.7 veranschaulicht ist. Ausgehend von einer iPS-Kultur, die in mTeSR1-Medium gehalten wird, werden im ersten Schritt embryoiden Körper („embryoid bodies“, EBs) gebildet, in deren Zellen für vier Tage mittels der Zytokine BMP-4, VEGF und SCF eine mesodermale Differenzierung induziert



**Abbildung 3.7: Schematisches Protokoll zur Differenzierung von iPS in Osteoklasten.** Ausgehend von iPS-Kulturen in mTeSR1-Medium erfolgt die Bildung embryoider Körper (EBs) sowie die Induktion des Mesoderms für 4 Tage in mTeSR1-Medium, supplementiert mit BMP-4, VEGF und SCF. Anschließend erfolgt die hämatopoetische Spezifizierung und Expansion für 1–9 Wochen in X-VIVO-15-Medium mit IL-3 und M-CSF. Die dabei entstehenden monozytären Suspensionszellen werden für 6–14 Tage in Alpha-MEM-Medium mit M-CSF und RANKL zu Osteoklasten differenziert. Phasenkontrastaufnahmen der Differenzierungskultur zeigen iPS-Kolonien (a), einen EB (b), zwei monozytenproduzierende Komplexe (c) und differenzierte Osteoklasten (d). Adaptiert von Uta Rössler.

### 3.2 Etablierung eines iPS-basierten Krankheitsmodells für osteoklastenreiche ARO

wird. Anschließend bilden sich aus gereiften EBs unter hämatopoetischen Kulturbedingungen (X-VIVO-15-Medium supplementiert mit IL-3 und M-CSF) adhärenente Komplexe aus, die über mehrere Wochen kontinuierlich monozytäre Zellen produzieren. Diese Suspensionszellen können geerntet und unter Verwendung der Zytokine M-CSF und RANKL in Alpha-MEM-Medium zu Osteoklasten differenziert werden.



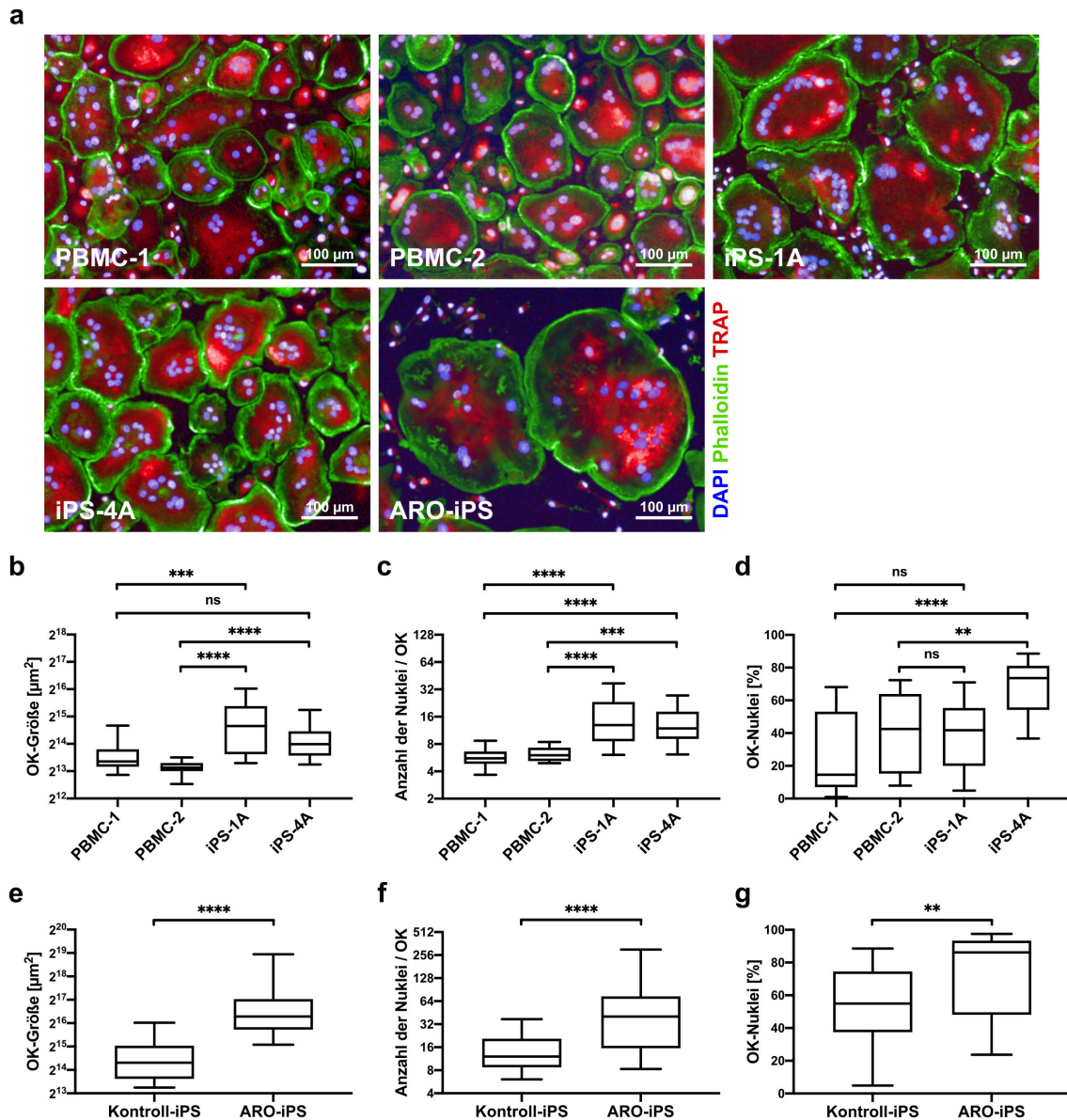
**Abbildung 3.8: Phasenkontrastaufnahmen differenzierter PBMC- und iPS-Osteoklastenkulturen.** Aus PBMCs angereicherte Monozyten (PBMC-1 und -2) und die iPS-Linien iPS-1A, iPS-4A und ARO-iPS wurden in OKs differenziert. PBMCs sowie iPS-1A und iPS-4A sind gesunde Kontrollen.

Im Folgenden wurde untersucht, ob von iPS stammende Osteoklasten vergleichbar zu *in vitro* differenzierten primären Osteoklasten sind und ob sich der erwartete osteopetrotische Osteoklastenphänotyp auch in den erzeugten ARO-iPS zeigt. Dazu wurden aus PBMCs angereicherte Monozyten von zwei gesunden Blutspendern (PBMC-1 und -2), zwei Kontroll-iPS-Linien (iPS-1A und iPS-4A) ebenfalls gesunder Spender sowie die Patientenzelllinie ARO-iPS in Osteoklasten differenziert. Phasenkontrastaufnahmen beispielhafter Osteoklastenkulturen sind in Abb. 3.8 dargestellt. Generell war die Morphologie von primären und iPS-basierten Osteoklasten vergleichbar. Auffallend waren jedoch die unterschiedlichen Größen der Osteoklasten. ARO-iPS bildeten häufig überdurchschnittlich große Osteoklasten, die nicht selten an die 100 oder mehr Nuklei aufwiesen. Ein Teil eines solchen Riesenosteoklasten ist auch in Abb. 3.8 zu sehen. Osteoklasten der Kontrollzelllinien iPS-1A und iPS-4A zeigten ebenfalls eine Tendenz zu einer vergrößerten Fläche, wenn auch in deutlich geringerem Umfang als bei Osteoklasten der ARO-iPS.

#### 3.2.2 Vergleichbare Morphologie von iPS- und primären PBMC-Osteoklasten

Aufgrund dieser beobachteten Größenunterschiede wurden verschiedene Parameter der Osteoklastenmorphologie quantifiziert. Dies erfolgte anhand von Osteoklastendifferenzierungen der oben genannten Monozyten und iPS-Zelllinien, die zu vergleichbaren Zeitpunkten fixiert und zytochemisch gefärbt wurden. Repräsentative Beispiele dieser Osteoklastenfärbungen sind in Abb. 3.9-a zu sehen. Auch gefärbte primäre und iPS-basierte Osteoklasten stimmten grundsätzlich in der Zellmorphologie überein. Osteoklasten beider Ursprünge, inklusive der ARO-iPS, wiesen zahlreiche Nuklei, einen deutlichen Aktinring sowie eine starke TRAP-Färbung auf. Wie anhand der Quantifizierung der Osteoklastengröße in Abb. 3.9-b zu sehen ist, waren jedoch aus iPS differenzierte Osteoklasten wie erwartet etwas größer als primäre Osteoklasten. Dieses Phänomen ist noch deutlicher sichtbar bei der Betrachtung der Verteilung der Osteoklastengröße der Gesamtheit der analysierten Osteoklasten aller Experimente (Abb. A.2-a im Anhang). Jedoch scheint es abhängig von der Zelllinie zu sein, da dieser Unterschied kaum bei Osteoklasten der Zelllinie iPS-4A (Kruskal-Wallis-Test, Dunns multipler Mittelwertvergleich PBMC-1 vs. iPS-4A  $P = 0,06$ ), jedoch deutlich bei Osteoklasten der anderen Kontrollzelllinie iPS-1A sichtbar war (Kruskal-Wallis-Test, Dunns multipler Mittelwertvergleich PBMC-1 vs. iPS-1A  $P = 0,0009$ ). Entsprechend den unterschiedlichen Osteoklastengrößen der verschiedenen Zelltypen waren auch signifikante Unterschiede zwischen den Anzahlen der Nuklei pro Osteoklast sichtbar (Abb. 3.9-c, Abb. A.2-b im Anhang). Aus iPS differenzierte Osteoklasten wiesen signifikant mehr Nuklei auf als primäre Osteoklasten. Um beurteilen zu können, wie effizient die Osteoklastendifferenzierung aus iPS im Vergleich zu primären Zellen ist, wurde außerdem der Anteil aller gefärbten Nuklei bestimmt, die in Osteoklasten liegen (siehe Abb. 3.9-d). Während sich ähnlich viele iPS-Monozyten der Kontrollzelllinie iPS-1A zu Osteoklasten entwickelten wie primäre Monozyten (bis zu 70%, Median 42%), war der Anteil der zu Osteoklasten differenzierten Zellen bei der Kontrollzelllinie iPS-4A signifikant höher als der der primären Monozyten (bis zu 89%, Median 74%). Erwartungsgemäß waren im Vergleich zu den Kontroll-iPS bei der Patientenzelllinie ARO-iPS signifikant größere Osteoklasten mit mehr Nuklei zu beobachten (siehe Abb. 3.9-e und -f, Mann-Whitney-Test  $P \leq 0,0001$ ). Im Mittel waren die Osteoklasten der ARO-iPS vier Mal größer und hatten drei Mal mehr Nuklei als die der Kontroll-iPS (Vergleich der Mediane). Auch war der Anteil der zu Osteoklasten differenzierten Zellen bei ARO-iPS signifikant höher als bei iPS gesunder Spender (Abb. 3.9-g, Mann-Whitney-Test  $P = 0,007$ ).

### 3.2 Etablierung eines iPS-basierten Krankheitsmodells für osteoklastenreiche ARO



**Abbildung 3.9: Quantitative Analyse von differenzierten PBMC- und iPS-Osteoklasten.** Aus PBMCs angereicherte Monozyten (PBMC-1 und -2) und die iPS-Linien iPS-1A, iPS-4A und ARO-iPS wurden in OKs differenziert und je 4 Tage nach Beobachtung der ersten differenzierten OKs fixiert und gefärbt. PBMCs sowie die Zelllinien iPS-1A und iPS-4A sind gesunde Kontrollen. **(a)** Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen gefärbter OKs. Blau: DAPI (Nuklei), grün: Phalloidin (Aktin), rot: TRAP. **(b)–(g)** Quantifizierung der gefärbten OKs. Dargestellt sind zusammenfasste Daten von je 3 Experimenten mit jeweils 3 technischen Replikaten (Min., 1. Quartil, Median, 3. Quartil, Max.). Kontroll-iPS entsprechen den zusammenfassten Daten von iPS-1A und iPS-4A. **(b)**, **(e)** Größe der OK-Fläche. **(c)**, **(f)** Anzahl der Nuklei pro OK. **(d)**, **(g)** Anteil der Nuklei, die in OKs liegen. Statistische Analyse: **(b)–(d)** Kruskal-Wallis-Test, Dunns multipler Mittelwertvergleich. **(e)–(g)** Mann-Whitney-Test.  $P > 0,05$  (ns),  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*),  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*).

### 3.2.3 Resorptionsdefekt der ARO-iPS-Osteoklasten und vergleichbare Resorptionsfunktion der iPS- und PBMC-Kontrollosteoklasten

Im Zusammenhang mit osteoklastenreicher ARO ist das wichtigste Analysemerkmal der Osteoklasten ihre Resorptionsfunktion. Um diese analysieren zu können, wurden differenzierte PBMC- und iPS-Osteoklasten für fünf Tage auf Knochenscheiben kultiviert. Anschließend identifizierte und vermaß unser Kooperationspartner Jacob Bastholm Olesen die entstandenen unterschiedlichen Resorptionsformen auf den Knochenscheiben. Beispiele der verschiedenen Resorptionsformen (gruben- und kanalförmige Resorption sowie Pseudoresorption) sind in Abb. 3.10-a zu sehen.

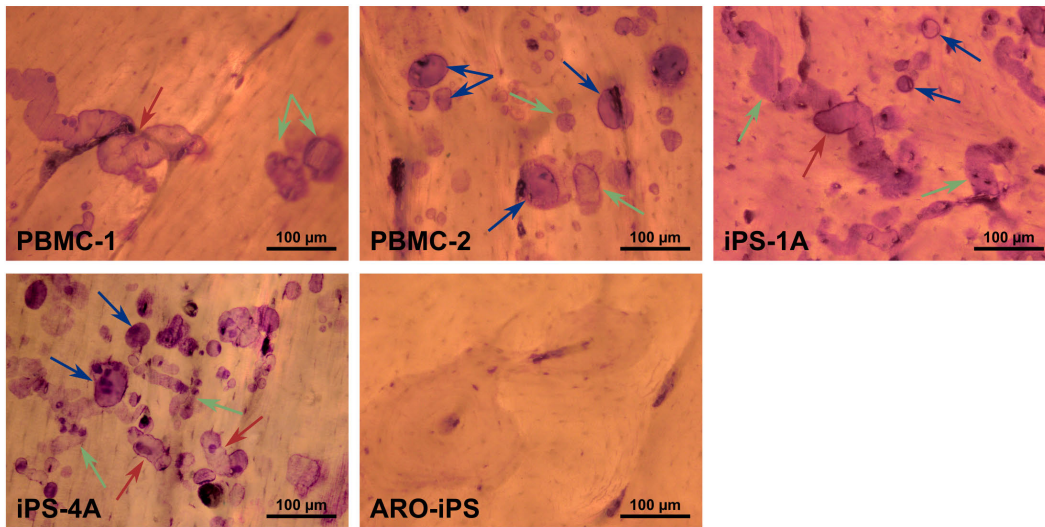
Auf allen Knochenscheiben, auf denen Osteoklasten gesunder Spender kultiviert wurden, konnte Resorption nachgewiesen werden. Das Erscheinungsbild der osteoklastenvermittelten Fraßspuren war zwischen primären und iPS-Osteoklasten vergleichbar. Wie erwartet zeigte sich jedoch keine Resorption, wenn Osteoklasten der ARO-iPS ausgesät wurden (siehe Abb. 3.10-a). Aus der Quantifizierung der erodierten Knochenoberfläche, die in Abb. 3.10-b und -d dargestellt ist, lässt sich schließen, dass PBMC- und iPS-Osteoklasten gesunder Spender eine vergleichbare Resorptionsaktivität aufwiesen, wenn auch in den iPS-Osteoklasten tendenziell bis signifikant mehr Pseudoresorption erkennbar war (Kruskal-Wallis-Test, Dunns multipler Mittelwertvergleich PBMC-1 vs. iPS-1A  $P=0,28$ , PBMC-2 vs. iPS-4A  $P=0,002$ ). Wie in Abb. 3.10-d zu erkennen ist, zeigten iPS-Osteoklasten, insbesondere die der Zelllinie iPS-4A, auch mehr kanalförmige Resorption als PBMC-Osteoklasten (Kruskal-Wallis-Test, Dunns multipler Mittelwertvergleich PBMC-1 vs. iPS-4A und PBMC-2 vs. iPS-4A  $P \leq 0,0001$ ).

Insgesamt hatten von iPS und PBMC stammende Osteoklasten mit den von uns entwickelten Protokollen ein vergleichbares Differenzierungs- und Resorptionsverhalten. Außerdem spiegelten sich der in den ARO-Patienten beschriebene Resorptionsdefekt der Osteoklasten sowie das Vorhandensein vergrößerter Osteoklasten in den differenzierten Osteoklasten der Patientenzelllinie ARO-iPS wider. Somit stellen ARO-iPS und die aus ihnen differenzierten Osteoklasten ein gutes Krankheitsmodell der ARO dar.

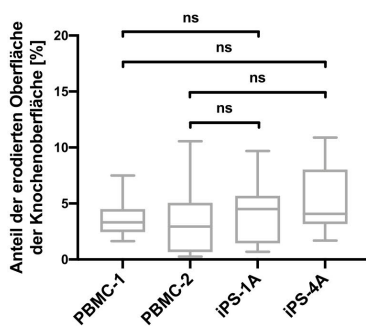


### 3.2 Etablierung eines iPS-basierten Krankheitsmodells für osteoklastenreiche ARO

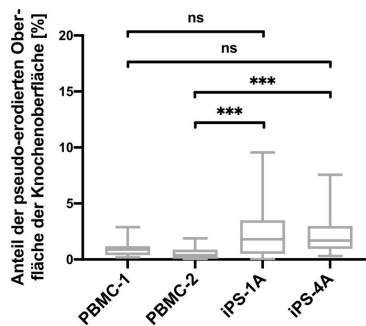
a



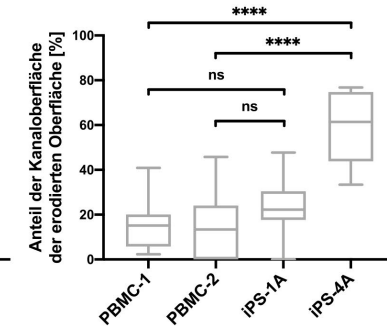
b



c



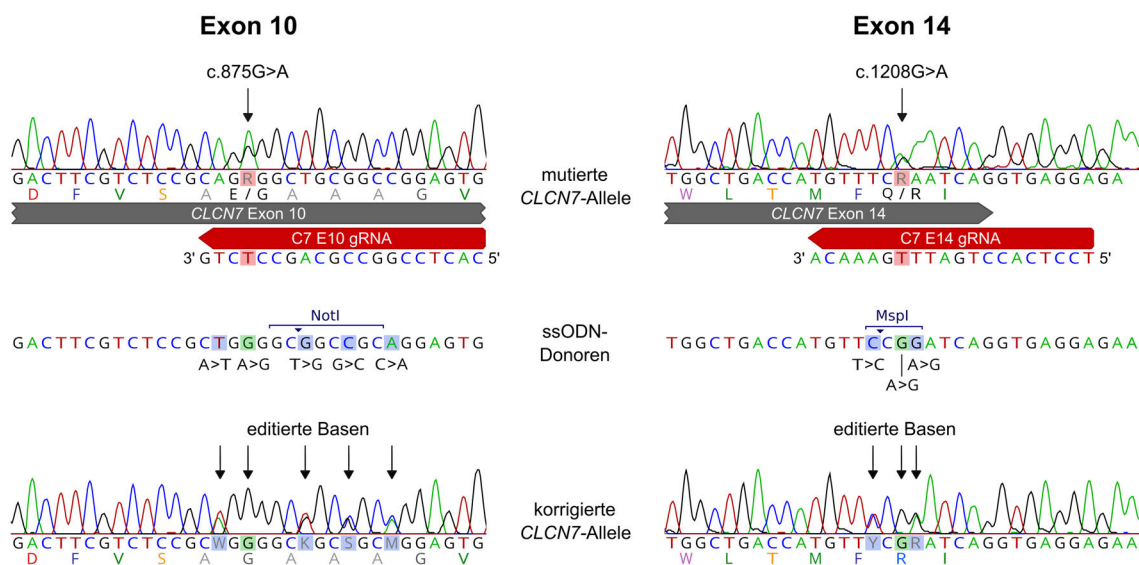
d



**Abbildung 3.10: Analyse der Knochenresorption von PBMC- und iPS-Osteoklasten.** Aus PBMCs angereicherte Monozyten (PBMC-1 und -2) und die iPS-Linien iPS-1A, iPS-4A und ARO-iPS wurden in OKs differenziert, auf Knochenscheiben transferiert und dort 5 Tage kultiviert. **(a)** Beispielhafte lichtmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Resorptionsformen. Roter Pfeil: kanalförmige Resorption, blauer Pfeil: grubenförmige Resorption, grüner Pfeil: Pseudoresorption. **(b)–(d)** Vertiefungen auf der Knochenoberfläche wurden entsprechenden Resorptionsformen zugeordnet und vermessen. Dargestellt sind zusammengefasste Daten von je 3 Experimenten (Min., 1. Quartil, Median, 3. Quartil, Max.), mit durchschnittlich 7 analysierten Knochenscheiben pro Experiment (minimal 3, maximal 12). **(b)** Anteil der erodierten Oberfläche (gruben- und kanalförmige Resorption) der Knochenoberfläche. **(c)** Anteil der pseudo-erodierten Oberfläche der Knochenoberfläche. **(d)** Anteil der kanalförmigen Resorption der erodierten Oberfläche. Statistische Analyse: **(b)–(d)** Kruskal-Wallis-Test, Dunns multipler Mittelwertvergleich.  $P > 0,05$  (ns),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*),  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*).

### 3.3 CRISPR/Cas9-basierte Mutationskorrektur in ARO-iPS

Ein möglicher gentherapeutischer Ansatz für ARO ist die patientenspezifische Mutationskorrektur mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems. Da bei dem im Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Patienten und der aus seinen PBMCs reprogrammierten ARO-iPS eine Compound-Heterozygotie des *CLCN7*-Gens vorliegt, ist es wichtig, die Genomeditierung allelspezifisch vorzunehmen. Aus diesem Grund wurden für beide *CLCN7*-Mutationen gRNAs designt, die bevorzugt das mutierte Allel binden, indem die mutierte Base Teil der gRNA-Zielsequenz ist und möglichst weit am 3'-Ende dieser liegt. Wie in Abb. 3.11 veranschaulicht ist, konnte für die Mutation in Exon 10 des *CLCN7*-Gens eine gRNA gefunden werden (im Folgenden C7 E10 gRNA genannt), in der die Mutation die vierte Base vor dem 3'-Ende der gRNA-Zielsequenz ist. Bei der gRNA für Exon 14 (C7 E14 gRNA) ist die Mutation die siebte Base vor dem 3'-Ende der gRNA-Zielsequenz. Für die HDR-vermittelten Mutationskorrekturen wurden



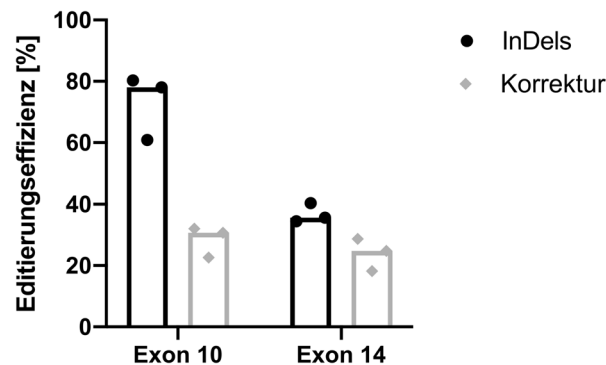
**Abbildung 3.11: Strategie zur CRISPR/Cas9-basierten Korrektur der *CLCN7*-Mutationen.** Die mutationsspezifischen gRNAs C7 E10 und C7 E14 ermöglichen die Cas9-vermittelte Induktion von DSBs bevorzugt auf dem jeweiligen mutierten *CLCN7*-Allel in Exon 10 bzw. 14. Mithilfe von ssODN-Donoren können diese DSBs von der Zelle durch HDR repariert werden, wodurch die *CLCN7*-Mutationen (roter Hintergrund) korrigiert (A>G, grüner Hintergrund) und stille heterozygote Nukleotidaustausche (blauer Hintergrund) eingebracht werden können. Durch diese Korrektur entstehen die Restriktionsschnittstellen NotI (Exon 10) und MspI (Exon 14).



außerdem DNA-Donoren in Form von einzelsträngigen Oligonukleotiden (ssODNs) designt. Wie in Abb.3.11 veranschaulicht ist, ermöglichen diese Donoren nicht nur eine Korrektur (A>G, grüner Hintergrund) der jeweiligen Mutation (roter Hintergrund), sondern auch das Einbringen stiller zusätzlicher Nukleotidaustausche (blauer Hintergrund), durch die jeweils eine Restriktionsschnittstelle entsteht. Die HDR wird dabei über je 60 bp lange Homologiearme gesteuert, deren Sequenzen identisch zu den Zielloci sind (nicht dargestellt). Im Fall einer erfolgreichen Editierung des lediglich mutierten Allels, läge das zuvor heterozygote mutierte Basenpaar nun homozygot in der Wildtypvariante vor, während die eingebrachten stillen Mutationen heterozygot vorhanden wären (siehe korrigierte *CLCN7*-Allele in Abb.3.11).

### 3.3.1 Effiziente Genomeditierung in ARO-iPS

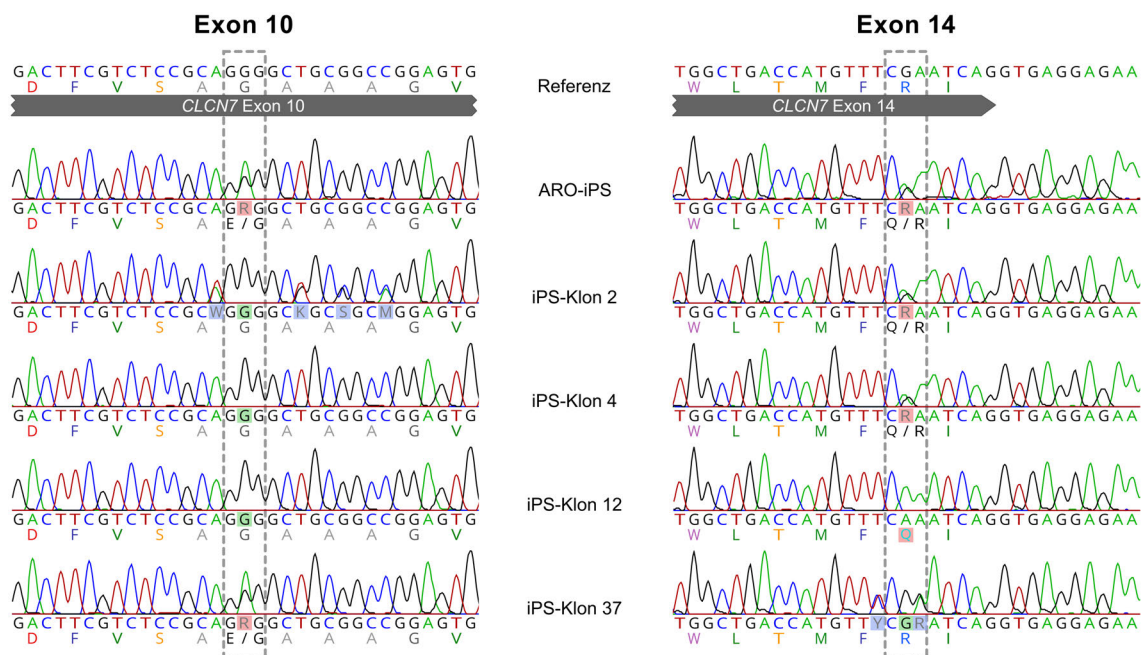
Für die separate Mutationskorrektur der *CLCN7*-Mutation in Exon 10 bzw. in Exon 14 wurde die jeweilige gRNA komplexiert mit dem Cas9-Protein als Ribonukleoprotein (RNP) gemeinsam mit dem entsprechenden ssODN-Donor mittels Transfektion in die ARO-iPS eingebracht. Eine Analyse der *CLCN7*-DNA-Sequenzen der



**Abbildung 3.12: TIDER-Analyse der *CLCN7*-Mutationskorrektur in editierten ARO-iPS.** Für *CLCN7* Exon 10 oder 14 spezifische Cas9-RNPs und ssODNs wurden in ARO-iPS transfiziert, 4 Tage später erfolgte die DNA-Isolation und Sequenzierung der *CLCN7*-Loci. Editierungseffizienzen wurden mithilfe des TIDER-Webtools bestimmt (Brinkman et al. 2018, <https://tider.deskgen.com>). Datenpunkte zeigen Werte unabhängiger Experimente (n=3), Balken sind Mediane. Schwarz: Anteil der Sequenzen mit InDels. Grau: Anteil der Sequenzen mit HDR-vermittelter Korrektur.

### 3 Ergebnisse

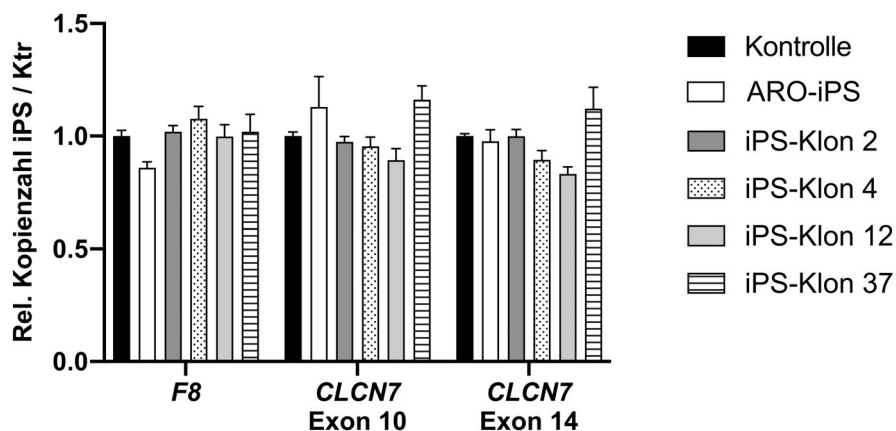
transfizierten Mischkultur mithilfe des TIDER-Algorithmus (Brinkman et al. 2018) ermöglichte die Identifizierung und Quantifizierung der Editierungsereignisse. Die Ergebnisse einer solchen TIDER-Analyse für die *CLCN7* Exons 10 und 14 sind jeweils beispielhaft im Anhang in Abb.A.3 und Abb.A.4 gezeigt. Indem die aberranten Sequenzen des editierten Lokus in der transfizierten Mischkultur (siehe untere Sequenz in Abb.A.3-a) mit der entsprechenden Referenzsequenz verglichen werden, lassen sich vorhandene Insertionen und Deletionen (InDels) und HDR-vermittelte Korrekturen vorhersagen und quantifizieren. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten sind in Abb. 3.12 zusammengefasst. In Exon 10 des *CLCN7*-Gens wurden in bis zu 80% der sequenzierten Allele InDels und in 23–32% der Fälle die gewünschte HDR-vermittelte Korrektur identifiziert. Damit war zu erwarten, dass nur wenige bis keine unveränderten Allele mehr vorhanden waren. Obwohl der Anteil an Sequenzen mit entstandenen InDels in Exon 14 nur halb so groß war, war die Korrekturreffizienz nur minimal geringer als in Exon 10 (18–29%). Nachdem die erfolgreichen und zugleich effizienten Mutationskorrekturen mittels TIDER-Analyse nachgewiesen werden konnten, wurden Einzelzellen der transfizierten Mischkulturen klonal expandiert. Für die Genotypisierung wurden die einzelnen iPS-Klone sequenziert.



**Abbildung 3.13: DNA-Sequenzen ausgewählter editierter iPS-Klone von *CLCN7* Exon 10 und 14.** Ausschnitte von den Exons 10 und 14 des *CLCN7*-Gens der gDNA von klonal expandierten editierten ARO-iPS wurden sequenziert. Mutierte Basen (c.875G>A und c.1208G>A) sind dargestellt mit rot, korrigierte Basen mit grünem und eingebrachte stille Mutationen mit blauem Hintergrund.

Die DNA-Sequenzen von den Exons 10 und 14 des *CLCN7*-Gens von vier ausgewählten Klonen sind in Abb. 3.13 abgebildet. Wie zu sehen ist, enthielten iPS-Klon 2 und 37 jeweils die gewünschte A>G Mutationskorrektur in *CLCN7* Exon 10 bzw. Exon 14 sowie heterozygot die stillen Mutationen. Klon 4 und 12 wiesen zwar die Mutationskorrektur in Exon 10 auf, jedoch keine stillen Mutationen. In Klon 12 lag die ARO-Mutation in Exon 14 außerdem homozygot vor. Somit stellte sich die Frage, ob diese beiden Klone einen Teil des maternalen *CLCN7*-Allels, auf dem auch die Mutation in Exon 10 (c.875G>A) liegt, verloren hatten oder ob das maternale Allel über HDR mithilfe des paternalen Allels korrigiert wurde.

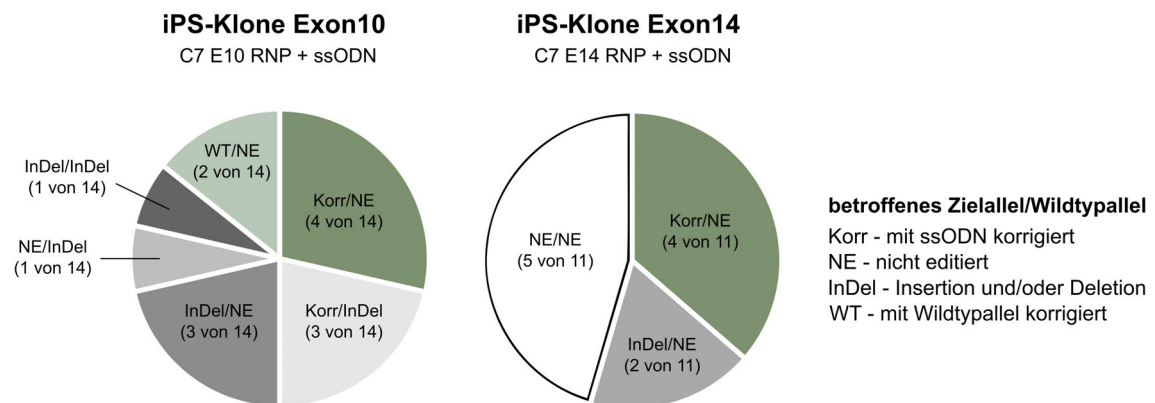
Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine Kopienzahlanalyse mittels quantitativer PCR genomischer DNA der Exons 10 und 14 des *CLCN7*-Gens sowie zur Kontrolle des X-chromosomalen *F8*-Gens durchgeführt. Wie die Ergebnisse in Abb. 3.14 zeigen, lag jedoch in keiner der getesteten Zelllinien eine Kopienzahlvariation vor. Es kann also davon ausgegangen werden, dass in den Klonen 4 und 12 eine Korrektur der Mutation in Exon 10 des *CLCN7*-Gens mithilfe des paternalen Wildtypallels stattgefunden hatte.



**Abbildung 3.14: Kopienzahlanalyse ausgewählter editierter iPS-Klone.** Quantitative PCR genomischer DNA der Exons 10 und 14 des *CLCN7*-Gens sowie des X-chromosomalen *F8*-Gens. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 technischen Replikaten der relativen Kopienzahl. Normalisierung zur endogenen Kontrolle sowie Kalibrierung zur Kontrolle (gDNA aus Blut, männlich).

Gemeinsam mit den identifizierten Genotypen der restlichen getesteten Klone (aufgelistet in Tabelle A.1 und Tabelle A.2 im Anhang) sind diese Ergebnisse in den Kreisdiagrammen der nachfolgenden Abbildung (Abb. 3.15) zusammengefasst. Aus

der transfizierten Mischkultur, in der die Editierung des Exons 10 des *CLCN7*-Gens vorgenommen wurde, sind 14 Klone hervorgegangen. Darunter befanden sich 9 Klone (64%), in denen das pathogene Zielallel korrigiert wurde. Allerdings enthielten 3 dieser Klone zusätzlich InDels auf dem Wildtypallel und 2 Klone wurden, wie oben bereits erwähnt, nicht mithilfe des Donors, sondern mit dem Wildtypallel korrigiert. Folglich konnte in 4 der 14 Klone (29%) die gewünschte ssODN-vermittelte Korrektur und gleichzeitig ein intaktes Wildtypallel nachgewiesen werden. Die restlichen 5 Klone (57%) zeigten Insertionen und Deletionen auf mindestens einem der Allele, wobei in nur einem der Klone nicht das pathogene Zielallel, sondern lediglich der Wildtyploкус editiert wurde. Somit wurde in jedem Klon mindestens ein Allel von Exon 10 editiert und es konnte kein Klon nachgewiesen werden, der den Genotyp der Ursprungszelllinie ARO-iPS trug. Insgesamt wurden in 13 der 14 (93%) pathogenen Ziellallele und in 5 der 14 (36%) Wildtyploci Cas9-induziert genetische Veränderungen herbeigeführt.



**Abbildung 3.15: Verteilung der *CLCN7*-Genotypen der editierten iPS-Klone.** Grafische Darstellung der Verteilung identifizierter iPS-Klongenotypen der editierten Exons 10 und 14 des *CLCN7*-Gens. Analytierte gDNA wurde aus klonal expandierten editierten ARO-iPS gewonnen. Positive Klone sind in Dunkelgrün, mit Wildtypallel korrigierte Klone in Hellgrün, Klone mit InDels auf mindestens einem Allel in Grau und nicht editierte Klone in Weiß dargestellt.

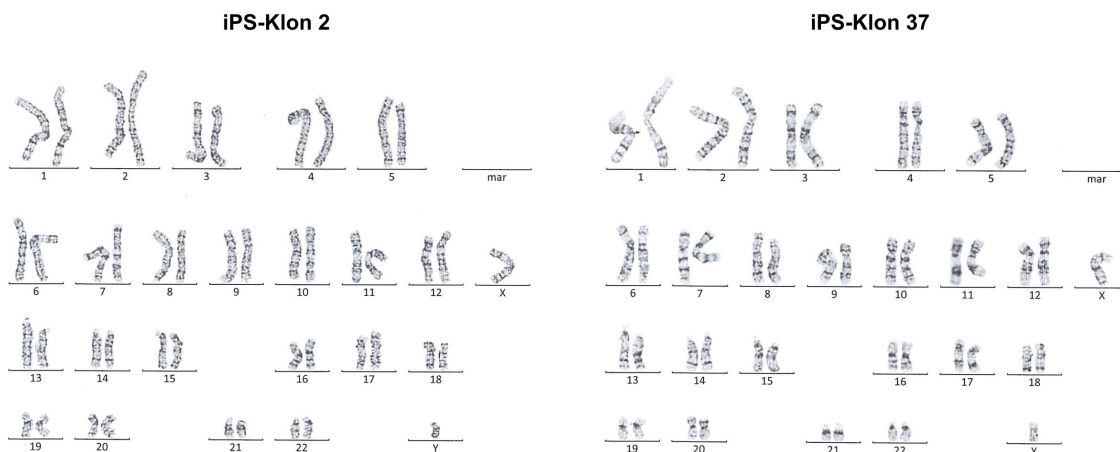
Die Editierung des *CLCN7* Exons 14 der ARO-iPS resultierte in 11 Klonen, von denen in 4 (36%) die gewünschte Mutationskorrektur stattgefunden hatte. Zwei der 11 Klone (18%) hatten eine Deletion auf dem pathogenen Zielallel, während die restlichen 5 Klone (45%) keine Editierung aufwiesen. Insgesamt wurden hier 6 der 11 (55%) betroffenen Ziellallele editiert, während alle Wildtypallele intakt blieben. Damit bestä-

tigen die Ergebnisse der Genotypisierung beider Korrekturansätze die der TIDER-Analyse der transfizierten Mischkulturen aus Abb. 3.12.

Im Folgenden wurde mit iPS-Klon 2 (Mutation c.875G>A in *CLCN7* Exon 10 wurde korrigiert) und iPS-Klon 37 (Mutation c.1208G>A in *CLCN7* Exon 14 wurde korrigiert) weitergearbeitet.

### 3.3.2 Genomintegrität der korrigierten iPS-Klone

Zunächst wurde die genomische Integrität beider korrigierter Klone untersucht. Dazu wurde zuerst eine zytogenetische Analyse Giemsa-gefärbter Metaphasenchromosomen beider iPS-Klone durchgeführt. Wie anhand der Karyogramme in Abb. 3.16 zu sehen ist, konnten sowohl im iPS-Klon 2 als auch im iPS-Klon 37 keine Aneuploidien festgestellt werden.



**Abbildung 3.16: Zytogenetische Analyse der korrigierten iPS-Klone 2 und 37.** Karyogramme Giemsa-gefärbter Metaphasenchromosomen der Zelllinien iPS-Klon 2 und iPS-Klon 37. Karyotyp beider Klone: 46,XY.

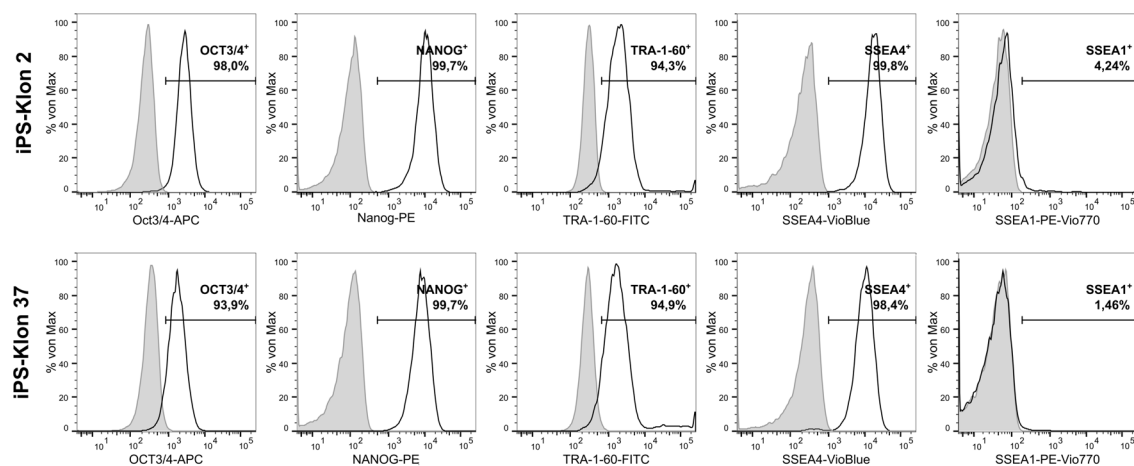
Außerdem wurden die Genome beider iPS-Klone sowie der Ausgangszelllinie ARO-iPS mittels Hochdurchsatzverfahren („next generation sequencing“) sequenziert. Im Vergleich zu den Ursprungszellen (ARO-iPS) konnten im iPS-Klon 2 neun neue Einzelnukleotidvarianten identifiziert werden, wovon sechs möglicherweise pathogen sein könnten und drei als Polymorphismen einzuordnen sind (siehe Tabelle A.3 im Anhang). In iPS-Klon 37 wurden im Vergleich zu den ARO-iPS zehn

### 3 Ergebnisse

neue Einzelnukleotidvarianten beobachtet, von denen die Hälfte als potenziell pathogen und die andere Hälfte als Polymorphismus eingestuft werden kann. Es konnten keine neuen strukturellen Varianten festgestellt werden. Keine der entstandenen Varianten konnte mit den vom CRISPOR-Webtool vorhergesagten Off-Target-Stellen in Zusammenhang gebracht werden.

#### 3.3.3 Erhaltene Pluripotenz in korrigierten iPS-Klonen

Da Genomeditierung und klonale Expansion große Stressfaktoren für iPS darstellen, ist es nötig nachzuprüfen, ob die generierten korrigierten iPS-Klone auch weiterhin pluripotent sind. Zu diesem Zweck wurden die Pluripotenzmarker OCT3/4, NANOG, TRA-1-60 und SSEA4 sowie als Negativkontrolle der Differenzierungsmarker SSEA1 immunfluoreszent gefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Wie die dargestellten Ergebnisse in Abb.3.17 zeigen, sind zwischen 94 und 100% der gefärbten Zellen beider Klone positiv für die jeweiligen Pluripotenzmarker, wohingegen die Proteinexpression des Differenzierungsmarkers SSEA1 nur in unter 5% (Klon 2) bzw. unter 2% (Klon 37) der Zellen nachzuweisen war. Damit konnte die erhaltene Pluripotenz beider korrigierter Klone bestätigt werden.

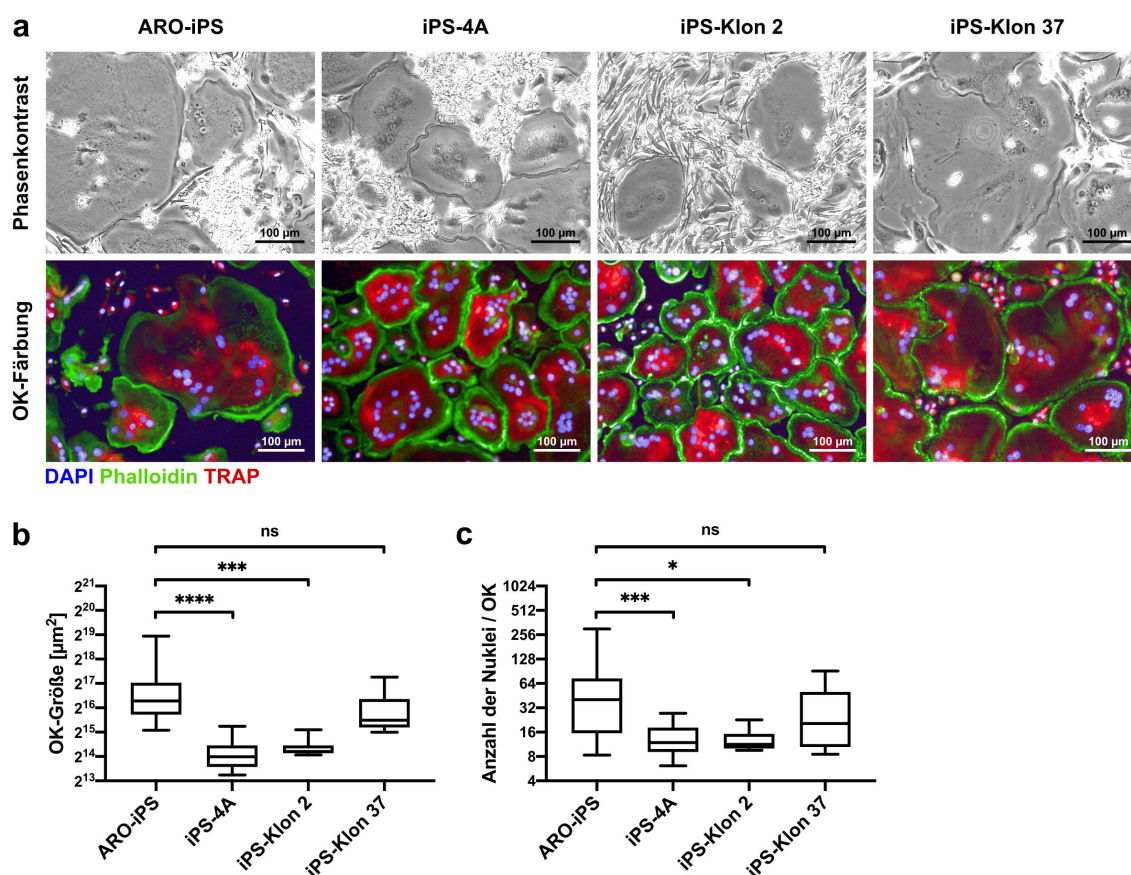


**Abbildung 3.17: FACS-Analyse der pluripotenzspezifischen Proteinexpression in den korrigierten iPS-Klonen 2 und 37.** Die Pluripotenzmarker OCT3/4, NANOG, TRA-1-60 und SSEA4 sowie der Differenzierungsmarker SSEA1 wurden in Einzelzellsuspensionen der iPS-Klone 2 und 37 immunfluoreszent gefärbt. Zelltrümmer und -dubletten wurden wie in Abb.A.1 gezeigt von der Analyse ausgeschlossen. Dargestellt sind gefärbte (schwarz) und ungefärbte Zellen (grau, Negativkontrolle).



## 3.3.4 Erfolgreiche Osteoklastendifferenzierung der korrigierten iPS-Klone

Nachdem die genomische Integrität sowie die Pluripotenz beider korrigierten iPS-Klone nachgewiesen werden konnte, wurden diese zusammen mit den Kontrollzelllinien iPS-4A und ARO-iPS zu Osteoklasten differenziert. Zwar gelang es, alle iPS-Linien erfolgreich in Osteoklasten zu differenzieren, die Ausbeute an



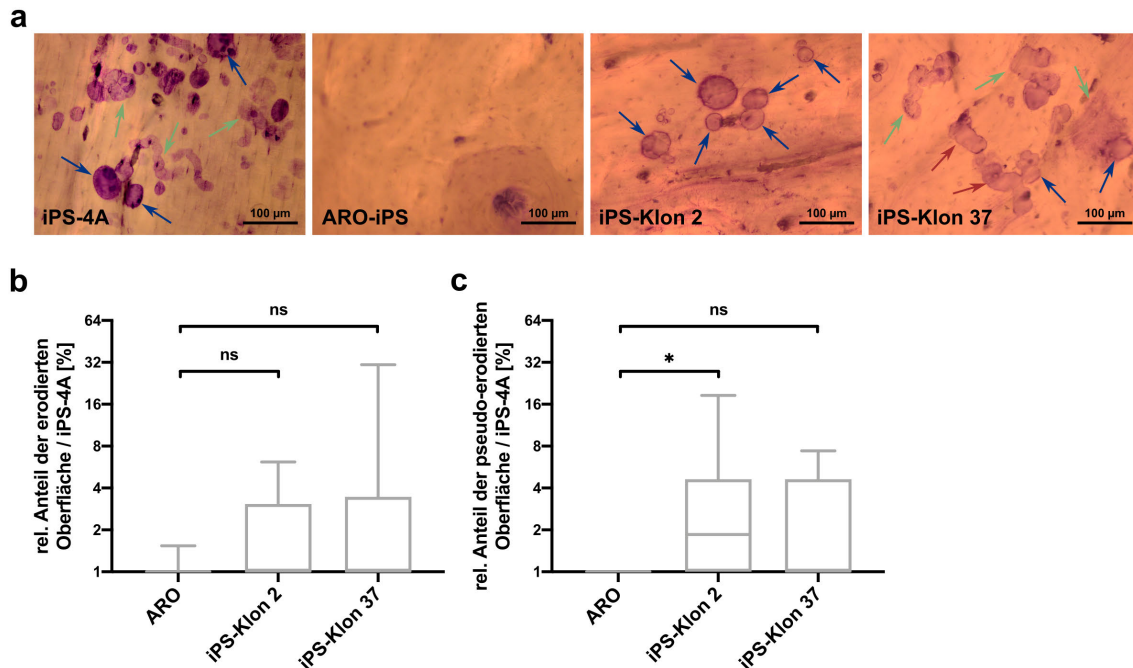
**Abbildung 3.18: Osteoklastendifferenzierung der korrigierten iPS-Klone.** Die korrigierten iPS-Klone 2 und 37 sowie die Kontrollen iPS-4A und ARO-iPS wurden in OKs differenziert. **(a)** Beispielhafte Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen differenzierter OKs der verschiedenen iPS-Linien. Osteoklastenkulturen wurden 4 Tage nach Beobachten der ersten differenzierten OKs fixiert und gefärbt, blau: DAPI (Nuklei), grün: Phalloidin (Aktin), rot: TRAP. **(b), (c)** Quantifizierung der gefärbten OKs. Dargestellt sind zusammengefasste Daten von je 3 Experimenten mit je 3 technischen Replikaten (Min., 1. Quartil, Median, 3. Quartil, Max.), mit Ausnahme von Klon 2 (nur ein Experiment mit 4 technischen Replikaten). **(b)** Größe der OK-Fläche. **(c)** Anzahl der Nuklei pro OK. Statistische Analyse: **(b), (c)** Kruskal-Wallis-Test, Dunns multipler Mittelwertvergleich.  $P > 0,05$  (ns),  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) ,  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*).

monozytären Osteoklastenvorläuferzellen der korrigierten Klone war jedoch geringer als die der Kontrollzelllinien iPS-4A und ARO-iPS, weshalb es in den folgenden Experimenten nicht immer möglich war, alle Experimente drei Mal zu wiederholen. Kultivierte Osteoklasten aller vier Zelllinien sind in den Phasenkontrastaufnahmen in Abb. 3.18-a zu sehen. Die Polarisierung der Osteoklasten durch Ausbildung des Aktinfilamentrings sowie die Anzahl der Osteoklastennuklei lassen sich deutlicher in den repräsentativen zytochemischen Osteoklastenfärbungen derselben Abbildung erkennen. Wie bereits in Abschnitt 3.2 beschrieben wurde, war auffällig, dass ARO-iPS zu größeren Osteoklasten mit mehr Nuklei neigten. Wie anhand der mikroskopischen Osteoklastenaufnahmen und der Quantifizierung der Osteoklastengröße in Abb. 3.18 und Abb. A.5 im Anhang zu sehen ist, war dieser Phänotyp auch in Osteoklasten des korrigierten iPS-Klons 37, nicht jedoch in denen des Klons 2 vorhanden. Die statistische Analyse der Quantifizierungsdaten mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns multiplen Mittelwertvergleich bestätigte, dass es keinen signifikanten Unterschied in Größe und Anzahl der Nuklei zwischen Osteoklasten von ARO-iPS und iPS-Klon 37 gab, während die Osteoklasten des korrigierten iPS-Klons 2 im Vergleich zu Osteoklasten der ARO-iPS signifikant kleiner waren ( $P = 0,002$ ) und weniger Nuklei aufwiesen ( $P = 0,015$ ). Leider konnte jedoch aufgrund geringer Zellausbeute der iPS-Osteoklastendifferenzierung von Klon 2 nur ein Experiment durchgeführt werden, weshalb dieses Ergebnis kritisch zu beurteilen ist.

#### **3.3.5 Eingeschränkte Wiederherstellung der Resorptionsfunktion in Osteoklasten der korrigierten iPS-Klone**

Im Folgenden wurde untersucht, ob die jeweilige Mutationskorrektur der generierten iPS-Klone zu einer Wiederherstellung der Resorptionsfunktion in differenzierten Osteoklasten führen konnte. Dazu wurde die Knochenresorption differenzierter Osteoklasten der iPS-Klone 2 und 37 sowie der Positiv- und Negativkontrollen iPS-4A und ARO-iPS wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben analysiert. Wie die nachfolgende Abbildung (Abb. 3.19) zeigt, konnte Resorption von den Osteoklasten der korrigierten iPS-Klone beobachtet werden, erwartungsgemäß jedoch nicht von den Osteoklasten der Patientenzelllinie ARO-iPS. Bei Osteoklasten des iPS-Klons 37 konnte sogar die aggressivere kanalförmige Resorptionsform nachgewiesen werden (siehe rote Pfeile in Abb. 3.19-a). Wie anhand der Quantifizierung der Knochenresorption in Abb. 3.19-b zu sehen ist, war im





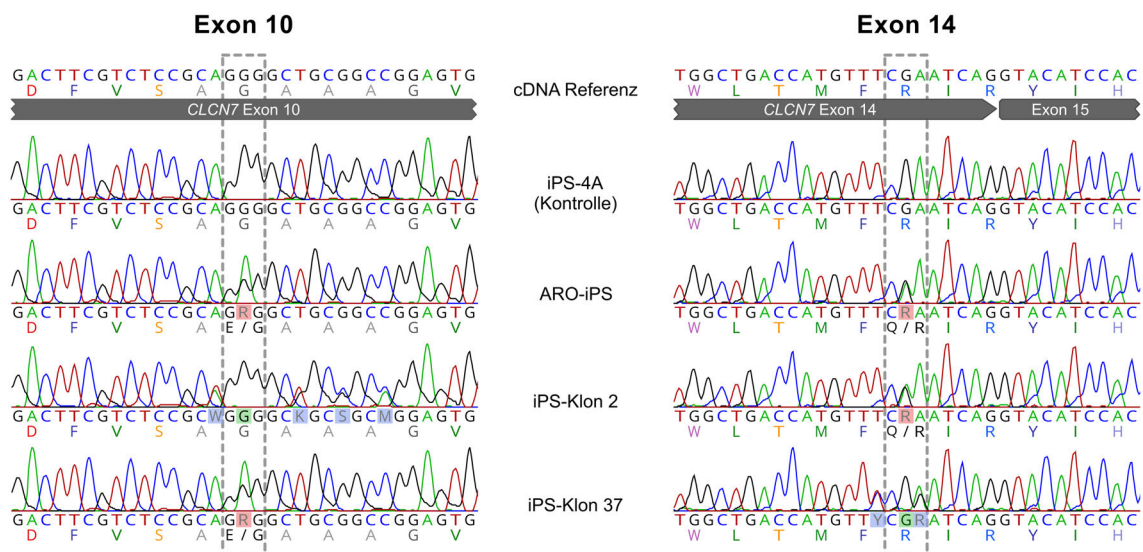
**Abbildung 3.19: Analyse der Knochenresorption von Osteoklasten der korrigierten iPS-Klone.** Die korrigierten iPS-Klone 2 und 37 sowie die Positiv- und Negativkontrollen iPS-4A und ARO-iPS wurden in OKs differenziert und für 5 Tage auf Knochenscheiben kultiviert. **(a)** Lichtmikroskopische Aufnahmen einzelner Resorptionsvertiefungen (roter Pfeil: kanalförmige Resorption, blauer Pfeil: grubenförmige Resorption, grüner Pfeil: Pseudo-resorption). Quantifizierte Knochenresorption **(b)** und Pseudoresorption **(c)** relativ zum medianen Anteil der erodierten Knochenoberfläche von iPS-4A. Dargestellt sind zusammenfassende Daten von 3 Experimenten (Min., 1. Quartil, Median, 3. Quartil, Max.), mit durchschnittlich 3 analysierten Knochenscheiben pro Experiment (minimal 1, maximal 8). Statistische Analyse: Kruskal-Wallis-Test, Dunns multipler Mittelwertvergleich,  $P > 0,05$  (ns),  $P = 0,0155$  (\*).

Vergleich zu den Osteoklasten der Positivkontrolle iPS-4A bei den Osteoklasten der korrigierten iPS-Klone jedoch deutlich weniger Resorption sichtbar. Relativ gesehen zur Positivkontrolle iPS-4A lag der Anteil der erodierten Knochenoberfläche der Osteoklasten der Klone bei maximal 6% bzw. 30% (Kruskal-Wallis-Test, Dunns multipler Mittelwertvergleich, ARO-iPS vs. Klon 2  $P = 0,14$ , ARO-iPS vs. Klon 37  $P = 0,11$ ). Neben tiefer Resorptionsvertiefungen waren auch oberflächige Erosionen (Pseudoresorption) bei den korrigierten iPS-Klonen zu beobachten. Normalisiert zur Positivkontrolle lag der Anteil der pseudo-erodierten Oberfläche bei Klon 2 bei maximal 19% (Dunns multipler Mittelwertvergleich, ARO-iPS vs. Klon 2  $P = 0,015$ ) und bei Klon 37 bei maximal 7% (Dunns multipler Mittelwertvergleich, ARO-iPS vs. Klon 37  $P = 0,07$ ). Die absolute Quantifizierung zur Bestimmung der Anzahl der Resorptionsereignisse in Abb.A.7 im Anhang zeigt allerdings auch, dass es große

Schwankungen bezüglich der Resorption zwischen den einzelnen Experimenten derselben Zelllinie gab (0–60 Resorptionsvertiefungen). Zudem konnten aufgrund der geringen Zellausbeute der Osteoklastendifferenzierungen aus den iPS-Klonen nur sehr wenige Knochenscheiben analysiert werden (durchschnittlich drei Knochenscheiben).

### 3.3.6 Keine Auffälligkeiten in der *CLCN7*-mRNA von Osteoklasten der korrigierten iPS-Klone

Um zu untersuchen, ob eine allelspezifische Genstilllegung oder Spleißdefekte die mögliche Ursache für die eingeschränkte Resorptionsfähigkeit der korrigierten Klone sein könnten, wurde die cDNA des *CLCN7*-Gens von Osteoklasten amplifiziert und sequenziert. Die Amplifikation von Exon 5 bis 17 der cDNA des *CLCN7*-Gens lieferte bei iPS-Klon 2 und iPS-Klon 37 sowie den Kontrollen iPS-4 und ARO-iPS je ein spezifisches PCR-Produkt, das sequenziert werden konnte (siehe Gelelektrophorese-Aufnahme der PCR in Abb. A.6 im Anhang). Ausschnitte der cDNA-Sequenzen von Exon 10 sowie Exon 14 und 15 des *CLCN7*-Gens sind in Abb. 3.20 abgebildet.

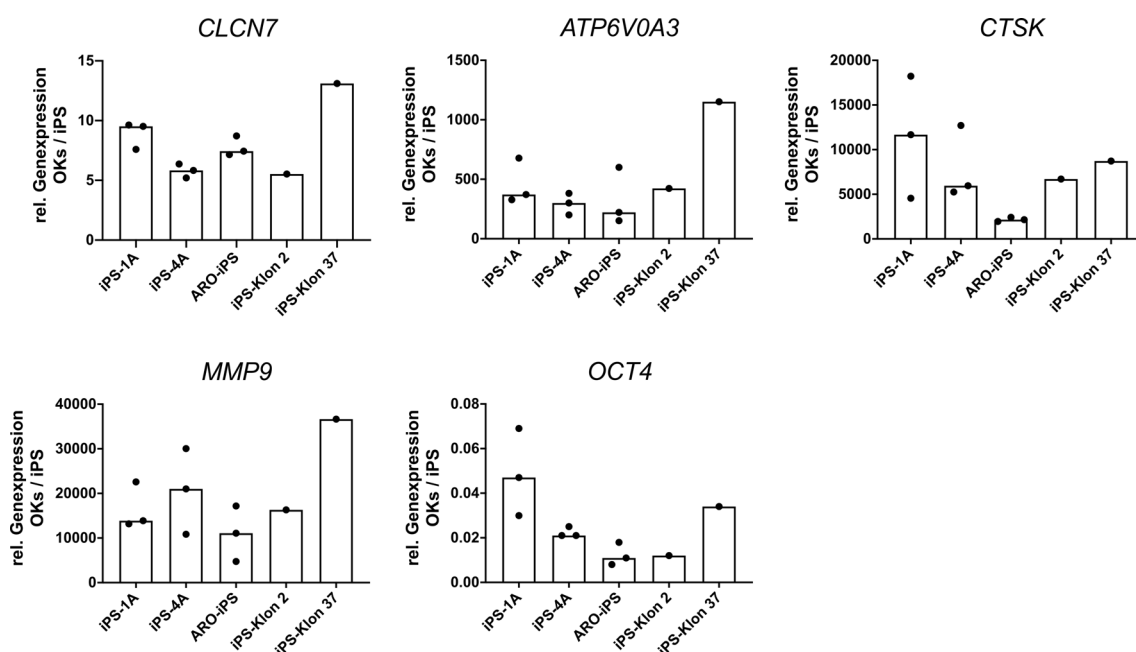


**Abbildung 3.20: Ausschnitte der Sequenzen der *CLCN7*-cDNA in Osteoklasten der korrigierten iPS-Klone.** Aus differenzierten OKs gewonnene mRNA der korrigierten iPS-Klone 2 und 37, der Ausgangszelllinie ARO-iPS und der Kontrolle iPS-4A wurde in cDNA umgeschrieben. *CLCN7* wurde amplifiziert und sequenziert. ARO-Mutationen haben roten, korrigierte Mutationen grünen und stille eingebrachte Mutationen blauen Hintergrund.

Wie anhand der Signalhöhe der eingebrachten heterozygoten stillen Mutationen (blauer Hintergrund) in den Sequenzen zu sehen ist, wurden beide Allele in den Osteoklasten der korrigierten Klone gleichermaßen exprimiert. Darüber hinaus konnten keine Spleißdefekte beobachtet werden (nicht dargestellt für Exon 10, siehe Übergang von *CLCN7* Exon 14 zu 15). Auch die restlichen Bereiche der sequenzierten *CLCN7*-cDNA (Exon 5–17) zeigten keinerlei Auffälligkeiten.

### 3.3.7 Normale Induktion der osteoklastenspezifischen Genexpression in differenzierten Osteoklasten korrigierter iPS-Klone

Zur Überprüfung der osteoklastenspezifischen Genexpression wurde die mRNA von undifferenzierten iPS und differenzierten Osteoklasten der korrigierten iPS-Klone sowie der Kontrollen iPS-4A und ARO-iPS mittels qRT-PCR analysiert. Es wurden die mRNA-Expressionslevel der osteoklastenspezifischen Gene *CLCN7*, *ATP6V0A3*,



**Abbildung 3.21: Quantitative Analyse der osteoklastenspezifischen Genexpression mittels qRT-PCR in differenzierten iPS.** Analysiert wurde die Genexpression der Osteoklastenmarker *CLCN7*, *ATP6V0A3*, *CTSK* und *MMP9* sowie des Pluripotenzmarkers *OCT4* mit iPS- und Osteoklasten-RNA der Zelllinien iPS-4A, ARO-iPS, iPS-Klon 2 und iPS-Klon 37. Dargestellt ist die zur endogenen Kontrolle normalisierte Genexpression in OKs relativ zur Genexpression in iPS. Datenpunkte repräsentieren Werte einzelner unabhängiger Experimente, Balken zeigen Mediane.

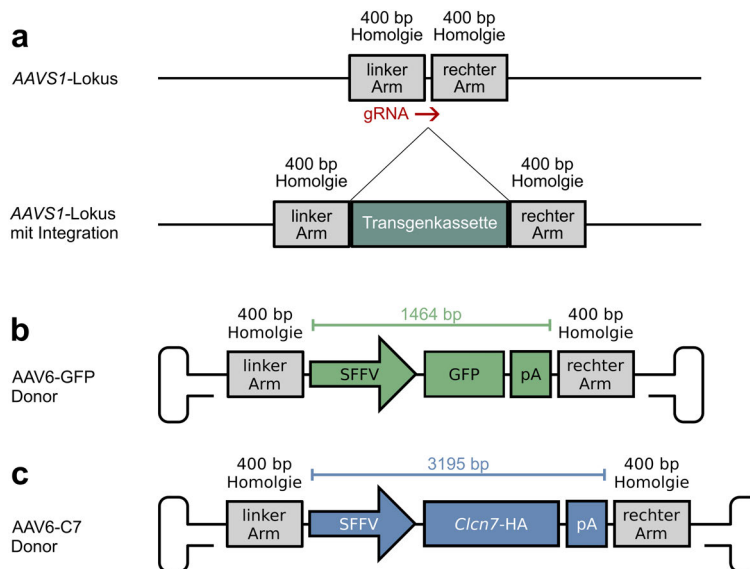
*CTSK* und *MMP9* sowie des Pluripotenzmarkers *OCT4* untersucht. Zur Veranschaulichung der Expressionsunterschiede zwischen iPS und Osteoklasten wurden die mRNA-Level der Osteoklasten zu denen der undifferenzierten iPS normalisiert (siehe Abb. 3.21). Wie erwartet konnte im Vergleich zu undifferenzierten iPS eine Hochregulation der Osteoklastenmarkerexpression sowie ein nahezu vollständiger Expressionsverlust des pluripotenzspezifischen Gens *OCT4* in differenzierten Osteoklasten beobachtet werden. Dabei zeigten Osteoklasten des iPS-Klons 37 eine Tendenz zu einer stärkeren Expressionsinduktion der Osteoklastenmarker *CLCN7*, *ATP6VOA3* und *MMP9*, nicht jedoch von *CTSK*. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass aufgrund der geringen Zellausbeute der Osteoklastendifferenzierung nur eine Osteoklasten-mRNA analysiert werden konnte. In Osteoklasten der ARO-iPS waren im Vergleich zu den anderen Zelllinien außerdem verringerte *CTSK*-Level vorhanden. Auch wenn zwischen den verschiedenen Zelllinien kleine Unterschiede in der Hochregulation osteoklastenspezifischer Genexpression vorhanden waren, lagen diese in dem für das jeweilige Gen üblichen Bereich der experimentellen Schwankungen. Somit konnten keine Auffälligkeiten bezüglich der Induktion der osteoklastenspezifischen Genexpression in den differenzierten Osteoklasten der korrigierten Klone 2 und 37 beobachtet werden.

#### 3.4 Additiver Gentransfer in den *AAVS1*-Lokus mittels CRISPR/Cas9

Neben der patientenspezifischen Mutationskorrektur ist der additive Gentransfer von Wildtyp-cDNA in den *AAVS1*-Lokus, einen sogenannten genomischen „sicheren Hafen“, ein weiterer möglicher gentherapeutischer Ansatz zur Heilung der ARO. Für die Etablierung dieser Methode wurden zwei verschiedene Transgenkonstrukte getestet. Eines der Donorkonstrukte enthielt eine GFP-Expressionskassette, das andere eine Expressionskassette für die Wildtyp-cDNA des *Clcn7*-Gens der Ratte, die mit einem HA-Tag markiert war. Das ClC-7-Protein des Menschen und der Ratte stimmen in 96% der Proteinsequenz überein (Brandt und Jentsch 1995), jedoch akkumuliert das ClC-7-Protein der Ratte bei Überexpression weniger stark im endoplasmatischen Retikulum als das humane (unveröffentlichte Daten von Tobias Stauber). Während das *Clcn7*-HA-Konstrukt für den eigentlichen gentherapeutischen Ansatz für die *CLCN7*-abhängige ARO genutzt werden konnte, ermöglichte das GFP-Konstrukt aufgrund seines enthaltenen fluoreszierenden Reporterproteins eine einfache Analyse der Integrationseffizienz und erleichterte damit die Etablierungsarbeit

### 3.4 Additiver Gentransfer in den AAVS1-Lokus mittels CRISPR/Cas9

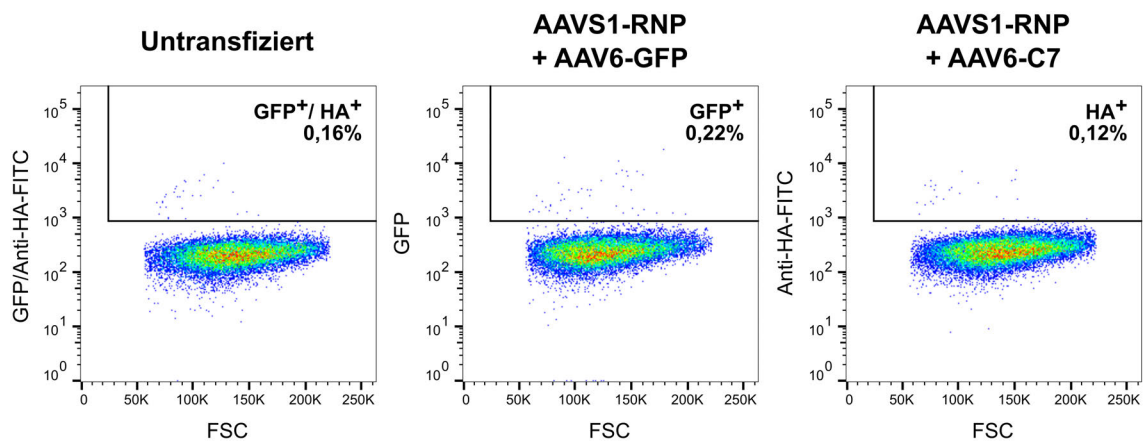
der Methode. Wie in Abb.3.22 veranschaulicht ist, sind beide Transgenkonstrukte unter der Kontrolle des starken viralen Promoters SFFV. Um die HDR-vermittelte Integration der Konstrukte in den *AAVS1*-Lokus zu ermöglichen, sind beide Konstrukte außerdem mit den homologen Sequenzen 400 bp stromauf- und stromabwärts der gRNA-Zielsequenz, und damit der Cas9-Schnittstelle, flankiert. Als Donorvektoren für den additiven Gentransfer wurden rekombinante AAV6-Vektoren benutzt, sodass die Donorkonstrukte als einzelsträngige DNA-Donoren mittels Transduktion in die Zellen eingebracht werden konnten. Der in Abb.3.22-b dargestellte AAV6-GFP-Donor wurde uns von Matthew Porteus zur Verfügung gestellt, während der Donor für das *Cln7*-HA-Konstrukt (AAV6-C7) durch Umklonierung des AAV6-GFP-Donors generiert wurde.



**Abbildung 3.22: Schema der Transgenaddition in den *AAVS1*-Lokus und der Donorvektoren.** (a) Durch je 400 bp lange Homologiearme stromauf- und stromabwärts der gRNA-Zielsequenz und Cas9-Schnittstelle kann die Integration der Transgenkassette in den *AAVS1*-Lokus über HDR erfolgen. (b) AAV6-Donorvektor für die transgene GFP-Expressionskassette. (c) AAV6-Donorvektor für die transgene *Cln7*-HA-Expressionskassette.

### 3.4.1 Stilllegung der Transgene in ARO-iPS

Für die Integration des GFP- bzw. des *Clcn7*-HA-Transgens in den *AAVS1*-Lokus wurde zunächst das Cas9-Protein, komplexiert mit der *AAVS1*-spezifischen gRNA (AAVS1-RNP), mittels Transfektion in ARO-iPS eingebracht. Anschließend wurde das jeweilige einzelsträngige GFP- bzw. *Clcn7*-HA-Donorkonstrukt mit dem jeweiligen rekombinanten AAV6-Vektor in die Zellen transduziert. Eine Woche nach der durchgeführten Genomeditierung wurde die Proteinexpression der Transgene mittels Durchflusszytometrie untersucht. Um das *Clcn7*-HA-Transgen detektieren zu können, wurden die Zellen zuvor mit einem Fluorochrom-gekoppelten HA-Antikörper gefärbt. ARO-iPS, in die das GFP-Transgen eingebracht wurde, konnten dagegen ungefärbt analysiert werden. Wie anhand der Ergebnisse der FACS-Analyse in Abb. 3.23 zu sehen ist, konnte jedoch keine stabile Proteinexpression der Transgene in den ARO-iPS nachgewiesen werden, obwohl zwei Tage nach der Transfektion eine starke transiente Transgenexpression beobachtet werden konnte (siehe Abb. A.8 im Anhang). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob die Transgene nicht stabil in den *AAVS1*-Lokus integriert werden konnten oder ob die Integration erfolgreich stattgefunden hatte, die Transgene jedoch nicht exprimiert wurden.



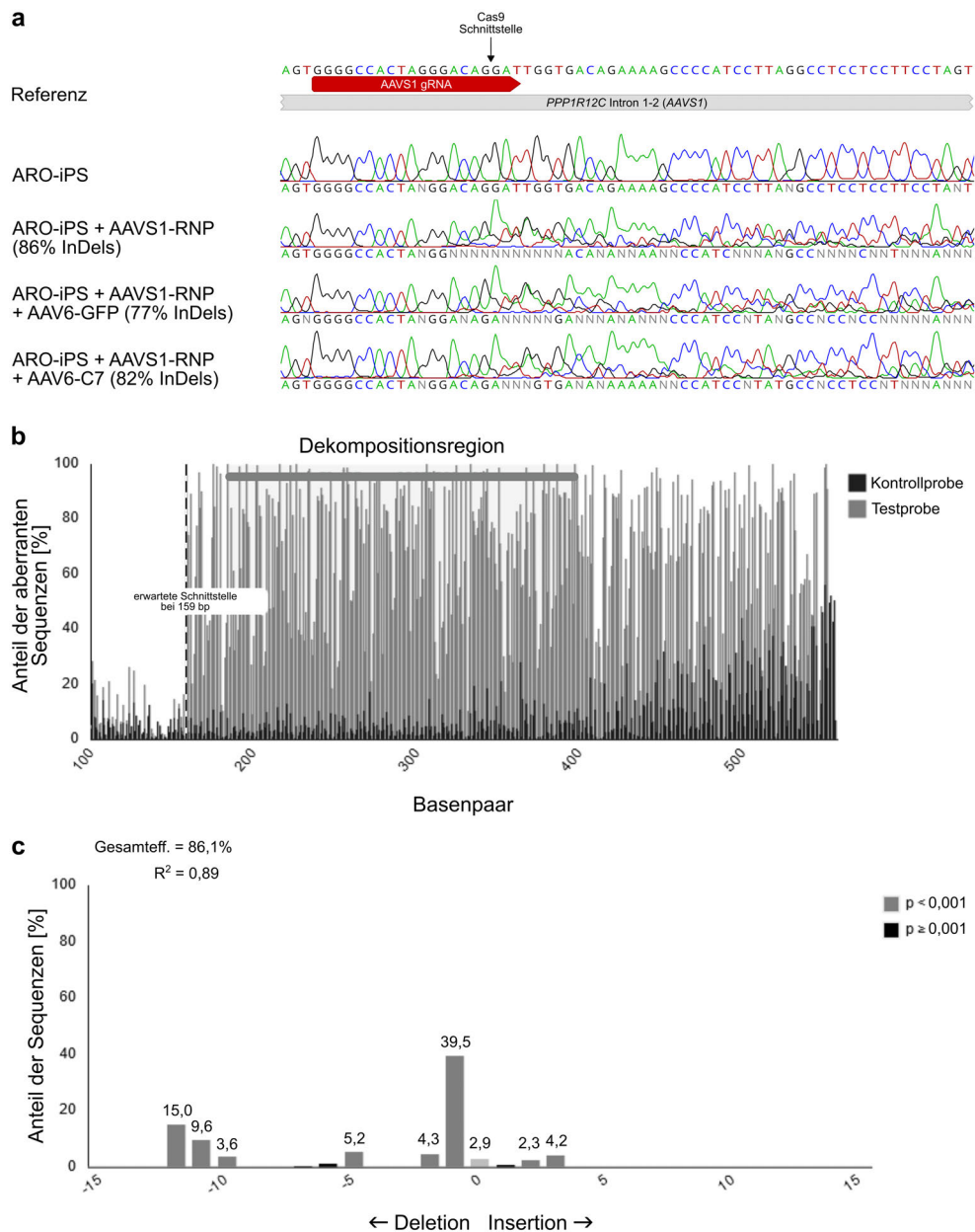
**Abbildung 3.23: FACS-Analyse der Transgenexpression in editierten ARO-iPS.** ARO-iPS wurden mit AAVS1-RNP transfiziert und mit AAV6-Donoren (GFP oder C7) transduziert. Die Analyse erfolgte 6 Tage nach der Genomeditierung. Untransfizierte ARO-iPS und mit AAVS1-RNP sowie AAV6-C7 editierte ARO-iPS wurden mit Anti-HA-FITC gefärbt. GFP-editierte ARO-iPS wurden ungefärbt analysiert. Zelltrümmer und -dubletten wurden wie in Abb. A.1 gezeigt von der Analyse ausgeschlossen.

Dazu wurde zuerst überprüft, ob es mit dem eingebrachten AAVS1-spezifischen Cas9-RNP möglich war, DNA-Doppelstrangbrüche in den ARO-iPS zu induzieren, die die Voraussetzung für eine HDR-vermittelte Integration des Transgens in den AAVS1-Lokus sind. Da DNA-Doppelstrangbrüche zu Insertionen und Deletionen (InDels) führen können, lässt sich die Cas9-Aktivität mithilfe der TIDE-Analyse untersuchen, die anhand aberranter DNA-Sequenzen des sequenzierten Ziellokus errechnen kann, wie hoch der Anteil der Allele mit InDels in der editierten Mischkultur ist. Dafür wurde der AAVS1-Lokus der editierten ARO-iPS-Mischkultur amplifiziert, sequenziert und mithilfe des TIDE-Webtools (Brinkman et al. 2014, <https://tide.deskgen.com>) analysiert. In den AAVS1-Sequenzen in Abb. 3.24-a sowie in den Ergebnissen der beispielhaften TIDE-Analyse in Abb. 3.24-b sind die aberranten Sequenzen im AAVS1-Lokus, die ab 3 bp vor der Cas9-Schnittstelle auftreten, deutlich zu erkennen. Mithilfe dieser Sequenzierdaten und des TIDE-Algorithmus wurde ein Anteil der Sequenzen mit InDels im AAVS1-Lokus in den editierten Mischkulturen von ca. 80% berechnet. Wie in Abb. 3.24-c in den Ergebnissen der beispielhaften TIDE-Analyse zu sehen ist, konnten am häufigsten eine Deletion eines Basenpaars (39,5% der Allele) und eine Deletion von 12 bp (15% der Allele) ermittelt werden. Diese hohe Editierungseffizienz unterschied sich dabei kaum zwischen den verschiedenen editierten ARO-iPS (kein Donor oder Donor AAV6-GFP oder Donor AAV6-C7). Folglich konnten Cas9-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche im AAVS1-Lokus in den editierten ARO-iPS nachgewiesen werden.

Mittels PCR wurde anschließend untersucht, ob nach erfolgreicher Induktion des DNA-Doppelstrangbruchs durch Cas9 im AAVS1-Lokus auch eine stabile Integration des GFP- bzw. *Cln7*-HA-Transgens stattgefunden hatte. Wie in dem Schema der PCR-Strategie in Abb. 3.25-a veranschaulicht ist, wurden dazu die stromauf- und stromabwärts liegenden Übergänge vom AAVS1-Lokus zum jeweiligen Donorkonstrukt sowie der AAVS1-Lokus ohne Insert amplifiziert. Mithilfe dieser PCRs, deren Gelelektrophorese-Aufnahmen in Abb. 3.25-b dargestellt sind, konnte die erfolgreiche stabile Integration des GFP- bzw. des *Cln7*-HA-Transgens in den AAVS1-Lokus der ARO-iPS nachgewiesen werden, die mit AAVS1-spezifischen Cas9-RNP transfiziert und dem entsprechenden AAV6-Donor transduziert wurden. Damit kann davon ausgegangen werden, dass es vermutlich aufgrund des viralen Promoters zur Stilllegung des Transgenlokus gekommen ist, wodurch keine Proteinexpression in der FACS-Analyse gesehen werden konnte (siehe Abb. 3.23).



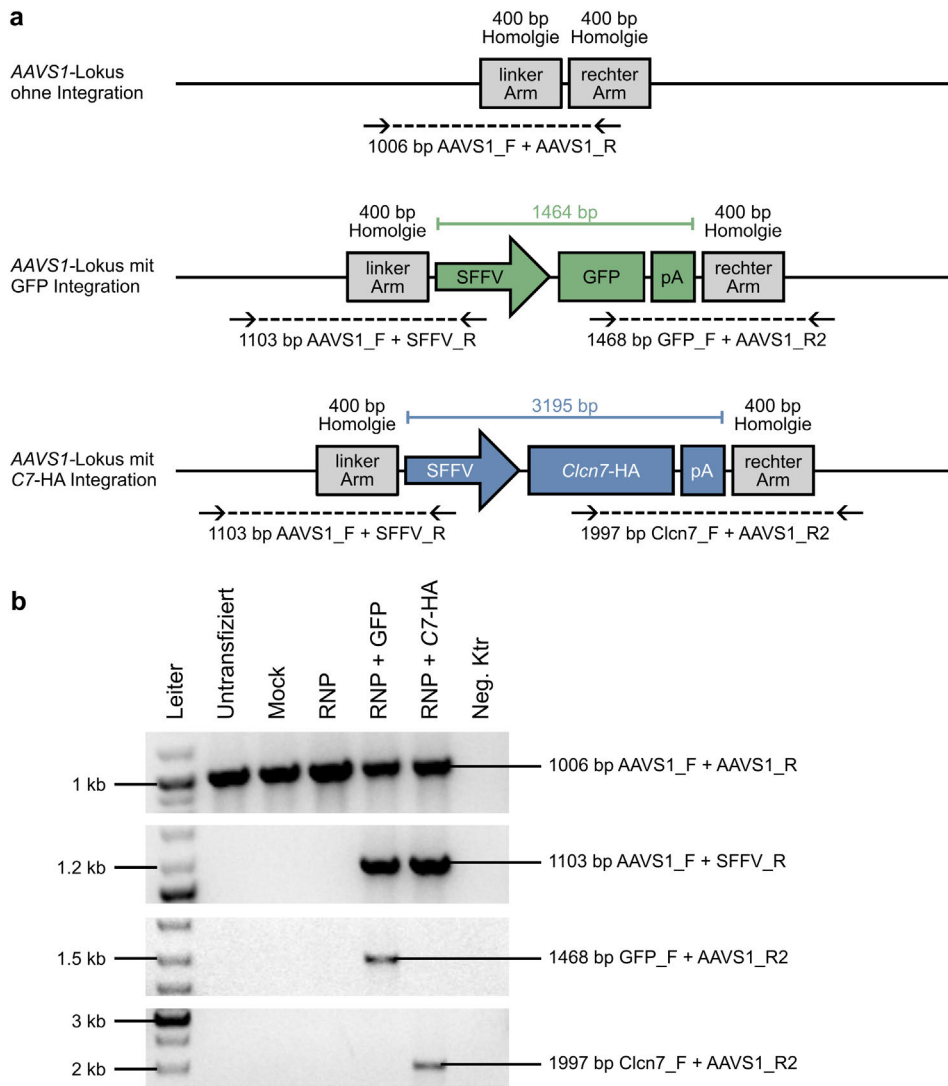
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.24: TIDE-Analyse des AAVS1-Lokus in editierten ARO-iPS.** ARO-iPS wurden mit AAVS1-RNP transfiziert und ggf. mit AAV6-GFP oder AAV6-C7 transduziert. DNA wurde 1 Woche nach Genomeditierung isoliert und analysiert. **(a)** Ausschnitte der AAVS1-Sequenzen sowie vorhergesagte Anteile der Sequenzen mit InDels im AAVS1-Lokus in editierten ARO-iPS. **(b)** Qualitätskontrolle der TIDE-Analyse durch Visualisierung der erwarteten Cas9-Schnittstelle (gestrichelte Linie), der genutzten Dekompositionsregion (grauer Balken) und der aberranten Sequenzen der Testprobe (grau, ARO-iPS + AAVS1-RNP) und Kontrollprobe (schwarz, ARO-iPS). **(c)** Die Vorhersage der Anteile der Sequenzen mit bestimmten InDels im AAVS1-Lokus in der Testprobe (ARO-iPS + AAVS1-RNP). Die Bestimmung der Anteile der Sequenzen mit InDels in (a) sowie die Erstellung der Grafiken (b) und (c) erfolgte mittels TIDE-Webtool, Beschriftungen wurden ins Deutsche übersetzt (Brinkman et al. 2014, <https://tide.deskgen.com>).



### 3.4 Additiver Gentransfer in den AAVS1-Lokus mittels CRISPR/Cas9



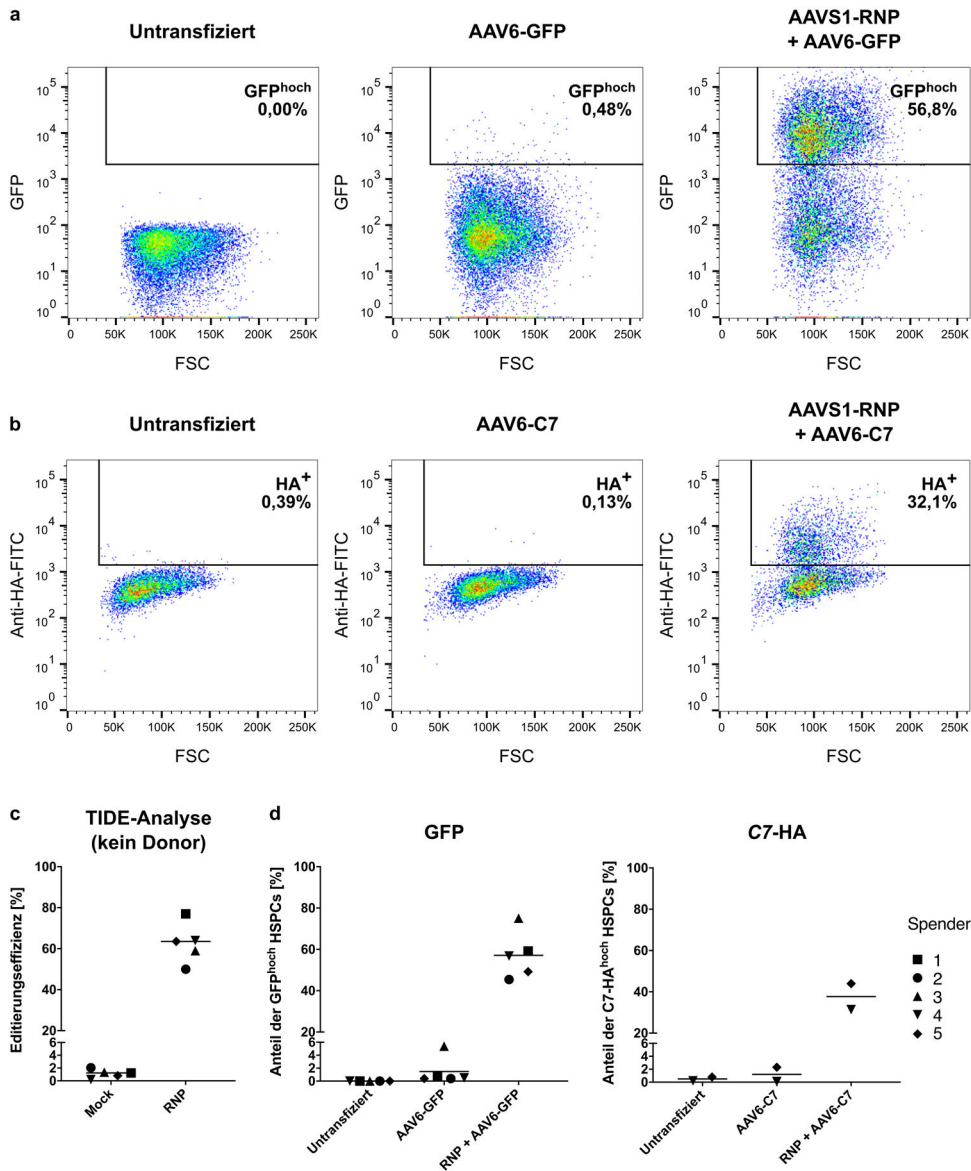
**Abbildung 3.25: PCR-Nachweis der Transgenaddition in den AAVS1-Lokus editierter ARO-iPS.** (a) Schema der PCR-Strategie zum Nachweis einer stabilen Integration des *Clcn7*-HA- oder GFP-Transgens in den AAVS1-Lokus. Pfeile mit gestrichelter Linie zeigen PCR-Produkte mit Primern: AAVS1-Lokus ohne Transgen (1006 bp), linker Übergang AAVS1 zu Transgen (1103 bp) und rechter Übergang Transgen zu AAVS1 (GFP-Transgen: 1468 bp, *Clcn7*-HA-Transgen: 1997 bp). (b) Gelelektrophorese-Aufnahmen der PCRs. Genomische DNA der ARO-iPS wurde 1 Woche nach AAVS1-Genomeditierung gewonnen: untransfiziert, transfiziert ohne AAVS1-Cas9-RNP (Mock), transfiziert mit RNP, transfiziert mit RNP und transduziert mit AAV6-GFP (RNP + GFP) oder AAV6-C7 (RNP + C7-HA). Die Negativkontrolle der PCR enthielt keine DNA.

#### 3.4.2 Effiziente Transgenaddition in den *AAVS1*-Lokus in HSPCs

Da der virale SFFV-Promoter in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSPCs) nicht zur Genstilllegung führt (Bak et al. 2017), wurde im nächsten Schritt die gentherapeutische Strategie der Genaddition in den eigentlichen therapeutischen Zielzellen, den HSPCs, getestet. Aufgrund der Seltenheit der ARO und des geringen Alters der Patienten stehen jedoch keine HSPCs von Patienten zur Verfügung, weshalb mit CD34<sup>+</sup> HSPCs aus Nabelschnurblut gesunder Kinder gearbeitet wurde. Wie zuvor bei den ARO-iPS (beschrieben im vorherigen Abschnitt) wurden die Zellen mit dem *AAVS1*-spezifischen Cas9-RNP transfiziert und anschließend mit dem AAV6-GFP- oder AAV6-C7-Donor transduziert. Die Genexpression der Transgene wurde dann vier Tage nach der Genomeditierung mittels FACS-Analyse untersucht, die eine starke Transgenexpression in einem hohen Anteil der behandelten HSPCs zeigte. In der in Abb. 3.26-a dargestellten beispielhaften FACS-Analyse exprimierten über 56% der editierten HSPCs das GFP-Transgen im hohen Maß. Jedoch war auch in 0,5% der HSPCs, die nur mit dem AAV6-GFP-Donor transduziert wurden und kein *AAVS1*-RNP erhielten, eine starke GFP-Expression vorhanden. Da die FACS-Analyse bereits vier Tage nach der Genomeditierung durchgeführt wurde, könnte es sich dabei noch um transiente Expression des Vektors handeln, oder der Donorvektor wurde in diesen Zellen unspezifisch ins Genom integriert. In den editierten HSPCs, die in Abb. 3.26-b dargestellt sind, konnte die Expression des deutlich größeren *Cln7*-HA-Transgens in 32% der analysierten Zellen gezeigt werden. In Abb. 3.26-c, -d und -e sind die bestimmten Editierungseffizienzen der behandelten HSPCs aller fünf Nabelschnurblutspender zusammengefasst. Wurden die Zellen lediglich mit dem *AAVS1*-RNP transfiziert, erhielten jedoch keinen Donorvektor, konnten mittels TIDE-Analyse in 50–77% der Allele InDels nachgewiesen werden (Abb. 3.26-c, beispielhafte TIDE-Analyse in Abb. A.9 im Anhang). Bei zusätzlicher Transduktion mit dem AAV6-GFP-Donor lag der Anteil der HSPCs mit einer starken GFP-Expression im nahezu gleichen Bereich (45–75%). Da für den AAV6-C7-Donor zunächst eine Umklonierung nötig war und der Vektor daher erst später zur Verfügung stand, konnten nur zwei der fünf gespendeten HSPCs mit dem *Cln7*-HA-Konstrukt behandelt werden. Wie bereits beschrieben, lag der Anteil der *Cln7*-HA<sup>+</sup> Zellen des einen Spenders bei 32%, während sich der des anderen Spenders sogar bei 44% befand.

Um zu überprüfen, ob die Transgenaddition auch spezifisch im *AAVS1*-Lokus stattgefunden hatte, wurden wie bereits in Abschnitt 3.4.1 beschrieben verschiedene

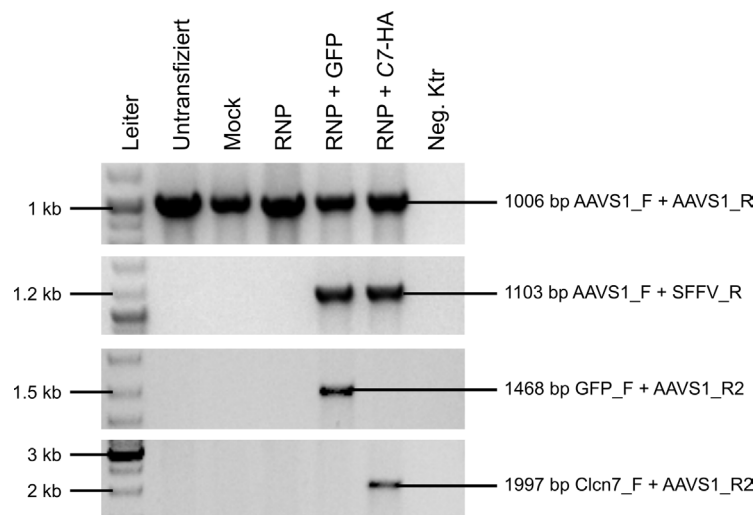
### 3.4 Additiver Gentransfer in den AAVS1-Lokus mittels CRISPR/Cas9



**Abbildung 3.26: Bestimmung der Editierungseffizienz des AAVS1-Lokus in HSPCs.** (a), (b) Beispielhafte FACS-Analyse der HSPCs von Spender 4 zur Bestimmung der Integrationseffizienz des GFP- (a) bzw. *Cln7*-HA-Transgens (b) in den AAVS1-Lokus. HSPCs wurden mit AAVS1-RNP transfiziert und mit AAV6-Donoren transduziert. Zur Kontrolle wurden HSPCs nicht behandelt oder ohne AAVS1-RNP transfiziert und nur mit AAV6-Donoren transduziert. Die Analyse erfolgte 4 Tage nach Genomeditierung. Zelltrümmer und -dubletten wurden wie in Abb. A.1 gezeigt von der Analyse ausgeschlossen. In (b) dargestellte Zellen wurden mit Anti-HA-FITC gefärbt. (c) TIDE-Analyse zur Bestimmung der Anteile der Sequenzen mit InDels im AAVS1-Lokus in editierten HSPCs. HSPCs wurden mit AAVS1-RNP transfiziert (keine Transduktion mit AAV6-Donor), 4 Tage danach wurde gDNA isoliert, AAVS1 amplifiziert und sequenziert. DNA-Sequenzen wurden mittels TIDE-Webtool analysiert (Brinkman et al. 2014, <https://tide.deskgen.com>). (d) Mittels FACS-Analyse bestimmte Integrationseffizienzen des GFP- bzw. *Cln7*-HA-Transgens in den AAVS1-Lokus in editierten HSPCs aller Spender. FACS-Analysen wurden wie in (a) und (b) beschrieben durchgeführt.

PCRs durchgeführt. In Abb.3.27 sind die Gelelektrophorese-Aufnahmen der PCRs beispielhaft von Nabelschnurblutspender 4 abgebildet. Wie bereits in ARO-iPS konnte auch in den HSPCs die spezifische Integration des GFP bzw. des *Clcn7*-HA-Transgens in den AAVS1-Lokus nachgewiesen werden.

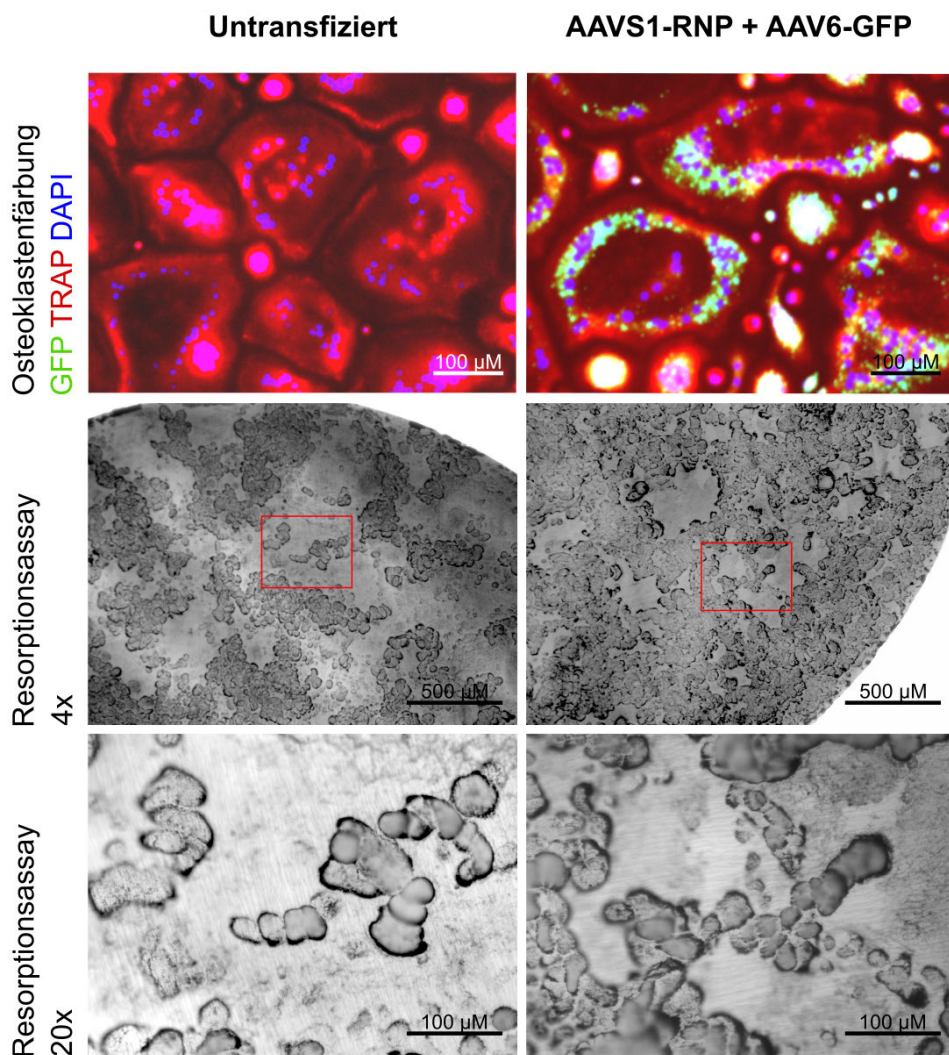
Es lässt sich zusammenfassen, dass die Editierungseffizienz und damit auch der Anteil der HSPCs mit erfolgreicher Transgenaddition in den AAVS1-Lokus sich zwar von Spender zu Spender unterschieden hat, insgesamt aber sehr hoch war, besonders wenn man bedenkt, dass kein Schritt zur Selektion der erfolgreich editierten Zellen stattgefunden hat. Außerdem lässt sich vermuten, dass die Effizienz zur Integration des deutlich größeren *Clcn7*-HA-Konstruktes etwas geringer ist als die des GFP-Transgens.



**Abbildung 3.27: PCR-Nachweis der Transgenaddition in den AAVS1-Lokus editierter HSPCs.** Genomische DNA wurde aus HSPCs 4 Tage nach AAVS1-Genomeditierung der HSPCs gewonnen: untransfiziert, transfiziert ohne AAVS1-Cas9-RNP (Mock), transfiziert mit RNP, transfiziert mit RNP und transduziert mit AAV6-GFP (RNP + GFP) oder AAV6-C7 (RNP + C7-HA). Gelelektrophorese-Aufnahmen der PCRs zum Nachweis des AAVS1-Lokus ohne Transgen (1006 bp), des linken Übergangs AAVS1 zu Transgen (1103 bp) und des rechten Übergangs Transgen zu AAVS1 (GFP-Transgen: 1468 bp, *Clcn7*-HA-Transgen: 1997 bp). Die PCR-Negativkontrolle enthielt keine DNA.

### 3.4.3 Erfolgreiche Transgenexpression in differenzierten funktionellen Osteoklasten editierter HSPCs

In einem Pilotexperiment wurden schließlich unbehandelte HSPCs und HSPCs, die mit dem AAVS1-spezifischen Cas9-RNP transfiziert und mit dem AAV6-GFP-Donor transduziert worden waren, in Osteoklasten differenziert. Insgesamt fiel auf, dass



**Abbildung 3.28: Differenzierung und Resorptionsanalyse von Osteoklasten editierter HSPCs.** TRAP- und DAPI-gefärbte OKs, differenziert aus nicht editierten (untransfiziert) und editierten (AAVS1-RNP + AAV6-GFP) HSPCs. Für das Resorptionsassay wurden nicht editierte und editierte HSPCs für 14 Tage auf Dentin in Osteoklasten differenziert. Erodierete Dentinoberfläche wurde mit Tinte angefärbt.

sich aus HSPCs differenzierte Zellen ungewöhnlich schnell (2–3 Tage nach RANKL-Zugabe) zu abnormal großen Osteoklasten mit häufig über 50 Nuklei entwickelten. Differenzierte TRAP- und DAPI-gefärbte Osteoklasten sind in den repräsentativen Fluoreszenzaufnahmen in Abb. 3.28 zu sehen, wobei in den Osteoklasten der editierten HSPCs auch eine deutliche GFP-Expression erkennbar ist. Die Differenzierung schien in den editierten HSPCs nicht beeinträchtigt gewesen zu sein. Ungefärbte (nicht gezeigt) und gefärbte editierte HSPCs stimmten in der Morphologie mit der untransfizierter Kontroll-HSPCs überein. Obwohl nur 60% der HSPCs dieses Spenders durch die Genomeditierung GFP<sup>+</sup> waren, ließ sich diese GFP-Expression in nahezu allen Osteoklasten beobachten, war jedoch in den einzelnen Osteoklasten unterschiedlich stark ausgeprägt. Zusätzlich wurde die Knochenresorptionsfähigkeit von den Osteoklasten der HSPCs untersucht. Wie in (Abb. 3.28) zu erkennen ist, war auffällig viel Knochenoberfläche sowohl durch nicht editierte als auch durch editierte HSPC-Osteoklasten gleichermaßen erodiert. Aufgrund dieses Pilotversuchs lässt sich folglich schlussfolgern, dass vermutlich weder Osteoklastendifferenzierung noch -funktion durch die Prozesse der Genomeditierung in HSPCs beeinträchtigt wurden.

## 4 Diskussion

Die CRISPR/Cas9-Technologie ermöglicht eine effiziente und spezifische Genomeditierung und eröffnet damit neue Möglichkeiten für die zellbasierte Gentherapie schwerer genetisch bedingter Erkrankungen. Für die Entwicklung neuer gentherapeutischer Ansätze und die Untersuchung dieser auf ihre Wirksamkeit und Sicherheit, sind jedoch Krankheitsmodelle notwendig. Induzierte pluripotente Stammzellen stellen eine unerschöpfliche Quelle manipulierbarer humaner Zellen verschiedenster genetischer Hintergründe dar, die sich gezielt in eine Vielzahl spezifischer Zelltypen differenzieren lassen und sich daher ausgezeichnet für die In-vitro-Krankheits- und Therapiemodellierung eignen. Die Kombination der iPS- und der CRISPR/Cas9-Technologie erlaubte innerhalb der letzten Jahre die Entwicklung zahlreicher iPS-Krankheitsmodelle genetisch bedingter Erkrankungen, wie bspw. Duchenne-Muskeldystrophie (Li et al. 2015; Young et al. 2016), zystische Fibrose (Firth et al. 2015), hypertrophe Kardiomyopathie (Jehuda et al. 2018) und neonataler Diabetes (Ma et al. 2018), in denen sowohl die molekularen und zellulären Pathomechanismen der zugrundeliegenden Mutationen als auch der therapeutische Effekt einer genetischen Korrektur untersucht werden konnte.

### 4.1 Patientenspezifische iPS als In-vitro-Krankheitsmodell für ARO

Insbesondere für seltene Erkrankungen wie die autosomal-rezessive Osteopetrose, bei denen Patientenmaterial für In-vitro-Versuche nur schwer zugänglich ist, stellen iPS für die Erforschung dieser Krankheiten eine gute Alternative zu primären Zellen dar. Erste Versuche der In-vitro-Krankheits- und Gentherapiemodellierung für *TCIRG1*-bedingte ARO wurden 2015 zunächst in osteopetrotischen iPS der Maus (Neri et al. 2015) und kürzlich auch in humanen iPS eines ARO-Patienten durchgeführt (Chen et al. 2019). Für *CLCN7*-bedingte ARO wurde bisher allerdings weder ein humanes iPS-basiertes Krankheitsmodell noch eine gentherapeutische Strategie beschrieben.

### 4.1.1 Generierung der iPS-Linie BIHi002-A (ARO-iPS) aus PBMCs eines Patienten mit *CLCN7*-bedingter ARO

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde zunächst aus PBMCs eines Patienten mit neuropathischer autosomal-rezessiver Osteopetrose die iPS-Linie BIHi002-A (ARO-iPS) generiert. Diese Zelllinie trägt die patientenspezifische pathogene Compound-Heterozygotie des *CLCN7*-Gens, und aufgrund des Schweregrades der Osteopetrose des Patienten ist anzunehmen, dass diese zu einem Defekt des ClC-7-Chloridtransporters führt. Unsere Zelllinie BIHi002-A ist die erste in der Literatur beschriebene humane iPS-Linie eines Patienten mit *CLCN7*-bedingter ARO. Wenige Monate nach der Veröffentlichung unserer Patientenzelllinie wurde die Generierung einer weiteren humanen iPS-Linie eines ARO-Patienten mit einer anderen *CLCN7*-Mutation veröffentlicht (Okur et al. 2019). Darüber hinaus wurden kürzlich auch iPS eines *CLCN7*-bedingten ADOII-Patienten (Ou et al. 2019) sowie einzelne humane iPS-Linien von ARO-Patienten mit Mutationen in anderen Genen (*TCIRG1* und *SNX10*) erzeugt (Xu et al. 2017; Chen et al. 2019; Lanzi et al. 2019; Okur et al. 2019).

### 4.1.2 Etablierung eines Protokolls zur Differenzierung von iPS in Osteoklasten

Um die Effekte der osteopetroseassoziierten Mutationen auf die Osteoklastenfunktion untersuchen zu können, ist neben der Erzeugung von Patienten-iPS-Linien auch die Entwicklung eines Protokolls zur Differenzierung der iPS in funktionstüchtige Osteoklasten notwendig. Auf der Basis der Protokolle zur Differenzierung von Makrophagen aus iPS von Lachmann et al. und Buchrieser et al. entwickelte meine Kollegin Uta Rössler die in dieser Arbeit von mir angewandte Methode zur iPS-Osteoklastendifferenzierung (Lachmann et al. 2015; Buchrieser et al. 2017). Zwar wurden in den letzten Jahren bereits ähnliche Protokolle zur Differenzierung von humanen pluripotenten Stammzellen in Osteoklasten veröffentlicht (Choi et al. 2009; Grigoriadis et al. 2010; Jeon et al. 2016; Chen et al. 2017a), diese sind im Vergleich zu unserem Protokoll jedoch aufwendiger, benötigen beispielsweise eine Anreicherung der myeloiden Progenitoren, verwenden zusätzliche Wachstumsfaktoren und ergeben eine geringere Osteoklastenausbeute. Mit dem von uns entwickelten iPS-Differenzierungsprotokoll ließen sich über einen Zeitraum von mehr als zwei Monaten wöchentlich mehrere Millionen monozytäre Zellen ernten und es entwickelten sich bis zu 85% der angehefteten Vorläuferzellen zu Osteoklasten. Zwar wurde in den bisher beschriebenen Protokollen zur iPS-Osteoklastendifferenzierung keine Quantifizierung der Differenzierungseffizienz vorgenommen, anhand der Aufnahmen dif-



ferenzierter Osteoklasten lässt sich allerdings erkennen, dass diese deutlich geringer ist als in unserem Protokoll.

Da bisher noch nicht untersucht wurde, ob sich iPS-basierte Osteoklasten *in vitro* in der Entwicklung, Morphologie und Resorptionsfunktion von primären PBMC-basierten Osteoklasten unterscheiden, wurde im Zuge dieser Arbeit die In-vitro-Osteoklastendifferenzierung und -funktion von zwei gesunden Blutspendern mit der von zwei iPS-Kontrolllinien ebenfalls gesunder Spender verglichen. Insgesamt waren sowohl die Entwicklung der Osteoklasten als auch die osteoklastentypische Zellmorphologie von iPS- und PBMC-Osteoklasten vergleichbar. Allerdings waren aus iPS differenzierte Osteoklasten im Mittel signifikant größer und hatten mehr Nuclei als primäre *in vitro* differenzierte Osteoklasten. Da diese Phänomene jedoch bei einer der beiden Kontrollzelllinien deutlich stärker vorhanden waren als bei der anderen Kontrolle, spricht dies dafür, dass die beobachteten Unterschiede in der Osteoklastengröße auch auf die verschiedenen Eigenschaften der Zellspender, wie etwa genetischer Hintergrund, Alter und Geschlecht, und nicht nur auf den iPS-Ursprung selbst oder das iPS-Differenzierungsprotokoll zurückzuführen sind. Die iPS-Kontrollzelllinie BIHi001-A (iPS-1A) wurde aus Vorhautfibroblasten eines kaukasischen Neugeborenen erzeugt, während die Linie BIHi004-A (iPS-4A) aus Fibroblasten einer Hispanoamerikanerin im Alter von 35–39 Jahren hervorgegangen ist.

Für die In-vitro-Untersuchung von osteopetroseassoziierten Mutationen mithilfe von iPS-Osteoklasten ist neben der typischen Zellmorphologie die Resorptionsfähigkeit der differenzierten Osteoklasten besonders entscheidend. Im Zuge dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Knochenresorptionsfunktion von iPS-Osteoklasten vergleichbar mit der *in vitro* differenzierter primärer Osteoklasten ist. Es ließen sich keine Unterschiede in der Morphologie der Knochenresorption von PBMC- und iPS-Osteoklasten feststellen. Im Vergleich zu PBMC-Osteoklasten erodierten aus iPS differenzierte Osteoklasten jedoch tendenziell etwas mehr Knochenoberfläche und bildeten anteilig auch häufiger kanalförmige Resorptionsvertiefungen. Davon ausgehend und weil die kanalförmige Knochenresorption im Vergleich zur grubenförmigen den aggressiveren Abbaumechanismus darstellt, der durch erhöhte Cathepsin-K-Expression und damit mehr Kollagenolyse charakterisiert ist (Merrild et al. 2015; Søre und Delaissé 2017), scheint die Resorptionsaktivität der iPS-Osteoklasten etwas höher und aggressiver zu sein als die der PBMC-Osteoklasten. Dies ist vermutlich auf die beobachtete Vergrößerung und die vermehrte Anzahl der Nuclei zurückzuführen, da bereits mehrfach beschrieben wurde, dass größere Osteoklasten mit mehr Zellkernen auch ein höheres Maß an Resorption zeigen (Piper et al. 1992; Lees et al. 2001; Boissy et al. 2005).

Merrild et al. beobachteten außerdem eine vermehrte und aggressivere Knochenresorption (mit mehr kanalförmigen Resorptionsvertiefungen) bei Osteoklasten, die aus Knochenmarkszellen anstatt aus PBMCs differenziert wurden (Merrild et al. 2015). Auch Osteoklasten, die in dieser Arbeit aus Nabelschnurblut-HSPCs differenziert wurden, zeigten ein ungewöhnlich hohes Maß an Knochenresorption. Darüber hinaus entwickelten sie sich auffällig schnell zu besonders großen Zellen. Somit scheinen aus iPS differenzierte Osteoklasten solchen Osteoklasten tendenziell ähnlicher zu sein, die *in vitro* aus Knochenmarkszellen bzw. HSPCs differenziert wurden als solchen, die von PBMCs abstammen. Dies deutet darauf hin, dass die aus iPS differenzierten monozytären Zellen weniger reif sind als Monozyten des peripheren Blutes. Diese Hypothese könnte durch einen direkten Vergleich von *in vitro* differenzierten iPS-Osteoklasten und Knochenmarks- bzw. HSPC-Osteoklasten überprüft werden.

Wie bereits in der Literatur mehrfach beschrieben wurde, stellt die hohe Datenvariabilität bei der Arbeit mit In-vitro-Osteoklastenassays eine Herausforderung dar (Roodman 1999; Kirstein et al. 2006; Grigoriadis et al. 2010; Merrild et al. 2015). Wie auch bereits oben diskutiert wurde, unterscheidet sich erfahrungsgemäß das Differenzierungspotenzial und die -kinetik zwischen verschiedenen Zellspendern. Bei dem von uns entwickelten Protokoll zur Differenzierung von Osteoklasten aus iPS waren abhängig vom Zellspender nach der Zugabe von RANKL zum Kulturmedium die ersten Osteoklasten zwischen zwei und neun Tagen später sichtbar. Auch bei der Wiederholung eines Experimentes mit Zellen desselben Spenders waren Abweichungen von 1–2 Tagen möglich. Hinzu kommt, dass Osteoklasten aufgrund ungehemmter Zellfusion *in vitro* umso größer werden, je länger sie kultiviert werden. Um die Osteoklasten zwischen verschiedenen Zellspendern zu möglichst vergleichbaren Zeitpunkten beurteilen zu können, wurden die Zellen daher stets gleich lang ab Erscheinen der ersten sichtbaren Osteoklasten weiterkultiviert. Da allerdings zahlreiche weitere Faktoren wie z.B. Zelldichte und -verteilung die Osteoklastenentwicklung außerdem stark beeinflussen und sich bereits minimale Zeitunterschiede in der Kultivierungsdauer in quantitativen Osteoklastenassays bemerkbar machen, ist bei allen In-vitro-Osteoklastenassays eine hohe Datenvariabilität zu erwarten. So ließ sich auch bei den hier differenzierten iPS-Osteoklasten eine hohe Variabilität der Osteoklastenmorphologie und -aktivität beobachten, nicht nur zwischen Zellen verschiedenen Ursprungs, sondern auch innerhalb experimenteller Replikate mit Zellen desselben Spenders.

Es lässt sich zusammenfassen, dass wir ein einfaches und effizientes Protokoll zur Differenzierung von iPS zu Osteoklasten entwickelt haben. Außerdem konnte an-

hand von quantitativen und qualitativen Analysen zum ersten Mal gezeigt werden, dass *in vitro* die Entwicklung, Zellmorphologie und Resorptionsfunktion von iPS-basierten und primären Osteoklasten vergleichbar sind. Dies ermöglicht die Untersuchung von Pathomechanismen diverser Osteoklastendefekte mithilfe von patientenspezifischen iPS-Linien, die entweder direkt aus somatischen Patientenzellen reprogrammiert oder mittels CRISPR/Cas9-basierter Genomeditierung von Kontrollzelllinien generiert werden können.

##### 4.1.3 iPS-basiertes ARO-Krankheitsmodell

Sowohl durch die Generierung einer patientenspezifischen ARO-iPS-Linie als auch durch die Etablierung eines Protokolls zur Differenzierung der iPS zu Osteoklasten wurde ein Krankheitsmodell geschaffen, mit dem die Effekte der pathogenen Mutation auf die Osteoklastenentwicklung und -funktionalität untersucht werden können. Die *in vitro* differenzierten Osteoklasten der generierten Zelllinie ARO-iPS spiegelten den zellulären Phänotyp der *CLCN7*-bedingten ARO wider. Die Osteoklasten unseres iPS-basierten ARO-Modells wiesen eine normale Osteoklastogenese sowie die zelltypische Morphologie auf. Verglichen mit den Osteoklasten der Kontrollzelllinien waren die *CLCN7*-defekten Osteoklasten der ARO-iPS allerdings signifikant vergrößert und hatten mehr Nuklei, was sich mit den Beobachtungen von Kornak et al. und Neutzsky-Wulff et al. im *Clcn7*<sup>-/-</sup>-Mausmodell deckt (Kornak et al. 2001; Neutzsky-Wulff et al. 2008; Weinert et al. 2010). Überraschenderweise wiesen *in vitro* differenzierte Osteoklasten dieses Osteopetrose-Mausmodells allerdings keine Größenauffälligkeiten auf (Neutzsky-Wulff et al. 2008). Aber auch in Knochenbiopsien von ARO und ADO-Patienten wurden deutlich vergrößerte Osteoklasten beobachtet (Bollerslev et al. 1993; Del Fattore et al. 2006). Ungeklärt ist bisher noch die Ursache für die vergrößerten *CLCN7*-defekten Osteoklasten. Denkbar wäre eine verringerte Apoptose, die hier bei der In-vitro-Differenzierung der Osteoklasten jedoch nicht beobachtet wurde. Vielmehr differenzierten die Osteoklastenvorläufer der ARO-iPS-Linie schneller zu besonders großen Osteoklasten mit überdurchschnittlich vielen Nuklei als die der Kontroll-iPS, was auf eine vermehrte Zellfusion hindeuten könnte. Eine detaillierte Analyse der Osteoklastogenese und der damit einhergehenden Zellfusion könnte neue Erkenntnisse über den zugrunde liegenden Pathomechanismus liefern.

Osteoklasten der ARO-iPS waren nicht in der Lage, Resorptionsvertiefungen zu bilden. Dieser Resorptionsdefekt wurde auch bei *in vitro* differenzierten Osteoklasten des *Clcn7*<sup>-/-</sup>-Mausmodells beobachtet (Kornak et al. 2001; Neutzsky-Wulff et al. 2008). Neutzsky-Wulff et al. konnten außerdem nachweisen, dass der beobachtete

Resorptionsdefekt auf die Unfähigkeit der ClC-7-defekten Osteoklasten zurückzuführen ist, den anorganischen Knochenanteil, nicht jedoch den organischen abzubauen zu können (Neutzsky-Wulff et al. 2008). Abhängig von der Art der *CLCN7*-Mutation und der Schwere der Osteopetrose wurde anstatt eines vollständigen Resorptionsverlustes jedoch auch eine eingeschränkte Resorptionsfunktion beobachtet (Henriksen et al. 2004; Kornak et al. 2006; Del Fattore et al. 2006; Chen et al. 2016). Unklar ist bisher allerdings der genaue Pathomechanismus des Resorptionsdefektes von ClC-7-defekten Osteoklasten. Kornak et al. konnten zum einen zeigen, dass die Säuresekretion in die Resorptionslakunen der *Clcn7*<sup>-/-</sup>-Osteoklasten stark beeinträchtigt war, zum anderen war aber auch die Ausbildung der Bürstensaummembran gestört (Kornak et al. 2001). Somit könnte der Resorptionsdefekt sowohl primär auf den Azidifizierungsdefekt selbst zurückzuführen sein, oder aber der ClC-7-Defekt beeinträchtigt den lysosomalen Transport und damit die Ausbildung der Bürstensaummembran, über die die Säuresekretion der Osteoklasten bewerkstelligt wird. Letzteres wird dadurch bekräftigt, dass die intrazelluläre (lysosomale) Azidifizierung ClC-7-defekter Zellen nicht betroffen zu sein scheint (Kornak et al. 2001; Lange et al. 2006; Weinert et al. 2010).

Die beiden *CLCN7*-Mutationen c.875G>A (p.G292E) und c.1208G>A (p.R403Q) unserer Patientenzelllinie wurden bisher noch nicht näher charakterisiert. Letztere wurde allerdings bereits zusammen mit einer weiteren *CLCN7*-Mutation als ebenfalls compound heterozygote Mutation eines ARO-Patienten beschrieben (Pangrazio et al. 2010). Da die Osteoklasten der ARO-iPS, wie auch die der *Clcn7*<sup>-/-</sup>-Maus, *in vitro* keinerlei Resorptionsvertiefungen bilden können, ist anzunehmen, dass die Missense-Mutationen im *CLCN7*-Gen unseres ARO-Patienten zu einem vollständigen Funktionsverlust oder zur Instabilität des Chloridtransporters ClC-7 führen. Die betroffenen Aminosäuren 292 und 403 des Chloridtransporters sind in der  $\alpha$ -Helix G bzw. J lokalisiert (siehe Abb. 1.8) und sind somit nicht an der Chloridbindung beteiligt. Dennoch könnten die durch die Missense-Mutationen verursachten Aminosäuresubstitutionen die Proteinstabilität und -funktionalität stark einschränken, da die unpolare Aminosäure Glycin durch die negativ geladene Glutaminsäure bzw. das positiv geladene Arginin durch das ungeladene Glutamin ersetzt ist. Zudem sind die beiden Aminosäuren zwischen verschiedenen Wirbeltieren hoch konserviert. In einem ARO-Patienten wurde die homozygote *CLCN7*-Mutation c.889G>A (p.V297M) identifiziert, die sich in unmittelbarer Nähe zu der hier beschriebenen Mutation p.G292E befindet und wie diese ebenfalls in der  $\alpha$ -Helix G lokalisiert ist (Phadke et al. 2010). Zwar ist die in diesem Fall betroffene Aminosäure nicht direkt in die Chloridbindung involviert, ihre Seitenkette zeigt jedoch in Richtung der Chloridbin-

dungsstelle, weshalb Phadke et al. vermuteten, dass der Austausch der kleinen Aminosäure Valin durch eine Aminosäure mit größerer Seitenkette wie Methionin mit einer räumlichen und damit funktionellen Störung der Bindungsstelle einhergehen könnte (Phadke et al. 2010). Darüber hinaus konnten Leisle et al. zeigen, dass die *CLCN7*-Mutation p.V297M nicht zu einer verringerten Proteinexpression des mutierten ClC-7, aber zum Verlust der Membranströme führt, was eine direkte Störung des Ionentransportes von ClC-7 durch die Mutation vermuten lässt (Leisle et al. 2011). Diese mögliche Erklärung für die Pathogenität der Mutation p.V297M kann auch für die hier beschriebene und benachbarte Mutation p.G292E in Betracht gezogen werden, da die kleine Aminosäure Glycin durch die weitaus größere Glutaminsäure ersetzt ist. Zwar wurden auch Varianten des *CLCN7*-Gens identifiziert, die sich in der Nähe der zweiten hier beschriebenen Mutation c.1208G>A (p.R403Q) befinden (p.R403X und p.G389R), jedoch ist bisher noch nichts über deren Pathogenität und Bedeutung für die ClC-7-Proteinfunktion veröffentlicht.

Eine genaue Charakterisierung der von uns erzeugten Patientenzelllinie BIHi002-A (ARO-iPS) in Hinblick auf die Auswirkungen der *CLCN7*-Mutationen auf den Chloridtransporter selbst und dessen Fehlfunktion auf die Zelle stand nicht im Fokus dieser Arbeit, könnte jedoch Bestandteil zukünftiger Untersuchungen sein. Eine Immunofluoreszenzanalyse von ClC-7 könnte beispielsweise Aufschluss über die Lokalisation und Stabilität des mutierten Transporters geben. Durch die Analyse des pH-Wertes der Resorptionslakunen und der Lysosomen könnte überprüft werden, ob die Mutationen der ARO-iPS Zelllinie wie im Fall des *Clcn7*-Knockouts zu einem Azidifizierungsdefekt führen. Darüber hinaus könnten die Bürstensaummembran und Versiegelungszone der Osteoklasten mittels Elektronenmikroskopie untersucht werden. Eine Fusionsanalyse könnte außerdem klären, ob die vergrößerten Osteoklasten das Ergebnis vermehrter Zellfusion sind. Zudem wurde im Rahmen dieser Arbeit nur der zelluläre Phänotyp der Osteoklasten untersucht. Da der Patient aus dessen Zellen die ARO-iPS-Linie generiert wurde, aber neben dem für die Osteopetrose typischen Knochenphänotyp zusätzlich eine schwere Neuropathie aufwies, könnten auch wichtige Erkenntnisse aus der Untersuchung iPS-abgeleiteter Neurone oder Gehirn-Organoiden gewonnen werden.

Obwohl der Pathomechanismus der *CLCN7*-bedingten Osteopetrose im Groben verstanden ist, sind viele Details insbesondere im Hinblick auf die Heterogenität der Erkrankung und der physiologischen Rolle von ClC-7 noch nicht geklärt. Bisher ist noch keine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation etabliert, da es zum einen viele verschiedene Mutationen gibt, die zu unterschiedlich starken Ausprägungen der Erkrankung führen, zum anderen wurden aber selbst verschiedene Schweregrade

innerhalb einer Familie beobachtet, die dieselbe Mutation teilen (Frattini et al. 2003; Waguespack et al. 2007). Somit ist es aufgrund der großen Heterogenität der *CLCN7*-bedingten ARO und der mangelnden Kenntnisse über die Effekte verschiedenster Mutationen auf die Funktion des Chloridtransporters und folglich auch die Osteoklastenfunktion, oftmals sehr schwierig, frühzeitig eine Verlaufsprognose zu erstellen. Diese ist jedoch nicht nur für die Eltern betroffener Kinder, sondern vor allem auch für die Planung der Behandlungsstrategie von großer Bedeutung. Hier konnte gezeigt werden, dass zu Osteoklasten differenzierte iPS eines ARO-Patienten als ein In-vitro-Krankheitsmodell genutzt werden können, das die für die Erkrankung typische Osteoklastendysfunktion widerspiegelt. Damit ist dieses iPS-basierte Krankheitsmodell ein für die Erforschung der Osteopetrose wertvolles Tool, mit dem nicht nur Mutationen und ihre Effekte auf die Osteoklastenentwicklung und -funktion systematisch untersucht, sondern auch neue Therapien entwickelt und getestet werden können.

## 4.2 CRISPR/Cas9-basierte gentherapeutische Strategien für Osteopetrose

### 4.2.1 Effiziente HDR-vermittelte Mutationskorrektur in ARO-iPS

Die patientenspezifische Mutationskorrektur mittels CRISPR/Cas9-Genomeditierung ist eine mögliche gentherapeutische Strategie für ARO-Patienten, die in dem hier entwickelten ARO-iPS-Krankheitsmodell getestet wurde. Durch die Verwendung eines besonders reichhaltigen iPS-Kulturmediums, der Cas9-Ribonukleoproteine und modifizierter ssODN-Donoren konnten ohne Selektion InDels in bis zu 80% und HDR-vermittelte monoallelische Mutationskorrekturen in 30% der Zellen erreicht werden. Die hier erzielten hohen Editierungs- und Korrektoreffizienzen sind vergleichbar mit denen neuester Publikationen, die ebenfalls hoch effiziente Veränderungen einzelner Nukleotide mittels CRISPR und ssODN-Donoren in iPS mit vergleichbaren Protokollen zeigten. Okamoto et al. und Yumlu et al. konnten die gewünschten Punktmutationen in 18 bzw. 21% der iPS einbringen (Yumlu et al. 2017; Okamoto et al. 2019). Bruntraeger et al. zeigten eine Mutationsrate von 98% sowie HDR-vermittelte Nukleotidaustausche in bis zu 40% von editierten iPS-Klonen (Bruntraeger et al. 2019). Ähnliche Korrektoreffizienzen mithilfe der Elektroporation von Cas9-RNPs und ssODNs in iPS wurden auch von Xu et al. erreicht (Xu et al. 2018).

Allerdings ist eine derart effiziente Genomeditierung in iPS erst dank neuester methodischer Verbesserungen möglich. Noch vor wenigen Jahren war die CRISPR-Technologie in iPS nur schwer anzuwenden. Zwar brachte die Entdeckung des CRISPR/Cas9-Systems den Durchbruch hinsichtlich einfacher, schneller und effizienter Genomeditierung, allerdings zeigte sich auch, dass es besonders hinsichtlich der Effizienz große Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen gibt. Insbesondere in humanen iPS war die Genomeditierung anfänglich äußerst ineffizient, und gezielte, HDR-vermittelte Veränderungen waren nur mithilfe von Selektionsmarkern zu bewerkstelligen (Mali et al. 2013b; Miyaoka et al. 2016; Burnight et al. 2017). Beispielsweise konnten zu Beginn in humanen iPS lediglich Editierungseffizienzen von 2–4% (Mali et al. 2013b) und HDR-vermittelte Nukleotidaustausche in weniger als 0,2% der Zellen erzielt werden (Miyaoka et al. 2016). Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass iPS schwer zu transfizierende Zellen sind, da sie besonders leicht apoptotisch werden, ihre Pluripotenz verlieren und größere Mengen exogener DNA zytotoxisch auf sie wirken.

Während anfänglich Cas9, gRNA und Donor-DNA mithilfe von Plasmiden in die Zellen geschleust wurden (Xue et al. 2014; Kime et al. 2016), werden heute hauptsächlich plasmidfreie Methoden in iPS verwendet (Martin et al. 2019; Bruntraeger et al. 2019). Kim et al. und Hendel et al. konnten zeigen, dass die Elektroporation von prä-komplexierten Cas9-gRNA-Ribonukleoproteinen deutlich schonender als eine plasmidbasierte Transfektion für primäre humane Zellen ist und in höheren Editierungseffizienzen resultiert (Kim et al. 2014; Hendel et al. 2015). Auch für die Donorkonstrukte stehen mittlerweile nicht-plasmid Alternativen zur Verfügung, sodass auch eine HDR-vermittelte Genomeditierung plasmidfrei durchgeführt werden kann. Ding et al. und Yang et al. etablierten die präzise HDR-vermittelte Genomeditierung mittels CRISPR/Cas9 und ssODN-Donoren in iPS bereits 2013 (Ding et al. 2013; Yang et al. 2013). Durch die Kombination von Cas9-RNPs und ssODNs können somit kleine Genomveränderungen effizient auch in empfindlichen Zelltypen eingefügt werden, ohne dass die Editierungskomponenten selbst die Zellviabilität stark beeinträchtigen (Schumann et al. 2015; Gundry et al. 2016). Wie von Hendel et al. und Renaud et al. beschrieben wurde, können chemische Modifikationen von gRNAs und ssODNs die Stabilität und somit auch zusätzlich die Editierungseffizienzen steigern (Hendel et al. 2015; Renaud et al. 2016). Außerdem erzielten Richardson et al. und Okamoto et al. mehr HDR-vermittelte Genomeditierungen mit antisense-ssODNs, die komplementär zur lokusspezifischen Sequenz der gRNA sind, als mit sense-ssODNs (Richardson et al. 2016; Okamoto et al. 2019). Neben den Komponenten für die Genomeditierung selbst sind bei der genetischen Manipulation von

iPS die Transfektionsmethode und die Wahl des Mediums entscheidend. Insbesondere wenn klonale Populationen aus editierten Einzelzellen expandiert werden sollen, ist das richtige Kulturmedium von großer Bedeutung. Unter den Transfektionsmethoden haben sich die Neon<sup>®</sup> Transfektion und Nukleofektion bewährt (Byrne et al. 2014). Chen und Pruett-Miller untersuchten systematisch unterschiedliche Kulturbedingungen für die klonale Expansion von iPS und erzielten mit StemFlex<sup>™</sup> und Cellartis<sup>®</sup> DEF-CS<sup>™</sup> Medium die besten Ergebnisse (Chen und Pruett-Miller 2018). Aufgrund eigener Erfahrungen und der in der Literatur beschriebenen Optimierungsmöglichkeiten wurden für die Mutationskorrekturen in den iPS in dieser Arbeit daher Cas9-RNPs, modifizierte antisense-ssODNs und gRNAs, Neon<sup>®</sup> Transfektion und Cellartis<sup>®</sup> DEF-CS<sup>™</sup> Medium verwendet.

In den hier verwendeten antisense-ssODN-Donoren waren nicht nur die entsprechenden Mutationskorrekturen codiert, sondern gleichzeitig auch stille Mutationen in unmittelbarer Nähe der korrigierten Nukleotide. Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass nach erfolgreicher HDR-vermittelter Korrektur das erneute Binden des Cas9-RNPs verhindert wird, was zu InDels und damit zum Verlust der bereits erfolgten Mutationskorrektur führen kann. Wie auch bereits in der Literatur beschrieben wurde, führt diese Strategie somit zu höheren Korrekturraten (Paquet et al. 2016; Maguire et al. 2019; Okamoto et al. 2019). Da es durch die CRISPR/Cas9-Genomeditierung auch zu größeren On-Target-Deletionen kommen kann (Kosicki et al. 2018), kann bei der auf Sanger-Sequenzierung basierenden Genotypisierung editierter Klone der Verlust von Heterozygotie leicht als Homozygotie missinterpretiert werden. Mithilfe der stillen Mutationen, die nach erfolgreicher HDR-basierter Korrektur heterozygot vorliegen, kann daher leichter ein Verlust der Heterozygotie in editierten Klonen identifiziert werden. In der Tat wurden zwei Klone identifiziert, die zwar nicht mehr die pathogene Mutation in Exon 10 des *CLCN7*-Gens, aber auch nicht die stillen Mutationen des ssODNs aufwiesen. Eine qPCR-Analyse des Lokus offenbarte jedoch, dass kein Allelverlust stattgefunden hatte, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass Cas9-induziert das betroffene maternale Allel mithilfe des paternalen Wildtypallels korrigiert wurde. Cas9-induzierte donorunabhängige Korrekturen mittels interhomologer Rekombination wurden auch schon von Anderen in editierten humanen Zygoten beschrieben (Ma et al. 2017; Lee und Kim 2018).

Obwohl iPS schwer zu transfizierende Zellen sind, gelang hier durch die beschriebene Kombination verschiedenster Optimierungen der CRISPR/Cas9-Methode die Mutationskorrektur selektionsfrei und in außergewöhnlich hohem Maß, wie es bisher noch nicht oft in der Literatur beschrieben wurde.



#### 4.2.2 Allelspezifische gRNAs und Cas9-RNPs ermöglichen hoch spezifische Genomeditierung

Durch die Wahl einer gRNA, die die heterozygote Patientenmutation abdeckt und in der diese möglichst nah am 3'-Ende des lokusspezifischen Teils der gRNA lokalisiert ist, konnte überwiegend erreicht werden, dass lediglich das betroffene Allel editiert wurde, während das Wildtypallel intakt blieb. Die c.875G>A Mutation in Exon 10 des *CLCN7*-Gens ist an vierter Stelle des 3'-Endes der gRNA-Zielsequenz lokalisiert, während die Mutation c.1208G>A in Exon 14 durch die siebte Position abgedeckt wird. Da die letzten fünf Basen vor dem 3'-Ende der gRNA-Zielsequenz (sogenannte Seed-Sequenz) als besonders wichtig für gRNA-Bindung gelten und daher Basen-fehlpaarungen in diesem Bereich kaum oder gar nicht vom Cas9-Protein toleriert werden (Mali et al. 2013a; Hsu et al. 2013; Wang et al. 2014; Wu et al. 2014), war davon auszugehen, dass die Allelspezifität der gRNA für Exon 10 sehr hoch sein würde, während die gRNA für Exon 14 zu einem kleinen Anteil möglicherweise auch das Wildtyp-Allel binden könnte. Überraschenderweise ließ sich aber das Gegenteil beobachten. Während bei Exon 14 ausschließlich Editierungen des pathogenen Zielallels nachgewiesen werden konnten, wurden in Exon 10 in 36% der untersuchten Wildtypallele unspezifische genetische Veränderungen identifiziert. Allerdings war die Editierungseffizienz insgesamt auch deutlich höher in Exon 10. Sind die verwendete Zelllinie und das angewendete Editierungsprotokoll identisch, haben der Ort des Ziellokus selbst, aber auch die Sequenz des lokusspezifischen Teils der gRNA Einfluss auf die Editierungseffizienz. Beispielsweise wurden Guanin an erster und Cytosin an fünfter Position des 3'-Endes sowie ein GC-Gehalt von über 60% der gRNA-Zielsequenz mit höheren Effizienzen in Zusammenhang gebracht (Doench et al. 2014; Ren et al. 2014; Wang et al. 2014). Diese Eigenschaften der gRNA-Sequenz treffen auf die gRNA für Exon 10, nicht jedoch Exon 14 zu, was eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Editierungseffizienzen sein könnte.

Während in der Literatur beschrieben wurde, dass die CRISPR/Cas9-Technologie auch zu unerwünschten Mutationen, großen Deletionen und komplexen strukturellen Veränderungen sowohl am Ziellokus selbst als auch an Off-Target-Stellen führen kann (Fu et al. 2013; Cho et al. 2014; Kosicki et al. 2018), konnten mithilfe der zytogenetischen Analyse und der Genomsequenzierung keine bedeutenden neu entstandenen Alterationen festgestellt werden. Bei der Verwendung einer allelspezifischen gRNA stellt das Wildtypallel die wahrscheinlichste Off-Target-Stelle dar, und dennoch konnten einige Klone identifiziert werden, in denen dort keine Editierung stattgefunden hatte. Je Zelllinie wurden im Genom lediglich einige weni-

ge Einzelnukleotidvarianten festgestellt, die jedoch nicht mit vorhergesagten Off-Target-Stellen in Verbindung gebracht werden konnten und daher wahrscheinlich eher in spontaner Mutationsakkumulation als Folge langer Kultivierungszeiten zu begründen sind. In der Literatur wurden vergleichbare oder sogar größere Anzahlen neu entstandener Varianten in länger kultivierten und editierten pluripotenten Stammzellen und iPS beschrieben (Smith et al. 2014; Suzuki et al. 2014; Veres et al. 2014). Allerdings gilt zu berücksichtigen, dass die genetische Analyse einzelner Klone keineswegs eine allgemeine Aussage zu Off-Target-Effekten der hier angewendeten Editierungsansätze zulässt, da möglicherweise vorhandene Off-Target-Mutationen anderer editierter Zellen desselben Experimentes mit dieser Methode nicht erfasst werden konnten. Dennoch zeigt die genetische Untersuchung der beiden mittels CRISPR/Cas9 korrigierten iPS-Klone, dass eine sichere Editierung ohne Off-Target-Effekte grundsätzlich möglich ist. Die Verwendung von Cas9-RNPs, wie sie auch hier für die Korrektur der ARO-iPS eingesetzt wurden, wurde nicht nur mit erhöhter Editierungseffizienz, sondern auch mit reduzierter Off-Target-Aktivität in Zusammenhang gebracht. Im Gegensatz zur plasmidbasierten Cas9-Expression, können die lokusspezifischen Cas9-RNPs, nachdem sie in die Zellen eingeschleust wurden, den Ziellokus sofort schneiden und persistieren nur für 1–2 Tage in der Zelle, wodurch die Wahrscheinlichkeit für unspezifische Nukleaseaktivität sinkt (Kim et al. 2014; Liang et al. 2015; Schumann et al. 2015). Mittels Cas9-RNPs wurden auch schon andere iPS-Linien erzeugt, in denen keine Off-Target-Mutationen festgestellt werden konnten (Suzuki et al. 2014; Veres et al. 2014; Yang et al. 2014). Dass trotz der Verwendung des Cas9-RNPs abseits von einzelnen Klonen Off-Target-Effekte aber dennoch ein Problem darstellen, konnten Martin et al. durch die Analyse der editierten iPS-Mischkultur zeigen, in der sie in über 60% der Zellen Off-Target-Mutationen nachwiesen (Martin et al. 2019). Mithilfe einer veränderten, spezifischeren Cas9-Nuklease (HiFi-Cas9) konnte die Off-Target-Aktivität jedoch enorm reduziert werden, ohne Beeinträchtigung der Editierung am Ziellokus (Vakulskas et al. 2018; Martin et al. 2019). Auch andere entwickelten spezifischere Cas9-Varianten, wie eSpCas9 (Slaymaker et al. 2016), SpCas9-HF1 (Kleinstiver et al. 2016), Hypa-Cas9 (Chen et al. 2017b) und evoCas9 (Casini et al. 2018), die jedoch zum Teil mit einer verringerten On-Target-Editierungseffizienz einhergehen (Kim et al. 2017; Kulcsár et al. 2017; Zhang et al. 2017). Für die Korrektur von Einzelnukleotidvarianten wurden kürzlich außerdem zwei weitere CRISPR/Cas9-abgeleitete Methoden entwickelt, die das Risiko unerwünschter On- und Off-Target-Mutagenese verringern, indem sie auf DNA-Doppelstrangbrüche und DNA-Donoren verzichten. Bei der sogenannten Basen- und Prime-Editierung wird eine katalytisch beeinträchtigt-

te Cas9-Nuklease verwendet, die an ein Enzym gekoppelt ist, das die gewünschten Nukleotidveränderungen einfügt. Bei der zuerst entwickelten Baseneditierung ermöglichen an Cas9-Mutanten fusionierte Cytidin- bzw. Adenosin-Deaminasen lediglich die vier Transitionsmutationen G→A, A→G, C→T und T→C (Komor et al. 2016; Gaudelli et al. 2017). Durch die Fusion einer reversen Transkriptase an die Cas9-Mutante können nun jedoch mittels Prime-Editierung alle 12 Punktmutationen sowie Deletionen und Insertionen ohne DNA-Doppelstrangbrüche und DNA-Donoren realisiert werden (Anzalone et al. 2019). Da auf diese Weise die Bildung zahlreicher unerwünschter InDels verhindert werden kann, ist anzunehmen, dass diese beiden Methoden in der Zukunft von enormer Bedeutung bei der Entwicklung therapeutischer Anwendungen der CRISPR/Cas9-basierten Technologien sein werden.

### 4.2.3 Partielle Wiederherstellung der Osteoklastenfunktion in korrigierten ARO-iPS

Die Osteoklastendifferenzierung der iPS-Klone, in denen jeweils eines der betroffenen Allele mittels CRISPR/Cas9 korrigiert wurde, offenbarte, dass der zelluläre Osteopetrosephänotyp nur unvollständig durch die heterozygote Mutationskorrektur wiederhergestellt werden konnte. Zum einen entwickelte sich nur der Klon mit der *CLCN7*-Mutationskorrektur in Exon 10 zu Osteoklasten normaler Größe, während der andere Klon, in dem die Korrektur von der Missense-Mutation in Exon 14 vorgenommen wurde, sich ähnlich häufig zu Riesenosteoklasten entwickelte wie die ARO-iPS Ausgangszelllinie mit der Compound-Heterozygotie des *CLCN7*-Gens. Zum anderen zeigten beide korrigierten Klone trotz der morphologischen Unterschiede ein ähnlich geringes Maß an wiederhergestellter Knochenresorptionsaktivität. Dies war überraschend, da diese iPS-Klone, wie die gesunden Eltern des ARO-Patienten auch, heterozygot nur noch eine der beiden pathogenen *CLCN7*-Mutationen aufwiesen und damit eine vollständige Wiederherstellung der Resorptionsfunktion zu erwarten war. Zudem war bei den korrigierten Klonen teilweise mehr oberflächige Pseudoresorption als tiefer gehende Knochenerosion zu beobachten, was dem Resorptionsverhalten von Osteoklasten von Patienten mit milder und intermediärer Osteopetrose ähnelt (Henriksen et al. 2006; Supanchart et al. 2014; Howaldt et al. 2020). Als mögliche Ursachen für diese beeinträchtigte Resorption wurden gestörte vesikuläre Azidifizierung sowie eine gestörte Ausbildung der Versiegelungszone diskutiert (Henriksen et al. 2006; Xing et al. 2013; Howaldt et al. 2020). Es ist daher denkbar, dass die *Clc-7*-Funktion in den Osteoklasten der editierten iPS-Klone trotz der heterozygoten Mutationskorrektur eingeschränkt ist.

Eine naheliegende Überlegung war, ob die neben der Mutationskorrektur selbst eingebrachten stillen Mutationen die *CLCN7*-Expression negativ beeinflusst haben könnten, da diese relativ nah am Ende des jeweiligen Exons lokalisiert sind und daher möglicherweise das Spleißen beeinträchtigen. Allerdings zeigten sich keine veränderten *CLCN7*-mRNA-Expressionslevel und auch die Amplifikation und Sequenzierung der cDNA wies die heterozygote Expression beider Allele sowie das Vorhandensein aller Exons nach. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass durch die Amplifikation der cDNA auch nur solche Genprodukte sichtbar gemacht werden können, die die entsprechenden Primerbindungsstellen enthalten. Würde durch die stillen Mutationen beispielsweise neben dem normalen Transkript zusätzlich ein dominant negatives Genprodukt entstehen, dessen mRNA mindestens eine der Primerbindungsstellen nicht enthielte, ließe sich das mit dieser Methode nicht nachweisen. Auch die Analyse der Genomdaten beider korrigierter Klone ergab keine Hinweise auf Störungen anderer Gene, die für die Osteoklastenfunktion von Bedeutung sind. Auffällig bei der Differenzierung der iPS-Klone zu Osteoklasten war allerdings, dass die Ausbeute produzierter monozytärer Zellen deutlich geringer war als bei den nicht-editierten Kontrollzelllinien. Unklar ist der Grund dafür, da die Pluripotenz beider Klone nicht eingeschränkt zu sein schien. Eine mögliche Hypothese wäre daher auch, dass die Einschränkung der Osteoklastenfunktion nicht auf anhaltende Störungen des ClC-7-Chloridtransporters zurückzuführen ist, sondern die Zellfunktionen aufgrund der Editierungsprozedur und/oder der hohen Passage generell osteoklastenunspezifisch beeinträchtigt sein könnten. Zuletzt wäre ebenfalls eine Adaption der Zellen an die gestörte Chloridhomöostase und die damit einhergehenden Beeinträchtigungen des vesikulären Transportes denkbar, die trotz der Mutationskorrektur nicht vollständig umzukehren war. Um diesen Fragen auf den Grund zu gehen, wäre es notwendig, die Proteinexpression sowie die Funktion von ClC-7 in diesen Zelllinien näher zu untersuchen, was aus zeitlichen Gründen leider nicht umzusetzen war. Aufschluss könnte auch die Osteoklastenanalyse von iPS eines oder beider Elternteile des Spenders der ARO-iPS geben. Oder aber die pathogenen Varianten werden heterozygot jeweils mit und ohne die zusätzlichen stillen Mutationen mittels CRISPR/Cas9 in eine Kontrollzelllinie eines gesunden Spenders eingebracht und dann auf ihre Osteoklastenfunktion hin untersucht. Zusätzlich könnte überprüft werden, ob eine Korrektur beider pathogener Mutationen der ARO-iPS in einer verbesserten Funktionswiederherstellung resultiert. Denn obwohl die Eltern keinerlei Symptome aufweisen, ist die Osteoklastenfunktion der korrigierten iPS-Klone ähnlich stark eingeschränkt wie von ADOII-Patienten, die auch einen asymptomatischen

Verlauf haben können. Schließlich sollten die Ergebnisse auch mithilfe von Mutationskorrekturen in anderen ARO-iPS-Linien validiert werden.

Kürzlich konnten Chen et al. anhand von iPS-Osteoklasten eines ARO-Patienten mit einer compound heterozygoten Mutation des *TCIRG1*-Gens zeigen, dass durch die transgene Expression der Wildtyp *TCIRG1*-cDNA in den Patienten-iPS die eingeschränkte Knochenresorptionsfähigkeit der differenzierten Osteoklasten wiederhergestellt werden konnte. Charakteristisch für die Osteoklasten der osteopetrotischen iPS war eine verminderte Resorption mit verkleinerten Resorptionsvertiefungen, während die Osteoklasten der transgenen Patienten-iPS vergleichbar große Resorptionsvertiefungen erzeugen konnten wie die iPS-Osteoklasten einer gesunden Kontrollzelllinie (Chen et al. 2019). Allerdings wurde nur die Größe der einzelnen Resorptionsvertiefungen betrachtet, nicht jedoch der Anteil der erodierten Knochenoberfläche oder die Anzahl der Resorptionsvertiefungen, sodass keine Aussage zum gesamten Ausmaß der Resorptionswiederherstellung möglich war. Interessanterweise wurde das Transgen retroviral nicht in die bereits reprogrammierten iPS eingebracht, sondern die genetische Manipulation wurde zuerst in den Patienten-Fibroblasten vorgenommen und anschließend wurde sowohl aus transduzierten als auch aus nicht-transduzierten Zellen jeweils eine eigene iPS-Linie erzeugt (Chen et al. 2019). Gegenüber der von uns gewählten Strategie, in der die genetische Manipulation in den bereits reprogrammierten iPS durchgeführt wurde, hat diese Methode den Vorteil, dass hohe Passagen der iPS vermieden werden können und möglicherweise wirken sich die negativen Effekte der Genmanipulationsprozedur weniger stark auf die Zellen aus, da Fibroblasten robuster als iPS sind.

Analog zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit wurde auch eine partielle Wiederherstellung der Osteoklastenfunktion in gentherapeutischen Experimenten zur Heilung der ARO im Mausmodell beobachtet. Johansson et al. isolierten HSPCs aus der fetalen Leber eines *oc/oc*-Mausmodells für *TCIRG1*-bedingte Osteopetrose, in die sie mittels retroviraler Transduktion das nicht-mutierte *Tcirg1*-Transgen einbrachten. Die genetisch manipulierten HSPCs wurden dann in neugeborene bestrahlte *oc/oc*-Mäuse derselben Mauslinie transplantiert. Nach erfolgreichem Anwachsen des Transplantates wurden PBMCs der Mäuse entnommen und *in vitro* zu Osteoklasten differenziert. Diese Osteoklasten zeigten zwar eine Wiederherstellung der Knochenresorptionsfunktion, im Vergleich zum Wildtyp betrug diese aber lediglich um die 10%, wie ebenso in den hier gezeigten iPS-Experimenten. Die Osteoklastenentwicklung schien nicht beeinträchtigt, die Osteoklastenzahl sowie Größe waren vergleichbar zu Wildtyp-Osteoklasten. Auch die relativen Expressionslevel von Wildtyp- und transgenem *Tcirg1* waren in den *in vitro* differenzier-

ten Osteoklasten ähnlich. Erstaunlich ist allerdings, dass trotz der schlechten In-vitro-Resorptionsfunktion der genetisch veränderten Osteoklasten die Transplantation der genetisch veränderten HSPCs in der Hälfte der Tiere zu einem verlängerten Überleben sowie zu einer fast vollständigen Normalisierung des Knochenphänotyps führen konnte, und dies, obwohl drei Wochen nach der Transplantation nur zwischen 15 und 30% transgene Zellen im peripheren Blut der transplantierten Mäuse vorhanden waren (Johansson et al. 2007). Darüber hinaus zeigten Supanchart et al. im transgenen Mausmodell, dass allein 30% der CIC-7-Aktivität ausreichend für eine normale Resorptionsfähigkeit der Osteoklasten sind (Supanchart et al. 2014).

Dies zeigt deutlich, dass selbst eine partielle Wiederherstellung der Osteoklastenfunktion ausreichend für eine erfolgreiche Gentherapie der Osteopetrose sein könnte. Somit hat auch der von uns im iPS-basierten ARO-Modell entwickelte Ansatz der CRISPR/Cas9-basierten Mutationskorrektur gentherapeutisches Potenzial und sollte weiterverfolgt und -entwickelt werden. Allerdings muss auch berücksichtigt werden, dass bei der Anwendung dieser Strategie in den therapeutisch relevanten HSPCs zum jetzigen Forschungsstand keine klonale Expansion einzelner erfolgreich editierter Zellen durchgeführt werden kann. Bei der Transplantation einer Zellmischung, in der nur ein Anteil korrigierter Stammzellen enthalten wäre, wäre somit auch zu erwarten, dass das Resorptionspotenzial der gesamten Osteoklastenpopulation noch einmal geringer wäre als das der hier gezeigten korrigierten iPS-Klone.

### 4.2.4 Additiver Gentransfer in einen genomischen „sicheren Hafen“

Die patientenspezifische Mutationskorrektur ist ein minimalinvasiver gentherapeutischer Ansatz, der der physiologischen Situation am nächsten kommt. Da ARO jedoch durch eine Vielzahl von verschiedenen Mutationen hervorgerufen werden kann und der Großteil der genetischen Varianten für den jeweiligen Patienten einzigartig ist, gestaltet sich die Translation dieser Therapiestrategie in die Klinik schwierig. Daher stellt die Genaddition einer Wildtypkopie des betroffenen Gens einen vielversprechenden konkurrierenden Ansatz dar. Wie in den vorherigen Absätzen diskutiert wurde, ist dies auch der aktuell verfolgte Ansatz bei der Entwicklung einer Gentherapie für *TCIRG1*-bedingte ARO. Im Gegensatz zu der in diesem Zusammenhang bisher beschriebenen unspezifischen retroviral- und lentiviral-vermittelten Integration wurde sich hier auf die CRISPR/Cas9-basierte lokusspezifische Genaddition in den genomischen „sicheren Hafen“ *AAVS1* fokussiert, da diese Strategie in Bezug auf ungewollte Mutagenese und Onkogenaktivierung womöglich sicherer ist.

Da größere Genomveränderungen, wie Transgenadditionen, mit ssODNs nur ineffizient umzusetzen sind (Yang et al. 2013; Wang et al. 2017), haben sich für derartige Anwendungen unter anderem rekombinante AAV-Donorvektoren bewährt (Dever et al. 2016). Beispielsweise konnten mittels Cas9-RNPs und eines AAV6-GFP-Donorvektors in HSPCs im *AAVS1*-Lokus Integrationsraten um die 50% erzielt werden (Bak et al. 2017). Zur Etablierung der Methode in iPS wurde hier zunächst auch der in Bak et al. 2017 beschriebene AAV6-GFP-Donorvektor für die Genaddition einer SFFV-getriebenen GFP-Expressionskassette in den *AAVS1*-Lokus verwendet. Ausgehend von diesem Reporterkonstrukt wurde ein Vektor generiert, mit dem anstelle des GFP-Gens die Wildtyp-*Cln7*-cDNA der Ratte inseriert werden kann. Die Proteinsequenzen des ClC-7-Chloridtransporters stimmen zwischen Mensch und Ratte zu 96% überein (Brandt und Jentsch 1995). Für die Etablierung der Methode eignet sich das Gen der Ratte allerdings besser als das humane, da es bei Überexpression besser das endoplasmatische Retikulum verlassen kann (unveröffentlichte Daten von Tobias Stauber). Obwohl die stabile Integration des GFP bzw. *Cln7*-Transgens in den *AAVS1*-Lokus mittels PCR nachgewiesen werden konnte, war trotz anfänglich starker Proteinexpression eine Woche nach der Transduktion keine Transgenexpression mehr detektierbar. Naheliegender ist folglich die durch den starken viralen Promoter induzierte Stilllegung des Transgens, die nicht in HSPCs (Bak et al. 2017), aber in iPS aufzutreten scheint. Eine durch den SFFV-Promoter bedingte Stilllegung des Transgens in pluripotenten Stammzellen und iPS wurde auch schon von Müller-Kuller et al. 2015 und Hoffmann et al. 2017 beschrieben. Auch in Hinblick auf die therapeutische Anwendung ist daher ein Austausch des viralen SFFV-Promoters durch einen Säugetierpromoter empfehlenswert. Aufgrund der Limitierung der Vektorgenomgröße der rekombinanten AAVs sollte dieser allerdings eine möglichst kurze Sequenz haben und dennoch eine starke Transgenexpression induzieren. Daten neuester Veröffentlichungen zeigen, dass sich eine verkürzte Version des Elongationsfaktor  $1\alpha$  (EF1 $\alpha$ )-Promoters, genannt EFS (EF1 $\alpha$  „short“), sowohl für iPS als auch für gentherapeutische Anwendungen zu eignen scheint (Carbonaro et al. 2014; Thudium et al. 2016; Martin et al. 2019). Eine weitere Möglichkeit wäre der Ubiquitin-C (UbC)-Promoter. Durch die Verwendung eines Protokolls, das vergleichbar zu der in dieser Arbeit angewendeten Methode ist, konnten Martin et al. kürzlich eine stabile UbC-getriebene Transgenexpression in über 40% editierter iPS erreichen (Martin et al. 2019).

Während die lokusspezifische Integration der SFFV-getriebenen GFP-Expressionskassette in den *AAVS1*-Lokus in iPS zur Stilllegung des Transgens führte, konnten in ersten Pilotversuchen in den therapeutisch relevanten HSPCs die Ergebnisse

von Bak et al. reproduziert und 4 Tage nach Transfektion und Transduktion ohne Selektion eine starke GFP-Expression in 45–75% der editierten Zellen beobachtet werden. Dever et al. und Bak et al. konnten zeigen, dass nahezu alle Zellen, die zu diesem Zeitpunkt eine hohe Transgenexpression aufwiesen, diejenigen mit stabiler Transgenaddition sind (Dever et al. 2016; Bak et al. 2017). Wie an den hier und von Dever et al. gezeigten Daten zu erkennen ist, schwankt die Effizienz der lokusspezifischen Transgenaddition zwischen den verschiedenen HSPC-Spendern zum Teil erheblich. In bis zu 5% der HSPCs, die nur mit dem AAV6-Donor transduziert wurden, aber keine *AAVS1*-spezifische Cas9-RNPs erhielten, war ebenfalls eine starke GFP-Expression sichtbar, was eine zufällige Integration der Transgen-Expressionskassette vermuten lässt. Möglicherweise könnte es sich aber auch um eine Cas9-unabhängige, homologievermittelte spezifische Integration des Transgens in den *AAVS1*-Lokus handeln, wie sie zuvor mit AAV-Vektoren in Russell und Hirata 1998 und Barzel et al. 2015 beschrieben wurde. Zudem ist der hier verwendete Ziellocus *AAVS1* eine bevorzugte Integrationsstelle von natürlich vorkommenden, aber auch rekombinanten AAVs (Samulski et al. 1991; Ward und Walsh 2012). Dennoch sollte bezüglich des Sicherheitsaspekts der Gentherapie ein geringer Anteil an Zellen mit zufälliger Transgenintegration bedacht werden.

Bei der Genaddition des therapeutisch relevanten *Clcn7*-Transgens in den *AAVS1*-Lokus der ersten beiden getesteten HSPC-Spender zeichnete sich eine etwas geringere Integrationseffizienz ab als beim Einbringen des GFP-Reportergens. Da diese Genomeditierung bisher jedoch nur in HSPCs von zwei Spendern durchgeführt werden konnte, ist eine aussagekräftige Beurteilung erst nach weiteren Versuchsdurchführungen möglich. Da das *Clcn7*-Transgen doppelt so groß wie die GFP-Kassette ist, könnte dies dennoch eine reduzierte Integrationsrate erklären. Denkbar ist außerdem, dass aufgrund der schwächeren Fluoreszenzintensität des gefärbten *Clcn7*-HA-Tags nicht alle positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie detektiert werden können und somit der Anteil der transgenen HSPCs unterschätzt wird.

In einem ersten Testversuch gelang es, HSPCs, die mit dem *AAVS1*-spezifischen Cas9-RNP transfiziert und mit dem AAV6-GFP-Donor transduziert wurden, zu Osteoklasten zu differenzieren. Obwohl der Anteil der GFP<sup>+</sup>-Zellen der undifferenzierten HSPCs nur 60% betrug, konnte in nahezu allen Osteoklasten eine GFP-Expression, wenn auch in unterschiedlich starkem Ausmaß, beobachtet werden. Ähnliches wurde in einer Studie von Flores et al. berichtet, in der neonatale osteopetrotische *oc/oc*-Mäuse ohne Konditionierung mit GFP<sup>+</sup>-Knochenmarkszellen einer gesunden Maus transplantiert wurden. Obwohl nach einigen Wochen im Knochenmark und peripheren Blut nur 2 bzw. 6% GFP<sup>+</sup>-Zellen zu verzeichnen war, waren



30% der Osteoklasten GFP<sup>+</sup>. Dieser Effekt konnte auf die Fusion von GFP-positiven und -negativen Osteoklastenvorläufern zurückgeführt werden, da keine selektive Expansion der transplantierten HSPCs stattgefunden hatte. Bemerkenswert ist zudem, dass Osteoklasten der transplantierten *oc/oc*-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle *in vitro* nur eine Resorptionsaktivität von 14% aufwiesen und sich der osteopetrotische Phänotyp dennoch vollständig normalisierte (Flores et al. 2010), ähnlich wie in der in Abschnitt 4.2.3 bereits erwähnten Studie von Johansson et al. 2007. Diese Daten werden außerdem von der Arbeit von Coccia et al. gestützt, die ein fünf Monate altes Mädchen mit ARO mit den Knochenmarkszellen ihres gesunden Bruders transplantierte. Nach erfolgreichem Anwachsen des Transplantats konnten im peripheren Blut 30% mononukleäre Zellen männlichen Ursprungs nachgewiesen werden, während 81% der Osteoklasten mindestens ein Y-Chromosom trugen (Coccia et al. 1980). Zusammen verdeutlichen diese Daten, dass *in vivo* nur ein kleiner Anteil des gesamten Knochenresorptionspotenzials der Osteoklastenpopulation genutzt wird und vermutlich eine partielle Wiederherstellung der Resorptionsfunktion ausreichend für die Heilung der Osteopetrose ist (Flores et al. 2010). In Hinblick auf die autologe Transplantation *ex vivo* korrigierter HSPCs bedeutet dies auch, dass das hier gezeigte Maß der Editierungseffizienz in HSPCs ausreichend für die Gentherapie der Osteopetrose sein könnte und die editierten Zellen ohne zusätzliche Anreicherung der korrigierten Population chimär transplantiert werden könnten. Dies gilt es in zukünftigen Studien zu überprüfen.

Neben der Klärung der Frage, wie hoch der Anteil der korrigierten HSPCs in den zu transplantierenden Zellen sein muss, um Osteopetrose heilen zu können, muss außerdem untersucht werden, ob die Funktion und das Engraftment-Potenzial der Stammzellen trotz Genomeditierung erhalten bleiben. Zwar zeigten Dever und Kollegen durch primäre und sekundäre Transplantationen der humanen editierten HSPCs in immundefiziente Mäuse, dass ihre Editierungsstrategie, die auch in dieser Arbeit angewendet wurde, keine Beeinträchtigung des Anwachsens und der Funktion der langzeitrepopulierenden HSCs nach sich zieht (Dever et al. 2016), dennoch sollten vergleichbare Experimente für die von uns entwickelte Gentherapiestrategie durchgeführt werden. Idealerweise könnten diese In-vivo-Versuche mit der Untersuchung der Wirkung der transplantierten *Clcn7*-transgenen HSPCs auf den Knochenphänotyp osteopetrotischer *Clcn7*<sup>-/-</sup>-Mäuse kombiniert werden. Tatsächlich ist es aber hoch fraglich, ob eine sowohl immundefiziente als auch osteopetrotische Maus überhaupt bzw. lang genug überlebensfähig wäre. Hinzu kommt, dass sich humane Osteoklastenvorläuferzellen nur mithilfe des humanen Wachstumsfaktors M-CSF, nicht jedoch mit der Variante der Maus zu Osteoklasten entwickeln können. Folglich

müsste für eine Analyse der Osteoklastenfunktion *in vivo* in dieses Mausmodell zusätzlich noch das humane M-CSF-Transgen eingebracht werden. Demnach stellt die Generierung und Zucht dieser Tiere eine große Herausforderung dar.

Eine ähnliche, vielversprechende gentherapeutische Behandlungsstrategie für ARO, die wie hier auf dem additiven Gentransfer der Wildtyp-cDNA in HSPCs beruht, zeigten Moscatelli und Kollegen. Allerdings erfolgte die Genaddition nicht lokusspezifisch mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems, sondern lentiviral. Sie transduzierten HSPCs des peripheren Blutes von ARO-Patienten mit Mutationen im *TCIRG1*-Gen mit einem lentiviralen Vektor, der unter der Kontrolle des SFFV-Promoters das Wildtyp-*TCIRG1*-Gen exprimierte. Obwohl sie die transduzierten HSPCs in immundefiziente Mäuse transplantierten und diese dort anwachsen konnten, war eine Analyse der Osteoklastenfunktion aufgrund der eben diskutierten Maus-Problematik nur *in vitro* möglich. Im Resorptionsassay wiesen die transduzierten und differenzierten Osteoklasten der ARO-Patienten im Vergleich zur Kontrolle eine Resorptionsaktivität von 70–80% auf (Moscatelli et al. 2013). Vergleichbare Ergebnisse konnten sie kürzlich außerdem mit einem klinisch anwendbaren lentiviralen Vektor erzielen, in dem die *TCIRG1*-Expression der Kontrolle des bereits zuvor diskutierten EFS-Promoters unterlag (Moscatelli et al. 2018).

Zusammengefasst konnte mit den hier gezeigten Pilotexperimenten die Machbarkeit eines effizienten CRISPR/Cas9-basierten, lokusspezifischen additiven Gentransfers in einen genomischen „sicheren Hafen“ in humanen HSPCs als mögliche Behandlungsstrategie für ARO unter Beweis gestellt werden. In Zukunft gilt es die gentherapeutische Strategie in Hinblick auf die klinische Anwendung weiter zu entwickeln und diese in einem geeigneten Osteopetrose-Modellsystem auf ihre Wirksamkeit und Sicherheit zu untersuchen.

### 4.3 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieses Projektes wurde die erste in der Literatur beschriebene iPS-Linie eines Patienten mit *CLCN7*-bedingter ARO erzeugt. Zudem wurde ein verbessertes, robustes und effizientes Protokoll zur Differenzierung von iPS in funktionelle Osteoklasten entwickelt, das im Vergleich zu bisher veröffentlichten Protokollen kostengünstiger sowie einfacher ist und mit dem eine größere Osteoklastenausbeute erreicht werden kann. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass iPS-abgeleitete Osteoklasten gesunder Zellspender eine zu primären *in vitro* differenzierten Osteoklasten vergleichbare Zellmorphologie und Knochenresorption aufweisen. Darüber

hinaus spiegelten die differenzierten Osteoklasten der Patientenzelllinie ARO-iPS den zellulären Phänotyp der Osteopetrose wider, sodass diese als In-vitro-System für die Krankheits- und Therapiemodellierung der *CLCN7*-bedingten ARO genutzt werden können. Dieses wurde genutzt, um erste gentherapeutische Strategien für ARO zu etablieren und zu analysieren. Mittels CRISPR/Cas9-basierter Genomeditierung wurde jeweils eine der beiden compound heterozygoten Mutationen korrigiert, wodurch die Osteoklastenfunktion zu einem Maß partiell wiederhergestellt werden konnte, das ausreichend für eine gentherapeutische Anwendung sein könnte. Neben der patientenspezifischen Mutationskorrektur wurde außerdem der breiter anwendbare Ansatz des additiven Gentransfers in einen genomischen „sicheren Hafen“ getestet. Ohne Selektion konnte in bis zu 75% der behandelten Stammzellen das SFFV-getriebene Transgen lokusspezifisch integriert werden, das allerdings in iPS, nicht jedoch in HSPCs, aufgrund des starken viralen Promoters stillgelegt wurde. Obwohl nur etwas mehr als die Hälfte der behandelten HSPCs das Transgen trugen, war in nahezu allen differenzierten Osteoklasten dieser Zellen eine Transgenexpression zu beobachten, was auf die Fusion transgennegativer mit transgenpositiven Osteoklastenvorläufern zurückzuführen ist. Folglich ist die Editierungseffizienz vermutlich hoch genug, um eine therapeutische Wirkung erzielen zu können, wenn die Mischung der editierten HSPCs mit sowohl transgenpositiven als auch -negativen Zellen transplantiert werden würde.

Die hier etablierten gentherapeutischen Ansätze für ARO werden in Zukunft für eine mögliche klinische Anwendung weiterentwickelt und parallel zu alternativen Strategien verglichen. Bezüglich der Strategie der Mutationskorrektur könnte eine homozygote Korrektur ohne zusätzlich eingebrachte stille Mutationen möglicherweise in einer verbesserten Wiederherstellung der Knochenresorptionsfähigkeit resultieren. Eine Optimierung des Protokolls zur Genomeditierung, beispielsweise durch die Verwendung eines reichhaltigeren Kulturmediums, könnte außerdem die Passagenzahl verringern und die Kondition der Zellen verbessern. In Hinblick auf die Translation der Methode, für die eine bestmögliche Spezifität und damit Sicherheit des Systems notwendig ist, sollten außerdem andere Nuklease-Varianten getestet werden. Für die Mutationskorrektur käme die zuvor erwähnte Prime-Editierung in Frage (Anzalone et al. 2019), wenn auch für deren Anwendung in Stammzellen zunächst das entsprechende Protein kommerziell erhältlich sein müsste, da die bisher veröffentlichte plasmidbasierte Expression des Enzyms für die empfindlichen Stammzellen nicht in Frage kommt. Verfügbar ist hingegen schon das Protein der spezifischeren Nuklease HiFi-Cas9 (Vakulskas et al. 2018), die direkt sowohl für die Strategie der Mutationskorrektur als auch der Genaddition getestet werden könnte. Wie außer-

dem hier bereits diskutiert wurde, sollte für den additiven Gentransfer ein für die Klinik relevanter Promoter gewählt werden. Denkbar wäre alternativ auch die Integration der Wildtyp-*CLCN7*-cDNA in den *CLCN7*-Lokus selbst unter Verwendung des endogenen Promoters. Für die Validierung der verbesserten gentherapeutischen Ansätze sollten schließlich weitere ARO-Patientenzellen zu iPS reprogrammiert werden, in denen die Strategien ebenfalls auf ihre Wirksamkeit hin untersucht werden könnten.

Im nächsten Schritt gilt es die optimierten gentherapeutischen Strategien für ARO in einem geeigneten Modellsystem zu untersuchen, in dem die Analyse des Knochenumbaus und damit die therapeutische Wirkung der Gentherapie möglich ist. Da diese Untersuchungen *in vivo* in Mäusen, wie zuvor bereits diskutiert, schwierig sind, könnte die Weiterentwicklung des hier etablierten iPS-basierten ARO-Krankheitsmodells eine hilfreiche Alternative bieten. Denkbare wäre eine dynamische Langzeit-3D-Kultur mit humanen iPS-basierten Osteoblasten und Osteoklasten sowie deren Vorläuferzellen auf einem spongiösen Knochengewebe, in der das Schicksal und die Funktionstüchtigkeit der gentechnisch manipulierten Zellen im Laufe der Zeit untersucht werden könnte. Ein erstes humanes, iPS-basiertes 3D-Knochenmodell, mit dem die In-vitro-Knochenbildung und das Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten beobachtet werden konnte, wurde von Jeon et al. beschrieben. Sie differenzierten iPS zu mesenchymalen Stammzellen und Makrophagen, die sie dann auf einem Hydroxyapatit-beschichteten Polymer kultivierten. Dort entwickelten sich die iPS-abgeleiteten mesenchymalen Stammzellen und Makrophagen zu Osteoblasten bzw. Osteoklasten, wodurch *in vitro* im 3D-Knochenmodell Knochengewebe gebildet werden konnte (Jeon et al. 2016).

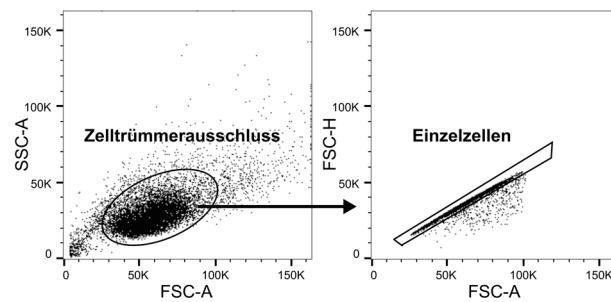
Neben der Krankheits- und Therapiemodellierung könnten genetisch korrigierte Patienten-iPS auch als unlimitierte Zellquelle für eine Gentherapie mit autologen hämatopoetischen Stammzellen für ARO dienen. Erste Untersuchungen hinsichtlich einer solchen therapeutischen Strategie wurden 2015 von Neri et al. in iPS der Maus durchgeführt. Zunächst wurden aus Fibroblasten einer *Tcirg1 oc/oc*-Maus osteopetrotische iPS reprogrammiert, die dann durch die Integration eines BAC-Konstruktes, das die gesamte genomische Region des Wildtyp-*Tcirg1*-Gens enthielt, genetisch korrigiert wurden. Diese korrigierten iPS konnten dann *in vitro* sowohl in frühe hämatopoetische Vorläuferzellen als auch reife Osteoklasten differenziert werden, wobei Letztere eine vollständige Wiederherstellung der Resorptionsfunktion zeigten (Neri et al. 2015). Da bisher noch keine Methode zur Erzeugung von langzeitrepopulierenden HSCs der Maus aus iPS bekannt ist, wurde dieser Behandlungsansatz jedoch noch nicht *in vivo* untersucht. Auch die Generierung von hu-

manen langzeitrepopulierenden HSCs aus iPS ist noch nicht etabliert. Neueste Ergebnisse der Osteoklastenforschung zeigen allerdings, dass Osteoklasten nicht wie bisher angenommen relativ kurzlebige Zellen sind, die durch Apoptose zugrunde gehen und durch neue Osteoklasten ersetzt werden. Vielmehr sind sie langlebige Osteoklasten-Synzytien, die durch iterative Fusion mit zirkulierenden monozytären Zellen aufrechterhalten werden (Jacome-Galarza et al. 2019). Zudem konnte gezeigt werden, dass allein durch die postnatale Transfusion gesunder monozytärer Zellen in osteopetrotische Mäuse ein Langzeit-Gentransfer in Osteoklasten nachweisbar war und sich der Knochenphänotyp dieser Tiere nahezu normalisierte (Jacome-Galarza et al. 2019). Auch 2010 wurde bereits in einer anderen Studie berichtet, dass sich der Phänotyp osteopetrotischer Mäuse durch wiederholte Injektionen von myeloiden Vorläuferzellen verbesserte (Cappariello et al. 2010). Somit wäre zukünftig auch eine Behandlung mit Transfusionen von autologen genetisch korrigierten iPS-basierten oder auch primären hämatopoetischen Vorläufern bis hin zu Monozyten denkbar.

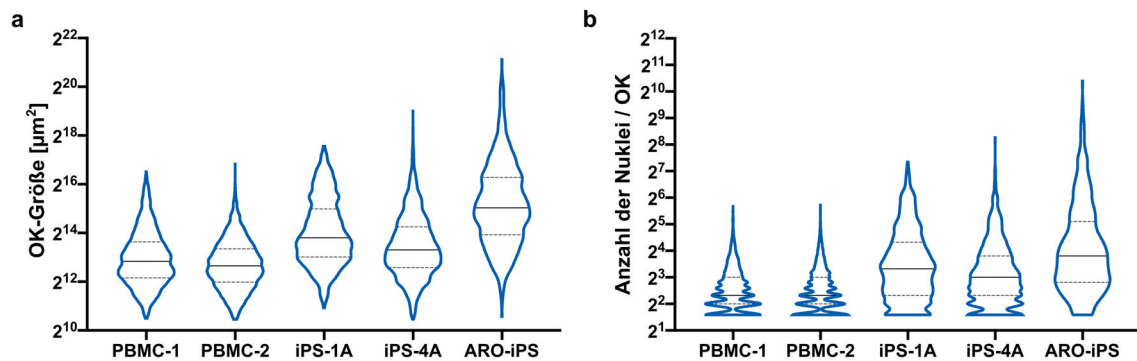
Aktuelle Entwicklungen im Bereich der Stammzellforschung und Genomeditierung eröffnen vielversprechende neue Möglichkeiten für sichere und effektive Stammzell- und Gentherapien, die in Zukunft zur kurativen Behandlung der Osteopetrose eingesetzt werden könnten. In dieser Arbeit wurden erste gentherapeutische Ansätze für *CLCN7*-bedingte ARO entwickelt und untersucht, die die Grundlage für zukünftige Gentherapien bilden. In Zukunft gilt es auf diesen Grundlagen aufzubauen, die entwickelten gentherapeutischen Strategien zu verbessern, alternative Ansätze zu erforschen sowie entwickelte präklinische Konzepte für die klinische Anwendung anzupassen.



# Anhang



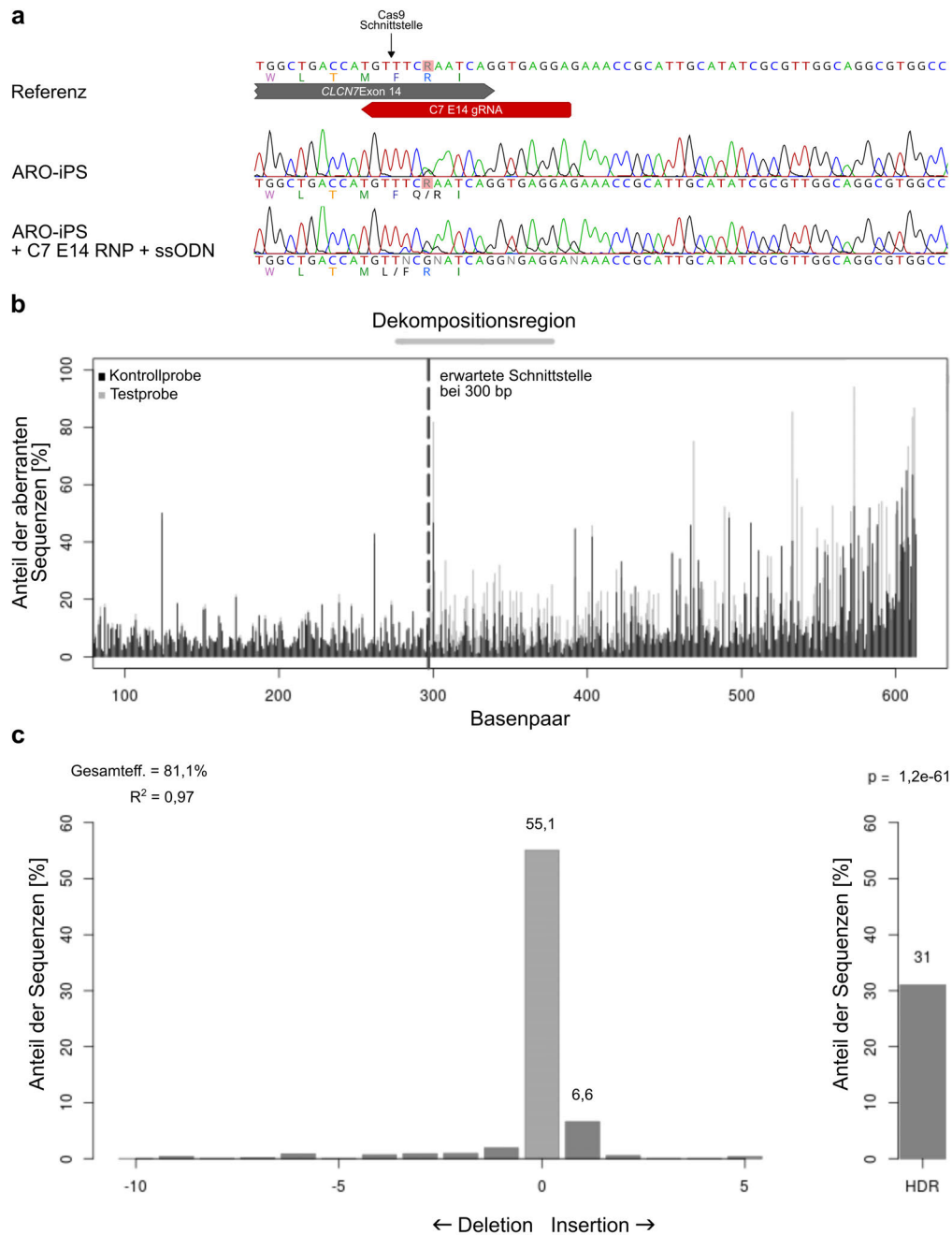
**Abbildung A.1: Zelltrümmer- und Dublettenausschluss für die FACS-Analyse.** Zelltrümmer wurden anhand des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) ausgeschlossen. Zur Auswahl von Einzelzellen werden Dubletten anhand des Verhältnisses von Pulshöhe (H) zu Pulsfläche (A) der FSC ausgeschlossen.



**Abbildung A.2: Verteilung der Größe und Anzahl der Nuklei von PBMC- und iPS-Osteoklasten.** Aufgetragen wurden die Verteilung der Osteoklastengröße (a) und die Anzahl der Nuklei pro Osteoklast (b) aller analysierten Osteoklasten von drei gepoolten Experimenten, sowie die entsprechenden medianen Werte und Quartile. Anzahl der analysierten Osteoklasten: 2716 (PBMC-1), 4538 (PBMC-2), 1402 (iPS-1A), 2893 (iPS-4A), 630 (ARO-iPS).







**Abbildung A.4: TIDER-Analyse des Exons 14 von *CLCN7* in editierten ARO-iPS.** ARO-iPS wurden mit C7E14 RNP und ssODN-Donoren transfiziert. DNA wurde 1 Woche nach Genomeditierung isoliert und analysiert. **(a)** Ausschnitte der *CLCN7*-Sequenzen von Exon 14 in editierten ARO-iPS. **(b)** Qualitätskontrolle der TIDER-Analyse durch Visualisierung der erwarteten Cas9-Schnittstelle (gestrichelte Linie), der genutzten Dekompositionsregion (grauer Balken) und der aberranten Sequenzen der Testprobe (grau, ARO-iPS + C7 E14 RNP + ssODN) und Kontrollprobe (schwarz, ARO-iPS). **(c)** Die Vorhersage der Anteile der Sequenzen mit bestimmten InDels sowie mit gewünschter Mutationskorrektur (HDR) in Exon 14 des *CLCN7*-Gens in der Testprobe. (b) und (c) wurden mittels TIDER-Webtool generiert und ins Deutsche übersetzt (Brinkman et al. 2018, <https://tider.deskgen.com>).

**Tabelle A.1: *CLCN7*-Genotypen der editierten ARO-iPS-Klone (Exon 10).** Für das betroffene maternale Allel des *CLCN7*-Gens Exon 10 spezifische Cas9-RNPs und ssODNs wurden in ARO-iPS transfiziert und klonale Zellpopulationen wurden expandiert. *CLCN7* Exon 10 und Exon 14 wurden aus gDNA der Klone amplifiziert und sequenziert. Genotypen wurden für maternale (m) und paternale Allele (p) bestimmt. Positive Klone sind mit \* markiert. Für InDels wurde die Anzahl der deletierten (del) bzw. inserierten (ins) Basenpaare angegeben.

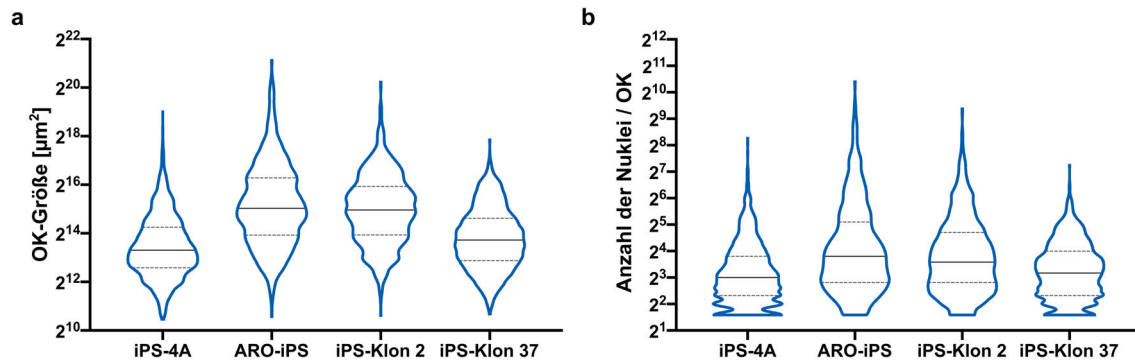
<b>Klon</b>	<b>Exon 10</b>	<b>Exon 14</b>
1	del2 (m), nicht editiert (p)	N/A
2*	mit ssODN korrigiert (m), nicht editiert (p)	nicht editiert (m, p)
3	mit ssODN korrigiert (m), del1 (p)	N/A
4	mit paternalem Allel korrigiert (m), nicht editiert (p)	nicht editiert (m, p)
5	mit ssODN korrigiert (m), del3 ins2 (p)	N/A
6*	mit ssODN korrigiert (m), nicht editiert (p)	nicht editiert (m, p)
7	del18 (m), nicht editiert (p)	N/A
8*	mit ssODN korrigiert (m), nicht editiert (p)	nicht editiert (m, p)
9	nicht editiert (m), ins1 (p)	N/A
10	del5 (m), nicht editiert (p)	N/A
11	mit ssODN korrigiert (m), del12 (p)	N/A
12	mit paternalem Allel korrigiert (m), nicht editiert (p)	ARO c.1208G>A homozygot, mit paternalem Allel mutiert (m), nicht editiert (p)
13	del2 (m oder p), del1 (m oder p)	N/A
14*	mit ssODN korrigiert (m), nicht editiert (p)	nicht editiert (m, p)

**Tabelle A.2: *CLCN7*-Genotypen der editierten ARO-iPS-Klone (Exon 14).** Für das betroffene paternale Allel des *CLCN7*-Gens Exon 14 spezifische Cas9-RNPs und ssODNs wurden in ARO-iPS transfiziert und klonale Zellpopulationen wurden expandiert. *CLCN7* Exon 10 und Exon 14 wurden aus gDNA der Klone amplifiziert und sequenziert. Genotypen wurden für maternales (m) und paternales Allel (p) bestimmt. Positive Klone sind mit \* markiert. Für InDels wurde die Anzahl der deletierten (del) bzw. inserierten (ins) Basenpaare angegeben.

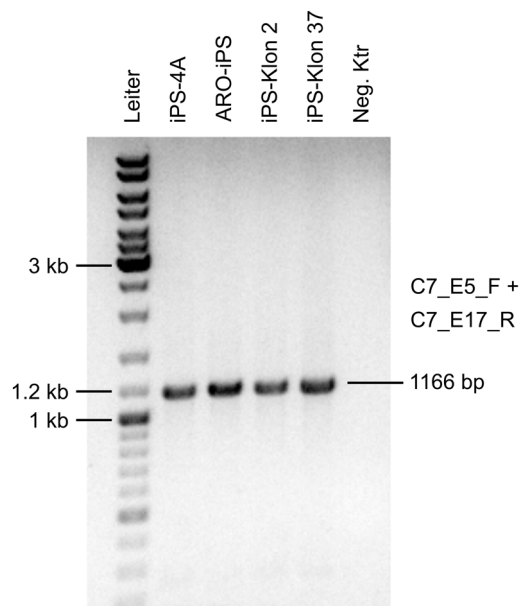
<b>Klon</b>	<b>Exon 10</b>	<b>Exon 14</b>
28	N/A	nicht editiert (m), del5 ins2 (p)
29*	nicht editiert (m, p)	nicht editiert (m), mit ssODN korrigiert (p)
30*	nicht editiert (m, p)	nicht editiert (m), mit ssODN korrigiert (p)
31	N/A	nicht editiert (m, p)
32*	nicht editiert (m, p)	nicht editiert (m), mit ssODN korrigiert (p)
33	N/A	nicht editiert (m), del15 (p)
34	N/A	nicht editiert (m, p)
35	N/A	nicht editiert (m, p)
36	N/A	nicht editiert (m, p)
37*	nicht editiert (m, p)	nicht editiert (m), mit ssODN korrigiert (p)
38	N/A	nicht editiert (m, p)

**Tabelle A.3: Entstandene genetische Varianten in korrigierten iPS-Klonen.** Die Genome der korrigierten iPS-Klone wurden mittels Hochdurchsatzverfahren sequenziert. Varianten der iPS-Klone, die von der Ausgangszelllinie ARO-iPS abwichen, wurden mit VarFish gefiltert und mittels Mutation Taster auf die potenzielle Pathogenität überprüft. Dargestellt sind neu entstandene Mutationen in den korrigierten iPS-Klonen, die nicht den gewünschten eingebrachten Varianten der Mutationskorrektur im *CLCN7*-Gen entsprechen.

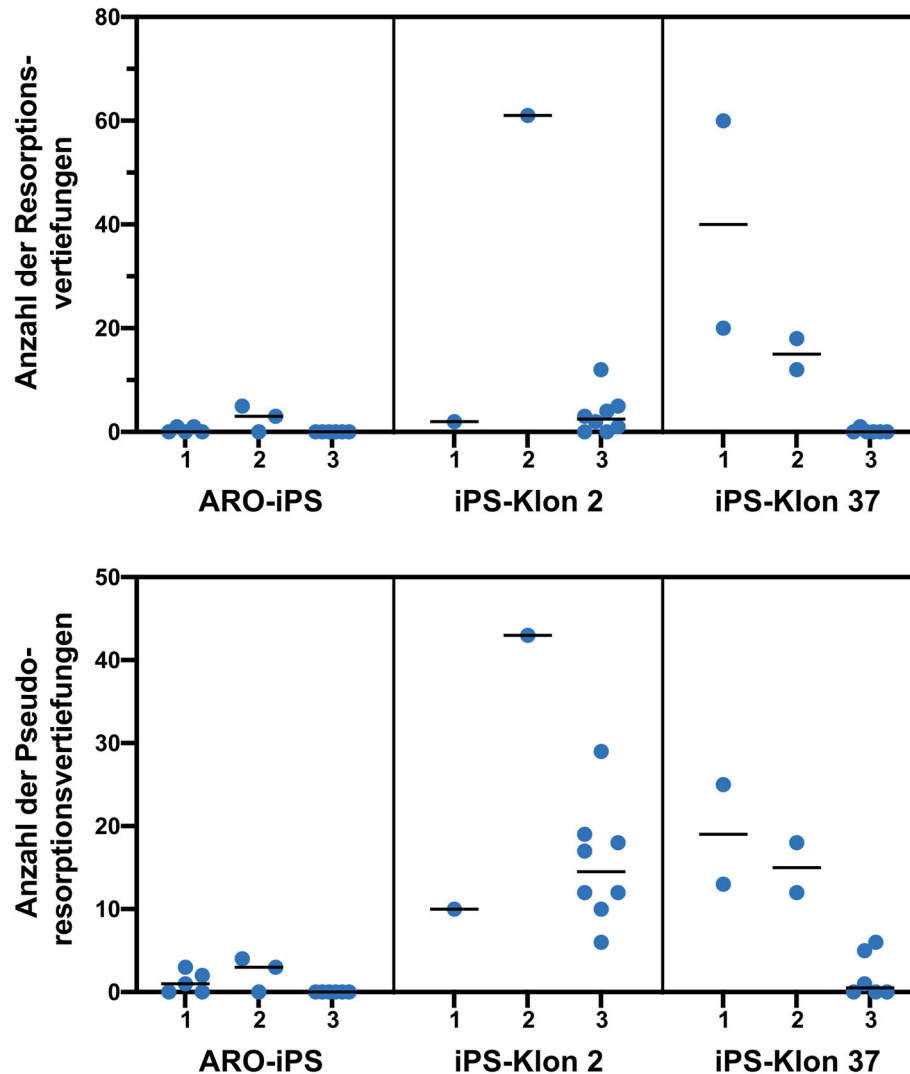
Gen	Variante	Vorhergesagte Pathogenität
<b>iPS-Klon 2 (Mutation c.875G&gt;A in <i>CLCN7</i> Exon 10 korrigiert)</b>		
<i>TFAP2E</i>	chr1:36039909_36039909delC	potenziell pathogen
<i>HIPK1</i>	chr1:114515928G>T	potenziell pathogen
<i>MED13</i>	chr6:155054795T>C	potenziell pathogen
<i>SAMD9</i>	chr7:92733646G>T	potenziell pathogen
<i>NEFM</i>	chr8:24772344C>T	potenziell pathogen
<i>CAMSAP1</i>	chr9:138701357A>T	Polymorphismus
<i>GP1BA</i>	chr17:4837853_4837854insT	Polymorphismus
<i>CYP4F11</i>	chr19:7810698A>G	Polymorphismus
<i>RBBP7</i>	chr23:16887298T>A	potenziell pathogen
<b>iPS-Klon 37 (Mutation c.1208G&gt;A in <i>CLCN7</i> Exon 14 korrigiert)</b>		
<i>TFAP2E</i>	chr1:36039909_36039909delC	potenziell pathogen
<i>OBSCN</i>	chr1:228547857G>A	Polymorphismus
<i>JADE1 (PHF17)</i>	chr4:129795709A>T	potenziell pathogen
<i>ARSI</i>	chr5:149675985C>A	potenziell pathogen
<i>SEC61B</i>	chr9:101984885G>A	potenziell pathogen
<i>IRX3</i>	chr16:54319110A>C	Polymorphismus
<i>C17orf102</i>	chr17:32902025C>A	Polymorphismus
<i>CCL3L3</i>	chr17:34522277T>A	Polymorphismus
<i>HOXB-AS3</i>	chr17:46673330A>G	potenziell pathogen
<i>TRIOBP</i>	chr22:38119209C>T	Polymorphismus



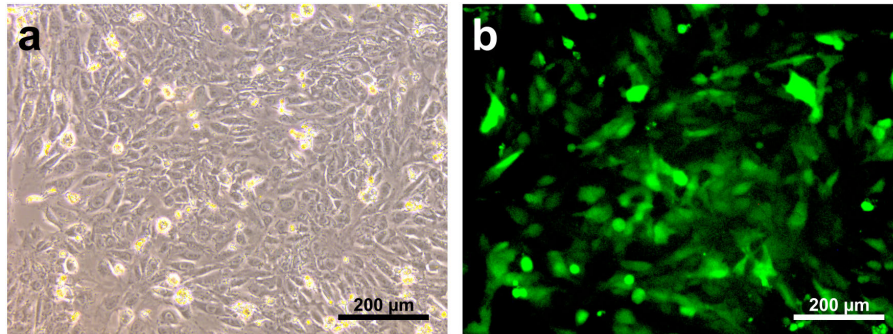
**Abbildung A.5: Verteilung der Größe und Anzahl der Nuklei von nicht editierten und korrigierten iPS-Osteoklasten.** Aufgetragen wurden die Verteilung der Osteoklastengröße (a) und die Anzahl der Nuklei pro Osteoklast (b) aller analysierten Osteoklasten von drei gepoolten Experimenten, sowie die entsprechenden medianen Werte und Quartile. Anzahl der analysierten Osteoklasten: 2893 (iPS-4A), 630 (ARO-iPS), 1539 (iPS-Klon 2), 1246 (iPS-Klon 37).



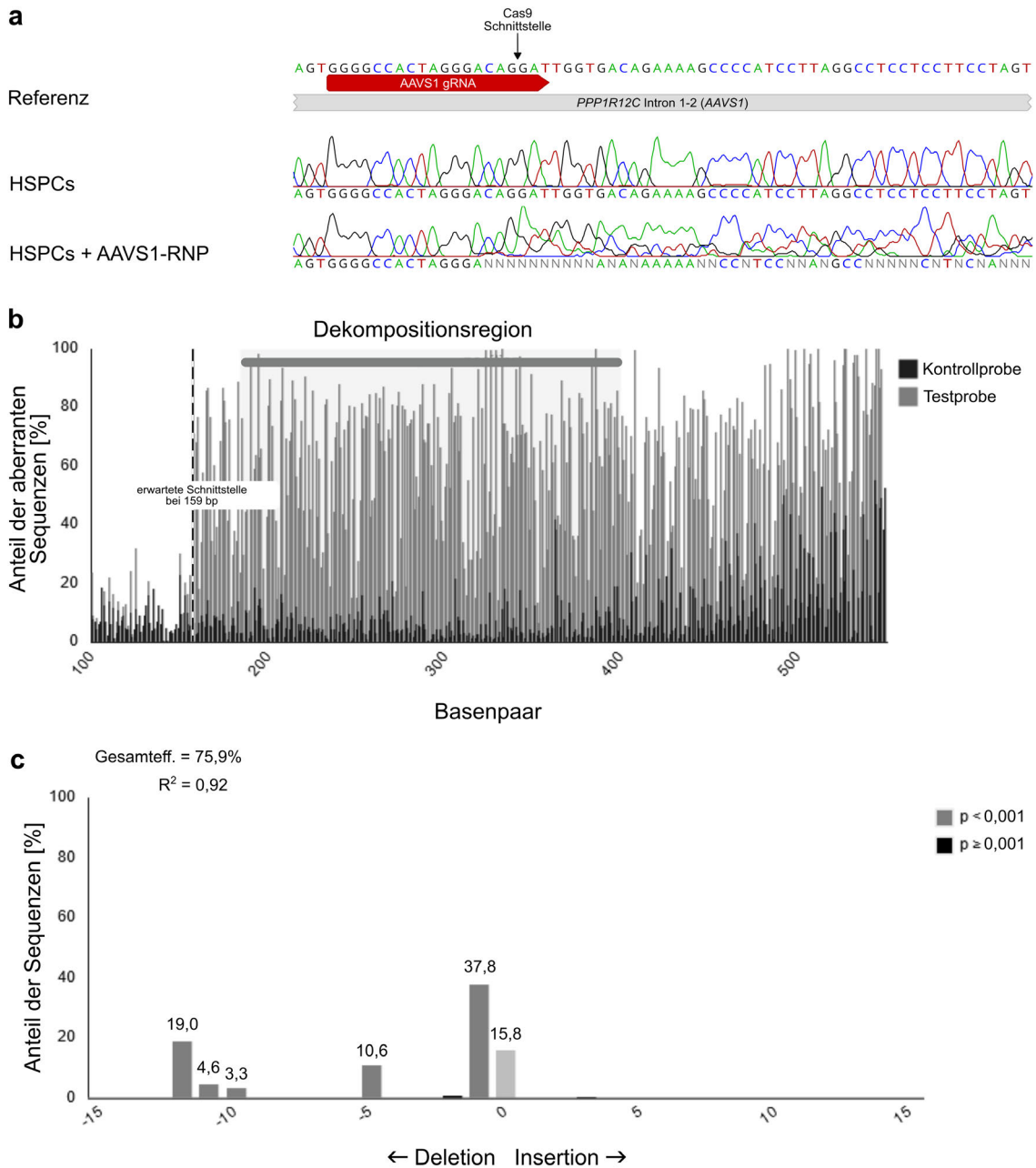
**Abbildung A.6: Gelelektrophorese-Aufnahme der *CLCN7*-PCR von cDNA differenzierter iPS-Osteoklasten.** Aus differenzierten OKs gewonnene mRNA der korrigierten iPS-Klone 2 und 37, der Ausgangszelllinie ARO-iPS und der Kontrolle iPS-4A wurde in cDNA umgeschrieben und Exon 5–17 des *CLCN7*-Gens wurden mit einem Primerpaar amplifiziert.



**Abbildung A.7: Anzahl der Resorptionsvertiefungen von Osteoklasten der korrigierten iPS-Klone.** Die korrigierten iPS-Klone 2 und 37 sowie die Ursprungszelllinie ARO-iPS wurden in OKs differenziert und für 5 Tage auf Knochenscheiben kultiviert. Vertiefungen auf der Knochenoberfläche wurden entsprechenden Resorptionsformen zugeordnet (echte Resorption, Pseudoresorption) und gezählt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Dargestellt sind Werte für jede analysierte Knochenscheibe sowie der Median der Werte aller Knochenscheiben des entsprechenden Experiments (1, 2 oder 3). Pro Experiment wurden durchschnittlich 3 Knochenscheiben analysiert (min. 1, max. 8).



**Abbildung A.8: Transiente Proteinexpression des GFP-Transgens in editierten iPS.** ARO-iPS wurden mit *AAVS1*-spezifischen Cas9-RNPs transfiziert und mit AAV6-GFP-Donoren transduziert. Mikroskopische Aufnahmen des Phasenkontrastes (**a**) und der GFP-Fluoreszenz (**b**) wurden 48 h nach der Genomeditierung erstellt.



**Abbildung A.9: Beispielhafte TIDE-Analyse des AAVS1-Lokus in editierten HSPCs.** HSPCs wurden mit AAVS1-RNP transfiziert. DNA wurde 4 Tage nach Genomeditierung isoliert und analysiert. **(a)** Ausschnitte der AAVS1-Sequenzen im AAVS1-Lokus in editierten HSPCs. **(b)** Qualitätskontrolle der TIDE-Analyse durch Visualisierung der erwarteten Cas9-Schnittstelle (gestrichelte Linie), der genutzten Dekompositionsregion (grauer Balken) und der aberranten Sequenzen der Testprobe (grau, HSPCs + AAVS1-RNP) und Kontrollprobe (schwarz, HSPCs). **(c)** Die Vorhersage der Anteile der Sequenzen mit bestimmten InDels im AAVS1-Lokus in der Testprobe (HSPCs + AAVS1-RNP). Die Bestimmung der Anteile der Sequenzen mit InDels in (a) sowie die Erstellung der Grafiken (b) und (c) erfolgte mittels TIDE-Webtool, Beschriftungen wurden ins Deutsche übersetzt (Brinkman et al. 2014, <https://tide.deskgen.com>).



# Literaturverzeichnis

- Agbandje-McKenna, M. und Kleinschmidt, J. (2011). AAV Capsid Structure and Cell Interactions. In *Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols*, Seiten 47–92. Humana Press.
- Albers-Schönberg, H. E. (1904). Röntgenbilder einer seltenen Knochenkrankung. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 51:365–368.
- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A., u a. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576(7785):149–157.
- Arai, F., Miyamoto, T., Ohneda, O., Inada, T., Sudo, T., Brasel, K., Miyata, T., Anderson, D. M., und Suda, T. (1999). Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (RANK) receptors. *Journal of Experimental Medicine*, 190(12):1741–1754.
- Arnett, A. L. H., Beutler, L. R., Quintana, A., Allen, J., Finn, E., Palmiter, R. D., und Chamberlain, J. S. (2013). Heparin-binding correlates with increased efficiency of AAV1-and AAV6-mediated transduction of striated muscle, but negatively impacts CNS transduction. *Gene Therapy*, 20(5):497–503.
- Bak, R. O., Dever, D. P., und Porteus, M. H. (2018). CRISPR/Cas9 genome editing in human hematopoietic stem cells. *Nature Protocols*, 13(2):358–376.
- Bak, R. O., Dever, D. P., Reinisch, A., Hernandez, D. C., Majeti, R., und Porteus, M. H. (2017). Multiplexed genetic engineering of human hematopoietic stem and progenitor cells using CRISPR/Cas9 and AAV6. *Elife*, 6:e27873.
- Balemans, W., Van Wesenbeeck, L., und Van Hul, W. (2005). A clinical and molecular overview of the human osteopetroses. *Calcified Tissue International*, 77(5):263–274.
- Bartl, R. und Bartl, C. (2017). *Modelling and Remodelling of Bone*, Seiten 21–30. Springer International Publishing, Cham.
- Barzel, A., Paulk, N. K., Shi, Y., Huang, Y., Chu, K., Zhang, F., Valdmanis, P. N., Spector, L. P., Porteus, M. H., Gaensler, K. M., u a. (2015). Promoterless gene targeting without nucleases ameliorates haemophilia B in mice. *Nature*, 517(7534):360–364.
- Bellin, M., Marchetto, M. C., Gage, F. H., und Mummery, C. L. (2012). Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(11):713–726.
- Ben Jehuda, R., Shemer, Y., und Binah, O. (2018). Genome Editing in Induced Pluripotent Stem Cells using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Reviews and Reports*, 14(3):323–336.
- Bénichou, O. D., Laredo, J. D., und De Vernejoul, M. C. (2000). Type II autosomal dominant osteopetrosis (Albers-Schönberg disease): clinical and radiological manifestations in 42 patients. *Bone*, 26(1):87–93.

- Boissy, P., Andersen, T. L., Abdallah, B. M., Kassem, M., Plesner, T., und Delaissé, J.-M. (2005). Resveratrol Inhibits Myeloma Cell Growth, Prevents Osteoclast Formation, and Promotes Osteoblast Differentiation. *Cancer Research*, 65(21):9943–9952.
- Boiti, F., Hahn, G., Brenner, S., Schulz, A., Walsh, S., Smitka, M., Kornak, U., Meißner, C., und von der Hagen, M. (2016). Schwere epileptische Enzephalopathie bei neuropathischer autosomal-rezessiver Osteopetrose ohne Störung der Hämatopoese.
- Bollerslev, J., Marks, S. C., Pockwinse, S., Kassem, M., Brixen, K., Steiniche, T., und Mosekilde, L. (1993). Ultrastructural investigations of bone resorptive cells in two types of autosomal dominant osteopetrosis. *Bone*, 14(6):865–869.
- Boyce, B. F. und King, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473(2):139–146. Highlight Issue: Bone Remodeling: Facts and Perspectives.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., und Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937):337–342.
- Brandt, S. und Jentsch, T. J. (1995). ClC-6 and ClC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Letters*, 377(1):15–20.
- Brickman, J. M. und Serup, P. (2017). Properties of embryoid bodies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 6(2):e259.
- Brinkman, E. K., Chen, T., Amendola, M., und van Steensel, B. (2014). Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Research*, 42(22):e168.
- Brinkman, E. K., Kousholt, A. N., Harmsen, T., Leemans, C., Chen, T., Jonkers, J., und van Steensel, B. (2018). Easy quantification of template-directed CRISPR/Cas9 editing. *Nucleic Acids Research*, 46(10):e58.
- Brown, N., Song, L., Kollu, N. R., und Hirsch, M. L. (2017). Adeno-Associated Virus Vectors and Stem Cells: Friends or Foes? *Human Gene Therapy*, 28(6):450–463. PMID: 28490211.
- Brown, N. J. und Hirsch, M. L. (2015). Adeno-associated virus (AAV) gene delivery in stem cell therapy. *Discovery Medicine*, 20(111):333–342.
- Bruntraeger, M., Byrne, M., Long, K., und Bassett, A. R. (2019). Editing the Genome of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes. In *CRISPR Gene Editing*, Seiten 153–183. Springer.
- Buchrieser, J., James, W., und Moore, M. D. (2017). Human induced pluripotent stem cell-derived macrophages share ontogeny with MYB-independent tissue-resident macrophages. *Stem Cell Reports*, 8(2):334–345.
- Burnight, E. R., Gupta, M., Wiley, L. A., Anfinson, K. R., Tran, A., Triboulet, R., Hoffmann, J. M., Klaahsen, D. L., Andorf, J. L., Jiao, C., u a. (2017). Using CRISPR-Cas9 to generate gene-corrected autologous iPSCs for the treatment of inherited retinal degeneration. *Molecular Therapy*, 25(9):1999–2013.
- Butscheidt, S., Rolvien, T., Kornak, U., Schmidt, F. N., Schinke, T., Amling, M., und Oheim, R. (2018). Clinical Significance of DXA and HR-pQCT in Autosomal Dominant Osteopetrosis (ADO II). *Calcified Tissue International*, 102(1):41–52.

- Byrne, S. M., Mali, P., und Church, G. M. (2014). Genome editing in human stem cells. In *Methods in Enzymology*, Band 546, Seiten 119–138. Elsevier.
- Campos-Xavier, A., Saraiva, J. M., Ribeiro, L. M., Munnich, A., und Cormier-Daire, V. (2003). Chloride channel 7 (CLCN7) gene mutations in intermediate autosomal recessive osteopetrosis. *Human Genetics*, 112(2):186–189.
- Cappariello, A., Berardi, A. C., Peruzzi, B., Del Fattore, A., Ugazio, A., Bottazzo, G. F., und Teti, A. (2010). Committed osteoclast precursors colonize the bone and improve the phenotype of a mouse model of autosomal recessive osteopetrosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(1):106–113.
- Carbonaro, D. A., Zhang, L., Jin, X., Montiel-Equihua, C., Geiger, S., Carmo, M., Cooper, A., Fairbanks, L., Kaufman, M. L., Sebire, N. J., u a. (2014). Preclinical Demonstration of Lentiviral Vector-mediated Correction of Immunological and Metabolic Abnormalities in Models of Adenosine Deaminase Deficiency. *Molecular Therapy*, 22(3):607–622.
- Casini, A., Olivieri, M., Petris, G., Montagna, C., Reginato, G., Maule, G., Lorenzin, F., Prandi, D., Romanel, A., Demichelis, F., u a. (2018). A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast. *Nature Biotechnology*, 36(3):265–271.
- Chen, I.-P., Luxmi, R., Kanaujiya, J., Hao, Z., und Reichenberger, E. J. (2017a). Craniometaphyseal Dysplasia Mutations in ANKH Negatively Affect Human Induced Pluripotent Stem Cell Differentiation into Osteoclasts. *Stem Cell Reports*, 9(5):1369–1376.
- Chen, J. S., Dagdas, Y. S., Kleinstiver, B. P., Welch, M. M., Sousa, A. A., Harrington, L. B., Sternberg, S. H., Joung, J. K., Yildiz, A., und Doudna, J. A. (2017b). Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, 550(7676):407–410.
- Chen, W., Twaroski, K., Eide, C., Riddle, M. J., Orchard, P. J., und Tolar, J. (2019). TCIRG1 Transgenic Rescue of Osteoclast Function Using Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Patients with Infantile Malignant Autosomal Recessive Osteopetrosis. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 101(21):1939–1947.
- Chen, X., Zhang, K., Hock, J., Wang, C., und Yu, X. (2016). Enhanced but hypofunctional osteoclastogenesis in an autosomal dominant osteopetrosis type II case carrying a c.1856C>T mutation in CLCN7. *Bone Research*, 4:16035.
- Chen, Y.-H. und Pruett-Miller, S. M. (2018). Improving single-cell cloning workflow for gene editing in human pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, 31:186–192.
- Chen, Y.-W., Huang, S. X., De Carvalho, A. L. R. T., Ho, S.-H., Islam, M. N., Volpi, S., Notarangelo, L. D., Ciancanelli, M., Casanova, J.-L., Bhattacharya, J., u a. (2017c). A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nature Cell Biology*, 19(5):542–549.
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S., und Kim, J.-S. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Research*, 24(1):132–141.
- Choi, K.-D., Vodyanik, M. A., und Slukvin, I. I. (2009). Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived li<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> progenitors. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9):2818–2829.
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3(Supplement 3):S131–S139.

- Cleiren, E., Bénichou, O., Van Hul, E., Gram, J., Bollerslev, J., Singer, F. R., Beaverson, K., Aledo, A., Whyte, M. P., Yoneyama, T., deVernejoul, M.-C., und Van Hul, W. (2001). Albers-Schönberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the *CLCN7* chloride channel gene. *Human Molecular Genetics*, 10(25):2861–2867.
- Coccia, P. F., Krivit, W., Cervenka, J., Clawson, C., Kersey, J. H., Kim, T. H., Nesbit, M. E., Ramsay, N. K. C., Warkentin, P. I., Teitelbaum, S. L., Kahn, A. J., und Brown, D. M. (1980). Successful Bone-Marrow Transplantation for Infantile Malignant Osteopetrosis. *New England Journal of Medicine*, 302(13):701–708. PMID: 6986555.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., und Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121):819–823.
- Coudert, A. E., de Vernejoul, M.-C., Muraca, M., und Del Fattore, A. (2015). Osteopetrosis and its relevance for the discovery of new functions associated with the skeleton. *International Journal of Endocrinology*, 2015.
- De Vernejoul, M.-C. und Kornak, U. (2010). Heritable sclerosing bone disorders: presentation and new molecular mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192(1):269–277.
- Del Fattore, A., Cappariello, A., und Teti, A. (2008). Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. *Bone*, 42(1):19–29.
- Del Fattore, A., Peruzzi, B., Rucci, N., Recchia, I., Cappariello, A., Longo, M., Fortunati, D., Ballanti, P., Iacobini, M., Luciani, M., u a. (2006). Clinical, genetic, and cellular analysis of 49 osteopetrotic patients: implications for diagnosis and treatment. *Journal of Medical Genetics*, 43(4):315–325.
- Delaissé, J.-M., Andersen, T. L., Engsig, M. T., Henriksen, K., Troen, T., und Blavier, L. (2003). Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microscopy Research and Technique*, 61(6):504–513.
- DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., Philippakis, A. A., Del Angel, G., Rivas, M. A., Hanna, M., u a. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics*, 43(5):491–498.
- Dever, D. P., Bak, R. O., Reinisch, A., Camarena, J., Washington, G., Nicolas, C. E., Pavel-Dinu, M., Saxena, N., Wilkens, A. B., Mantri, S., u a. (2016). CRISPR/Cas9  $\beta$ -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*, 539(7629):384–389.
- Ding, Q., Regan, S., Xia, Y., Oostrom, L., Cowan, C., und Musunuru, K. (2013). Enhanced Efficiency of Human Pluripotent Stem Cell Genome Editing through Replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell*, 12(4):393–394.
- Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., u a. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 34(2):184–191.
- Doench, J. G., Hartenian, E., Graham, D. B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B. L., Xavier, R. J., und Root, D. E. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nature Biotechnology*, 32(12):1262–1267.
- Dolatshad, H., Tatwavedi, D., Ahmed, D., Tegethoff, J. F., Boultonwood, J., und Pellagatti, A. (2019). Application of induced pluripotent stem cell technology for the investigation of hematological disorders. *Advances in Biological Regulation*, 71:19–33.

- Doudna, J. A. und Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213):1258096.
- Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T., und MacKinnon, R. (2002). X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*, 415(6869):287–294.
- Dye, B. R., Hill, D. R., Ferguson, M. A. H., Tsai, Y.-H., Nagy, M. S., Dyal, R., Wells, J. M., Mayhew, C. N., Nattiv, R., Klein, O. D., u a. (2015). In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *Elife*, 4:e05098.
- Edwards, J. R. und Mundy, G. R. (2011). Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(4):235.
- El-Tawil, T. und Stoker, D. J. (1993). Benign osteopetrosis: a review of 42 cases showing two different patterns. *Skeletal Radiology*, 22(8):587–593.
- Faust, G. G. und Hall, I. M. (2014). SAMBLASTER: fast duplicate marking and structural variant read extraction. *Bioinformatics*, 30(17):2503–2505.
- Feng, L., Campbell, E. B., Hsiung, Y., und MacKinnon, R. (2010). Structure of a Eukaryotic CLC Transporter Defines an Intermediate State in the Transport Cycle. *Science*, 330(6004):635–641.
- Firth, A. L., Menon, T., Parker, G. S., Qualls, S. J., Lewis, B. M., Ke, E., Dargitz, C. T., Wright, R., Khanna, A., Gage, F. H., u a. (2015). Functional gene correction for cystic fibrosis in lung epithelial cells generated from patient iPSCs. *Cell Reports*, 12(9):1385–1390.
- Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S., und Cavazzana-Calvo, M. (2010). 20 years of gene therapy for SCID. *Nature Immunology*, 11(6):457–460.
- Florencio-Silva, R., Rodrigues da Silva Sasso, G., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., und Cerri, P. S. (2015). Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Research International*, 2015.
- Flores, C., de Vries, T. J., Moscatelli, I., Askmyr, M., Schoenmaker, T., Langenbach, G. E. J., Ehinger, M., Everts, V., und Richter, J. (2010). Nonablative neonatal bone marrow transplantation rapidly reverses severe murine osteopetrosis despite low-level engraftment and lack of selective expansion of the osteoclastic lineage. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(9):2069–2077.
- Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8:917–929.
- Frattini, A., Pangrazio, A., Susani, L., Sobacchi, C., Mirolo, M., Abinun, M., Andolina, M., Flanagan, A., Horwitz, E. M., Mihci, E., Notarangelo, L. D., Ramenghi, U., Teti, A., Van Hove, J., Vujic, D., Young, T., Albertini, A., Orchard, P. J., Vezzoni, P., und Villa, A. (2003). Chloride Channel ClCN7 Mutations Are Responsible for Severe Recessive, Dominant, and Intermediate Osteopetrosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(10):1740–1747.
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., und Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 31(9):822–826.
- Gaj, T., Gersbach, C. A., und Barbas, 3rd, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7):397–405.

- Garcez, P. P., Loiola, E. C., da Costa, R. M., Higa, L. M., Trindade, P., Delvecchio, R., Nascimento, J. M., Brindeiro, R., Tanuri, A., und Rehen, S. K. (2016). Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*, 352(6287):816–818.
- Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I., und Liu, D. R. (2017). Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551(7681):464–471.
- Graves, A. R., Curran, P. K., Smith, C. L., und Mindell, J. A. (2008). The Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter ClC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature*, 453(7196):788–792.
- Grigoriadis, A. E., Kennedy, M., Bozec, A., Brunton, F., Stenbeck, G., Park, I.-H., Wagner, E. F., und Keller, G. M. (2010). Directed differentiation of hematopoietic precursors and functional osteoclasts from human ES and iPS cells. *Blood*, 115(14):2769–2776.
- Grimm, D., Pandey, K., Nakai, H., Storm, T. A., und Kay, M. A. (2006). Liver Transduction with Recombinant Adeno-Associated Virus Is Primarily Restricted by Capsid Serotype Not Vector Genotype. *Journal of Virology*, 80(1):426–439.
- Gundry, M., Brunetti, L., Lin, A., Mayle, A., Kitano, A., Wagner, D., Hsu, J., Hoegenauer, K., Rooney, C., Goodell, M., und Nakada, D. (2016). Highly Efficient Genome Editing of Murine and Human Hematopoietic Progenitor Cells by CRISPR/Cas9. *Cell Reports*, 17(5):1453–1461.
- Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., Renaud, J.-B., Schneider-Maunoury, S., Shkumatava, A., Teboul, L., Kent, J., u a. (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology*, 17(1):148.
- Halleen, J. M., Räisänen, S., Salo, J. J., Reddy, S. V., Roodman, G. D., Hentunen, T. A., Lehenkari, P. P., Kaija, H., Vihko, P., und Väänänen, H. K. (1999). Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(33):22907–22910.
- Hayman, A. R. (2008). Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*, 41(3):218–223.
- Helfrich, M. H., Aronson, D. C., Everts, V., Mieremet, R. H. P., Gerritsen, E. J. A., Eckhardt, P. G., Groot, C. G., und Scherft, J. P. (1991). Morphologic features of bone in human osteopetrosis. *Bone*, 12(6):411–419.
- Hendel, A., Bak, R. O., Clark, J. T., Kennedy, A. B., Ryan, D. E., Roy, S., Steinfeld, I., Lunstad, B. D., Kaiser, R. J., Wilkens, A. B., u a. (2015). Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nature Biotechnology*, 33(9):985–989.
- Hennig, A. F., Rössler, U., Boiti, F., von der Hagen, M., Gossen, M., Kornak, U., und Stachelscheid, H. (2019). Generation of a human induced pluripotent stem cell line (BIHi002-A) from a patient with CLCN7-related infantile malignant autosomal recessive osteopetrosis. *Stem Cell Research*, 35:101367.
- Henriksen, K., Gram, J., Schaller, S., Dahl, B. H., Dziegiel, M. H., Bollerslev, J., und Karsdal, M. A. (2004). Characterization of osteoclasts from patients harboring a G215R mutation in ClC-7 causing autosomal dominant osteopetrosis type II. *The American Journal of Pathology*, 164(5):1537–1545.
- Henriksen, K., Sørensen, M. G., Jensen, V. K., Dziegiel, M. H., Nosjean, O., und Karsdal, M. A. (2008). Ion transporters involved in acidification of the resorption lacuna in osteoclasts. *Calcified Tissue International*, 83(3):230–242.

- Henriksen, K., Sørensen, M. G., Nielsen, R. H., Gram, J., Schaller, S., Dziegiel, M. H., Everts, V., Bolerslev, J., und Karsdal, M. A. (2006). Degradation of the organic phase of bone by osteoclasts: a secondary role for lysosomal acidification. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(1):58–66.
- Ho, B. X., Pek, N. M. Q., und Soh, B.-S. (2018). Disease modeling using 3D organoids derived from human induced pluripotent stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4):936.
- Hoffmann, D., Schott, J. W., Geis, F. K., Lange, L., Müller, F. J., Lenz, D., Zychlinski, D., Steinemann, D., Morgan, M., Moritz, T., u a. (2017). Detailed comparison of retroviral vectors and promoter configurations for stable and high transgene expression in human induced pluripotent stem cells. *Gene Therapy*, 24(5):298–307.
- Howaldt, A., Hennig, A. F., Rolvien, T., Rössler, U., Stelzer, N., Knaus, A., Böttger, S., Zustin, J., Geißler, S., Oheim, R., Amling, M., Howaldt, H. P., und Kornak, U. (2020). Adult osteosclerotic metaphyseal dysplasia with progressive osteonecrosis of the jaws and abnormal bone resorption pattern due to a LRRK1 splice site mutation. *Journal of Bone and Mineral Research*.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., und Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6):1262–1278.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., u a. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(9):827–832.
- Jacome-Galarza, C. E., Percin, G. I., Muller, J. T., Mass, E., Lazarov, T., Eitler, J., Rauner, M., Yadav, V. K., Crozet, L., Bohm, M., u a. (2019). Developmental origin, functional maintenance and genetic rescue of osteoclasts. *Nature*, 568(7753):541–545.
- Jefferies, K. C., Cipriano, D. J., und Forgac, M. (2008). Function, structure and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(1):33–42.
- Jehuda, R. B., Eisen, B., Shemer, Y., Mekies, L. N., Szantai, A., Reiter, I., Cui, H., Guan, K., Haron-Khun, S., Freimark, D., Sperling, S. R., Gherghiceanu, M., Arad, M., und Binah, O. (2018). CRISPR correction of the PRKAG2 gene mutation in the patient's induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes eliminates electrophysiological and structural abnormalities. *Heart Rhythm*, 15(2):267–276.
- Jentsch, T. J. und Pusch, M. (2018). CLC Chloride Channels and Transporters: Structure, Function, Physiology, and Disease. *Physiological Reviews*, 98(3):1493–1590. PMID: 29845874.
- Jeon, O. H., Panicker, L. M., Lu, Q., Chae, J. J., Feldman, R. A., und Elisseeff, J. H. (2016). Human iPSC-derived osteoblasts and osteoclasts together promote bone regeneration in 3D biomaterials. *Scientific Reports*, 6:26761.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., und Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096):816–821.
- Johansson, M. K., de Vries, T. J., Schoenmaker, T., Ehinger, M., Brun, A. C. M., Fasth, A., Karlsson, S., Everts, V., und Richter, J. (2007). Hematopoietic stem cell-targeted neonatal gene therapy reverses lethally progressive osteopetrosis in oc/oc mice. *Blood*, 109(12):5178–5185.
- Kasper, D., Planells-Cases, R., Fuhrmann, J. C., Scheel, O., Zeitz, O., Ruether, K., Schmitt, A., Poët, M., Steinfeld, R., Schweizer, M., u a. (2005). Loss of the chloride channel ClC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration. *The EMBO Journal*, 24(5):1079–1091.

- Katsimbri, P. (2017). The biology of normal bone remodelling. *European Journal of Cancer Care*, 26(6):e12740.
- Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihira, S., Seki, M., Karimbux, N. Y., Goncalves, R. B., Valverde, P., Dibart, S., Li, Y.-P., Miranda, L. A., Ernst, C. W. O., Izumi, Y., und Taubman, M. A. (2006). B and T Lymphocytes Are the Primary Sources of RANKL in the Bone Resorptive Lesion of Periodontal Disease. *The American Journal of Pathology*, 169(3):987–998.
- Kenkre, J. S. und Bassett, J. H. D. (2018). The bone remodelling cycle. *Annals of Clinical Biochemistry*, 55(3):308–327. PMID: 29368538.
- Khazen, N. E., Faverly, D., Vamos, E., Van Regemorter, N., Flament-Durand, J., Carton, B., Cremer-Perlmutter, N., Opitz, J. M., und Reynolds, J. F. (1986). Lethal osteopetrosis with multiple fractures in utero. *American Journal of Medical Genetics*, 23(3):811–819.
- Kim, S., Bae, T., Hwang, J., und Kim, J.-S. (2017). Rescue of high-specificity Cas9 variants using sgRNAs with matched 5' nucleotides. *Genome Biology*, 18(1):218.
- Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J., und Kim, J.-S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research*, 24(6):1012–1019.
- Kime, C., Mandegar, M. A., Srivastava, D., Yamanaka, S., Conklin, B. R., und Rand, T. A. (2016). Efficient CRISPR/Cas9-Based Genome Engineering in Human Pluripotent Stem Cells. *Current Protocols in Human Genetics*, 88(1):21.4.1–21.4.23.
- Kirstein, B., Grabowska, U., Samuelsson, B., Shiroo, M., Chambers, T. J., und Fuller, K. (2006). A novel assay for analysis of the regulation of the function of human osteoclasts. *Journal of Translational Medicine*, 4(1):45.
- Kleinstiver, B. P., Pattanayak, V., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Zheng, Z., und Joung, J. K. (2016). High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529(7587):490–495.
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., und Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533(7603):420–424.
- Koressaar, T. und Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10):1289–1291.
- Kornak, U. (2011). Animal models with pathological mineralization phenotypes. *Joint Bone Spine*, 78(6):561–567.
- Kornak, U., Bösl, M. R., und Kubisch, C. (1999). Complete genomic structure of the CLCN6 and CLCN7 putative chloride channel genes. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1447(1):100–106.
- Kornak, U., Kasper, D., Bösl, M. R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G., und Jentsch, T. J. (2001). Loss of the ClC-7 Chloride Channel Leads to Osteopetrosis in Mice and Man. *Cell*, 104(2):205–215.
- Kornak, U. und Mundlos, S. (2003). Genetic Disorders of the Skeleton: A Developmental Approach. *The American Journal of Human Genetics*, 73(3):447–474.
- Kornak, U., Ostertag, A., Branger, S., Bénichou, O., und de Vernejoul, M.-C. (2006). Polymorphisms in the CLCN7 Gene Modulate Bone Density in Postmenopausal Women and in Patients with Autosomal



- Dominant Osteopetrosis Type II. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(3):995–1000.
- Kornak, U., Schulz, A., Friedrich, W., Uhlhaas, S., Kremens, B., Voit, T., Hasan, C., Bode, U., Jentsch, T. J., und Kubisch, C. (2000). Mutations in the  $\alpha 3$  subunit of the vacuolar  $H^+$ -ATPase cause infantile malignant osteopetrosis. *Human Molecular Genetics*, 9(13):2059–2063.
- Kosicki, M., Tomberg, K., und Bradley, A. (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nature Biotechnology*, 36(8):765–771.
- Kulcsár, P. I., Tálás, A., Huszár, K., Ligeti, Z., Tóth, E., Weinhardt, N., Fodor, E., und Welker, E. (2017). Crossing enhanced and high fidelity SpCas9 nucleases to optimize specificity and cleavage. *Genome Biology*, 18(1):190.
- Lachmann, N., Ackermann, M., Frenzel, E., Liebhaber, S., Brenning, S., Happle, C., Hoffmann, D., Klimenkova, O., Lüttge, D., Buchegger, T., u a. (2015). Large-scale hematopoietic differentiation of human induced pluripotent stem cells provides granulocytes or macrophages for cell replacement therapies. *Stem Cell Reports*, 4(2):282–296.
- Lancaster, M. A. und Huch, M. (2019). Disease modelling in human organoids. *Disease Models & Mechanisms*, 12(7):dmm039347.
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P., und Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501(7467):373–379.
- Lange, P. F., Wartosch, L., Jentsch, T. J., und Fuhrmann, J. C. (2006). CIC-7 requires Ostm1 as a  $\beta$ -subunit to support bone resorption and lysosomal function. *Nature*, 440(7081):220–223.
- Lanzi, G., Ferraro, R. M., Masneri, S., Piovani, G., Barisani, C., Sobacchi, C., Villa, A., Vezzoni, P., und Giliani, S. (2019). Generation of 3 clones of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a patient affected by Autosomal Recessive Osteopetrosis due to mutations in TCIRG1 gene. *Stem Cell Research*, Seite 101660.
- Lee, H. und Kim, J.-S. (2018). Unexpected CRISPR on-target effects. *Nature Biotechnology*, 36(8):703–704.
- Lees, R. L., Sabharwal, V. K., und Heersche, J. N. M. (2001). Resorptive state and cell size influence intracellular pH regulation in rabbit osteoclasts cultured on collagen-hydroxyapatite films. *Bone*, 28(2):187–194.
- Leisle, L., Ludwig, C. F., Wagner, F. A., Jentsch, T. J., und Stauber, T. (2011). CIC-7 is a slowly voltage-gated  $2Cl^-/1H^+$ -exchanger and requires Ostm1 for transport activity. *The EMBO Journal*, 30(11):2140–2152.
- Li, H. (2013). Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv preprint arXiv:1303.3997*.
- Li, H., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., Tanaka, M., Amano, N., Watanabe, A., Sakurai, H., Yamamoto, T., Yamanaka, S., und Hotta, A. (2015). Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*, 4(1):143–154.

- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., und Subgroup, . G. P. D. P. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16):2078–2079.
- Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Zou, Y., Quintanilla, R., Sridharan, M., Carte, J., Chen, W., Roark, N., Ranganathan, S., Ravinder, N., und Chesnut, J. D. (2015). Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *Journal of Biotechnology*, 208:44–53.
- Lisowski, L., Tay, S. S., und Alexander, I. E. (2015). Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, 24:59–67.
- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods*, 25(4):402–408.
- Lo Iacono, N., Blair, H. C., Poliani, P. L., Marrella, V., Ficara, F., Cassani, B., Facchetti, F., Fontana, E., Guerrini, M. M., Traggiai, E., u a. (2012). Osteopetrosis rescue upon RANKL administration to Rankl<sup>-/-</sup> mice: A new therapy for human RANKL-dependent ARO. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(12):2501–2510.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Taschenlehrbuch Histologie. 3. Auflage*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Lund, R. J., Nikula, T., Rahkonen, N., Närvä, E., Baker, D., Harrison, N., Andrews, P., Otonkoski, T., und Lahesmaa, R. (2012). High-throughput karyotyping of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, 9(3):192–195.
- Ma, H., Marti-Gutierrez, N., Park, S.-W., Wu, J., Lee, Y., Suzuki, K., Koski, A., Ji, D., Hayama, T., Ahmed, R., u a. (2017). Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, 548(7668):413–419.
- Ma, S., Viola, R., Sui, L., Cherubini, V., Barbetti, F., und Egli, D. (2018).  $\beta$  cell replacement after gene editing of a neonatal diabetes-causing mutation at the insulin locus. *Stem Cell Reports*, 11(6):1407–1415.
- Maguire, J. A., Cardenas-Diaz, F. L., Gadue, P., und French, D. L. (2019). Highly Efficient CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in Human Pluripotent Stem Cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 48(1):e64.
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L., und Church, G. M. (2013a). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnology*, 31(9):833–838.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., und Church, G. M. (2013b). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121):823–826.
- Martí, M., Mulero, L., Pardo, C., Morera, C., Carrió, M., Laricchia-Robbio, L., Esteban, C. R., und Belmonte, J. C. I. (2013). Characterization of pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 8(2):223–253.
- Martin, R. M., Ikeda, K., Cromer, M. K., Uchida, N., Nishimura, T., Romano, R., Tong, A. J., Lemgart, V. T., Camarena, J., Pavel-Dinu, M., Sindhu, C., Wiebking, V., Vaidyanathan, S., Dever, D. P., Bak, R. O., Laustsen, A., Lesch, B. J., Jakobsen, M. R., Sebastiano, V., Nakauchi, H., und Porteus, M. H. (2019). Highly Efficient and Marker-free Genome Editing of Human Pluripotent Stem Cells by CRISPR-Cas9 RNP and AAV6 Donor-Mediated Homologous Recombination. *Cell Stem Cell*, 24(5):821–828.

- Mazzolari, E., Forino, C., Razza, A., Porta, F., Villa, A., und Notarangelo, L. D. (2009). A single-center experience in 20 patients with infantile malignant osteopetrosis. *American Journal of Hematology*, 84(8):473–479.
- Mellis, D. J., Itzstein, C., Helfrich, M. H., und Crockett, J. C. (2011). THEMATIC REVIEW The skeleton: a multi-functional complex organ. The role of key signalling pathways in osteoclast differentiation and in bone resorption. *Journal of Endocrinology*, 211:131–143.
- Merrild, D. M. H., Pirapaharan, D. C., Andreassen, C. M., Kjærsgaard-Andersen, P., Møller, A. M. J., Ding, M., Delaissé, J.-M., und Søe, K. (2015). Pit-and trench-forming osteoclasts: a distinction that matters. *Bone Research*, 3:15032.
- Miyaoka, Y., Berman, J. R., Cooper, S. B., Mayerl, S. J., Chan, A. H., Zhang, B., Karlin-Neumann, G. A., und Conklin, B. R. (2016). Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing. *Scientific Reports*, 6:23549.
- Moscatelli, I., Löfvall, H., Schneider Thudium, C., Rothe, M., Montano, C., Kertész, Z., Sirin, M., Schulz, A., Schambach, A., Henriksen, K., u a. (2018). Targeting NSG mice engrafting cells with a clinically applicable lentiviral vector corrects osteoclasts in infantile malignant osteopetrosis. *Human Gene Therapy*, 29(8):938–949.
- Moscatelli, I., Thudium, C. S., Flores, C., Schulz, A., Askmyr, M., Gudmann, N. S., Andersen, N. M., Porras, O., Karsdal, M. A., Villa, A., Fasth, A., Henriksen, K., und Richter, J. (2013). Lentiviral gene transfer of TCIRG1 into peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells restores osteoclast function in infantile malignant osteopetrosis. *Bone*, 57(1):1–9.
- Müller, F.-J., Schuldt, B. M., Williams, R., Mason, D., Altun, G., Papapetrou, E. P., Danner, S., Goldmann, J. E., Herbst, A., Schmidt, N. O., u a. (2011). A bioinformatic assay for pluripotency in human cells. *Nature Methods*, 8(4):315–317.
- Müller-Kuller, U., Ackermann, M., Kolodziej, S., Brendel, C., Fritsch, J., Lachmann, N., Kunkel, H., Lausen, J., Schambach, A., Moritz, T., und Grez, M. (2015). A minimal ubiquitous chromatin opening element (UCOE) effectively prevents silencing of juxtaposed heterologous promoters by epigenetic remodeling in multipotent and pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Research*, 43(3):1577–1592.
- Nakashima, T. und Takayanagi, H. (2011). New regulation mechanisms of osteoclast differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1240(1):E13–E18.
- Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, 526(7573):351–360.
- Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., und Strohl, W. R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs*, 31(4):317–334.
- Neri, T., Muggeo, S., Paulis, M., Caldana, M., Crisafulli, L., Strina, D., Focarelli, M., Faggioli, F., Recordati, C., Scaramuzza, S., Scanziani, E., Mantero, S., Buracchi, C., Sobacchi, C., Lombardo, A., Naldini, L., Vezzoni, P., Villa, A., und Ficara, F. (2015). Targeted Gene Correction in Osteopetrotic-Induced Pluripotent Stem Cells for the Generation of Functional Osteoclasts. *Stem Cell Reports*, 5(4):558–568.
- Neutzsky-Wulff, A. V., Karsdal, M. A., und Henriksen, K. (2008). Characterization of the bone phenotype in CIC-7-deficient mice. *Calcified Tissue International*, 83(6):425–437.
- Neve, A., Corrado, A., und Cantatore, F. P. (2011). Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell and Tissue Research*, 343(2):289–302.

- Nienhuis, A. W., Dunbar, C. E., und Sorrentino, B. P. (2006). Genotoxicity of Retroviral Integration In Hematopoietic Cells. *Molecular Therapy*, 13(6):1031–1049.
- Okamoto, S., Amaishi, Y., Maki, I., Enoki, T., und Mineno, J. (2019). Highly efficient genome editing for single-base substitutions using optimized ssODNs with Cas9-RNPs. *Scientific Reports*, 9(1):4811.
- Okur, F. V., Cevher, İ., Özdemir, C., Kocaefe, Ç., und Çetinkaya, D. U. (2019). Osteopetrotic induced pluripotent stem cells derived from patients with different disease-associated mutations by non-integrating reprogramming methods. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1):211.
- Ono, T. und Nakashima, T. (2018). Recent advances in osteoclast biology. *Histochemistry and Cell Biology*, 149(4):325–341.
- Orchard, P. J., Fasth, A. L., Le Rademacher, J., He, W., Boelens, J. J., Horwitz, E. M., Al-Seraihy, A., Ayas, M., Bonfim, C. M., Boulad, F., Lund, T., Buchbinder, D. K., Kapoor, N., O'Brien, T. A., Perez, M. A. D., Veys, P. A., und Eapen, M. (2015). Hematopoietic stem cell transplantation for infantile osteopetrosis. *Blood*, 126(2):270–276.
- Ortmann, D. und Vallier, L. (2017). Variability of human pluripotent stem cell lines. *Current Opinion in Genetics & Development*, 46:179–185. Cell reprogramming.
- Ott, C.-E., Fischer, B., Schröter, P., Richter, R., Gupta, N., Verma, N., Kabra, M., Mundlos, S., Rajab, A., Neitzel, H., und Kornak, U. (2013). Severe neuronopathic autosomal recessive osteopetrosis due to homozygous deletions affecting OSTM1. *Bone*, 55(2):292 – 297.
- Ou, M., Li, C., Tang, D., Xue, W., Xu, Y., Zhu, P., Li, B., Xie, J., Chen, J., Sui, W., u a. (2019). Genotyping, generation and proteomic profiling of the first human autosomal dominant osteopetrosis type II-specific induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1):251.
- Palagano, E., Menale, C., Sobacchi, C., und Villa, A. (2018). Genetics of osteopetrosis. *Current Osteoporosis Reports*, 16(1):13–25.
- Pang, Q., Chi, Y., Zhao, Z., Xing, X., Li, M., Wang, O., Jiang, Y., Liao, R., Sun, Y., Dong, J., und Xia, W. (2016). Novel mutations of CLCN7 cause autosomal dominant osteopetrosis type II (ADO-II) and intermediate autosomal recessive osteopetrosis (IARO) in Chinese patients. *Osteoporosis International*, 27(3):1047–1055.
- Pangrazio, A., Pusch, M., Caldana, E., Frattini, A., Lanino, E., Tamhankar, P. M., Phadke, S., Lopez, A. G. M., Orchard, P., Mihci, E., u a. (2010). Molecular and clinical heterogeneity in CLCN7-dependent osteopetrosis: report of 20 novel mutations. *Human Mutation*, 31(1):e1071–e1080.
- Papapetrou, E. P. und Schambach, A. (2016). Gene Insertion Into Genomic Safe Harbors for Human Gene Therapy. *Molecular Therapy*, 24(4):678–684.
- Paquet, D., Kwart, D., Chen, A., Sproul, A., Jacob, S., Teo, S., Olsen, K. M., Gregg, A., Noggle, S., und Tessier-Lavigne, M. (2016). Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature*, 533(7601):125–129.
- Parra-Torres, A. Y., Valdés-Flores, M., Orozco, L., und Velázquez-Cruz, R. (2013). Molecular aspects of bone remodeling. In *Topics in Osteoporosis*, Seiten 1–27. IntechOpen.
- Penna, S., Capo, V., Palagano, E., Sobacchi, C., und Villa, A. (2019). One Disease, Many Genes: Implications for the Treatment of Osteopetroses. *Frontiers in Endocrinology*, 10:85–93.

- Peterson, S., Loring, J. F., Wesselschmidt, R. L., und Schwartz, P. H. (2011). *Human stem cell manual: a laboratory guide*. Elsevier.
- Phadke, S. R., Fischer, B., Gupta, N., Ranganath, P., Kabra, M., und Kornak, U. (2010). Novel mutations in Indian patients with autosomal recessive infantile malignant osteopetrosis. *Indian Journal of Medical Research*, 131:508–514.
- Piper, K., Boyde, A., und Jones, S. J. (1992). The relationship between the number of nuclei of an osteoclast and its resorptive capability in vitro. *Anatomy and Embryology*, 186(4):291–299.
- Qin, A., Cheng, T. S., Pavlos, N. J., Lin, Z., Dai, K. R., und Zheng, M. H. (2012). V-ATPases in osteoclasts: Structure, function and potential inhibitors of bone resorption. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(9):1422–1435.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., und Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11):2281–2308.
- Rausch, T., Zichner, T., Schlattl, A., Stütz, A. M., Benes, V., und Korbel, J. O. (2012). DELLY: structural variant discovery by integrated paired-end and split-read analysis. *Bioinformatics*, 28(18):i333–i339.
- Reinholt, F. P., Widholm, S. M., Ek-Rylander, B., und Andersson, G. (1990). Ultrastructural localization of a tartrate-resistant acid ATPase in bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 5(10):1055–1061.
- Ren, X., Yang, Z., Xu, J., Sun, J., Mao, D., Hu, Y., Yang, S.-J., Qiao, H.-H., Wang, X., Hu, Q., Deng, P., Liu, L.-P., Ji, J.-Y., Li, J., und Ni, J.-Q. (2014). Enhanced Specificity and Efficiency of the CRISPR/Cas9 System with Optimized sgRNA Parameters in *Drosophila*. *Cell Reports*, 9(3):1151–1162.
- Renaud, J.-B., Boix, C., Charpentier, M., De Cian, A., Cochennec, J., Duvernois-Berthet, E., Perrouault, L., Tesson, L., Edouard, J., Thinard, R., Cherifi, Y., Menoret, S., Fontanière, S., de Crozè, N., Fraichard, A., Sohm, F., Anegon, I., Concordet, J.-P., und Giovannangeli, C. (2016). Improved Genome Editing Efficiency and Flexibility Using Modified Oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 Nucleases. *Cell Reports*, 14(9):2263–2272.
- Richardson, C. D., Ray, G. J., DeWitt, M. A., Curie, G. L., und Corn, J. E. (2016). Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nature Biotechnology*, 34(3):339–344.
- Robinton, D. A. und Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481(7381):295–305.
- Roodman, G. D. (1999). Cell biology of the osteoclast. *Experimental Hematology*, 27(8):1229–1241.
- Russell, D. W. und Hirata, R. K. (1998). Human gene targeting by viral vectors. *Nature Genetics*, 18(4):325–330.
- Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J. D., Housman, D. E., Epstein, N., und Hunter, L. A. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *The EMBO Journal*, 10(12):3941–3950.
- Sander, J. D. und Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 32(4):347–355.
- Sanjana, N. E., Shalem, O., und Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods*, 11(8):783–784.

- Schulz, A. S., Moshous, D., Steward, C. G., Villa, A., und Sobacchi, C. (2016). Osteopetrosis. Consensus Guidelines for Diagnosis, Therapy and Follow-Up. Internetquelle verfügbar unter: [https://esid.org/content/download/14303/398344/file/00\\_OP\\_Guidelines\\_V3.pdf](https://esid.org/content/download/14303/398344/file/00_OP_Guidelines_V3.pdf).
- Schumann, K., Lin, S., Boyer, E., Simeonov, D. R., Subramaniam, M., Gate, R. E., Haliburton, G. E., Chun, J. Y., Bluestone, J. A., Doudna, J. A., u a. (2015). Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33):10437–10442.
- Sebastian, A. und Loots, G. G. (2018). Genetics of Sost/SOST in sclerosteosis and van Buchem disease animal models. *Metabolism*, 80:38–47. Updates on Bone Metabolism.
- Seeman, E. und Delmas, P. D. (2006). Bone Quality – The Material and Structural Basis of Bone Strength and Fragility. *New England Journal of Medicine*, 354(21):2250–2261. PMID: 16723616.
- Shalhoub, V., Elliott, G., Chiu, L., Manoukian, R., Kelley, M., Hawkins, N., Davy, E., Shimamoto, G., Beck, J., Kaufman, S. A., u a. (2000). Characterization of osteoclast precursors in human blood. *British Journal of Haematology*, 111(2):501–512.
- Shamriz, O., Shaag, A., Yaacov, B., NaserEddin, A., Weintraub, M., Elpeleg, O., und Stepensky, P. (2017). The use of whole exome sequencing for the diagnosis of autosomal recessive malignant infantile osteopetrosis. *Clinical Genetics*, 92(1):80–85.
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., und Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(2):115–130.
- Sims, N. A. und Gooi, J. H. (2008). Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(5):444–451. Bone Remodelling.
- Slymaker, I. M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D. A., Yan, W. X., und Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351(6268):84–88.
- Smith, C., Gore, A., Yan, W., Abalde-Atristain, L., Li, Z., He, C., Wang, Y., Brodsky, R., Zhang, K., Cheng, L., und Ye, Z. (2014). Whole-Genome Sequencing Analysis Reveals High Specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-Based Genome Editing in Human iPSCs. *Cell Stem Cell*, 15(1):12–13.
- Sobacchi, C., Schulz, A., Coxon, F. P., Villa, A., und Helfrich, M. H. (2013). Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nature Reviews Endocrinology*, 9(9):522–536.
- Sobacchi, C., Villa, A., Schulz, A., und Kornak, U. (2016). CLCN7-related osteopetrosis. In *GeneReviews*<sup>®</sup>. University of Washington, Seattle.
- Søe, K. und Delaissé, J.-M. (2010). Glucocorticoids maintain human osteoclasts in the active mode of their resorption cycle. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(10):2184–2192.
- Søe, K. und Delaissé, J.-M. (2017). Time-lapse reveals that osteoclasts can move across the bone surface while resorbing. *Journal of Cell Science*, 130(12):2026–2035.
- Spence, J. R., Mayhew, C. N., Rankin, S. A., Kuhar, M. F., Vallance, J. E., Tolle, K., Hoskins, E. E., Kalinichenko, V. V., Wells, S. I., Zorn, A. M., u a. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, 470(7332):105–109.
- Standring, S. (2015). *Gray's anatomy e-book: the anatomical basis of clinical practice*. Elsevier Health Sciences.

- Stark, Z. und Savarirayan, R. (2009). Osteopetrosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4(1).
- Stauber, T., Weinert, S., und Jentsch, T. J. (2012). Cell Biology and Physiology of CLC Chloride Channels and Transporters. In *Comprehensive Physiology*, Seiten 1701–1744. American Cancer Society.
- Steward, C. G. (2003). Neurological aspects of osteopetrosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 29(2):87–97.
- Steward, C. G., Blair, A., Moppett, J., Clarke, E., Virgo, P., Lankester, A., Burger, S. R., Sauer, M. G., Flanagan, A. M., Pamphilon, D. H., und Orchard, P. J. (2005). High peripheral blood progenitor cell counts enable autologous backup before stem cell transplantation for malignant infantile osteopetrosis. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 11(2):115–121.
- Supanchart, C. und Kornak, U. (2008). Ion channels and transporters in osteoclasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473(2):161–165. Highlight Issue: Bone Remodeling: Facts and Perspectives.
- Supanchart, C., Wartosch, L., Schlack, C., KÄ¼hnisch, J., Felsenberg, D., Fuhrmann, J. C., De Vernejoul, M.-C., Jentsch, T. J., und Kornak, U. (2014). CLC-7 expression levels critically regulate bone turnover, but not gastric acid secretion. *Bone*, 58:92–102.
- Suzuki, K., Yu, C., Qu, J., Li, M., Yao, X., Yuan, T., Goebel, A., Tang, S., Ren, R., Aizawa, E., Zhang, F., Xu, X., Soligalla, R., Chen, F., Kim, J., Kim, N., Liao, H.-K., Benner, C., Esteban, C., Jin, Y., Liu, G.-H., Li, Y., und IzpissuaÂ Belmonte, J. (2014). Targeted Gene Correction Minimally Impacts Whole-Genome Mutational Load in Human-Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cell Clones. *Cell Stem Cell*, 15(1):31–36.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., und Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5):861–872.
- Takahashi, K. und Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4):663–676.
- Takasato, M., Pei, X. E., Chiu, H. S., Maier, B., Baillie, G. J., Ferguson, C., Parton, R. G., Wolvetang, E. J., Roost, M. S., de Sousa Lopes, S. M. C., u a. (2015). Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*, 526(7574):564–568.
- Taranta, A., Migliaccio, S., Recchia, I., Caniglia, M., Luciani, M., Rossi, G. D., Dionisi-Vici, C., Pinto, R. M., Francalanci, P., Boldrini, R., Lanino, E., Dini, G., Morreale, G., Ralston, S. H., Villa, A., Vezzoni, P., Principe, D. D., Cassiani, F., Palumbo, G., und Teti, A. (2003). Genotype-Phenotype Relationship in Human ATP6i-Dependent Autosomal Recessive Osteopetrosis. *The American Journal of Pathology*, 162(1):57–68.
- Teti, A., Blair, H. C., Schlesinger, P., Grano, M., Zambonin-Zallone, A., Kahn, A. J., Teitelbaum, S. L., und Hruska, K. A. (1989). Extracellular protons acidify osteoclasts, reduce cytosolic calcium, and promote expression of cell-matrix attachment structures. *The Journal of Clinical Investigation*, 84(3):773–780.
- Thudium, C. S., Moscatelli, I., Löfvall, H., Kertész, Z., Montano, C., Bjurström, C. F., Karsdal, M. A., Schulz, A., Richter, J., und Henriksen, K. (2016). Regulation and Function of Lentiviral Vector-Mediated TCIRG1 Expression in Osteoclasts from Patients with Infantile Malignant Osteopetrosis: Implications for Gene Therapy. *Calcified Tissue International*, 99(6):638–648.
- Tolar, J., Teitelbaum, S. L., und Orchard, P. J. (2004). Osteopetrosis. *New England Journal of Medicine*, 351(27):2839–2849.

- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., und Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15):e115.
- Väänänen, H. K., Zhao, H., Mulari, M., und Halleen, J. M. (2000). The cell biology of osteoclast function. *Journal of Cell Science*, 113(3):377–381.
- Vakulskas, C. A., Dever, D. P., Rettig, G. R., Turk, R., Jacobi, A. M., Collingwood, M. A., Bode, N. M., McNeill, M. S., Yan, S., Camarena, J., u a. (2018). A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nature Medicine*, 24(8):1216–1224.
- Van Wesenbeeck, L., Cleiren, E., Gram, J., Beals, R. K., Bénichou, O., Scopelliti, D., Key, L., Renton, T., Bartels, C., Gong, Y., u a. (2003). Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *The American Journal of Human Genetics*, 72(3):763–771.
- Veres, A., Gosis, B. S., Ding, Q., Collins, R., Ragavendran, A., Brand, H., Erdin, S., Cowan, C. A., Talkowski, M. E., und Musunuru, K. (2014). Low Incidence of Off-Target Mutations in Individual CRISPR-Cas9 and TALEN Targeted Human Stem Cell Clones Detected by Whole-Genome Sequencing. *Cell Stem Cell*, 15(1):27–30.
- Vialard, F., Simoni, G., Aboura, A., De Toffol, S., Molina Gomes, D., Marcato, L., Serero, S., Clement, P., Bouhanna, P., Rouleau, E., Grimi, B., Selva, J., Gaetani, E., Maggi, F., Joseph, A., Benzacken, B., und Grati, F. R. (2011). Prenatal BACs-on-Beads™: a new technology for rapid detection of aneuploidies and microdeletions in prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, 31(5):500–508.
- Villa, A., Guerrini, M. M., Cassani, B., Pangrazio, A., und Sobacchi, C. (2008). Infantile Malignant, Autosomal Recessive Osteopetrosis: The Rich and The Poor. *Calcified Tissue International*, 84(1):1–12.
- Waguespack, S. G., Hui, S. L., DiMeglio, L. A., und Econs, M. J. (2007). Autosomal Dominant Osteopetrosis: Clinical Severity and Natural History of 94 Subjects with a Chloride Channel 7 Gene Mutation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(3):771–778.
- Wang, G., Yang, L., Grishin, D., Rios, X., Lillian, Y. Y., Hu, Y., Li, K., Zhang, D., Church, G. M., und Pu, W. T. (2017). Efficient, footprint-free human iPSC genome editing by consolidation of Cas9/CRISPR and piggyBac technologies. *Nature Protocols*, 12(1):88–103.
- Wang, L., Blouin, V., Brument, N., Bello-Roufai, M., und Francois, A. (2011). Production and Purification of Recombinant Adeno-Associated Vectors. In *Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols*, Seiten 361–404. Humana Press.
- Wang, T., Wei, J. J., Sabatini, D. M., und Lander, E. S. (2014). Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System. *Science*, 343(6166):80–84.
- Ward, P. und Walsh, C. E. (2012). Targeted integration of a rAAV vector into the AAVS1 region. *Virology*, 433(2):356–366.
- Wartosch, L., Fuhrmann, J. C., Schweizer, M., Stauber, T., und Jentsch, T. J. (2009). Lysosomal degradation of endocytosed proteins depends on the chloride transport protein CIC-7. *The FASEB Journal*, 23(12):4056–4068. PMID: 19661288.
- Wattanapanitch, M. (2019). Recent Updates on Induced Pluripotent Stem Cells in Hematological Disorders. *Stem Cells International*, 2019.



- Weinert, S., Jabs, S., Hohensee, S., Chan, W. L., Kornak, U., und Jentsch, T. J. (2014). Transport activity and presence of ClC-7/Ostm1 complex account for different cellular functions. *EMBO Reports*, 15(7):784–791.
- Weinert, S., Jabs, S., Supanchart, C., Schweizer, M., Gimber, N., Richter, M., Rademann, J., Stauber, T., Kornak, U., und Jentsch, T. J. (2010). Lysosomal Pathology and Osteopetrosis upon Loss of H<sup>+</sup>-Driven Lysosomal Cl<sup>-</sup> Accumulation. *Science*, 328(5984):1401–1403.
- Weitzman, M. D. und Linden, R. M. (2011). Adeno-Associated Virus Biology. In *Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols*, Seiten 1–23. Humana Press, Totowa, NJ.
- Weller, M. L., Amornphimoltham, P., Schmidt, M., Wilson, P. A., Gutkind, J. S., und Chiorini, J. A. (2010). Epidermal growth factor receptor is a co-receptor for adeno-associated virus serotype 6. *Nature Medicine*, 16(6):662–664.
- Wilson, C. J. und Vellodi, A. (2000). Autosomal recessive osteopetrosis: diagnosis, management, and outcome. *Archives of Disease in Childhood*, 83(5):449–452.
- Wu, C. C., Econs, M. J., DiMeglio, L. A., Insogna, K. L., Levine, M. A., Orchard, P. J., Miller, W. P., Petryk, A., Rush, E. T., Shoback, D. M., Ward, L. M., und Polgreen, L. E. (2017). Diagnosis and Management of Osteopetrosis: Consensus Guidelines From the Osteopetrosis Working Group. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 102(9):3111–3123.
- Wu, S. M. und Hochedlinger, K. (2011). Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nature Cell Biology*, 13(5):497–505.
- Wu, X., Scott, D. A., Kriz, A. J., Chiu, A. C., Hsu, P. D., Dadon, D. B., Cheng, A. W., Trevino, A. E., Konermann, S., Chen, S., u a. (2014). Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 32(7):670–676.
- Xiao, W., Wang, Y., Pacios, S., Li, S., und Graves, D. T. (2016). Cellular and molecular aspects of bone remodeling. In *Tooth Movement*, Band 18, Seiten 9–16. Karger Publishers.
- Xing, W., Liu, J., Cheng, S., Vogel, P., Mohan, S., und Brommage, R. (2013). Targeted disruption of leucine-rich repeat kinase 1 but not leucine-rich repeat kinase 2 in mice causes severe osteopetrosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 28(9):1962–1974.
- Xu, J., Cheng, T., Feng, H. T., Pavlos, N. J., und Zheng, M. H. (2007). Structure and function of V-ATPases in osteoclasts: potential therapeutic targets for the treatment of osteolysis. *Histology and Histopathology*, 22(4):443–454.
- Xu, M., Lena Stattin, E., Murphy, M., und Barry, F. (2017). Generation of induced pluripotent stem cells (ARO-iPSC1-11) from a patient with autosomal recessive osteopetrosis harboring the c.212+1G>T mutation in SNX10 gene. *Stem Cell Research*, 24:51–54.
- Xu, X., Gao, D., Wang, P., Chen, J., Ruan, J., Xu, J., und Xia, X. (2018). Efficient homology-directed gene editing by CRISPR/Cas9 in human stem and primary cells using tube electroporation. *Scientific Reports*, 8(1):11649.
- Xue, H., Wu, J., Li, S., Rao, M. S., und Liu, Y. (2014). Genetic modification in human pluripotent stem cells by homologous recombination and CRISPR/Cas9 system. In *Human Embryonic Stem Cell Protocols*, Seiten 173–190. Springer.

- Yang, L., Grishin, D., Wang, G., Aach, J., Zhang, C.-Z., Chari, R., Homsy, J., Cai, X., Zhao, Y., Fan, J.-B., u a. (2014). Targeted and genome-wide sequencing reveal single nucleotide variations impacting specificity of Cas9 in human stem cells. *Nature Communications*, 5:5507.
- Yang, L., Guell, M., Byrne, S., Yang, J. L., De Los Angeles, A., Mali, P., Aach, J., Kim-Kiselak, C., Briggs, A. W., Rios, X., Huang, P.-Y., Daley, G., und Church, G. (2013). Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucleic Acids Research*, 41(19):9049–9061.
- Yoshimi, K., Kunihiro, Y., Kaneko, T., Nagahora, H., Voigt, B., und Mashimo, T. (2016). ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nature Communications*, 7(1):1–10.
- Young, C., Hicks, M., Ermolova, N., Nakano, H., Jan, M., Younesi, S., Karumbayaram, S., Kumagai-Cresse, C., Wang, D., Zack, J., Kohn, D., Nakano, A., Nelson, S., Miceli, M., Spencer, M., und Pyle, A. (2016). A Single CRISPR-Cas9 Deletion Strategy that Targets the Majority of DMD Patients Restores Dystrophin Function in hiPSC-Derived Muscle Cells. *Cell Stem Cell*, 18(4):533–540.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., und Thomson, J. A. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*, 318(5858):1917–1920.
- Yucer, N., Holzapfel, M., Vogel, T. J., Lenaeus, L., Ornelas, L., Laury, A., Sareen, D., Barrett, R., Karlan, B. Y., und Svendsen, C. N. (2017). Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells into fallopian tube epithelium. *Scientific Reports*, 7(1):10741.
- Yumlu, S., Stumm, J., Bashir, S., Dreyer, A.-K., Lisowski, P., Danner, E., und Kühn, R. (2017). Gene editing and clonal isolation of human induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9. *Methods*, 121:29–44.
- Zhang, D., Zhang, H., Li, T., Chen, K., Qiu, J.-L., und Gao, C. (2017). Perfectly matched 20-nucleotide guide RNA sequences enable robust genome editing using high-fidelity SpCas9 nucleases. *Genome Biology*, 18(1):191.

# Abkürzungen

AAV	Adenoassoziiertes Virus
AAVS1	Adenoassoziierte Virus-Integrationsstelle 1
ADO	Autosomal-dominante Osteopetrose
APC	Allophycocyanin
ARO	Autosomal-rezessive Osteopetrose
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Künstliches Bakterienchromosom
BGH	PolyA-Signal des Rinderwachstumshormons
BMP	„Bone morphogenetic protein“
BoBs	„BACs-on-Beads“
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CA	Carboanhydrase
Cas	CRISPR-assoziiert
CBS	Cystathionin- $\beta$ -Synthase
CD	Differenzierungscluster
cDNA	Komplementäre DNA
CLCN7, CIC-7, C7	Chlorid-Protonen-Antiporter, Chloridtransporter
CMP	Gemeinsamer myeloider Vorläufer
CRISPR	„Clustered regularly interspaced, short palindromic repeats“
crRNA	CRISPR-RNA
CTSK	Cathepsin K
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
EB	Embryoider Körper
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	„Fluorescence-activated cell sorting“, Durchflusszytometrie
FBS	Fetales Rinderserum

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt3-L	Ligand der Fms-ähnlichen Tyrosinkinase 3
FSC	Vorwärtsstreulicht
gDNA	Genomische DNA
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
gRNA	„Guide RNA“
sgRNA	„Single guide RNA“
HA	Hämagglutinin
HDR	Homologie-gerichtete Reparatur
HFF	Humane Vorhautfibroblasten
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSPC	Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzelle
IARO	Intermediäre ARO
IL	Interleukin
IMO	Infantile maligne Osteopetrose
InDels	Insertionen und Deletionen
ins	Insertion
iPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
Klf	„Krüppel-like factor“
KO	Knockout
MACS	Magnetische Zellsortierung
M-CSF	Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	„Messenger RNA“
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NF- $\kappa$ B	„Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung
ns	Nicht signifikant
OK	Osteoklast
OPG	Osteoprotegerin
PAM	„Protospacer adjacent Motif“, Protospacer-benachbartes Motiv
PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion

PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
qPCR	Quantitative PCR
qRT-PCR	Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR
rAAV	Rekombinanter AAV-Vektor
RANK	Rezeptoraktivator von NF- $\kappa$ B
RANKL	RANK-Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RT	Raumtemperatur
SCF	Stammzellfaktor
SeV	Sendaivirus
SFFV	„Spleen focus forming virus“
SSC	Seitwärtsstreulicht
SSEA	Stadiumspezifisches embryonales Antigen
ssODN	Einzelsträngiges Oligodesoxynukleotid
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TIDE	Tracking von InDels mittels Dekomposition
TIDER	Tracking von Insertionen, Deletionen und Rekombination
TPO	Thrombopoietin
tracrRNA	Trans-aktivierende crRNA
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V-ATPase	vakuoläre Adenosintriphosphatase
VE	Vaskulär-endothelial
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WT	Wildtyp



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zuerst meinen ganz besonderen Dank an Uwe Kornak richten, der mir nicht nur die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in diesem spannenden Projekt in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité anzufertigen, sondern mir und meiner Arbeit auch stets viel Vertrauen entgegen gebracht und mir den Raum für eigene wissenschaftlichen Ideen gelassen hat. Darüber hinaus bin ich sehr dankbar für seine Unterstützung und Geduld bei der Projektbetreuung sowie die unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen und Ratschläge.

Manfred Gossen und Harald Stachelscheid möchte ich sowohl für all die produktiven Projektbesprechungen und -diskussionen als auch für zahlreiche praktische Hilfestellungen im Labor danken.

Neben Harald Stachelscheid möchte ich auch dem restlichen Team der Technologieplattform Stammzellen des Berliner Instituts für Gesundheitsforschung an der Charité danken. Besonders hervorheben möchte ich dabei die ständige und herzliche Unterstützung in allen Belangen der iPS-Zellkultur durch Judit Küchler, Kristin Fischer und Janine Cernoch.

Außerdem möchte ich mich bei Petra Knaus bedanken, die sich die Zeit für das Zweitgutachten genommen hat.

Ich möchte ich mich ganz besonders bei Uta Rössler bedanken, die mir nicht nur die beste Kollegin war, sondern mir gleichzeitig auch eine so gute Freundin geworden ist. Ganz nach den Mottos „geteilte Freude ist doppelte Freude“ und „geteiltes Leid ist halbes Leid“ haben wir gemeinsam die Höhen und Tiefen unseres Projekts durchlebt. Ich konnte mich immer auf ihre Unterstützung und ihr offenes Ohr verlassen, sei es im Labor, bei der Projektplanung und -diskussion, oder bei privaten Angelegenheiten.

Ich danke Nina Stelzer für ihren unermüdlichen Einsatz und ihre hervorragende Arbeit im Labor, insbesondere für unzählige Osteoklastenfärbungen und deren Bildaufnahmen sowie die Übernahme der Zellkultur während meiner freien Tage.

All die enthusiastischen Diskussionen mit Dimitrios L. Wagner über aktuelle Geschehnisse in der CRISPR-Welt haben mir große Freude bereitet und ich bin sehr dankbar für den hilfreichen Wissensaustausch bezüglich neuester Protokollverbesserungen in der Genomeditierung.

Bei den Arbeiten der Viralen Core Facility der Charité möchte ich mich für die Produktion der AAV-Vektoren bedanken.

Für die Analyse der Genomdaten möchte ich Manuel Holtgrewe der Technologieplattform Bioinformatik des Berliner Instituts für Gesundheitsforschung danken.

Ich danke Kent Søe und Jacob Bastholm Olesen für die sehr gute Zusammenarbeit und ihre großartige Arbeit und Hilfe bei der Analyse der Knochenresorption.

Für Ratschläge und Protokolle bezüglich hämatopoetischer Stammzellen möchte ich mich bei Matthew H. Porteus bedanken.

Thorsten Braun und den weiteren Mitarbeitern der Geburtsstation des Virchow-Klinikums der Charité bin ich sehr dankbar für die kooperative Zusammenarbeit, ohne deren Hilfe die Arbeit mit hämatopoetischen Stammzellen nicht möglich gewesen wäre. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch bei all den Eltern, die das Nabelschnurblut ihrer Neugeborenen für unsere Forschung zur Verfügung gestellt haben.

Alexej Knaus möchte ich aus tiefstem Herzen für eine ganz besondere und unvergessliche Episode der Doktorarbeitszeit danken.

Bei Erwin Hilbrich möchte ich mich außerdem ganz besonders für die Unterstützung und Hilfe zu Hause bedanken. Ein riesengroßes Dankeschön für das Aushalten all meiner Launen, für unzähliges Wecken mit dem besten Kaffee der Stadt (wieviele Besprechungen und Seminare hätte ich sonst wohl verpasst), für einen stets vollen Kühlschrank, für all die köstlichen Abendessen und schönen WG-Abende.

Martin Schurade danke ich für seine Geduld und liebevolle Fürsorge und für das schier unendliche Verständnis dafür, dass die Doktorarbeit bei mir so (zu) oft an erster Stelle stand.

Darüber hinaus bin ich sehr dankbar für die zahlreichen Motivationsreden, tröstenden Worte, Ablenkungen und die gemeinsame Freude über jeden auch noch so kleinen Fortschritt im Projekt, die ich durch meine Freunde erfahren habe.

Ich danke meiner Familie dafür, dass sie mir eine so gute Bildung ermöglicht haben, mich immer bei meinem Weg unterstützt und an mich geglaubt haben.

Natürlich möchte ich mich auch ganz herzlich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe Kornak bedanken, auf deren Hilfe und Ratschläge immer Verlass war.



# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich,

**Anna Floriane**

Vorname

**Hennig**

Nachname

Matrikelnummer

geboren am

**Remscheid**

geboren in

,

an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche kenntlich gemacht habe. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen und wurde bisher nicht veröffentlicht.

Berlin, 16.03.2020

Ort, Datum

Unterschrift