

Aus dem Max Delbrück Centrum für molekulare Medizin  
in der Helmholtz Gemeinschaft

**DISSERTATION**

Generierung eines  
humanen isogenen FlpIn<sup>TM</sup> -Expressions-Zelllinienpanels  
mit Hilfe von AAVS1-Zinkfinger-Nukleasen zur Untersuchung  
von Kandidatengenem bei kardiometabolischen Erkrankungen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Bobenko  
aus St. Petersburg

Datum der Promotion: 05.06.2016

## Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die führende Todesursache weltweit. Die Suche nach genetischen Einflussfaktoren und die Entwicklung neuer gentherapeutischer Ansätze beeinflusst seit langem maßgeblich die Wissenschaft. Besonderes Interesse gilt der Entdeckung neuer Kandidatengene und deren funktioneller Untersuchung mittels biochemischer Verfahren. Um funktionelle Konsequenzen kontextspezifisch analysieren zu können, besteht Bedarf in der Entwicklung zuverlässiger Methoden für die präzise Veränderung des Genoms vitaler Zellen. Langfristig sollen diese Methoden auch für personalisierte Medizin und gentherapeutische Nutzung anwendbar sein.

In vorangegangenen Arbeiten wurde das Einbringen ausgewählter DNA-Abschnitte (Inserts) in das Genom vitaler Zellen demonstriert. Es zeigte sich der Wunsch nach gezieltem Einbau eines Inserts einmalig an vordefinierter Stelle im Zellgenom. Als solcher Integrationsort hat sich der “safe harbor” *AAVS1* Locus auf dem menschlichen Chromosom 19 etabliert, da er den Vorteil der durchgängigen Expression und Unabhängigkeit gegenüber benachbarten Genen aufweist. Da die Sequenz des *AAVS1* Locus bekannt ist, kann er mittels homologer Rekombination (HR) angesteuert werden. Die naturgemäß niedrige HR-Rate kann durch die Erzeugung eines DNA-Doppelstrangbruchs (DSB) gesteigert werden.

In der vorliegenden Arbeit wird eine neue Methode zur Erzeugung eines Zelllinienpanels dargestellt, welches zukünftig zelltypspezifische Untersuchungen von Kandidatengenen ermöglichen wird. Es wurde der komplexe Vektor *AAVS1*-LacZeo2 hergestellt, welcher als Integrationsplattform die FRT-Site des weltweit häufig genutzten Integrationssystems FlpIn<sup>TM</sup>-System (Invitrogen) sowie zum *AAVS1* Locus homologe Sequenzen enthält. Der Vektor wurde via HR in HEK293, HUVEC und HepG2 Zellen integriert. Hierbei wurde mittels Zinkfinger nukleasen (ZFNs) ortsspezifisch im *AAVS1* Locus ein DSB erzeugt. So konnten FRT-Zelllinien geschaffen werden. Zudem konnte auch die Funktionalität der FRT-Site demonstriert werden indem ein GFP-Insert via FRT-Site in den *AAVS1* Locus integriert wurde.

Die FRT-Site erlaubt die ortsspezifische Integration eines beliebigen Gens (gene of interest, GOI) mit Hilfe einer FLP-Rekombinase in das Genom der FRT-Zelle. Aufgrund der Positionierung der FRT-Site im *AAVS1* Locus sind die erzeugten Zelllinien untereinander vergleichbar und eine zelltypspezifische Untersuchung von Kandidatengenen ist möglich. In den *AAVS1* Locus des zweiten Chromosoms 19 wurde über HR ein Tetrazyklin-gesteuerter Tet-Repressor (M2rtTA) eingefügt. Dieser erlaubt über die Änderung der Doxyzyklinkonzentration im Zellkulturmedium die gezielte Regulation der GOI-Expression.

Die präsentierte Methode bildet die Grundlage für die Etablierung weiterer FRT-Site-tragender Zelllinien und deren Nutzung in der kardiometabolischen Forschung.

**Schlagwörter:** *AAVS1* Locus, “safe harbor”, Zinkfinger nukleasen, homologe Rekombination, FRT-Site, FlpIn<sup>TM</sup>-System, M2rtTA

## Abstract

Cardiovascular diseases constitute the leading cause of death globally. Searching for genetic factors and developing new approaches in gene therapy has great impact on research. Special interest is paid to discovering new candidate genes and performing their functional analysis using biochemical methods. To enable further analysis of functional consequences in specific contexts it is necessary to develop solid methods for precise genome manipulation in a living cell. In the long term this method may be applied for personalized medicine and gene therapy.

Previous studies demonstrate the insertion of specific DNA-sequences (called “inserts”) into the genome of a living cell. This led to demand of directed insertion of an insert at a single chosen location in the genome of the targeted cell. For this purpose the “safe harbor” *AAVS1* locus, located on chromosome 19, has proven useful, since this locus is ubiquitously expressed and independent of nearby genes. As the sequence of the *AAVS1* locus is well-characterized the locus can be targeted by homologous recombination (HR). Naturally the rate of HR is low, but can be increased significantly by creating a DNA double-strand break (DSB).

The present study presents a new approach for generating cell line panels that will allow cell type specific analysis of candidate genes. The complex vector AAVS1-LacZeo2 was created. As an integration platform it includes the FRT-site of the worldwide most commonly used integration system FlpIn<sup>TM</sup> (Invitrogen), as well as sequences homologous to the *AAVS1* locus. The vector was integrated in HEK293, HUVEC and HepG2 cells by HR. Therefor zinc finger nucleases (ZFNs) were used to create a DSB in the *AAVS1* locus. The creation of FRT-cells was demonstrated successfully. In addition functionality of the FRT-site was demonstrated by integrating a GFP-insert into the *AAVS1* locus using site-specific integration.

The FRT-site enables site-specific integration of any gene of interest (GOI) into the genome of the FRT-cell using FLP-recombinase. Because of the FRT-site-positioning in the *AAVS1* locus created FRT-cell lines are comparable among each other and a cell type specific analysis of candidate genes is possible. Into the *AAVS1* locus of the second chromosome 19 a tetracycline-controlled tet-repressor (M2rtTA) was integrated by HR. It allows the specific regulation of the GOI-expression through variation of the amount of doxycycline in cell culture medium.

The presented results provide a basis for the development of further FRT-cell lines and their use for cardiometabolic research.

**Keywords:** *AAVS1* locus, “safe harbor”, zinc finger nucleases, homologous recombination, FRT-Site, FlpIn<sup>TM</sup> -system, M2rtTA

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Einleitung . . . . .	1
1.2	Das Arbeitsmodell Zellkultur . . . . .	2
1.3	Homologe Rekombination . . . . .	5
1.4	<i>AAVS1</i> Locus . . . . .	7
1.5	Zinkfinger Nukleasen . . . . .	9
1.6	Das FlpIn <sup>TM</sup> -System . . . . .	11
1.7	Das Tet-Repressor-System . . . . .	14
1.8	Plasmide . . . . .	16
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
3.1	Plasmide . . . . .	20
3.1.1	Herstellung des <i>AAVS1</i> -LacZeo2-Plasmids . . . . .	20
3.1.2	Herstellung der ZFN-Plasmide . . . . .	22
3.1.3	<i>AAVS1</i> -M2rtTA . . . . .	23
3.1.4	pEGFP-N1 . . . . .	23
3.1.5	<i>AAVS1</i> -CAGGS-eGFP . . . . .	24
3.1.6	Plasmide des FlpIn <sup>TM</sup> -Systems . . . . .	24
3.2	Zellkultur . . . . .	24
3.2.1	Killing Curve . . . . .	25
3.2.2	Transfektion . . . . .	26
3.2.3	Transiente Transfektion mit Zinkfinger Nukleasen . . . . .	27
3.2.4	Stabile Transfektion mit <i>AAVS1</i> -CAGGS-EGFP . . . . .	27
3.2.5	Stabile Transfektion mit <i>AAVS1</i> -LacZeo2 . . . . .	27
3.2.6	Stabile Transfektion mit <i>AAVS1</i> -LacZeo2 und <i>AAVS1</i> -M2rtTA . . . . .	27
3.2.7	Stabile Transfektion weiterer Zellen mit <i>AAVS1</i> -LacZeo2 und <i>AAVS1</i> -M2rtTA . . . . .	28
3.2.8	Stabile Transfektion von FRT-HEK293 via FlpIn <sup>TM</sup> -System . . . . .	28
3.2.9	Antibiotikaselektion stabil transfizierter Zellen und Expansion der Klone	28
3.3	DNA-Extraktion . . . . .	29
3.4	Proteinexpressionsanalyse . . . . .	30
3.4.1	Proteinisolation . . . . .	30
3.4.2	Proteinquantifizierung mittels Bicinchoninsäure Assay (BCA) . . . . .	30
3.4.3	Gelelektrophorese . . . . .	30
3.4.4	Western Blot . . . . .	30
3.4.5	Immunodetektion . . . . .	31

3.5	Polymerasekettenreaktion (PCR) . . . . .	31
3.5.1	ZFN-Schnittstelle . . . . .	32
3.5.2	Sonden-PCR . . . . .	32
3.5.3	TOPO <sup>®</sup> Cloning . . . . .	33
3.5.4	Integrations-PCR . . . . .	35
3.6	Sequenzierung . . . . .	36
3.7	Southern Blot . . . . .	37
3.7.1	Restriktionsverdau . . . . .	37
3.7.2	Gelelektrophorese . . . . .	37
3.7.3	Kapillar-Blotting . . . . .	37
3.7.4	Hybridisierung . . . . .	37
3.8	Kits . . . . .	39
3.9	Verbrauchsmaterial und Geräte . . . . .	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
4.1	ZFN-Schnittstelle in Zielzellen . . . . .	41
4.2	AAVS1-LacZeo2-Donor-Plasmid . . . . .	41
4.3	ZFN-Plasmide und die Expression der ZFNs . . . . .	43
4.4	Transfektion - Rate und Erfolg . . . . .	44
4.5	Nachweis stabiler Transfektion des AAVS1-LacZeo2-Vektors . . . . .	46
4.6	Nachweis stabiler Transfektion des AAVS1-M2rtTA-Vektors . . . . .	47
4.7	Nachweis korrekter FRT-Integration . . . . .	48
4.8	Nachweis korrekter Tet-Repressor-Integration . . . . .	52
4.9	Nachweis der Funktionalität der FRT-Site in Zellen mit stabil integrierter FRT-Plattform . . . . .	54
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
5.1	Relevanz der Fragestellung . . . . .	56
5.2	Experimentelles System . . . . .	56
5.3	Weiterentwicklung der Methode . . . . .	62
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>71</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	71
8.2	Eidesstattliche Versicherung . . . . .	74
8.3	Curriculum Vitae . . . . .	75
8.4	Danksagung . . . . .	76

# 1 Einleitung

## 1.1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind aktuell die häufigste Todesursache weltweit. Sie gehören zu den komplexen und multifaktoriellen Erkrankungen. Bisher ist ihre Pathogenese noch unzureichend erforscht. Neben dem Einfluss durch die Lebens- und Ernährungsweise wurde auch ein genetischer Zusammenhang und eine Erbllichkeit von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bestätigt. Eine kleine Zahl kardiovaskulärer Erkrankungen konnte auf einzelne Gendefekte zurückgeführt werden und macht ein Screening für derartige Hochrisikopatienten möglich. Den Hauptanteil im klinischen Alltag stellen jedoch Patienten ohne monogenetische Herz-Kreislauf-Erkrankung dar.

Das komplexe Zusammenspiel zwischen Umweltfaktoren und genetischer Prädisposition kann zu einer klinischen Manifestation einer kardiovaskulären Erkrankung führen. Daher besteht großes Interesse neben bekannten Biomarkern neue und genetische Biomarker zu identifizieren. Mittels neuer genetischer Marker könnte die klinische Manifestation einer kardiovaskulären Erkrankung vorhersagbar gemacht und eine adäquate Therapie besonders früh eingeleitet werden.

Für die Suche nach genetischen Einflussfaktoren gibt es zahlreiche Forschungsansätze. In der experimentellen Genetik wird ein zu untersuchendes Phänomen isoliert und unter kontrollierten Bedingungen untersucht. So werden Umweltfaktoren möglichst uniform gehalten, um deren Effekt auf den Phänotyp zu unterbinden. Durch Kombination genomischer, epigenomischer und transkriptioneller Daten und umfangreiche Analysen genomischer Mechanismen werden neue Signalwege enthüllt, welche z.B. spezielle kardiovaskuläre Phänotypen bedingen. Es werden Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) und Mikrosatellitenmarker genotypisiert, gesammelt und deren genomweites Expressionsprofil sowie Assoziation mit bestimmten Phänotypen untersucht. Es besteht die Hypothese, dass zahlreiche mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziierte SNPs einen Einfluss auf Signalwege haben, welche zuvor nicht mit diesen Erkrankungen in Verbindung gebracht wurden [01].

In den letzten zehn Jahren konnten in genomweiten Assoziationsstudien (genome-wide association studies, GWAS) durch Untersuchung großer Populationen hunderte Kandidatengene identifiziert werden, welche im Verdacht stehen kardiovaskuläre Erkrankungen zu bedingen. Ob und welche einzelnen Genvarianten der Kandidatengene mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergehen, gilt fortführend zu untersuchen. So könnten neue genetische Risikofaktoren identifiziert werden. Eine bedeutende GWAS war die 2007 veröffentlichte Studie des Wellcome Trust Case Control Consortiums (WTCCC), in der insgesamt 14000 Fälle häufiger Erkrankungen, darunter die koronare Herzkrankheit, arterielle Hypertonie und Diabetes Typ I und II, mit 3000 Kontrollprobanden verglichen wurden [02]. Der Studie gelang es zahlreiche neue krankheitsassoziierte Gene zu identifizieren, deren funktio-

nelle Analyse allerdings noch nicht abgeschlossen ist.

Die rasante Entwicklung im Bereich der experimentellen Genetik und der GWAS bietet hiermit einen Anfang für die Entdeckung genetischer Risikofaktoren. Sinkende Kosten, steigende Testgeschwindigkeit und zunehmende Testzuverlässigkeit in der Sequenzierungstechnologie machen die genetische Untersuchung von kardiovaskulären Risikofaktoren besser zugänglich. Zudem macht die Stabilität der genetischen Faktoren im Verlauf des Lebens und deren geringe Beeinflussbarkeit durch äußere Umstände ein frühes Screening im präklinischen Stadium möglich [03].

Ebenso ist die Suche nach genetischen Faktoren für die Pharmakologie und Pharmaindustrie von entscheidendem Interesse. So exprimieren manche Patienten oder Bevölkerungsgruppen einzelne Enzyme nicht, welche für die Aktivierung von inaktiven Medikamenten (so genannten Prodrugs) notwendig sind. Dadurch ist die Wirkung dieser Medikamente herabgesetzt und der therapierte Patient kann maßgeblich gefährdet sein. Ein Beispiel hierfür ist der Wirkstoff Clopidogrel, welcher als Thrombozytenaggregationshemmer u.a. leitliniengerecht bei der Therapie eines Herzinfarkts eingesetzt wird. Clopidogrel wird als Prodrug verabreicht und muss durch das Enzym Cytochrom P-450-2C19 aktiviert werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym in bestimmten Patientengruppen aufgrund eines genetischen Polymorphismus funktionslos ist [04]. Clopidogrel wirkt somit nicht regelrecht, weshalb diese Patienten ein höheres Risiko haben einen erneuten Herzinfarkt zu erleiden. Somit ist die Suche nach genetischen Faktoren für die Identifikation pharmakologischer Non-Responder und die Entwicklung einer personalisierten Medizin entscheidend.

Das Auffinden dieser Polymorphismen allein ist allerdings nicht ausreichend. Ein bedeutsamer Schritt ist deren funktionelle Analyse, wofür geeignete Forschungsbedingungen notwendig sind. Hierbei muss der Zusammenhang zwischen Polymorphismus und einer kardiovaskulären Erkrankung in vitalem Gewebe nachgewiesen werden. Dabei ist es oftmals notwendig spezies- und gewebespezifische Analysen durchzuführen, da die untersuchten Kandidatengene nur in vereinzelt Geweben exprimiert werden können.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode in der Zellkultur vorgestellt, mit der Kandidatengene sowie damit verbundene zellinterne und zelltypspezifische Prozesse und Signalwege des menschlichen Körpers weiter erforscht werden sollen.

## 1.2 Das Arbeitsmodell Zellkultur

Zellkultur ist heutzutage eine weltweit vielfach genutzte und gut etablierte Methode für die Erforschung von Erkrankungen, Genen und zellinternen Mechanismen. Durch fortlaufende Verbesserung der Technologien wird versucht möglichst große Vergleichbarkeit mit den *in vivo* Bedingungen zu schaffen. Es werden permanent neue Zelllinien etabliert und weiterentwickelt. Die Nachfrage nach organ- und systemspezifischen immortalisierten, d.h. in der Anzahl ihrer Zellteilungen unbegrenzten Zellen, ist konstant hoch. Außerdem ist Zellkultur

eine gute Alternative zu Tierversuchen.

Zellkultur bietet den großen Vorteil der vollständigen Kontrolle über Kulturbedingungen, d.h. über Temperatur, Kohlenstoffdioxidgehalt (CO<sub>2</sub>), Mediumzusammensetzung, Teilungsverhältnisse und Selektion. Es lässt sich eine homogene immortalisierte Zelllinie erzeugen, d.h. eine Zelllinie, in der alle Zellen gleiche Eigenschaften aufweisen und eine unbegrenzte Anzahl an Zellteilungen vollziehen können. Eine derartige Zelllinie ist leicht zu vervielfältigen. Sie liefert unter Verwendung ein und derselben Kulturbedingungen auch bei verschiedenen Arbeitsgruppen beständige und reproduzierbare Ergebnisse. Außerdem benötigt Zellkultur wenig Equipment zum Kultivieren, ist gut vorhersehbar und gut zu steuern.

Zellkultur ist eine hervorragende Alternative zum Tiermodell, da zahlreiche physiologische Abläufe und Funktionen der einzelnen Zellart in der etablierten Zelllinie erhalten sind und ohne die Verwendung von Versuchstieren erforscht werden können. Anders als bei Modellorganismen ist in einer Zellkultur auch die Verwendung humaner Zellen möglich.

Wichtig ist dabei die Möglichkeit zu schaffen, Faktoren und zellinterne Abläufe in den Zellen zu untersuchen, für welche diese Faktoren spezifisch sind. Diese Gewebespezifität (tissue specificity) ist ein entscheidender einschränkender Umstand. So gibt es Faktoren, z.B. Splicing- oder Transkriptionsfaktoren, Histonmethylierungsmuster, Rezeptoren oder Kanäle, welche je nach Gewebe- oder Zellart massive Unterschiede im Expressionsmuster, in ihrem Verhalten oder ihren Auswirkungen auf die jeweilige Zelle aufweisen.

So konnte für die in neueren GWAS identifizierten Genvarianten im Locus *1p13* (auf dem humanen Chromosom 1) eine starke Assoziation mit Serum-LDL-Konzentrationen und Myokardinfarkten bei Patienten nachgewiesen werden [05]. In Experimenten mit murinen und humanen Hepatozyten und Fettzellen konnte gezeigt werden, dass das im Locus *1p13* gelegene Gen *SORT1* einen Einfluss auf die Plasmakonzentration der Lipoproteine LDL und VLDL hat. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Regulationsmechanismus der Genexpression leberspezifisch ist [05]. Dies offenbart einen bisher unbekanntem regulatorischen Signalweg im Metabolismus von Lipoproteinen. Dieser könnte für die Entwicklung neuerer Therapien zur Vorbeugung des Myokardinfarkts von Interesse sein. Gleichzeitig macht dies die weitere Untersuchung von *SORT1* und anderer im Locus *1p13* gelegener Gene und deren Genvarianten gewebespezifisch notwendig.

Besonders gut geeignet ist Zellkultur für die Untersuchung von intrazellulären Prozessen, wie z.B. Interaktionen zwischen DNA und RNA oder zwischen RNA und Proteinen. So wurden z.B. RNA binding motif (RBM) Proteine im Zellkulturmodell untersucht. Diese sind für die Bildung der mRNA verantwortlich. RBM-Proteine sind Bestandteil des Spliceosoms, einem Komplex, der Introns aus der prä-messenger RNA (prä-mRNA) herausschneidet und einzelne Exons miteinander verbindet. So entsteht die endgültige mRNA, welche für die Translation bei der Bildung von Proteinen notwendig ist. Kommt es zur Mutation im Gen des RNA binding motif Protein 20 (RBM20), so zeigt sich im Phänotyp eine dilatative Kardiomyopathie [06], eine schwerwiegende Herzmuskelerkrankung. Dieser Zusammen-



hang konnte im Mausmodell durch den Knock-Out des *RBM20* Gens bestätigt werden [07]. Jedoch sind exakte Funktionen, Interaktions- und Regulationsmechanismen des RBM20 noch unzureichend bekannt [07]. Da der Splicing-Faktor RBM20 nachweisbar intrazellulär vorliegt und auch dort aktiv ist, ist die Zellkultur eine willkommene Methode für dessen weitere Erforschung. Gleichzeitig wurde auch für RBM20 eine Gewebespezifität gezeigt. Die Expression des RBM20-Proteins variiert stark je nach Zellart: In Herzmuskelzellen ist sie sehr stark ausgeprägt, in Quadrizeps-Muskelzellen ebenfalls gut nachweisbar, wohingegen sie in anderen Geweben (z.B. Lunge, Leber, Niere, Milz, Gehirn) nicht zu detektieren ist [07]. Für die weitere Untersuchung von RBM20 sind also geeignete Zelllinien notwendig.

Humane Zellen haben zudem ein großes therapeutisches Potential. Schon heute gibt es zahlreiche Medikamente, die in tierischer Zellkultur hergestellt werden. Darunter befinden sich Antikörper für die Therapie maligner Erkrankungen, Hormone und Gerinnungsfaktoren. Darüber hinaus sind autologe und allogene Stammzelltransplantationen bei der Therapie von Erkrankungen des blutbildenden Systems, z.B. der Leukämie, beim Menschen zum Klinikalltag geworden. Im Gegensatz zu tierischen Zellen haben humane Zellen dabei geringeres antigenes Potential und können so besser vertragen werden. Die Nutzung humaner Zellen als Expressionssystem eines bestimmten Gens wäre für die Entwicklung neuer Therapien von entscheidendem Interesse, so z.B. für die Therapie monogenetischer Erkrankungen oder für die Substitution einzelner Stoffwechselprodukte bei Enzymdefekten.

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien mit Ursprung im kardiovaskulären System, HEK293, HUVEC und HepG2, entstammen allesamt humanem Gewebe. es handelt sich um etablierte Zelllinien, welche in vielen Arbeitsgruppen verwendet werden.

Die Human Embryonic Kidney 293 Cells (HEK293) (ATCC, CRL-1573<sup>TM</sup>) sind die weltweit meist genutzte epitheloide Zelllinie. Ihre Kultivierung und das Einbringen von Fremd-DNA in den Zellkern mittels Transfektion ist weit verbreitet. In der Wissenschaft werden HEK293 zur Untersuchung von Natriumkanälen und deren Beeinflussung durch Arzneistoffe [08], zur Erforschung von nukleären Exportmechanismen [09], posttranskriptionellem Gen-Silencing [10] und Proteininteraktionen [11] herangezogen. Sie sind ein häufig verwendetes Standard-Expressionssystem.

Die Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) (ATCC, CRL-2922<sup>TM</sup>) sind primäre humane Zellen vom endothelialen Typ. Die Zelllinie ist ein geeignetes Modell für die Erforschung von Blutgefäßendothelien und deren Ansprechen auf mechanische und pharmakologische Einflüsse [12]. Außerdem wird sie für die Untersuchung des Wachstumsfaktors VEGF [13] und von neuen anti-angiogenen Faktoren [14] in der Tumorforschung verwendet. Im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen spielen HUVEC für die Erforschung der Angiogenese bei Myokardinfarkt und Arteriosklerose eine Rolle.

Die Human Liver Hepatocellular Carcinoma Cell Line (HepG2) (ATCC, HB-8065<sup>TM</sup>) ist eine epitheliale Zelllinie. Die HepG2 Zelle ist ebenso wie die humane Leberzelle polar und exprimiert zahlreiche leberspezifische Proteine, wie z.B. Albumin [15], LDL [16] und

$\alpha$ -Fetoprotein [17]. Sie eignen sich zur Erforschung der Lebersynthese und ihrer pharmakologischen Beeinflussung [15, 16], des hepatozellulären Karzinoms (HCC) [17] und zur Untersuchung zytotoxischer und genotoxischer Substanzen [18]. In der kardiometabolischen Forschung lassen sich HepG2 gut für die Untersuchung von leber-, lipid- oder cholesterinstoffwechselfunktionsspezifischen Faktoren heranziehen.

Embryonic Stem Cells (ES) sind pluripotente Stammzellen aus dem Inneren einer Blastozyste. Sie proliferieren *in vitro* unbegrenzt, sind undifferenziert und können alle drei Keimblätter bilden [19]. Sie haben das Potential in verschiedene Zelltypen auszudifferenzieren und können deshalb als Quelle für Gewebezüchtung oder Transplantationen von Nutzen sein [20].

### 1.3 Homologe Rekombination

Die homologe Rekombination (HR) erlaubt den Austausch von Nukleotiden zwischen zwei identischen oder sehr ähnlichen DNA-Molekülen. Es ist ein natürlicher Mechanismus, der von Zellen genutzt wird, um ihr genetisches Material zu reparieren oder in der Meiose neu zu mischen. In der Gentechnik wird HR verwendet, um das Genom vitaler Zellen künstlich zu verändern. Derzeit ist es der genaueste Weg das Genom zu manipulieren [21].

In einer Zelle können im Laufe der DNA-Replikation oder durch äußere Einwirkung, z.B. durch ionisierende Strahlung oder mutagene Substanzen, DNA-Schäden entstehen. Diese können entscheidende Fehler in Zellfunktion und Zellzyklus bewirken. Eine Art der DNA-Schädigung ist das Entstehen eines DNA-Doppelstrangbruchs (double-strand break, DSB). Dieser kann jedoch durch zellinterne Mechanismen repariert werden. Für die Reparatur eines DSB gibt es zwei Möglichkeiten: die nicht-homologe Verbindung beider DNA-Enden miteinander oder die Homologie-vermittelte Reparatur (homology-directed repair). Letztere stellt eine Form von HR dar, welche zuverlässig genetische Information von einem DNA-Molekül mit ähnlicher Sequenz überträgt. Dabei wird in Abhängigkeit von dem homologen DNA-Donor entweder das zerschnittene Gen repariert oder eine neue Sequenz an der Stelle des DSB eingesetzt [22]. Als DNA-Donor kann sequenzgleiche (homologe) DNA verschiedenen Ursprungs dienen: die homologe Region des Schwesterchromatids, des zweiten Chromosoms oder eines extern vorliegenden DNA-Moleküls (z.B. Plasmid) [23]. Entscheidend dabei ist, dass die beiden dem DSB anliegenden Enden homolog zu dem als Vorlage verwendeten DNA-Abschnitt sind.

Die HR ist damit ein geeigneter Mechanismus für die stabile Integration eines zu untersuchenden Gens (gene of interest, GOI) in das Genom der Zielzelle. Gegenüber dem vorübergehenden (transienten) Einbringen eines GOI, z.B. in Form eines Plasmids, birgt die stabile (latente) Integration entscheidende Vorteile.

Bei der transienten Integration stellt das GOI eine Fremd-DNA dar und wird durch zellinterne Prozesse abgebaut. Gleichzeitig nimmt die Konzentration an GOI im Laufe der Zellteilung ab, da sich das transient integrierte GOI nicht selbst vervielfältigt. Somit sinkt

im Laufe der Zeit auch die Menge an exprimiertem GOI-Genprodukt in der Zelle. Dies erschwert die Analyse des GOI und macht dessen langfristige Erforschung unmöglich. Bei der stabilen Integration hingegen wird das GOI dauerhaft in das Genom der Zielzelle eingebaut. Dadurch erkennt die Zelle das GOI nicht als Fremd-DNA und baut es nicht ab. Zudem wird das GOI im Laufe der Zellteilungen mit der Zell-DNA vervielfältigt. Somit bleibt die Menge an Fremd-DNA in der Zelle konstant. Dies ermöglicht die langfristige Analyse des GOI in einer vitalen Zelle.

Bisher wurde für die stabile Integration eines GOI in das Genom einer vitalen Zelle üblicherweise die willkürliche Integration (random integration) genutzt. Dieses Verfahren wird durch virale Vektoren, Plasmide oder Transposons vermittelt. Dabei wird ein Vektor mit Antibiotika-Resistenzgen künstlich in eine Zelle eingeschleust und integriert sich willkürlich in deren DNA. Die manipulierten Zellen werden mit Antibiotika versetzt. Zellklone mit vollzogener Vektorintegration exprimieren das Antibiotika-Resistenzgen, werden durch die Antibiotika nicht abgetötet und können so identifiziert werden. Khandelia et al. stellten 2011 ein Verfahren vor, in dem sie sechs humane und fünf murine Zelllinien mit einem eigens konstruierten lentiviralen Vektor versetzten [24]. Dieser Vektor enthielt das Rekombinationssystem Cre-*loxP*-System. Das Cre-*loxP*-System beruht auf der natürlich vorkommenden Cre-Rekombinase. Diese spaltet und verknüpft DNA zwischen spezifischen Erkennungssequenzen. Als Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase dient die *loxP*-Site. Khandelia et al. versetzten Zellen mit einem *loxP*-Sites-tragendem Vektor. Dieser integrierte sich willkürlich in das Genom der Zielzelle und schuf so einen Akzeptorlocus. Anschließend wurden die manipulierten Zellen mit Cre-Rekombinase und einem speziellen Plasmid versetzt. Das Plasmid trug einen gewünschten DNA-Abschnitt und *loxP*-Sites. Die Cre-Rekombinase vermittelte die Integration des gewünschten DNA-Abschnittes in den Akzeptorlocus [24]. Damit demonstrierten Khandelia et al. wie in Zellen erfolgreich ein Rekombinasesystem integriert werden kann.

Die willkürliche Integration von Vektoren ins Zellgenom ist unkontrollierbar und birgt zudem die Gefahr einer maßgeblichen Veränderung der Zielzelle durch Fehlintegration oder transgenes Silencing [25], d.h. das Abschalten anderer Gene im Zellgenom. Die Expression eines willkürlich integrierten GOI ist ebenfalls schwer einschätzbar, da sie aufgrund epigenetischer Ereignisse im Verlauf zu Instabilität tendiert. Zudem sind zwei Zellen mit dem gleichen GOI aufgrund möglicher unterschiedlicher Integrationsmuster miteinander nicht vergleichbar. Darüber hinaus führt willkürliche Integration oft zu multiplen Integrationen eines GOI ins Zellgenom und erschwert die Erzeugung von isogenen Versuchsbedingungen deutlich [26].

Dagegen birgt die HR den entscheidenden Vorteil der besseren Kontrollierbarkeit bezüglich Integrationsort und -frequenz sowie eine bessere Steuerbarkeit. Für das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gilt HR als gesicherter Mechanismus und wurde auch für vereinzelte Säugerzellen beschrieben [27]. HR findet ausschließlich in der Synthesephase des Zellzyklus statt und ist abhängig von homologen Sequenzen von min-

destens 100 bp [28]. Durch gezieltes Ausnutzen dieser Tatsache lassen sich Vektoren mit homologen Sequenzen erzeugen und mittels HR in das Zellgenom ortspräzise integrieren.

Im Gegensatz zur Reparatur eines DSB durch nicht-homologe Verbindung beider DNA-Enden miteinander tritt die HR in den meisten Zellen allgemein selten auf. Deswegen war bislang eine sehr strenge Selektion mit Antibiotika notwendig, was die Experimente teilweise deutlich behindert hat [29]. Außerdem sinkt die Frequenz der HR mit zunehmender Länge des einzufügenden Konstruktes um das bis zu Dreifache [27]. Es wird zudem vermutet, dass die Effizienz der HR durch die Sequenz des eingefügten Gens und dessen regulatorische Elemente beeinflusst wird [27].

Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Rate an HR in somatischen Zellen durch die gezielte Erzeugung sequenzspezifischer DSB tausendfach verstärkt werden kann [30]. Und obwohl in eukaryotischen Zellen die nicht-homologe Verbindung zweier DNA-Enden gegenüber der HR überwiegt, kann die Frequenz der HR deutlich erhöht werden, wenn große Mengen an homologen Sequenzen in das Zellinnere eingeschleust werden [22]. Die HR ist damit sehr gut für die Integration definierter DNA-Abschnitte in das Genom einer Zelle geeignet.

Da für das gezielte Einfügen eines Inserts mittels HR homologe Sequenzen (“homologe Arme”) benötigt werden, muss die Sequenz der Ziel-DNA bekannt sein. Gleichzeitig ist bei der Wahl des DNA-Abschnitts für die Integration zu beachten, dass keine entscheidenden zellverändernden Konsequenzen aus der Disruption des gewählten DNA-Abschnitts und der Integration eines Inserts entstehen. Somit ist die Wahl eines passenden “safe harbor” notwendig.

## 1.4 *AAVS1* Locus

Die latente Infektion durch das Adeno-assoziierte Virus (AAV) wurde erstmals in den 1970er Jahren im Rahmen eines Screenings nach verborgener Infektion durch Hoggan et al. entdeckt. Seither ist sie von großem Interesse für die Gentherapieforschung [31]. Das AAV gehört zu der Familie der Parvoviridae und ist weltweit verbreitet. Es konnte gezeigt werden, dass 40 bis 80 % der Erwachsenen seropositiv für AAV sind und dass die Serokonversion, d.h. die Bildung spezifischer Antikörper gegen Antigene des AAV, innerhalb der ersten Lebensjahre stattfindet. Außerdem konnte die AAV-Integration in einer großen Auswahl an Zelllinien nachgewiesen werden [32]. Allerdings ist bis heute nur wenig über die Erstinfektion mit dem AAV und über seine Beziehung zu der menschlichen Wirtszelle bekannt.

Das AAV ist nicht pathogen, d.h. es hat keine Assoziation mit humanen Erkrankungen. Es hat die einmalige Eigenschaft sich latent (dauerhaft) in das Genom einer Zielzelle zu integrieren. Dabei tritt die Integration sowohl in sich teilenden, wie auch in sich nicht teilenden Zellen auf, in letzteren jedoch mit geringerer Frequenz [33]. Aus diesem Grund könnte das AAV als potentieller Vektor für humane Gentherapie genutzt werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine vorausgegangene Pluripotenz nach AAV-Infektion erhalten

bleibt [26].

Die AAV-Integration findet stets an dem q-Arm des Chromosoms 19 an einer spezifischen Position zwischen q13.3 und qter im humanen Genom statt [33]. Im besagten Bereich befindet sich das *protein phosphatase 1, regulatory subunit 12C (PPP1R12C)* Gen [34]. Der genaue Mechanismus der AAV-Integration ist nicht endgültig erforscht. Es konnten jedoch kurze Homologien zwischen AAV und dem ersten Exon und dem ersten Intron des *PPP1R12C* Gens nachgewiesen werden [35]. Kotin et al. infizierten Zelllinien mit einem Wildtyp-AAV und zeigten, dass bei 78 % der AAV-infizierten Zelllinien die Disruption einer bestimmten Genomsequenz innerhalb des *PPP1R12C* Gens stattfindet [31]. Dies bestärkt die Annahme, dass die AAV-Integration ortsspezifisch abläuft [34]. Bei der AAV-Integration wird das *PPP1R12C* Gen gespalten [34].

Der Locus wurde sequenziert und als *AAVS1* Locus bezeichnet [35]. Es konnte gezeigt werden, dass das *PPP1R12C* Gen und damit der *AAVS1* Locus in allen erforschten Primärzellen und üblicherweise genutzten Zelllinien transkribiert wird [26].

Somit eignet sich der *AAVS1* Locus aufgrund folgender Eigenschaften besonders gut als ein transgener “safe harbor”: Zum Einen sind durch Sequenzierungen die Lokalisation und Sequenz des *AAVS1* Locus genau bekannt. Der Locus wird in allen bekannten und häufig genutzten Zelltypen aktiv transkribiert. In ihn eingesetzte Gene werden exprimiert. Gleichzeitig sind durch Spaltung des *PPP1R12C* Gens keine nachteiligen Effekte auf die Zellphysiologie nachweisbar. Schließlich konnte in Zellkulturanalysen die einmalige Integration des AAV an der spezifischen Position auf dem Chromosom 19 und die Universalität des *AAVS1* Locus nachgewiesen werden [26, 35].

Ein anderer bekannter “safe harbor” ist der *ROSA26* Locus, welcher bei der Maus auf Chromosom 6 lokalisiert ist. Er wurde 1991 erstmals von Soriano et al. identifiziert. Dieser Locus wird in embryonalen und adulten Zellen durchgängig exprimiert und kann hoch-effizient angesteuert werden. Deshalb eignet er sich besonders gut für gezielte Genmodifikation (gene targeting) [36] und wird bevorzugt für die knock-in-Maus Technologie herangezogen. Im humanen Genom konnte bisher ein Homolog zum *ROSA26* Locus der Maus identifiziert werden [37]. Dieses ist bisher jedoch nur unzureichend erforscht und wird nicht als Integrationsort für GOI genutzt. Der *AAVS1* Locus hat im humanen Gewebe das Potential ebenso weitreichend für genetische Manipulationen genutzt zu werden wie der *ROSA26* Locus in der Maus.

In mehreren Arbeiten wurde die Überlegenheit des *AAVS1* Locus gegenüber anderen “safe harbor” Loci demonstriert. Lombardo et al. zeigten 2011 für mehrere humane Zellen, dass der *AAVS1* im Gegensatz zum *CCR5* Locus auf dem humanen Chromosom 3 weniger Einfluss auf benachbarte Gene hat, als dekondensiertes Chromatin vorliegt und eine stärkere Genexpression aufweist. Außerdem konnten die Autoren zeigen, dass die *AAVS1*-Manipulation von humanen Stammzellen gut toleriert wird: Die Differenzierungseigenschaft humaner Stammzellen bleibt erhalten und die anschließende Expression am *AAVS1* ist gleichbleibend [38].

Van Rensburg et al. beschrieben 2013 das Vorliegen von RNA-Polymerase II am *AAVS1* Locus. Diese fehlt am *CCR5*, weswegen der *AAVS1* Locus potentiell besser für Genintegration und -expression geeignet ist [39].

Jede Zelle besitzt in ihrem Genom zwei *AAVS1* Loci, jeweils einen auf jedem Chromosom 19. Da die Sequenz dieser Region gut bekannt ist, lässt sich mit Hilfe der HR ein gewünschter DNA-Abschnitt in den *AAVS1* Locus stabil integrieren. So demonstrieren Ramachandra et al. 2011 unter Verwendung der HR die Integration von heterospezifischen *loxP*-Sites in den *AAVS1* Locus [27]. Dabei nutzten sie für die HR linearisierte Plasmide mit *loxP*-Sites und zwei zum *AAVS1* Locus homologen Sequenzen. Nach Integration der *loxP*-Sites in den *AAVS1* Locus wurde über das Cre-*loxP*-System mit Hilfe eines baculoviralen Vektors ein gewünschter DNA-Abschnitt eingefügt. Schließlich wurde mittels PCR- und Southern Blot-Analyse die erfolgreiche Modifikation des *AAVS1* Locus nachgewiesen [27].

Aufgrund der eindeutigen Vorteile des *AAVS1* Locus als “safe harbor” wurde er in der vorliegenden Arbeit für die Integration eines Inserts ausgewählt.

## 1.5 Zinkfinger Nukleasen

Die Rate an HR lässt sich durch gezielte Erzeugung sequenzspezifischer DSB tausendfach verbessern [30]. Hierfür haben sich künstlich hergestellte Nukleasen etabliert, so genannte Zinkfinger Nukleasen (ZFNs), die in der Lage sind sequenzspezifisch einen DSB zu erzeugen. Diese Eigenschaft macht sie für die wissenschaftliche und gentherapeutische Forschung von großem Interesse.

ZFNs sind Hybride aus einer nichtspezifischen Nukleasedomäne und einer DNA-Bindungsdomäne. Letztere besteht aus mehreren miteinander verbundenen Zinkfingerproteinen (Anzahl P) [40]. Zinkfingerproteine wurden erstmals 1985 im Krallenfrosch *Xenopus laevis* beschrieben [41]. Jedes Zinkfingerprotein bindet drei aufeinander folgende Basenpaare (Codon) und vermittelt die Erkennung des gebundenen Codons [30]. Somit erkennt jede ZFN eine Sequenz von 3 x P Basenpaaren (siehe Abb. 1A). Dies entspricht einer Anzahl von 12 bp bei einer ZFN, welche aus 4 Zinkfingerproteinen besteht. Dabei sind die Orientierung der ZFNs zueinander und deren Bindungsabstand entscheidend für die Erzeugung eines DSB [25]. Bibikova et al. haben zeigen können, dass ein ZFN-Paar einen Optimalabstand zwischen den DNA-Bindungsdomänen aufweist. Binden zwei ZFNs in entgegengesetzter Orientierung und in korrektem Abstand zueinander an die DNA, so dimerisieren die Nukleasedomänen zur *FokI*-Endonuklease und erzeugen einen DSB [22]. Eine Rekombination zu etwa 95 % des Substrates erfolgt, wenn die ZFNs die Möglichkeit haben im individuellen Optimalabstand zueinander an die DNA zu binden [30], da die ZFNs dann in nahezu allen gebundenen DNA-Molekülen einen DSB erzeugen können. Bibikova et al. zeigten, dass bei einer Abweichung des Bindungsabstandes vom Optimalabstand um 2 bp die Rekombinationsrate bereits auf 40 % bzw. auf 60 % des Optimalwertes sinkt [30],

da entsprechend weniger DSB gebildet werden.

Erstmals demonstrierten Moehle et al. 2007 die Möglichkeit mittels spezifischer ZFNs und unter Verwendung der HR ein DNA-Segment in die DNA einer vitalen Zelle einzusetzen. Hierfür steuerten sie das *IL2R $\gamma$*  Gen auf dem humanen Chromosom 10 in der immortalisierten Zelllinie K562 an. Den Autoren gelang es nachweislich ein Insert von bis zu 8 kbp in den besagten Locus zu integrieren und dabei sogar auf die antibiotische Selektion zu verzichten [42]. Damit zeigten sie das Potential der ZFNs als Tool für DNA-Manipulationen in lebenden Zellen auf.

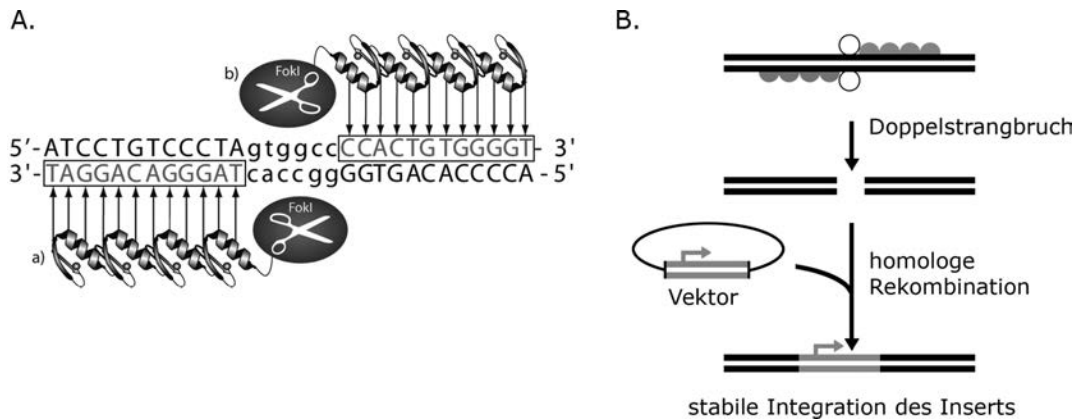


Abbildung 1: A. Schematische Darstellung der Bindung eines ZFN-Paares an die DNA. Jede der zwei ZFNs bindet mit vier Zinkfingerproteinen an eine Sequenz von 12 bp an entgegengesetzten Strängen anliegend an die ZFN-Schnittstelle. Der Abstand zwischen den beiden Bindungssequenzen beträgt 6 bp; a) Zinkfingerprotein mit DNA-Bindungsdomäne, b) *FokI*-Nukleasedomäne; B. Schematische Darstellung der homologen Rekombination (HR): Ein Doppelstrangbruch (DSB) wird durch zwei dimerisierende ZFNs erzeugt. Durch das Hinzufügen eines Vektors mit Insert und homologen Sequenzen wird das Insert mittels HR in die DNA der Zielzelle eingefügt. Der DSB wird repariert.

Durch die Modifikation der DNA-Bindungsdomäne der ZFNs lassen sich gezielt neue ZFNs erzeugen, welche gewünschte spezifische DNA-Sequenzen erkennen. Dadurch dass Zinkfingerproteine ursprünglich natürliche DNA-Bindungsmoleküle sind, können auch künstlich konstruierte ZFNs nachweislich in lebenden Zellen agieren [30]. Dieser Prozess konnte in zahlreichen Arbeitsmodellen, wie z.B. *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* oder somatischen Säugerzellen, gezeigt werden [40]. Die Verfügbarkeit derartiger künstlich erzeugter chimärer Restriktionsenzyme ermöglicht ortsspezifische Manipulationen im Genom einer lebenden Zelle.

Virale Vektoren bergen die Gefahr einer willkürlichen Integration und einer dadurch bedingten Gendisruption. Ebenfalls können sie in lebenden Organismen eine Immunantwort provozieren oder zu potentiell gefährlicher viraler Replikation führen. ZFNs und Plasmide weisen diese Risiken bei der Verwendung als Vektor nicht auf und sind damit geeigneter für die klinische Anwendung. So werden aktuell zwei ZFNs in klinischen Studien getestet: Eine ZFN wird als Teil eines therapeutischen anti-HIV-Ansatzes in drei Phase-1-Studien untersucht (siehe Studiennummern NCT00842634, NCT01044654, NCT01252641 unter [43]). Eine andere wird zur Zellmodifizierung in der anti-Krebs-Therapie geprüft (siehe NCT01082926

unter [43]).

Hockemeyer et al. zeigten 2009, dass der *AAVS1* Locus ein “safe harbor” ist. Sie demonstrierten die Manipulation des *AAVS1* Locus mittels spezifischer ZFNs und HR indem sie erfolgreich ein Expressionssystem in den *AAVS1* Locus von humanen embryonalen Stammzellen (hESCs) integrierten. Als Expressionssystem wählten sie das *eGFP* Gen mit vorgeschaltetem Cytomegalievirus-Promoter (*CMV* Promoter) und Puromycin-Resistenzgen. Dabei nutzten sie eigens konstruierte Plasmide mit zum *AAVS1* Locus homologen Sequenzen und selektionierten die positiven Klone mit Puromycin [44].

DeKolver et al. demonstrierten 2010 die Möglichkeit der separaten Ansteuerung beider *AAVS1* Loci einer Zelle: Die Autoren integrierten in einen *AAVS1* Locus ein induzierbares Expressionssystem mit *eGFP* Gen und Tet-Operator. In den anderen *AAVS1* Locus integrierten sie einen Tet-Repressor (tetracycline reverse transactivator, M2rtTA). In den so geschaffenen Zellen konnte durch den M2rtTA der Tet-Operator angesteuert werden und die Expression des *eGFP* Gens reguliert werden [26]. Die Autoren zeigten damit die Möglichkeit der erfolgreichen separaten Nutzung der einzelnen *AAVS1* Loci und der Interaktion zwischen den beiden Inserts.

In dieser Arbeit werden ZFNs genutzt um gezielt einen DSB im *AAVS1* Locus zu erzeugen, an der Stelle des DSB eine Integrationsplattform einzusetzen und dadurch den *AAVS1* Locus gezielt zu modifizieren. Die verwendeten ZFNs entstammen dem CompoZr<sup>®</sup>-Integration Kit (Sigma). Sie erkennen folgende spezifische Sequenz von je 12 bp im *AAVS1* Locus:

5'- ACCCCACAAGTGGggccacTAGGGACAGGAT - 3'

Großbuchstaben zeigen die ZFN-Bindungsstellen, Kleinbuchstaben zeigen die ZFN-Schnittstelle, über welcher die *FokI*-Domänen dimerisieren und den DSB erzeugen.

Die ZFNs binden in einem Abstand von 6 bp zueinander im *AAVS1* Locus zwischen dem ersten und zweiten Exon. Der so im *AAVS1* Locus gezielt erzeugte DSB kann für das Einfügen eines gewünschten Inserts via HR genutzt werden (siehe Abb. 1B).

## 1.6 Das FlpIn<sup>TM</sup>-System

Wie bereits in zahlreichen Arbeiten demonstriert wurde [26, 38, 44], lässt sich ein zu untersuchendes GOI mittels HR in den *AAVS1* Locus integrieren. Jedoch ist dieses Verfahren langfristig bei der großen Anzahl der GOI wenig praktikabel. Deshalb wurde in dieser Studie ein neuer Ansatz entwickelt. Hierbei sollen Zelllinien mit Integrationsplattform im *AAVS1* Locus entwickelt werden. Über diese Integrationsplattform soll jedes beliebige GOI in den *AAVS1* Locus integrierbar sein. Bei der Auswahl des Integrationssystems fiel die Entscheidung auf das FlpIn<sup>TM</sup>-System.

Das FlpIn<sup>TM</sup>-System basiert auf dem zirkulären 2 $\mu$  Plasmid der Bierhefe *Saccharomy-*



*ces cerevisiae*. Das Plasmid hat einer Größe von 6.3 kbp [45]. Es kodiert das Enzym Flp-Rekombinase und enthält zwei Regionen von jeweils 599 bp Länge. Innerhalb dieser Regionen liegen kurze spezifische Sequenzen, welche als flp recombination target sites (FRT-Sites) bezeichnet werden [46]. Die Flp-Rekombinase enthält ein katalytisches Zentrum für DNA-Strangaustausch. Sie bindet an die beiden 599 bp-Regionen und erzeugt einen DNA-Bruch [47]. Sie konserviert die hohe Energie des DNA-Rückrads (backbone) und vermittelt eine Rekombination zwischen den beiden FRT-Sites ohne auf hochenergetische Kofaktoren zurückgreifen zu müssen.

Die Flp-Rekombinase benötigt außer den FRT-Sites keine weitere Information für das Auffinden der Rekombinationsstelle [47]. Die Rekombination führt zu einer Inversion innerhalb des  $2\mu$  Plasmids [46]. Das  $2\mu$  Plasmid nutzt diesen Mechanismus, um sich innerhalb von einer DNA-Replikation der Hefezelle bis zu 100 Mal zu replizieren. Die Flp-vermittelte Rekombination erfolgt ortsspezifisch (site-specific), d.h. sie beschränkt sich jeweils auf eine kurze spezifische Sequenz [48], die FRT-Site. Es wurde gezeigt, dass die Flp-Rekombinase auch eine Rekombination zwischen zwei FRT-Sites vermitteln kann, wenn diese unmittelbar nebeneinander oder auf zwei separaten DNA-Molekülen gelegen sind [46].

Das FlpIn<sup>TM</sup>-System ist kommerziell verfügbar (Invitrogen). Es bietet spezifisch hergestellte pcDNA5-FRT-Expressionsvektoren, welche die FRT-Site und ein Hygromycin-Resistenzgen enthalten. Der pcDNA5-FRT-Expressionsvektor lässt sich manipulieren. So kann ein zu untersuchendes GOI in den Vektor integriert werden. Ein derartig veränderter GOI-Expressionsvektor kann in solche Zellen eingebracht werden, die selbst eine FRT-Site in ihrem Genom tragen (FlpIn<sup>TM</sup>-Zellen). Für die nötige Flp-Rekombinase kodiert das Plasmid pOG44. Als Produkt erhält man eine Zelllinie, welche das GOI unter der Kontrolle eines *CMV* Promoters exprimiert und resistent für das Antibiotikum Hygromycin ist (siehe Abb. 2) [49].

Das FlpIn<sup>TM</sup>-System bietet den Vorteil der kommerziellen Zugänglichkeit und Etabliertheit. Das vertriebene Kit wird ständig überprüft, modifiziert und funktioniert nachweislich. Notwendige Protokolle sind ausgearbeitet und DNA- und Antibiotikakonzentrationen für die Selektion von Klonen mit korrekter Integration des pcDNA5-FRT-Expressionsvektors ermittelt. Dies vereinfacht die Anwendung der Methode deutlich. Darüber hinaus ist das Einbringen des GOI vom pcDNA5-FRT-Expressionsvektor in die FlpIn<sup>TM</sup>-Zelle schnell, effizient und garantiert die Expression des GOI, sobald dieses erfolgreich im Genom integriert ist. Auf die Anwesenheit großer homologer Sequenzen kann verzichtet werden. Deswegen sind Plasmide mit FRT-Site und GOI (pFRT-GOI-Plasmide) kleiner, dringen leichter ins Zellinnere ein und ermöglichen ein einfacheres Einbringen eines GOI in die Zell-DNA als bei HR. Aus einer FlpIn<sup>TM</sup>-Zelllinie lässt sich für jedes passende pFRT-GOI-Plasmid eine isogene stabile GOI-Zelllinie generieren. Dies macht die Anzahl an verschiedenen GOI-Zelllinien unbegrenzt.

Ein Nachteil des FlpIn<sup>TM</sup>-Systems ist die limitierte Anzahl an vertriebenen Zelllinien.

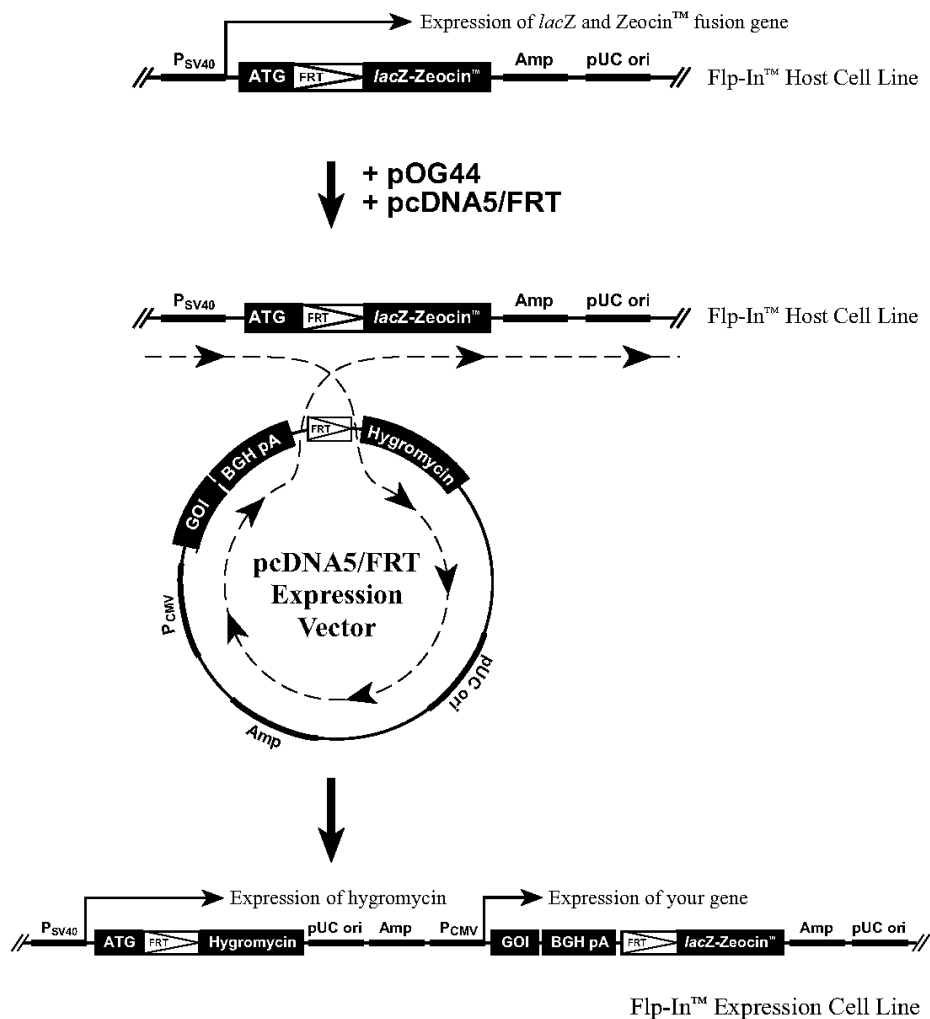


Abbildung 2: FlpIn<sup>TM</sup>-Mechanismus: Eine FlpIn<sup>TM</sup>-Zelllinie trägt eine exprimierte FRT-Site. Die Zelllinie wird mit den Vektoren pOG44 und dem GOI kodierenden FRT-Expressionsvektor (hier als pcDNA5-FRT bezeichnet) versetzt. Dabei erfolgt über die FRT-Site eine Integration des GOI und des Hygromycin-Resistenzgens in das Genom der FlpIn<sup>TM</sup>-Zelle. Dadurch entsteht eine Zelle mit einem SV40 Promoter getriebenem Hygromycin-Resistenzgen und einem CMV Promoter getriebenem GOI (Quelle: FlpIn<sup>TM</sup>-System Manual, Invitrogen).

Zum aktuellen Zeitpunkt ist sie auf sechs limitiert und enthält nur zwei humane Zelllinien (FlpIn<sup>TM</sup>-293 und FlpIn<sup>TM</sup>-Jurkat). Dies macht die angemessene Untersuchung von gewebespezifischen Faktoren im gewebeähnlichen Modell unmöglich (z.B. die Untersuchung des leberspezifischen Regulationsmechanismus der *SORT1*-Genexpression [05]). Darüber hinaus ist die FRT-Site in den angebotenen FlpIn<sup>TM</sup>-Zellen an einer unbekannt Position im Genom integriert. Die Position ist mit großer Wahrscheinlichkeit für jeden Zelltyp unterschiedlich. Dies macht die verfügbaren FlpIn<sup>TM</sup>-Zelllinien untereinander nicht vergleichbar.

Die hier vorgestellte neuartige Strategie das FlpIn<sup>TM</sup>-System in Kombination mit dem *AAVS1* Locus zu nutzen, soll ein neues Spektrum an Zelllinien für eine mögliche wissenschaftliche und medizinische Anwendung schaffen. Wird der FRT-Vektor allein appliziert, so integriert er sich unspezifisch in das Genom der Zelle. Daher wird in der vorliegenden Arbeit eine FRT-Site mittels HR in den *AAVS1* Locus integriert. Dies wird unter Verwendung von

ZFNs durchgeführt. Dadurch entsteht eine Zelllinie mit einer einzigen FRT-Site an bekannter Stelle. Mehrere derartig modifizierten Zelllinien sind untereinander gut vergleichbar, da sie keine unspezifisch integrierten FRT-Sites aufweisen. Außerdem steht ein über die FRT-Site in den *AAVS1* Locus eingefügtes GOI in allen Zelllinien unter der Kontrolle des gleichen *CMV* Promoters. Dadurch wird das GOI in allen Zellen gleich exprimiert.

## 1.7 Das Tet-Repressor-System

Die Untersuchung der Funktionen eines GOI in einer humanen Zelle wäre durch die genaue Regulation des GOI bedeutsam verbessert. Dabei sollte diese Regulation neben der “an-/aus”-Möglichkeit auch eine Dosierung der Expression zulassen. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Steuerung der GOI-Expression das etablierte System des Tet-Repressors (TetR) in Form des tetracycline reverse transactivator (M2rtTA) gewählt. Der Mechanismus des tetracycline reverse transactivator (M2rtTA) ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

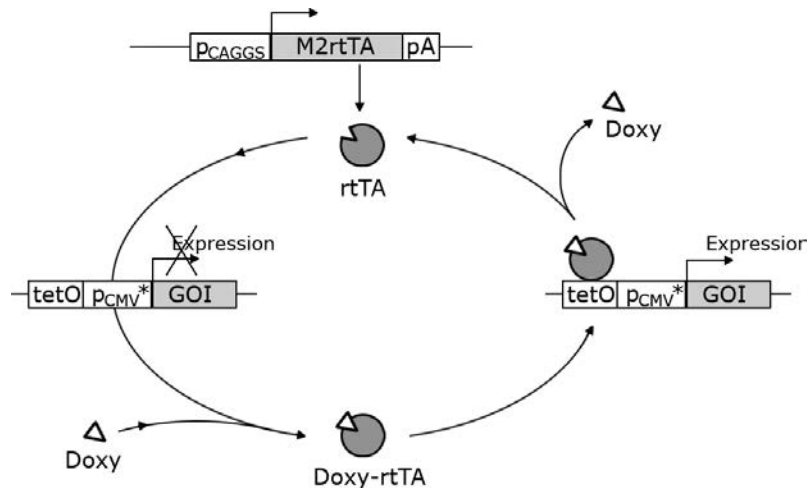


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des Tet-Repressor-Systems (Tet-On-System): Das modifizierte TetR-Protein rtTA wird über den tetracycline reverse transactivator (M2rtTA) exprimiert. M2rtTA steht unter der Kontrolle des *CAGGS* Promoters ( $P_{CAGGS}$ ). Die Zielzelle enthält ein GOI mit vorgeschaltetem Tet-Operator (*tetO*) und modifiziertem *CMV* Promoter ( $P_{CMV}^*$ ).  $P_{CMV}^*$  erlaubt ohne Aktivierung des *tetO* keine Expression des GOI. In Abwesenheit von Doxyzyklin (Doxy) bindet rtTA nicht an den *tetO* und das GOI in der Zielzelle wird nicht exprimiert. In Anwesenheit von Doxyzyklin bindet dieses an rtTA und der so entstehende Komplex bindet spezifisch an den *tetO*. Die Expression des GOI wird ermöglicht. Durch Entfernen von Doxyzyklin kann die Expression erneut herunterreguliert werden.

Das TetR-Expressionssystem wurde erstmals 1992 von Gossen und Bujard beschrieben [50]. In *E. coli* vermittelt der TetR den wichtigsten bakteriellen Resistenzmechanismus gegen Tetrazyklin-Antibiotika (z.B. Doxyzyklin) [51]. Durch eine spezifische Interaktion zwischen dem vom Bakterium exprimierten TetR-Protein und einer Tet-Operator-Sequenz (*tetO*), an die es bindet, wird die Aktivität eines dem *tetO* nachgeschalteten Promoters beeinflusst [50]. Über den Promoter werden Resistenzgene reguliert. Dabei ist für die Interaktion zwischen TetR und *tetO* das Vorliegen von Tetrazyklin entscheidend. In Abwesenheit von Tetrazyklin ist TetR an den *tetO* gebunden und die nachgeschalteten Resistenzgene werden nicht expri-

miert. In Anwesenheit von Tetrazyklin bindet dieses an den TetR. Dieser dissoziiert von der DNA und erlaubt damit die Expression der Resistenzgene [51]. Das *E. coli* Bakterium ist in diesem Fall resistent gegen Tetrazyklin.

Die Interaktion zwischen TetR-Protein, *tetO* und Tetrazyklin stellt die Grundlage für das in der Forschung genutzte TetR-Expressionssystem. Man unterscheidet zwischen Tet-Off- und Tet-On-System. Beim Tet-Off wird die Genexpression abgeschaltet, wenn das Antibiotikum Doxyzyklin in das Zellkulturmedium gegeben wird. Beim Tet-On wird die Genexpression bei Zugabe von Doxyzyklin hochreguliert [52]. Somit lässt sich die Genexpression mittels Doxyzyklin-Konzentration im Zellkulturmedium präzise beeinflussen [52].

Ein entscheidender Bestandteil des TetR-Systems ist das regulierende Protein. Für die Adaptation des TetR-Systems für eukaryote Zellen wurde das ursprüngliche TetR-Protein modifiziert. Im Tet-Off-System wurde das *TetR* Gen mit der C-terminalen Aktivator-domäne des Virionproteins 16 (VP16) des *Herpes simplex* Virus fusioniert. Es entsteht ein Aktivatorprotein, welches die DNA-Bindungseigenschaft des TetR und die Promoter-Aktivierungseigenschaft des VP16 besitzt [50]. Dieses veränderte Protein wird als tetracycline-controlled transactivator (tTA) bezeichnet [50]. Im Tet-On-System ist das regulatorische Protein tTA in vier Aminosäuren verändert, sodass ein reverse tTA (rtTA) entsteht [52]. Beide Systeme werden auf Plasmiden kodiert, welche ein Neomycin-Resistenzgen tragen [52]. Mit diesen Plasmiden transfizierte Zellen können deshalb mit Neomycin oder Geneticin (G418) selektioniert werden.

Das M2rtTA ist eine weiter modifizierte Variante des Tet-On-Systems (Tet-On Advanced). Sie wurde 2000 von Urlinger et al. beschrieben. M2rtTA ist durch seine verminderte basale Expression und erhöhte Doxyzyklin-Empfindlichkeit charakterisiert [53]. Dies bedeutet, dass er schon bei zehnfach verminderter Doxyzyklin-Konzentration funktioniert. Schließlich ist seine Expression in eukaryoten Zellen stabiler als die vorangegangener Tet-On-Systeme [53].

Ein weiterer Bestandteil des TetR-Systems ist die Zielsequenz für das TetR-Protein. Die Expression eines GOI wird über Doxyzyklin gesteuert, wenn dem GOI ein *tetO* und ein spezieller *CMV* Promoter vorgeschaltet sind (siehe Abb. 3). Der *CMV* Promoter ist modifiziert und verhindert im Tet-On-System ohne Bindung des regulatorischen Proteins an *tetO* die Expression des GOI. Dies ist besonders wichtig für GOI, die Proteine mit extrem hoher Toxizität oder Potenz in der Zelle kodieren und deren Expression zellverändernd sein kann.

Das TetR-System wurde bereits mehrfach erfolgreich zur Expressionsregulation angewendet. So zeigten Hockemeyer et al. 2009 die erfolgreiche Integration des M2rtTA in das Genom einer Zelle. Dabei bedienten sie sich lentiviraler M2rtTA-Vektoren und eines *tetO* regulierbaren *eGFP* Gens [44]. Die so veränderten Zellen wurden mit Doxyzyklin versetzt und auf *eGFP* Expression untersucht. Hockemeyer et al. zeigten das dosisabhängige Verhältnis zwischen *eGFP* Expression und Doxyzyklin [44]. DeKolver et al. demonstrierten 2010 die separate Nutzung beider *AAVS1* Loci der Zelle. Sie integrierten den M2rtTA in Form eines

Plasmids in einen der beiden *AAVS1* Loci und zeigten die doxzyklin-abhängige Induzierbarkeit eines *eGFP* Gens in dem zweiten *AAVS1* Locus [26].

In der vorliegenden Arbeit wird M2rtTA als Grundlage für die Erschaffung eines induzierbaren Expressionssystems genutzt. Gemäß des in Abbildung 3 dargestellten Mechanismus sollen die generierten FRT-Zelllinien dauerhaft steuerbar sein. Hierfür wird M2rtTA in Form eines Plasmids verwendet und über HR stabil in die DNA der Zielzelle integriert.

## 1.8 Plasmide

Um die für das FlpIn<sup>TM</sup>-System benötigte FRT-Site und das Tet-Repressor-System in den *AAVS1* Locus einzubringen, bedienen wir uns verschiedener Plasmide als Vektoren.

Plasmide sind extrachromosomal vorliegende, ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle. In ihrer Größe können sie von wenigen Kilobasenpaaren bis zu mehreren hundert differieren. Sie replizieren sich selbstständig in der Wirtszelle, sind dabei jedoch vollkommen von dieser abhängig [54]. Hierbei nutzt das Plasmid für seine Replikation das intrazelluläre Milieu und die zelleigenen Enzyme [55].

In der molekularbiologischen Forschung dienen Plasmide als weit verbreitetes Vehikel zur Einbringung von Fremd-DNA in Zellen. Sie können leicht in Bakterien vervielfältigt und aus diesen extrahiert werden, sie sind stabil und lange haltbar. Die Plasmid-DNA lässt sich mit Hilfe von Restriktionsenzymen präzise schneiden und verschiedene DNA-Inserts können mit dem Enzym Ligase eingefügt werden. Auf diese Weise können spezifische Vektoren geschaffen werden.

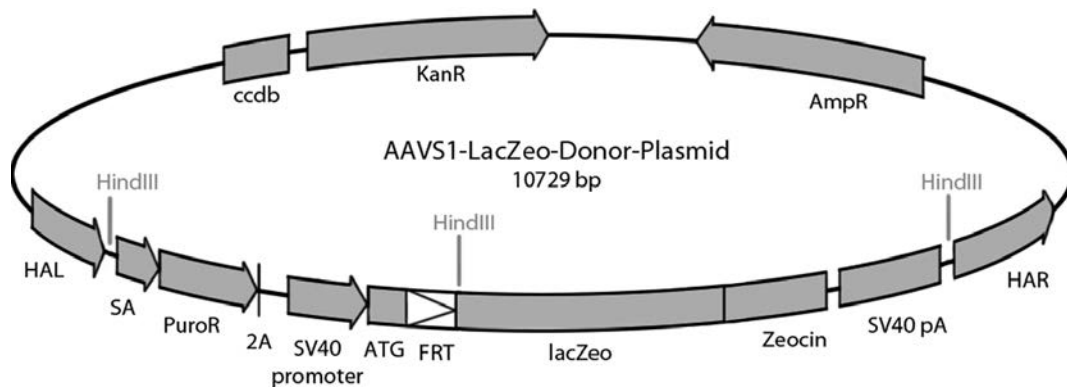


Abbildung 4: AAVS1-LacZeo2-Plasmid mit Schnittstellen des Restriktionsenzym HindIII; HAR/ HAL = zum *AAVS1* Locus homologe Arme

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Vektoren verwendet: das AAVS1-LacZeo2-Donor-Plasmid und das AAVS1-M2rtTA-Plasmid. Das AAVS1-LacZeo2-Plasmid (Abb. 4) enthält die FRT-Site des FlpIn<sup>TM</sup>-Systems. Der FRT-Site ist ein ATG-Initialkodon und ein verkürzter *SV40* early-Promoter vorgeschaltet. Dies sorgt für die Expression des Fusionsgens *LacZeo-Zeocin*. *LacZeo* kann genutzt werden, um Klone mit integrierter FRT-Site mit dem Antibiotikum *Zeocin* zu selektionieren. Außerdem enthält das AAVS1-LacZeo2-Plasmid ein

Puromycin-Resistenzgen (*PuroR*). Dieses ermöglicht die Selektion von Klonen mit korrekter Integration des FRT-LacZeo2-Inserts in den *AAVS1* Locus. Dabei ist dem *PuroR* kein Promoter vorgeschaltet, lediglich eine Splice Acceptor Site (SA-Site) sowie ein Polyadenylierungssignal (pA) nachgeschaltet (Abb. 4). Nach korrekter Integration des Inserts in den *AAVS1* Locus verbindet die SA-Site im Rahmen der Proteinexpression das Exon 1 des *AAVS1* Locus mit dem Insert. Dem Exon 1 ist der *PPP1R12C* Promoter vorgeschaltet. So wird die Expression des Puromycin-Resistenzgens über den *PPP1R12C* Promoter ermöglicht und mit dem pA beendet. Dieser Mechanismus dient der Verhinderung von Insert-Integrationen außerhalb des *AAVS1* Locus.

Zwei das Insert umrahmende homologe Arme (HAR und HAL) haben die Größe von jeweils 800 bp. Sie sind homolog zu den Sequenzen im *AAVS1* Locus, welche den durch ZFNs erzeugten DSB umgeben. Dadurch erlauben diese homologen Arme die HR des Inserts in den *AAVS1* Locus. Schließlich dient das *ccdB* Gen der Vervielfältigung des Plasmids in speziellen *E. coli* Bakterien, den *ccdB* survival cells.

Das im Plasmid enthaltene Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*) wird bei der Vervielfältigung der Plasmide in Bakterien genutzt. Das Plasmid wird in Bakterien eingeschleust und diese in einem Ampicillin-haltigen Medium vervielfältigt. Dabei wachsen nur die Bakterien, welche das Plasmid ins Zellinnere aufgenommen haben. Dadurch wird die Ausbeute bei der Vervielfältigung der Plasmide erhöht.

Das *AAVS1*-M2rtTA-Plasmid enthält den tetracycline reverse transactivator (M2rtTA) unter der Kontrolle des dauerhaft aktiven *CAGGS* Promoters. Zwei homologe Arme (HAR und HAL) ermöglichen die HR des Inserts in den *AAVS1* Locus. Außerdem enthält das Plasmid ein Neomycin-Resistenzgen (*NeoR*), welchem ebenso wie dem *PuroR* des *AAVS1*-LacZeo2-Donor-Plasmids kein eigenständiger Promoter, sondern eine SA-Site vorgeschaltet ist. Zudem ist dem *NeoR* ebenfalls ein pA nachgeschaltet. Das *NeoR* dient der Selektion der Zellen mit korrekter Integration des M2rtTA-Inserts mit Neomycin oder Geneticin (G418). Ist das M2rtTA-Insert korrekt im *AAVS1* Locus integriert, so steht das *NeoR* Gen unter der Kontrolle des *PPP1R12C* Promoters und die Aminoglykosid- 3'-Phosphotransferase wird exprimiert. Diese inaktiviert im Zellkulturmedium enthaltenes Neomycin oder Geneticin (G418) und ermöglicht ein Überleben der Klone mit korrekt integriertem M2rtTA-Insert. Ein Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*) dient der Erhöhung der Plasmid-Ausbeute bei der Plasmid-Vervielfältigung in Bakterien.

<b>Selektionsmedien für Zellkultur</b>		
Plasmid	Resistenzgen	Antibiotikum
<i>AAVS1</i> -LacZeo2	<i>PuroR</i>	Puromycin
<i>AAVS1</i> -M2rtTA	<i>NeoR</i>	Geneticin (G418)
FRT-GOI	<i>HygroR</i>	Hygromycin

Tabelle 1: Plasmid mit jeweiligem Resistenzgen und Selektionsantibiotikum

Somit findet durch die Integration von zwei unterschiedlichen Plasmiden in eine Zielzelle eine Kotransfektion statt. Der Mechanismus ist in Abbildung 5 dargestellt. Das AAVS1-LacZeo2-Plasmid dient als Vehikel für die Integration der FRT-Site in einen *AAVS1* Locus. Das AAVS1-M2rtTA-Plasmid dient der Integration des Tet-Repressor-Systems in den zweiten *AAVS1* Locus und ermöglicht die Regulation eines über die FRT-Site eingebrachten GOI. Beide Plasmide werden über HR mit Hilfe von ZFNs in den jeweiligen *AAVS1* Locus integriert. Die jeweiligen Resistenzgene *PuroR* und *NeoR* stehen jeweils unter der Kontrolle des *PPP1R12C* Promoters, welcher dem Exon 1 des *AAVS1* Locus vorgeschaltet ist.

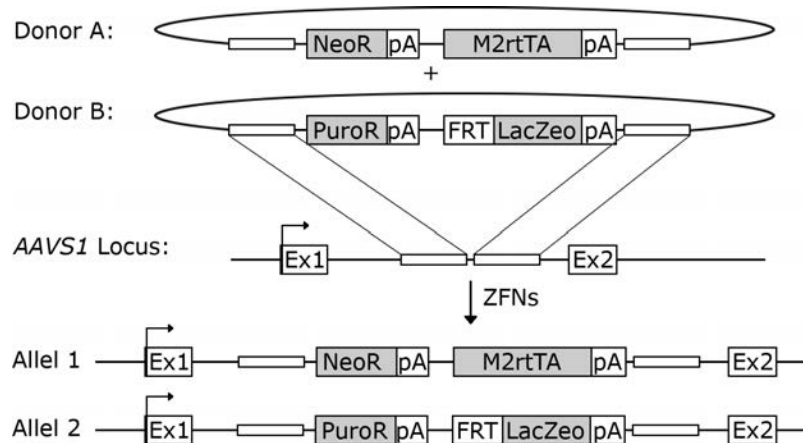


Abbildung 5: Mechanismus der Kotransfektion: Zwei verschiedene Donor-Plasmide werden via HR in jeweils einen *AAVS1* Locus integriert. Die Integration findet zwischen Exon 1 und Exon 2 statt. Nach Integration steht auf Allel 1 das *NeoR* Gen unter der Kontrolle des *PPP1R12C* Promoters und das *M2rtTA* Gen unter der Kontrolle des *CAGGS* Promoters. Auf Allel 2 steht das *PuroR* Gen unter der Kontrolle des *PPP1R12C* Promoters und das FRT-LacZeo2-Insert unter der Kontrolle des *SV40* Promoters.

Durch spezifische Veränderung des *AAVS1* Locus mittels HR unter Zuhilfenahme von ZFNs und durch die Kombination der FRT-Site als Integrationsplattform und des Tet-Repressor-Systems zur Expressionskontrolle wird ein komplexes System für die spezifische dauerhafte Manipulation humaner Zelllinien geschaffen. Dieses System soll eine bessere kontextspezifische Untersuchung von Kandidatengenen ermöglichen.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Zum aktuellen Zeitpunkt stehen der Wissenschaft zahlreiche Mechanismen zur Verfügung, mit denen sich das Genom einer Zelle gezielt manipulieren lässt. Allerdings gibt es keine einheitliche Methode, mit welcher sich ein GOI unkompliziert und sicher ins Zellgenom integrierten lässt. Außerdem gibt es bisher kein Verfahren, mit dem mehrere derartiger Zellen untereinander vergleichbar gemacht werden können.

In der vorliegenden Arbeit soll eine Methode etabliert werden, mit der gut untereinander vergleichbare Zelllinien als Tool für die Erforschung intrazellulärer Abläufe und Strukturen erzeugt werden können. Es wird eine Auswahl an Zelllinien geschaffen, von denen alle eine Integrationsplattform stabil in ihrem Genom integriert haben. Als Integrationsplattform soll die FRT-Site des kommerziell gut zugänglichen FlpIn<sup>TM</sup>-Systems (Invitrogen) und als Integrationsstelle der FRT-Site der "safe harbor" *AAVS1* Locus auf Chromosom 19 dienen. Dieser soll durch sequenzspezifische, künstlich hergestellte ZFNs erkannt und aufgeschnitten werden. Die FRT-Site wird im Anschluss in Form eines komplexen Plasmids über den Mechanismus der homologen Rekombination (HR) in den *AAVS1* Locus integriert. Dabei soll die Integration nur auf einem Allel des Chromosoms 19 stattfinden, d.h. die FRT-Site soll genau einmal in das Genom der Zelle integriert werden.

Für die spätere Regulation eines über die FRT-Site integrierten GOI wird auf dem zweiten Allel ein Tet-Repressor in Form eines tetracycline reversed transactivator (M2rtTA) eingefügt. Dieser wird einmalig in den durch die ZFNs aufgeschnittenen Bereich des *AAVS1* Locus integriert und ist über die Konzentration an Tetrazyklin im Nährmedium der Zelle hoch- und herunterregulierbar.

Die auf diese Weise erzeugten Zellen haben eine FRT-Site und einen Tet-Repressor. Mit dem FlpIn<sup>TM</sup>-Kit (Invitrogen) lassen sich spezielle GOI-FRT-Expressionvektoren herstellen. Über die FRT-Site lassen sich mittels dieser Expressionsvektoren und unter Zuhilfenahme des FlpIn<sup>TM</sup>-Kits gewünschte GOI gut in das Genom der Zielzelle integrieren. Deren Expression lässt sich durch Zugabe von Tetrazyklinen über den Tet-Repressor steuern.

Diese Methode birgt gegenüber vorangegangenen Arbeiten den entscheidenden Vorteil, dass über die FRT-Plattform jedes beliebige GOI in die Zelle integriert werden kann. Außerdem sind die einzelnen Zelllinien untereinander vergleichbar, da in allen die FRT-Site und damit auch das über die FRT-Site integrierte GOI ausschließlich und einmalig im *AAVS1* Locus enthalten ist. Dies stellt eine deutliche Verbesserung gegenüber den bisherigen Integrationsmethoden eines GOI in den *AAVS1* Locus dar, da diese sich keiner Integrationsplattform bedienen. Somit könnte diese neue Methode zukünftige Untersuchungen kardiovaskulärer Fragestellungen vereinfachen und verbessern sowie für die Etablierung neuer therapeutischer Methoden von großem Nutzen sein.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Plasmide

Zur Vervielfältigung der Vektoren wurden folgende *E. coli* Stämme verwendet: cddb survival cells und One Shot<sup>®</sup> Top10 Zellen.

Transformation eines Plasmids in *E. coli*:

1. Auftau der Bakterien auf Eis
2. 2  $\mu$ l Plasmidlösung hinzu, 30 Min Inkubation auf Eis
3. Zellen 30 s bei 42°C im Wasserbad schocken
4. Zellen 2 Min auf Eis kühlen
5. 250  $\mu$ l LB-Medium hinzu, 1 h bei 37°C horizontal schütteln
6. Ausplattieren der transformierten Zellen auf vorgewärmten Agarplatten (100  $\mu$ g/ml Ampicillin bzw. 50  $\mu$ g/ml Kanamycin)
7. Inkubation über Nacht bei 37°C

Am Folgetag wurden Klone gepickt, davon gemäß Qiagen-Protokoll ein Mini- und letztlich ein Maxiprep-Ansatz mit Antibiotika (Ampicillin/Kanamycin) hergestellt und die Plasmide hieraus mittels QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) protokollgemäß extrahiert. Die Konzentration der extrahierten DNA wurde via Nanodrop<sup>™</sup> ND-1000 Spectrophotometer gemessen.

Für den Glycerol-Stock eines Plasmids wurden 750  $\mu$ l Plasmid-Übernachtskultur mit 250  $\mu$ l 100 %igen Glycerols vermischt und bei -80°C kryokonserviert.

LB-Medium (pH 7,0): 10 g Bacto<sup>™</sup> Tryptone  
5 g Bacto<sup>™</sup> Yeast Extract  
10 g NaCl  
mit tridestilliertem H<sub>2</sub>O auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren

LB-Platten: 1 Liter LB-Medium  
15 g Bacto<sup>™</sup> Agar  
Antibiotikum (Ampicillin bzw. Kanamycin)

#### 3.1.1 Herstellung des AAVS1-LacZeo2-Plasmids

Für die Herstellung des AAVS1-LacZeo2-Donor-Plasmids wurden das AAVS1-SA-2A-puro-pA-Donor-Plasmid (Rudolf Jaenisch) und das pFRT-LacZeo2-Plasmid (Invitrogen) verwendet.

Das AAVS1-SA-2A-puro-pA-Plasmid wurde über zwei Stunden bei 37°C mit dem Restriktionsenzym SalI, das pFRT-LacZeo2-Plasmid mit den Restriktionsenzymen SalI und XhoI (beide 20000 U/ml, New England Biolabs) verdaut (je 2 U Restriktionsenzym auf 100 ng

Plasmid). Beide zerschnittenen Plasmide wurden mittels Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP; New England BioLabs, USA) dephosphoryliert: Pro 20  $\mu\text{l}$  Enzymverdau wurde 1  $\mu\text{l}$  CIP hinzugegeben und die Lösung 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

<b>AAVS1-SA-2A-puro-pA SalI</b>		<b>pFRT-LacZeo2-Plasmid SalI und XhoI</b>	
DNA	600 ng	DNA	600 ng
SalI	0,6 $\mu\text{l}$	SalI	0,6 $\mu\text{l}$
		XhoI	0,6 $\mu\text{l}$
Buffer 3	2,0 $\mu\text{l}$	Buffer 3	2,0 $\mu\text{l}$
BSA	0,2 $\mu\text{l}$	BSA	0,2 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O		H <sub>2</sub> O	
<b>Total</b>	<b>20,0 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>Total</b>	<b>20,0 <math>\mu\text{l}</math></b>

Tabelle 2: Verdauprotokoll des AAVS1-SA-2A-Plasmids mit SalI und des pFRT-LacZeo-Plasmids mit XhoI und SalI

Anschließend wurden beide Plasmide über ein 2 %iges Agarose-Gel bei 120 V über 2,5 Stunden der Größe nach aufgetrennt. Die 6602 bp Bande des AAVS1-SA-2A-Plasmids und die 4120 bp Bande des FRT-LacZeo2-Inserts wurden unter UV-Belichtung aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA mittels NucleoSpin<sup>®</sup> Kit aus dem Gel extrahiert. Die Konzentration des Extraktionproduktes wurde durch dessen Auftrennen auf einem 2 %igen Agarose-Gel bei 120 V mit SmartLadder (Eurogentec) als Maßstab bestimmt.

Agarose-Gel (2 %): 3 g Biozym LE Agarose  
150 ml 1 x TAE Puffer  
3  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid (10 mg/ml)

20 x TAE-Puffer: 96,8 g Tris Base (Tris-Hydroxyethyl-Aminomethan)  
22,8 ml Eisessigsäure (17,4 M)  
7,4 g Dinatrium-EDTA  
mit tridestilliertem H<sub>2</sub>O auf 1 Liter Lösung auffüllen

Das lineare AAVS1-SA-2A-puro-pA-Plasmid und das FRT-LacZeo2-Insert wurden im Verhältnis 1 : 3 vermengt und unter Zugabe von Rapid Ligation Buffer und T4 DNA Ligase (beide New England Biolabs) bei 22°C fünf Minuten inkubiert. Das Ligationsprodukt wurde protokollgemäß in ccdB survival cells transformiert und darin vervielfältigt.

Zur Überprüfung, ob das FRT-LacZeo2-Insert korrekt in das AAVS1-SA-2A-puro-pA-Donor-Plasmid integriert wurde, wurden je 100 ng mittels Miniprep Kit gewonnenem Plasmid mit 2 U des Restriktionsenzym HindIII (20000 U/ml, New England Biolabs) bei 37°C über zwei Stunden verdaut. Der Verdau wurde auf einem 2 %igen Agarose-Gel bei 120 V über eine Stunde der Größe nach aufgetrennt.

<b>AAVS1-LacZeo2-Plasmid HindIII</b>	
DNA	100 ng
HindIII	0,1 $\mu$ l
Buffer 2	2,0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	
<b>Total</b>	<b>20,0 <math>\mu</math>l</b>

Tabelle 3: Verdauprotokoll des AAVS1-LacZeo2-Plasmids mit HindIII

Anschließend wurden die laut HindIII-Verdau korrekt integrierten Plasmide unter Kontrolle durch den pGEM<sup>®</sup> 3Zf(+)-Vektor (Applied Biosystems) protokollgemäß sequenziert.

### 3.1.2 Herstellung der ZFN-Plasmide

Die erforderlichen ZFN-Plasmide lagen als TOPO<sup>®</sup> Vektoren vor. Die Korrektheit der Sequenzen war zuvor mittels PCR und Sequenzierung überprüft worden. Die ZFN-Inserts wurden in jeweils einen Expressionsvektor pcDNA<sup>™</sup> 3.1(-) kloniert.

Der pcDNA<sup>™</sup> 3.1(-) Expressionsvektor und die ZFN-TOPO<sup>®</sup> Vektoren wurden über zwei Stunden bei 37°C mit dem Restriktionsenzym EcoRI (20000 U/ml, New England Biolabs) verdaut (je 2 U Restriktionsenzym auf 100 ng Plasmid). Die zerschnittenen Plasmide wurden mittels Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP; New England BioLabs, USA) dephosphoryliert: Pro 20  $\mu$ l Enzymverdau wurde 1  $\mu$ l CIP hinzugegeben und die Lösung 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

<b>pcDNA<sup>™</sup> 3.1(-)/ ZFN-TOPO<sup>®</sup> EcoRI</b>	
DNA	700 ng
EcoRI	1,5 $\mu$ l
Buffer 3	2,0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	
<b>Total</b>	<b>20,0 <math>\mu</math>l</b>

Tabelle 4: Verdauprotokoll des pcDNA<sup>™</sup> 3.1(-) und der ZFN-TOPO<sup>®</sup> Vektoren mit EcoRI

Ein linearer pcDNA<sup>™</sup> 3.1(-) Expressionsvektor wurde mit je einem linearen ZFN-Insert vermischt und unter Zugabe von Rapid Ligation Buffer und T4 DNA Ligase (beide New England Biolabs) bei 25°C über 22 Minuten inkubiert. Das Ligationsprodukt wurde protokollgemäß in Top10 Zellen transformiert und darin vervielfältigt.

Zur Überprüfung der hergestellten ZFN-pcDNA<sup>™</sup> 3.1(-) Plasmide wurde zunächst ein Verdau mit dem Restriktionsenzym KpnI durchgeführt. Die Plasmide wurden über 1,5 Stunden bei 37°C mit dem Restriktionsenzym KpnI (10000 U/ml, New England Biolabs) verdaut (je 2 U Restriktionsenzym auf 100 ng Plasmid) und anschließend über ein 2 %iges Agarose-Gel bei 120 V über 1 Stunde der Größe nach aufgetrennt.

<b>ZFN-Plasmide KpnI</b>	
DNA	500 ng
KpnI	1,0 $\mu$ l
Buffer 1	2,0 $\mu$ l
BSA	0,2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	
<b>Total</b>	20,0 $\mu$ l

Tabelle 5: Verdau der ZFN-pcDNA<sup>TM</sup> 3.1(-) Plasmide mit KpnI

Die Klone mit dem laut Restriktionsverdau korrekt integriertem ZFN-Insert wurden unter Verwendung des T7-Promoter- und des BGH-Reverse-Primer protokollgemäß (Invitrogen) sequenziert und anschließend mit einem Western Blot überprüft. Die korrekten ZFN-Plasmide wurden für ihre Verwendung bei Transfektionen entsprechend vervielfältigt und zur langfristigen Aufbewahrung als Glycerol-Stock kryokonserviert.

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
T7-Promoter-Primer:	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH-Reverse-Primer:	TAGAAGGCACAGTCGAGGC

### 3.1.3 AAVS1-M2rtTA

Das AAVS1-M2rtTA-Plasmid entstammt der Arbeitsgruppe Rudolf Jaenisch [44]. Das Plasmid enthält den Tet-Repressor in Form eines tetracycline reverse transactivator (M2rtTA), welcher vom *CAGGS* Promoter gesteuert wird. Dieser Promoter ist ein Hybrid aus einem *CMV* Enhancer und einem  $\beta$ -Actin-Promoter und durchgehend aktiv. Außerdem weist das Plasmid zwei zum *AAVS1* Locus homologe Arme (HAR und HAL) auf. Darüber hinaus enthält es ein Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*) zur Selektion von *E. coli*, in denen es vervielfältigt wird, und ein Neomycin-Resistenzgen (*NeoR*). Letzteres erlaubt die Selektion stabil transfizierter Zellen mit Geneticin (G418). Ist der Tet-Repressor integriert, so wird die Neomycin-Resistenz vom *PPP1R12C* Promoter des *AAVS1* Locus gesteuert.

### 3.1.4 pEGFP-N1

Das pEGFP-N1-Plasmid (Clontech) hat eine Größe von 4,7 kbp und kodiert das enhanced green fluorescent protein (EGFP), eine optimierte, stärker exprimierte Variante des Wildtyp-GFP (wt-GFP) mit vorgeschaltetem *CMV* Promoter und MCS. Da die Zellen in der Lage sind dieses Plasmid im Rahmen einer transienten Transfektion aufzunehmen und GFP zu exprimieren, eignet es sich gut als Kontrollvektor für die Überprüfung der Transfektionsrate. Alle transfizierten Zellen wurden 24 und 48 Stunden nach Transfektion unter einem Fluoreszenzmikroskop auf die Expression von GFP untersucht. Mit zunehmender Anzahl

an Zellteilungen werden die einzelnen pEGFP-N1-Plasmide auf die neu entstehenden Zellen verteilt und teilweise von zellinternen Mechanismen abgebaut, sodass die GFP-Expression mit zunehmender Zeit abnimmt bis sie schließlich mit dem menschlichen Auge nicht mehr unter dem Mikroskop erkennbar ist.

### 3.1.5 AAVS1-CAGGS-eGFP

Das AAVS1-CAGGS-eGFP-Plasmid hat eine Größe von 9809 bp und entstammt der Arbeitsgruppe Rudolf Jaenisch [44]. Es enthält ein Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*), ein Puromycin-Resistenzgen (*PuroR*), zwei zum *AAVS1* Locus homologe Arme (HAR und HAL), einen *CAGGS* Promoter und kodiert EGFP. Wird das Plasmid über HR erfolgreich in den *AAVS1* Locus der Zelle integriert, so wird die Puromycinresistenz über den *PPP1R12C* Promoter gesteuert und die Zelle exprimiert stabil GFP, welches unter einem Fluoreszenzmikroskop gut erkennbar ist. Dieses Plasmid dient deshalb als Kontrollvektor für die ZFN-Schnittstelle und den Mechanismus der homologen Rekombination.

### 3.1.6 Plasmide des FlpIn<sup>TM</sup>-Systems

Das pOG44-Plasmid (Invitrogen) hat eine Größe von 5785 bp. Das Plasmid enthält das *FLP*-Gen für die Expression einer temperatursensitiven Flp-Recombinase (flp-F70L) unter der Kontrolle eines *CMV* Promoters, welche eine Rekombination via FRT-Site vermittelt, wenn das Plasmid zirkulär vorliegt. Der Vektor beinhaltet ein synthetisches Intron zur Verstärkung der Expression des *FLP*-Gens und ein Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*) für die Selektion transformierter *E. coli* Bakterien [49]. Das Plasmid wurde für die Transfektion von Zellen mit im Genom enthaltener FRT-Site verwendet. Da es selbst kein Resistenzgen für Antibiotika enthält, geht das Plasmid bei der Selektion der transfizierten Zellen verloren oder wird durch zellinterne Mechanismen abgebaut, weshalb ein mögliches erneutes Herausschneiden des FRT-Konstrukts aus dem Genom der Zelle verhindert wird.

Das pFRT-GFP-Plasmid ist ein Kontrollvektor für den Mechanismus der site-specific integration via FRT-Site. Das Plasmid enthält eine FRT-Site und kodiert das GFP, welches nach Integration in die FlpIn<sup>TM</sup>-Zielzelle unter der Kontrolle eines *CMV* Promoters exprimiert wird. Außerdem enthält es ein Hygromycin-Resistenzgen (*HygroR*), welches nach Integration des Inserts unter der Kontrolle eines *SV40* Promoters steht. Zellen mit korrekt integriertem Insert lassen sich mit Hygromycin selektionieren und leuchten unter dem Fluoreszenzmikroskop grün.

## 3.2 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden auf 10 cm-Zellkulturplatten in 10 ml Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Abhängig von der eingesetzten Zelllinie kamen unterschiedliche

Zellkulturmedien zum Einsatz. Die Teilung der Zellen erfolgte nach einem unterschiedlichen zeitlichen Muster. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht:

Zelllinie	Kulturmedium	Umsetzung	Konservierung
HEK293	DMEM 10 % FCS 2mM L-Glutamine	alle 2 Tage 1 : 6	10 % DMSO
HUVEC	DMEM 10 % FCS	alle 2 Tage 1 : 2	5 % DMSO
HepG2	RPMI 1640 Ready Mix	alle 3 Tage 1 : 4	5 % DMSO

Tabelle 6: Eingesetzte Zellkulturmedien, Kultivierungs- und Kryokonservierungsbedingungen

Alle Zellen wurden mit PBS und Trypsin/EDTA (0.05 % /0.02 %) (beides von Biochrom) gehandhabt. Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte bei geringer Passagezahl in komplettem Kulturmedium mit Zugabe von DMSO.

Kryokonservierung von Zellen (10 cm-Zellkulturplatte):

1. Waschen mit 3-4 ml PBS
2. Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung
3. Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> bis 90 % der Zellen von der Platte gelöst sind
4. Lösen der Zellen in 8-10 ml PBS, Transfer in Falcon-Tube
5. Zentrifugation bei 1000 rpm, 4°C, 10 Min, Entnahme des zellfreien Überstandes
6. Resuspension des Zellpellet in 1 ml Kryolösung (Kulturmedium mit DMSO)
7. Transfer in Kryoröhrchen, Herunterkühlen auf -80°C mittels Nalgene® Mr. Frosty Kryokonservierungsbox, Aufbewahrung bei -80°C

Auftau kryokonservierter Zellen:

1. Vorwärmen von Medium im Wasserbad auf 37°C
2. Auftauen des Kryoröhrchens im Wasserbad bei 37°C
3. Hinzugabe von 12 ml Kulturmedium, Transfer auf eine 10 cm-Zellkulturplatte
4. Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>
5. Mediumwechsel nach 24 h, Zellen teilen bei Konfluenz von 80 %

### 3.2.1 Killing Curve

Für alle Zelllinien wurde eine Killing Curve mit den Antibiotika Puromycin (Invivogen, USA) und Geneticin (G418, Invitrogen (Gibco), Groningen) durchgeführt. Pro Zelllinie wurden jeweils zwei 24-Well-Platten ausgesät, bei Erreichen einer etwa 70 %igen Konfluenz mit antibiotikahaltigem Medium versetzt und über zwei Wochen kultiviert. Dabei wurden die Zellen alle zwei Tage kontrolliert und das Medium spätestens alle drei Tage gewechselt.

Es wurde jeweils die niedrigste Antibiotikumkonzentration ermittelt, welche innerhalb von

drei bis fünf Tagen zu einem massiven Zelltod führt und die innerhalb von zwei Wochen alle Zellen abtötet. Daraus wurde die jeweilige Antibiotikumkonzentration für die Selektion positiver Klone abgeleitet.

### 3.2.2 Transfektion

Für die Transfektion wurden unterschiedliche Konzentrationen an Donor-Plasmid sowie verschiedene Transfektionsbedingungen verwendet. Gleichzeitig wurden sowohl Einfachtransfektionen (nur AAVS1-LacZeo2-Plasmid) als auch Kotransfektionen (AAVS1-LacZeo2- und AAVS1-M2rtTA-Plasmid gemeinsam) durchgeführt. Alle Transfektionen wurden nach Protokollen der Transfektionsmedienhersteller durchgeführt.

Für die Transfektion von HEK293 Zellen wurde wie folgt verfahren:

1. Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 1 : 2 ( $\mu\text{g}$  DNA :  $\mu\text{l}$  Lipofectamine) in 250  $\mu\text{l}$  OptiMEM lösen
2. 5 Min Inkubation bei RT
3. Hinzugabe der jeweils in 250  $\mu\text{l}$  OptiMEM gelösten Plasmide
4. 20 Min Inkubation bei RT
5. tröpfchenweise Hinzugabe in Well einer 6-Well-Platte mit 70 % konfluenten Zellen
6. Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>

Hunt et al. haben gezeigt, dass für die transiente Transfektion von HUVEC Zellen mit Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 und Lipofectamine<sup>TM</sup> LTX die besten Ergebnisse zu erreichen sind [56]. In Anlehnung daran wurden unsere stabilen Transfektionen mit beiden Reagenzien sowie mit dem Nucleofector<sup>®</sup> I Device (Lonza) durchgeführt, wobei mit Lipofectamine LTX die besten Ergebnisse erzielt werden konnten. Für die Transfektion von HUVEC Zellen wurde wie folgt verfahren:

1. DNA-Ansatz 1 : 1 mit PlusReagent ( $\mu\text{g}$  DNA :  $\mu\text{l}$  PlusReagent) in 250  $\mu\text{l}$  OptiMEM lösen, 5 Min Inkubation bei RT
2. Hinzugabe von 6,25  $\mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>TM</sup> LTX, 25 Min Inkubation bei RT
3. Medium im 6-Well mit 70 % konfluenten Zellen durch 2 ml vorgewärmtes OptiMEM ersetzen, tröpfchenweise Hinzugabe der Komplexe in Well
4. Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> über 4 h
5. OptiMEM durch komplettes Kulturmedium ersetzen, Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>

Für die Transfektion von HepG2 Zellen wurden Zellen niedriger Passagezahl im aktiven Teilungsstadium bei etwa 70 % Konfluenz trypsiniert, in PBS aufgelöst und mittels Neubauer Zählkammer gezählt. Anschließend wurde wie folgt verfahren:

1.  $10^6$  Zellen bei 200 x g über 10 Min zentrifugieren
2. Überstand entnehmen, Zellen in 100  $\mu$ l Cell Line Nucleofector<sup>®</sup> Solution V (Lonza) lösen, Hinzugabe der Plasmid-DNA
3. Transfer in eine Nucleofector<sup>®</sup>-Kuvette
4. Applikation des Programms T-28 am Nucleofector<sup>®</sup> I Device
5. Aufnahme der Zellen in 500  $\mu$ l vorgewärmtem Kulturmedium
6. Transfer in Well einer 6-Well-Platte mit vorgelegtem 1 ml vorgewärmten Kulturmedium

Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Medium gewechselt. Anschließend erfolgte die Weiterverarbeitung gemäß Fragestellung.

### **3.2.3 Transiente Transfektion mit Zinkfinger Nukleasen**

Zur Überprüfung der Funktionalität der hergestellten ZFN-pcDNA<sup>™</sup> 3.1(-) Plasmide wurde eine transiente Transfektion von HEK293 Zellen unter Verwendung von jeweils 4  $\mu$ g eines ZFN-Plasmids protokollgemäß durchgeführt. Nach 48 Stunden Inkubation wurden aus den Zellen Proteine isoliert und über einen Western Blot analysiert.

### **3.2.4 Stabile Transfektion mit AAVS1-CAGGS-EGFP**

Die Überprüfung des Mechanismus der HR wurde mittels permanenter Integration des EGFP-Inserts in HEK293 Zellen protokollgemäß durchgeführt. Die Transfektion erfolgte mit den Plasmiden AAVS1-CAGGS-EGFP, ZFN28 und ZFN44, wobei drei Ansätze von jeweils 20  $\mu$ g, 10  $\mu$ g und 5  $\mu$ g DNA insgesamt verwendet wurden (davon 80 % Donor-Plasmid und je 10 % einer Zinkfingernuklease). Im Verlauf der Selektion wurden die Zellen regelmäßig unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

### **3.2.5 Stabile Transfektion mit AAVS1-LacZeo2**

Die folgenden Transfektionen wurden mit den Plasmiden AAVS1-LacZeo2, ZFN28 und ZFN44 durchgeführt. Das Transfektionssystem wurde jeweils passend zum verwendeten Zelltyp gewählt. Für die Transfektion von HEK293 wurden 20  $\mu$ g DNA und für die von HepG2 5  $\mu$ g DNA als Ansatz gewählt (davon 80 % Donor-Plasmid und je 10 % einer Zinkfingernuklease).

### **3.2.6 Stabile Transfektion mit AAVS1-LacZeo2 und AAVS1-M2rtTA**

Die folgenden Transfektionen wurden mit den Plasmiden AAVS1-LacZeo2, AAVS1-M2rtTA, ZFN28 und ZFN44 durchgeführt. Das Transfektionssystem wurde jeweils passend zum verwendeten Zelltyp gewählt. Für die Transfektion von HEK293 wurden 20  $\mu$ g DNA, für die von HUVEC insgesamt je 2,5  $\mu$ g, 2,0  $\mu$ g, 1,5  $\mu$ g, 1,0  $\mu$ g und 0,5  $\mu$ g DNA und für die von



HepG2 5  $\mu\text{g}$  DNA als Ansatz verwendet (davon je 40 % eines Donor-Plasmids und je 10 % einer Zinkfinger-nuklease).

### 3.2.7 Stabile Transfektion weiterer Zellen mit AAVS1-LacZeo2 und AAVS1-M2rtTA

In Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen erfolgte die Etablierung weiterer stabil transfizierter Zelllinien, ebenfalls unter der Verwendung der Plasmide AAVS1-LacZeo2, AAVS1-M2rtTA, ZFN28 und ZFN44. Dabei wurden embryonale Stammzellen (ES Zellen) in Kooperation mit AG Siemens, SH-S5SY, SW620 und HPAF in Kooperation mit AG Landthaler sowie MCF-7 Zellen in Kooperation mit AG Löwer verwendet. Die Zellen wurden entsprechend der empfohlenen Kulturbedingungen kultiviert und transfiziert.

### 3.2.8 Stabile Transfektion von FRT-HEK293 via FlpIn<sup>TM</sup>-System

Mit einem aus der stabilen Transfektion mit den Plasmiden AAVS1-LacZeo2, ZFN28 und ZFN44 hervorgegangenen FRT-HEK293-Klon erfolgte eine Transfektion mit Plasmiden des FlpIn<sup>TM</sup>-Systems. Hierbei wurden die Transfektionsbedingungen gemäß Invitrogen-Protokoll und Zelltyp gewählt. Die Transfektion von FRT-HEK293 wurde mit 1  $\mu\text{g}$  DNA (davon 90 % pOG44-Plasmid und 10 % pFRT-GFP-Plasmid) durchgeführt. Im Verlauf der Selektion und bei Auftreten von Klonen wurden die Zellen stets unter einem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.

### 3.2.9 Antibiotikaselektion stabil transfizierter Zellen und Expansion der Klone

Alle stabil transfizierten Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 50-70 % mit Antibiotika selektioniert. Die Wahl des Antibiotikums erfolgte in Abhängigkeit vom transfizierten Vektor. Die Antibiotikakonzentration für das Selektionsmedium wurde anhand der Killing Curve gewählt. Tabelle 7 zeigt die jeweiligen Konzentrationen in Abhängigkeit von dem stabil transfizierten Vektor.

Selektionsmedien stabil transfizierter Zellen		
Zelllinie	Transfiziertes Plasmid	Antibiotikumkonzentration
HEK293	AAVS1-CAGGS-EGFP	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin
HEK293	AAVS1-LacZeo2	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin
HEK293	AAVS1-LacZeo2, AAVS1-M2rtTA	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418
HUVEC	AAVS1-LacZeo2	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin
HUVEC	AAVS1-LacZeo2, AAVS1-M2rtTA	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418
HepG2	AAVS1-LacZeo2	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin
HepG2	AAVS1-LacZeo2, AAVS1-M2rtTA	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418
FRT-HEK293	pOG44 und pFRT-GFP	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin

Tabelle 7: Zelllinien mit jeweiligem stabil transfiziertem Vektor und Konzentration an Selektionsantibiotikum

Diese Selektion wurde über mehrere Wochen fortgeführt bis sich mikroskopisch erste Kolonien zeigten. Sobald diese eine makroskopisch gut erkennbare Größe erreicht hatten, wurden die Kolonien gepickt und expandiert. Schließlich wurden die einzelnen Klone kryokonserviert und deren DNA für weitere Analysen isoliert.

### 3.3 DNA-Extraktion

Für die Extraktion von genomischer DNA aus Zellkultur wurde ein neues Protokoll etabliert. Als Ausgangsmaterial diente eine 10 cm Zellkulturplatte mit nahezu konfluenten Zellen. Durch diese Extraktionsmethode ließen sich DNA-Konzentrationen von  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  erreichen. Die Extraktion erfolgte entsprechend folgender Schritte:

1. Waschen der Zellen mit 3-4 ml PBS
2. Trypsinieren der Zellen mit mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung
3. Resuspension der Zellen in 8-10 ml PBS, Transfer in 15 ml Falcon-Tube
4. 10 Min Zentrifugation bei 1000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , Überstand verwerfen
5. Resuspension des Pellets in  $100 \mu\text{l}$  PBS, Transfer von je  $50 \mu\text{l}$  in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube
6. Zugabe von  $500 \mu\text{l}$  Tail Buffer und  $50 \mu\text{l}$  Proteinase K, Inkubation über Nacht bei  $55^{\circ}\text{C}$ , 10 Min Inkubation auf Eis
7. Zugabe von  $300 \mu\text{l}$  6 M NaCl-Lösung, 5 Min Inkubation auf Eis
8. 20 Min Zentrifugation bei 14000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$
9. Transfer von je  $500 \mu\text{l}$  Überstand in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube
10. Zugabe von 1 ml Isopropanol, 20 Min Inkubation auf Eis
11. 15 Min Zentrifugation bei 14000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , Überstand verwerfen
12. Zugabe von 1 ml 70 %igem Ethanol
13. 15 Min Zentrifugation bei 14000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , Überstand verwerfen
14. DNA-Pellet bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit offenem Deckel trocknen, in  $50 \mu\text{l}$  tridestillierten  $\text{H}_2\text{O}$  eluieren

Tail Buffer: 50 mM Tris (pH 8,0)  
100 mM EDTA  
100 nM NaCl  
1 % SDS

## 3.4 Proteinexpressionsanalyse

### 3.4.1 Proteinisolation

Für die Isolation von Proteinen aus zuvor transfizierten Zellen wurden die Zellen in PBS gewaschen und mit 60  $\mu\text{l}$  RIPA Buffer Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim) versetzt. Die Zellen wurden mit einem sterilen Spatel abgeschabt, jeweils in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube übertragen, sofort auf Eis gestellt und dort 10-15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden sie bei 14000 U über zehn Minuten zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in ein neues Eppendorf-Tube transferiert.

### 3.4.2 Proteinquantifizierung mittels Bicinchoninsäure Assay (BCA)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden je 2  $\mu\text{l}$  Überstand in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben und durch Zugabe von jeweils 23  $\mu\text{l}$  tridestillierten Wassers im Verhältnis 1 : 12,5 verdünnt. Zu jeder Probe wurden 200  $\mu\text{l}$  Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit Reagent A und B (im Verhältnis 50 : 1 frisch vermengt) hinzugegeben und das Gemisch bei 37°C über 30 Minuten inkubiert. Die Absorption wurde bei der Wellenlänge von 562 nm gemessen und die Konzentrationsbestimmung erfolgte unter Verwendung einer Standardkurve.

### 3.4.3 Gelelektrophorese

Laemmli Sample Buffer wurde im Verhältnis 20 : 1 mit  $\beta$ -Mercaptoethanol vermengt und anschließend 50  $\mu\text{g}$  zu untersuchenden Proteins im  $\mu\text{l}$  Verhältnis 1 : 1 mit dem vorbereiteten Laemmli Sample Buffer vermischt. Das Gemisch wurde über fünf Minuten bei 95°C und dann auf Eis inkubiert. Es wurde ein 4-20 %iges Tris-HCl Gel verwendet, protokollgemäß in TGS-Running Buffer eingebettet, 15  $\mu\text{l}$  Precision Plus Protein Marker (Kaleidoscope) und je 50  $\mu\text{l}$  Probe in die jeweiligen Taschen gefüllt und die Proteine bei konstanten 100 V über eine Stunde der Größe nach aufgetrennt.

TGS-Running Buffer (pH 8,3): 25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,1 % SDS

### 3.4.4 Western Blot

Für die Durchführung des Western Blots wurde die Membran unter horizontalem Schütteln eine Minute in Methanol aktiviert, anschließend unter Schütteln in Transferpuffer zum Einwirken belassen. Das Gel wurde zurechtgeschnitten und der Transferblot im Transfer-sandwich protokollgemäß wie folgt aufgebaut: Sandwich-(+)-Halter, 1 Schwamm, 3 Blatt Whatman Paper, Membran, Gel, 3 Blatt Whatman Paper, 1 Schwamm, Sandwich-(-)-Halter. Der Transfer erfolgte in einer Blotting-Kammer (Biorad) in Transferpuffer bei 50 V und

200 mA über eine Stunde bei 4°C, anschließend bei 65 V und 300 mA 30 Minuten.

Transferpuffer: TGS-Running Buffer  
15 % Methanol

### 3.4.5 Immunodetektion

Die Immundetektion erfolgte in fünf Schritten:

1. 30 Min Blocken der Membran mit 20 ml Milchlösung bei RT
2. Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C
3. 1h Waschen der Membran mit 20 ml PBS / Tween 0,1 % bei RT
4. 1h Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper bei RT
5. 1h Waschen der Membran mit 20 ml PBS / Tween 0,1 % bei RT

Der Primärantikörper bindet an die FLAG-tag des jeweiligen ZFN-Proteins, eine bekannte Proteinsequenz. Der Sekundärantikörper bindet den Primärantikörper spezifisch. Die Markierung der Proteine erfolgte protokollgemäß mittels enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham). Die Membran wurde mit dem Gemisch aus ECL-Reagenz A und B (Verhältnis 1 : 1) versetzt, zwei Minuten bei RT inkubiert, auf einem Film ausgewertet und fixiert.

Milchlösung: PBS  
0,1 % Tween 20 Solution (Biorad)  
Milchpulver (5 g pro 100 ml Lösung)

Primärantikörper: muriner anti-FLAG-Antikörper  
Sekundärantikörper: anti-Maus-Antikörper

## 3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient als schneller Nachweis einzelner Sequenzen im Genom der Zelle und zur Herstellung von Sonden für Southern Blot Analysen. Die Bedingungen sind substrat- und produktabhängig. Der Primerdesign erfolgte mittels des Programms EditSeq. Im Programm Oligo6 wurde die PCR-Produkt-Größe festgelegt. Aus den vorgeschlagenen Primerpaaren wurden manuell die mit den wenigsten Interaktionen zwischen den einzelnen Primern und mit der wenigsten Schlaufenbildung (loop) ausgewählt. Zur weiteren Kontrolle der PCR-Bedingungen wurden die Primer mittels "protocol writer" der Internetseite mutationdiscovery.com [57] überprüft. Die Bestellung des ausgesuchten Primerpaars erfolgte über das Biochemisch-Technologische Zentrum (BioTeZ) Berlin-Buch GmbH.

### 3.5.1 ZFN-Schnittstelle

Es wurden Primer für den Nachweis erworben, dass die verwendeten Zellen die ZFN-Schnittstelle mit der anliegenden homologen Armen in ihrem Genom enthalten. Die Primer binden außerhalb des homologen Arme im *AAVS1* Locus. Bei entsprechendem PCR-Protokoll entsteht ein PCR-Produkt der Größe von 2029 bp. Als DNA-Ansatz wurden jeweils 100 ng extrahierter DNA aus nicht transfizierten Zellen verwendet.

PCR	Primer	Sequenz (5'-3')
ZFN-Schnittstelle	FW-Primer:	CCGGAAGCTCTGCCCTCTAAC
	RW-Primer:	TGCTTCTTGGCCACGTAACCT

PCR-Ansatz (Total 25 $\mu$ l):	DNA	100 ng
	GC-Polymerase	1.0 $\mu$ l
	5x Buffer A	5.0 $\mu$ l
	FW-Primer (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
	RW-Primer (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l

Reaktion	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Zeit
Initiale Denaturierung	95	120 s
29 Zyklen:		
Denaturierung	95	30 s
Annealing	60,5	30 s
Elongation	72	210 s
Finale Polymerisierung	72	10 Min
Aufbewahrung	4	unbegrenzt

Tabelle 8: Protokoll für ZFN-Schnittstellen-PCR

Das PCR-Produkt wurde auf ein 2 %iges Agarose-Gel geladen und 2,5 Stunden bei 120 V aufgetrennt. Zur Größenmarkierung wurde der GeneRuler<sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet. Die korrekten Banden wurden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, das PCR-Produkt mittels NucleoSpin<sup>®</sup> Kit aus dem Gel extrahiert und unter der Verwendung oben genannter Primer protokollgemäß sequenziert.

### 3.5.2 Sonden-PCR

Für den Southern Blot wurden jeweils Primer für drei verschiedene Sonden entworfen.

Die 3'AAVS1-Sonde hat eine Größe von 256 bp und liegt im *AAVS1* Locus zwischen dem ersten und den zweiten Exon zwischen zwei Schnittstellen des Restriktionsenzym *EcoRV*. Die Sonde wurde protokollgemäß mit Taq-Polymerase und DNA untransfizierter HEK293 Zellen hergestellt.

Die 5'LacZeo2-Sonde hat eine Größe von 266 bp und liegt im FRT-LacZeo2-Insert im LacZ-ORF. Die Sonde wurde protokollgemäß mit Taq-Polymerase und dem AAVS1-LacZeo2-Plasmid hergestellt.

Die 5'M2rtTA-Sonde hat eine Größe von 455 bp und liegt zwischen HAL und M2rtTA-Insert. Die Sonde wurde protokollgemäß mit Taq-Polymerase und dem AAVS1-M2rtTA-Plasmid hergestellt.

PCR	Primer	Sequenz (5'-3')
3'AAVS1-Sonde	FW-Primer:	GCCCCCTCCCTTCCCCGTTCACTT
	RW-Primer:	AAACAGCCGTCAGCCGCACCTACCC
5'LacZeo2-Sonde	FW-Primer:	GGAAGGCCAGACGCGAATTAT
	RW-Primer:	CGCTGATTTGTGTAGTCGGTTTATG
5'M2rtTA-Sonde	FW-Primer:	TCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAG
	RW-Primer:	AGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAG

PCR-Ansatz (Total 30 $\mu$ l):	DNA	200 ng
	Taq Polymerase	0.2 $\mu$ l
	10x Buffer	3.0 $\mu$ l
	dNTPs	1.5 $\mu$ l
	FW-Primer (10 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ l
	RW-Primer (10 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ l

Reaktion	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Zeit
	3'AAVS1/5'LacZeo2/5'M2rtTA	3'AAVS1/5'LacZeo2/5'M2rtTA
Initiale Denaturierung	95	120 s
32 Zyklen:		
Denaturierung	95	30 s
Annealing	69.1/ 60.2/ 64.9	30 s
Elongation	72	30 s/ 30 s/ 50 s
Finale Polymerisierung	72	10 Min
Aufbewahrung	4	unbegrenzt

Tabelle 9: PCR-Protokoll für 3'AAVS1-, 5'LacZeo2- und 5'M2rtTA-Sonde

Die PCR-Produkte wurden über ein 2 %iges Agarose-Gel aufgetrennt. Die entsprechenden Banden wurden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, das PCR-Produkt mittels NucleoSpin<sup>®</sup> Kit aus dem Gel extrahiert und mittels Sequenzierung auf Korrektheit überprüft.

### 3.5.3 TOPO<sup>®</sup> Cloning

Für weitere Sondenherstellung mittels PCR wurde ein TOPO<sup>®</sup> Cloning mittels Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> PCR Cloning Kit (Invitrogen) mit dem pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> Vektor durchge-

führt. Dieser hat eine Größe von 3519 bp, weist ein Kanamycin- und eine Zeocin-Resistenzgen auf und liegt bereits linearisiert und am 3'-Ende kovalent an eine DNA-Topoisomerase gebunden vor. Die Vervielfältigung erfolgt in Top10 Zellen. Da das korrekte Einfügen des gewünschten DNA-Abschnitts, d.h. der Sonde, in den TOPO<sup>®</sup> Vektor zu einer Spaltung des letalen *ccdB* Gens führt, erlaubt es nur ein Wachstum von Top10 Zellen mit positiven Rekombinanten. Zellen mit einem nicht-rekombinanten Vektor sterben beim Kultivieren.

Für das TOPO<sup>®</sup> Cloning wurde protokollgemäß eine PCR mit 20 ng extrahierter Sonden-DNA durchgeführt. Dabei wurde die GC-Polymerase als Enzym genutzt, da sie bei der PCR die für das TOPO<sup>®</sup> Cloning erforderlichen stumpfen Enden (blunt ends) erzeugt.

PCR-Ansatz (Total 50 $\mu$ l):	DNA	20 ng
	GC-Polymerase	1.0 $\mu$ l
	5x Buffer	10.0 $\mu$ l
	FW-Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
	RW-Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l

Zur Überprüfung der Richtigkeit der blunt-end-PCR-Produkte wurden diese über ein 2 %iges Agarose-Gel aufgetrennt, die Banden korrekter Größen ausgeschnitten und die DNA mittels NucleoSpin<sup>®</sup> Kit aus dem Gel isoliert. Es wurden 4  $\mu$ l extrahierte PCR-DNA, 1  $\mu$ l Salt Solution und 1  $\mu$ l pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> Vektor vermengt und fünf Minuten bei RT inkubiert. Laut Invitrogen erhöht die Zugabe der Salzlösung aus 1.2 M NaCl und 0.06 M MgCl<sub>2</sub> die Anzahl an Transformationen um das Zwei- bis Dreifache.

Transformation des TOPO<sup>®</sup> Vektors in Top10 Zellen:

1. Auftau der Top10 Zellen auf Eis
2. Zugabe von 2  $\mu$ l TOPO<sup>®</sup> Cloning Produkt, 30 Min Inkubation auf Eis
3. 30 s Hitzeschock bei 42°C, 2 Min Inkubation auf Eis
4. Zugabe von 250  $\mu$ l LB-Medium, 1 h Inkubation bei 37°C (horizontal schütteln)
5. Ausplattieren auf vorgewärmte Agarplatten mit 50  $\mu$ g/ml Kanamycin
6. Inkubation über Nacht bei 37°C

Pro Sonde wurden zehn Klone gepickt, expandiert und mittels Miniprep Kit extrahiert. Zur Überprüfung der korrekten Integration der jeweiligen Sonde in den TOPO<sup>®</sup> Vektor wurde eine Sequenzierung mit M13-FW- und -RW-Primern (Applied Biosystems) durchgeführt.

PCR	Primer	Sequenz
TOPO <sup>®</sup> Vektor-Sequenzierung	M13 Reverse:	CAGGAAACAGCTATGAC
	M13 Forward (-20):	GTAAAACGACGGCCAG

Mit den korrekten Vektoren wurde eine PCR protokollgemäß durchgeführt. Bei der anschließenden Gelelektrophorese zeigte sich pro Sondenvektor eine einzige Bande, welche die

erwartete Größe aufwies. Diese wurde aus dem Gel herausgeschnitten, die DNA mittels NucleoSpin<sup>®</sup> Kit extrahiert und zusätzlich als Glycerol-Stocks konserviert.

### 3.5.4 Integrations-PCR

Es wurden spezielle Primer für einen PCR-Nachweis der korrekten Integration des FRT-LacZeo2-Inserts in den *AAVS1* Locus entwickelt. Dabei entspricht der HAL-FW-Primer dem FW-Primer für die ZFN-Schnittstelle (incl. homologer Arme) und der HAR-RW-Primer dem RW-Primer für die ZFN-Schnittstelle (incl. homologer Arme). Das HAL-PCR-Produkt hat eine Größe von 1799 bp, das HAR-PCR-Produkt hat eine Größe von 1581 bp.

PCR	Primer	Sequenz (5'-3')
HAL	FW-Primer:	CCGGAACTCTGCCCTCTAAC
	RW-Primer:	CCTACTCAGACAATGCGATGC
HAR	FW-Primer:	CGGCCTGGACGAGCTG
	RW-Primer:	TGCTTCTTGGCCACGTAACCT

Reaktion	Temperatur (°C) HAL/ HAR	Zeit HAL/ HAR
Initiale Denaturierung	95	10 Min
32 Zyklen:		
Denaturierung	95	30 s
Annealing	60,5/ 59,8	30 s
Elongation	72	180 s/ 160 s
Finale Polymerisierung	72	10 Min
Aufbewahrung	4	unbegrenzt

Tabelle 10: PCR-Protokoll für die HAL-/ HAR-PCR

Aufgrund der Größe der PCR-Produkte wurde der Ampli Taq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Als Ausgangsmaterial wurden 200 ng extrahierte DNA transfizierter Zellen verwendet. Die PCR-Produkte wurden über ein 2 %iges Agarose-Gel aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten, aus dem Gel isoliert und mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

PCR-Ansatz (Total 50 $\mu$ l):	DNA	200 ng
	Ampli Taq Gold <sup>®</sup>	25 $\mu$ l
	GC Enhancer	2 $\mu$ l
	FW-Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
	RW-Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l



### 3.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung ist eine gängige Methode zur Überprüfung der Abfolge der einzelnen Basen im DNA-Molekül. Sie wurde verwendet um PCR-Produkte und hergestellte Plasmide auf Sequenzrichtigkeit eindeutig zu überprüfen. Dabei wurden Sequenziergeräte von Applied Biosystems verwendet. Für die Sequenzierung wurden jeweils 200 ng Plasmid-DNA bzw. 2  $\mu$ l aus Agarose-Gel aufgereinigtes PCR-Produkt verwendet. Pro DNA-Probe wurde jeweils ein Ansatz mit FW- und einer mit RW-Primer gefertigt. Zudem wurde eine pGEM-Kontrolle zur Qualitätsüberprüfung der Sequenzierung durchgeführt: 1,5  $\mu$ l pGEM-Kontrollvektor (mit dem M13-Primer) wurde gemäß Sequencing-PCR-Ansatz und -PCR-Protokoll angesetzt und zusammen mit den Proben sequenziert.

Sequencing-PCR-Ansatz (Total 10 $\mu$ l):	DNA	200 ng/2 $\mu$ l
	Big Dye 1.1	1.0 $\mu$ l
	5 x Buffer	2 $\mu$ l
	Primer (10 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l

Reaktion	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Zeit
30 Zyklen:		
Denaturierung	96	10 s
Annealing	50	5 s
Elongation	60	4 Min
Aufbewahrung	4	unbegrenzt

Tabelle 11: Protokoll für Sequencing-PCR

Sephadex<sup>TM</sup>G-50 Superfine Pulver (GE Healthcare) wurde auf 96-Well einer Sephadexplatte verteilt, mit 300  $\mu$ l Chromographie-Wasser pro Well versetzt und über zwei Stunden quellen gelassen. Die Platte wurde fünf Minuten bei 2400 rpm zentrifugiert, der Durchlauf verworfen, jedes Well der Platte erneut mit 150  $\mu$ l Chromographie-Wasser versetzt und die Platte wiederum fünf Minuten bei 2400 rpm zentrifugiert. In eine saubere Sequenzierplatte wurden jeweils 10  $\mu$ l HIDI-Formamid vorgelegt, die Sephadexplatte fest daraufgesetzt und je 10  $\mu$ l Sequencing-PCR-Produkt in jeweils die Mitte eines Sephadex-Well gegeben. Die gestapelten Platten wurden fünf Minuten bei 2400 rpm zentrifugiert, wobei Nukleotide, kleinere Moleküle und Salze im Gel zurückgehalten werden, sodass ein gereinigtes PCR-Produkt durch das Sephadex-Gel ins Formamid gelangt. Die Sequenzierplatte mit dem Eluat wurde gemäß Bedienungsanleitung des Sequenziergeräts verpackt, ein Sample-Sheet angefertigt und die Platte in den Sequencer geladen. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte manuell.

## 3.7 Southern Blot

### 3.7.1 Restriktionsverdau

Je 10  $\mu\text{g}$  extrahierte DNA wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRV-HF (20000 U/ml, New England Biolabs) über acht Stunden bei 37°C verdaut.

DNA	10 $\mu\text{g}$
EcoRV-HF	2.0 $\mu\text{l}$
Buffer 4	6.0 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	
<b>Total</b>	60 $\mu\text{l}$

Tabelle 12: Protokoll für EcoRV-HF-Verdau

### 3.7.2 Gelelektrophorese

Der DNA-Verdau wurde mit jeweils 8  $\mu\text{l}$  6 x Agarose Loading Buffer versetzt und mit 2  $\mu\text{l}$  Massruler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) als Referenz in 1 x TAE-Puffer bei 55-67 V über neun Stunden im 0,8 % Agarose-Gel aufgetrennt.

Agarose-Gel (0,8 %): 2 g Seakem GTG Agarose (Biozym)  
250 ml 1 x TAE Puffer  
20  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid (10 mg/ml)

### 3.7.3 Kapillar-Blotting

Das Gel wurde in 0,125 M Salzsäure (HCl) über sieben Minuten unter ständigem horizontalen Schütteln depurinieren und zweimal kurz in tridestilliertem Wasser gewaschen. Ein Gel-großes Stück Transfermembran Hybond XL (Amersham) wurde kurz mit tridestilliertem Wasser angefeuchtet und ebenso wie das Gel über 30 Minuten unter ständigem horizontalen Schütteln in Denaturierungspuffer gewaschen. Der Transferblot wurde protokollgemäß wie folgt aufgebaut (von unten nach oben): 3 Blatt Whatman Paper, Gel, Membran, 3 Blatt Whatman Paper, Saugpapier, Glasplatte, Gewicht. Der Transfer erfolgte in einer feuchten Glaswanne in Denaturierungspuffer bei RT über Nacht. Die geblottete DNA wurde mittels StrataLinker® UV Crosslinker (Stratagene) bei 100 x 100  $\mu\text{Joule}$  an die Membran gebunden.

Denaturierungspuffer: 87.66 g NaCl  
20 g NaOH  
mit tridestilliertem H<sub>2</sub>O auf 1 Liter auffüllen

### 3.7.4 Hybridisierung

Die Membran mit gebundener DNA wurde in Glasröhrchen transferriert, in 2 x SSC fünf Minuten bei RT von Salzen gewaschen und neutralisiert, anschließend in 15 ml vorgewärmten

Rapid-Hyb Hybridisierungspuffer (Amersham, GE Healthcare) eine Stunde bei 65°C prehybridisiert. Für die Sondenherstellung diente das Random prime labeling kit (Stratagene). Die Sonden-PCR-Produkte wurden mit Random Oligonucleotide Primers gemischt und fünf Minuten bei 95°C erwärmt (DNA-Auftrennung in Einzelstränge). Anschließend fünf Minuten auf Eis gekühlt, kurz zentrifugiert, mit 5x Buffer,  $\alpha$ -dCTP<sup>32</sup>-Nukleotid und Klenow versetzt und bei 37°C zehn Minuten inkubiert.

$\alpha$ -dCTP<sup>32</sup>-Sondenherstellung: 25 ng Sonden-PCR-Produkt in 24  $\mu$ l tridestilliertes H<sub>2</sub>O  
 10  $\mu$ l Random Oligonucleotide Primers  
 10  $\mu$ l 5x Buffer  
 5  $\mu$ l frisches  $\alpha$ -dCTP<sup>32</sup>-Nukleotid (NEG-513 H)  
 1  $\mu$ l Klenow

Die Sonde wurde auf Eis abgekühlt und über Microspin S200HR Säulen (Amersham) zwei Minuten bei 3000 U/Min Zentrifugation aufgereinigt. Die Sonde wurde fünf Minuten bei 95°C erhitzt (Trennung der DNA-Stränge), fünf Minuten auf Eis abgekühlt, in 10 ml vorgewärmten Hybridisierungspuffer gegeben und die Membran darin über Nacht bei 65°C hybridisiert. Zur Entfernung der ungebundenen Anteile der radioaktiven Sonde wurde die Membran wie folgt gewaschen: zweimal kurz bei RT in 6 x SSC, zweimal jeweils eine Stunde bei 65°C in Waschlösung (0.2 x SET, 0.2 % SDS) und fünf Minuten bei RT in 2 x SSC. Die Membran wurde im feuchten Zustand luftdicht in Plastikfolie verpackt, die Aktivität gemessen und über drei bzw. sieben Tage zum Exponieren auf einem Phospho-Imager-Screen in einer Hypercassette<sup>TM</sup> (Amersham) verschlossen. Die Auswertung erfolgte mittels Fuji Phosphoimager FLA-7000 (Lifescience, FujiFilm) mit den Programmen Image Reader FLA-7000 und Multi Gauge Version 3.2 (beide FujiFilm). Der Southern Blot wurde mit spezifischen Sonden (3'-AAVS1-, 5'-LacZeo2-, 5'-M2rtTA-Sonde) durchgeführt.

20 x SSC-Lösung (pH 7,0): 175,2 g NaCl (3 M)  
 88,2 g Natriumcitrat-Dihydrat (0,3 M)  
 mit tridestilliertem H<sub>2</sub>O auf 1 Liter Lösung auffüllen

Waschlösung: 0.2 x SET  
 0.2 % SDS

20 x SET-Lösung (pH 7,8): 175,2 g NaCl (3 M)  
 48,4 g Tris/HCl (0,4 M)  
 7,45 g EDTA (20 mM)  
 mit tridestilliertem H<sub>2</sub>O auf 1 Liter auffüllen

10 %ige SDS-Lösung: 100 g Natriumdodecylsulfat (SDS)  
 in 1 Liter tridestillierten H<sub>2</sub>O lösen

### 3.8 Kits

Bezeichnung	Hersteller
BCA <sup>TM</sup> Protein Assay Kit	Pierce, USA
CompoZr <sup>®</sup> -Integration Kit	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Lipofectamine <sup>TM</sup> 2000 Transfection Kit	Invitrogen, Groningen
Lipofectamine <sup>TM</sup> LTX and Plus Reagent	Invitrogen, Groningen
Nucleofector <sup>®</sup> Kit	Amaxa Lonza, Visp
NucleoSpin <sup>®</sup> Extract II Kit	Clontech Laboratories Inc., USA
Prime-It <sup>®</sup> Random primer labelling kit	Stratagene/Agilent Technologies, Berlin
Pierce <sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
Quick Ligation <sup>TM</sup> Kit	New England BioLabs, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Zero Blunt <sup>®</sup> TOPO <sup>®</sup> PCR Cloning Kit	Invitrogen, Groningen

Tabelle 13: Verwendete Kits mit Herstellerverweis.

### 3.9 Verbrauchsmaterial und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Amersham Hybond-XL	GE Healthcare, Berlin
Axio Observer.Z1, Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Bacteria shaker ES20	Heraeus Instruments, Osterode
Bacto <sup>TM</sup> Tryptone	BD Becton, Dickinson and Company, USA
Bacto <sup>TM</sup> Yeast Extract	BD Becton, Dickinson and Company, USA
Bacto <sup>TM</sup> Agar	BD Becton, Dickinson and Company, USA
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Biozym LE GP Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Cell culture dishes 10 cm	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz
Cell culture plates 96-Well	Falcon, Oxnard, USA
Cell culture plates 24-Well	Falcon, Oxnard, USA
Cell culture plates 12-Well	Falcon, Oxnard, USA
Cell culture plates 6-Well	Falcon, Oxnard, USA
DMEM 30-2002	ATCC LGC Standards, USA
DMEM 41965	Invitrogen, Groningen
DNA Analyzer 3730 ABI Prism, Sequencer	Applied Biosystems, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
Falcon tubes 15 und 50 ml	Falcon, Oxnard, USA

FCS (Newborn)	Biochrom, Berlin
Fuji Phosphoimager FLA-7000 Lifescience	FujiFilm, Düsseldorf
Hypercassette <sup>TM</sup>	Amersham, GE Healthcare, Berlin
Image Reader FLA-7000	FujiFilm, Düsseldorf
Kühlschränke und Tiefkühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hanau
Loading Buffer 6 x, Gel Loading Dye	New England BioLabs, USA
MaxiPrep Zentrifuge	Beckman Coulter <sup>TM</sup> Avanti <sup>®</sup> , Krefeld
Microspin S200HR Amersham columns	GE Healthcare, Berlin
Multi Gauge, Version 3.2	FujiFilm, Düsseldorf
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NaOH	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nalgene <sup>®</sup> Mr. Frosty Freezing Container	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Nanodrop <sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Opti-MEM <sup>®</sup> Reduced Serum Medium, GlutaMAX <sup>TM</sup>	Invitrogen (Gibco), Groningen
PBS	Biochrom, Berlin
Plate Imager Reader BAS-1500	FujiFilm, Düsseldorf
Pipettes 2, 10, 20, 100, 200, 1000 $\mu$ l	Gilson, Langenfeld
PCR-Tubes 0,2 ml	Eppendorf, Hanau
Rapid-hyb Buffer Amersham W33166	GE Healthcare, Berlin
RPMI 1640 Ready Mix	PAA, Cölbe
Sephadex <sup>TM</sup> G-50 Superfine	GE Healthcare, Berlin
Stable Glutamine	PAA, Cölbe
Thermocycler (PTC-200)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hanau
Thermo-well PCR-plates	Corning, New York, USA
Tischvortexer VF2	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hanau
Transferpette <sup>®</sup> -8, Mehrfachpipette	Brand, Wertheim
Trypsin/EDTA (0.05 % /0.02 %)	Biochrom, Berlin
UV-Stratalinker <sup>®</sup> 1800	Stratagene, USA
Vortexer Vortex Genie <sup>®</sup> 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Whatman paper	Biometra, Göttingen
White/UV Transilluminator	UVP, Cambridge

Tabelle 14: Verwendete Materialien mit Herstellerverweis.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 ZFN-Schnittstelle in Zielzellen

Das Vorliegen der ZFN-Schnittstelle mit angrenzenden zum AAVS1-LacZeo2-Donor-Plasmid homologen Armen ist eine notwendige Voraussetzung für die korrekte Integration der FRT-Site in den *AAVS1* Locus. Zum Nachweis des Vorliegens des *AAVS1* Locus in den zur Transfektion verwendeten Zellen wurde mit der extrahierten DNA aus nicht-transfizierten HEK293, HepG2 und HUVEC Zellen eine PCR durchgeführt. In dieser PCR wurde ein PCR-Produkt vom Abschnitt zwischen den beiden homologen Armen im *AAVS1* Locus angefertigt. Dabei wurde die Schnittstelle der ZFNs im PCR-Produkt miterfasst, da sie zwischen den beiden homologen Armen gelegen ist.

Das erzeugte PCR-Produkt wurde zunächst mittels Gelelektrophorese auf seine Größe untersucht und anschließend sequenziert.

In der PCR wurde eine einzige Bande von 2028 bp erzeugt (siehe Abb. 6A). Abbildung 6B zeigt schematisch die Lage der PCR-Primer im *AAVS1* Locus. Die Sequenz des entstehenden PCR-Produktes stimmt mit der zu erwartenden Sequenz überein. Es konnte also gezeigt werden, dass alle verwendeten Zelllinien die ZFN-Erkennungssequenz sowie die beiden angrenzenden homologen Armen aufweisen. Somit sind alle Zelllinien für die geplante Transfektion und den Mechanismus der HR geeignet.

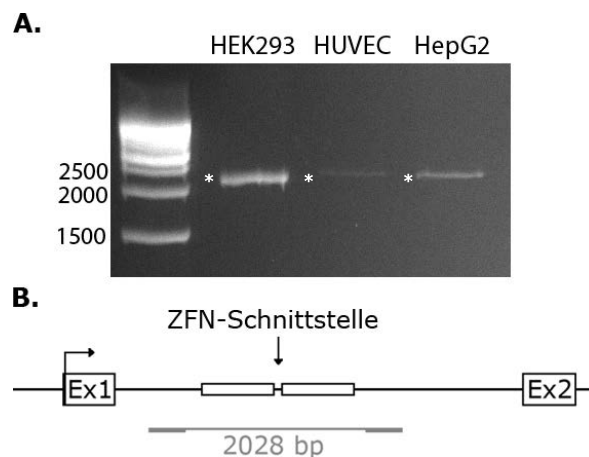


Abbildung 6: ZFN-Schnittstellen-PCR: A. Gelelektrophorese zeigt die erwartete Bande von 2028 bp für alle drei Zelllinien. Dies bedeutet, dass alle Zelllinien die ZFN-Schnittstelle mit den anliegenden homologen Armen aufweisen; B. Schematische Darstellung der Lage der PCR-Primer und des entstehenden PCR-Produktes zwischen Exon 1 und Exon 2 des *AAVS1* Locus der Zelllinien. Sterne dienen der Verdeutlichung der Banden.

### 4.2 AAVS1-LacZeo2-Donor-Plasmid

Die Herstellung eines korrekten AAVS1-LacZeo2-Donor-Plasmids ist eine weitere notwendige Voraussetzung für die Durchführung einer stabilen Transfektion der Zielzellen. Hierfür benötigt das Plasmid die folgenden Elemente: Das Plasmid soll zwei homologe Arme von

je 800 bp enthalten, welche das FRT-LacZeo2-Insert umgeben und homolog zu der Region um die ZFN-Schnittstelle im *AAVS1* Locus sind. Weiterhin soll es eine Splice Acceptor Site (SA-Site) und ein anschließendes 2A Ribosom Stuttering Signal enthalten. Diese erlauben die Expression des Puromycin-Resistenzgens unter der Kontrolle des *PPP1R112C* Promoters, wenn das FRT-LacZeo2-Insert korrekt in den *AAVS1* Locus integriert ist. Das Exon 1 beinhaltet den Translationsstart des *AAVS1* Locus.

Bei der Translation entstehen das durch das Exon 1 kodierte Polypeptid und die durch das Puromycin-Resistenzgen (*PuroR*) kodierte Puromycin-N-Acetyl-Transferase (PAC) als zwei einzelne Proteine [26]. Die PAC konvertiert Puromycin in eine inaktive Form und sorgt so für die Puromycin-Resistenz der transfizierten Zellen mit korrekt integriertem FRT-LacZeo2-Insert. Somit wird das *PuroR* abhängig vom *PPP1R112C* Promoter transkribiert.

Dem unter der Kontrolle des *SV40* Promoters stehenden FRT-LacZeo2-Insert ist eine SV40 Polyadenylierungssequenz nachgeschaltet. Das Insert wird unabhängig vom *PPP1R112C* Promoter transkribiert.

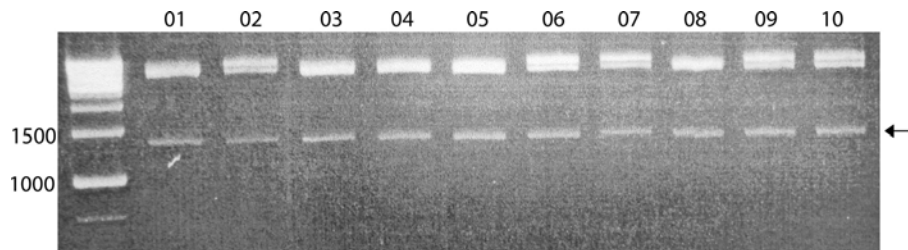


Abbildung 7: Restriktionsverdau des AAVS1-LacZeo2-Donor-Plasmids mit HindIII: In allen zehn Proben ist die erwartete Bande bei 1300 bp (Pfeil) als Nachweis der korrekten Integration des FRT-LacZeo2-Inserts ins AAVS1-SA-2A-puro-pA-Donor-Plasmid zu sehen.

Für die Herstellung dieses komplexen Plasmids wurde das pFRT-LacZeo2-Plasmid mit den Restriktionsenzymen Sall und XhoI und das AAVS1-SA-2A-puro-pA-Donor-Plasmid mit dem Restriktionsenzym Sall verdaut. Anschließend wurden das FRT-LacZeo2-Insert und das aufgeschnittene AAVS1-SA-2A-puro-pA-Donor-Plasmid ligiert.

Zur Überprüfung einer korrekten Ligation wurde das Ligationsprodukt mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut. Insgesamt schneidet HindIII dreimal: zweimal im AAVS1-Backbone und einmal im FRT-LacZeo2-Insert (siehe Abb. 4). Dabei sind bei korrekt orientierter Integration des Inserts in der Gelelektrophorese drei Banden zu erwarten: Größen je 1300 bp, 3800 bp und 5500 bp. Bei Integration in falscher Orientierung wären drei Banden der Größen 300 bp, 4900 bp und 5500 bp zu erwarten. Bei Selbstligation des AAVS1-SA-2A-puro-pA-Donor-Plasmids wären die zwei Banden der Größen 1000 bp und 5000 bp sichtbar.

Der Enzymverdau offenbarte mehrere korrekt zusammengebaute Plasmide (siehe Abb. 7). Die anschließende Sequenzierung bestätigte ein Übereinstimmen mit der gewünschten Sequenz. Somit konnte die erfolgreiche Herstellung des AAVS1-LacZeo2-Donor-Plasmids eindeutig nachgewiesen werden.

### 4.3 ZFN-Plasmide und die Expression der ZFNs

Die ZFN lagen zunächst in Form von ZFN-TOPO<sup>®</sup> Vektoren vor. Diese waren für die Transfektion nicht verwendbar, da der TOPO<sup>®</sup> Vektor keine Expression des integrierten ZFN-Inserts zulässt und dadurch keine aktiven ZFNs entstehen. Daher wurden die beiden ZFN-Inserts aus den jeweiligen TOPO<sup>®</sup> Vektoren herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pcDNA<sup>™</sup> 3.1(-) integriert.

Der Expressionsvektor pcDNA<sup>™</sup> 3.1(-) hat eine Größe von 5427 bp. Er enthält ein Neomycin- (*NeoR*) und ein Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*) sowie eine multiple cloning site (MCS), in die das gewünschte GOI (das jeweilige ZFN-Insert) integriert wird. Die MCS befindet sich unter der Kontrolle eines *CMV* Promoters. Dieser erlaubt die hochgradige, effiziente Expression des in die MCS eingebauten GOI. Das nachgeschaltete bovine growth hormone Polyadenylierungssignal (BGH pA) ermöglicht eine korrekte Terminierung der Transkription und eine Polyadenylierung der mRNA.

Zur Identifikation von Klonen mit korrekt integriertem ZFN-Insert wurden die ZFN-pcDNA<sup>™</sup> 3.1(-) Plasmide mit dem Restriktionsenzym KpnI zerschnitten und in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Bei korrekter Orientierung des jeweiligen ZFN-Inserts im pcDNA<sup>™</sup> 3.1(-) Vektor waren in der Gelelektrophorese Banden der Größen 1000 bp und 5500 bp zu erwarten. Bei falscher Orientierung des jeweiligen ZFN-Inserts im pcDNA<sup>™</sup> 3.1(-) Vektor waren Banden der Größen 300 bp und 6200 bp zu erwarten. Bei Selbstligation des pcDNA<sup>™</sup> 3.1(-) Vektors war eine Bande von 6500 bp zu erwarten.

Die im Restriktionsverdau korrekt orientierten ZFN-pcDNA<sup>™</sup> 3.1(-) Plasmide wurden anschließend sequenziert. Dies diente dazu sicherzustellen, dass die Amplifizierung der ZFN-Inserts keine Sequenzänderung verursacht hatte. In der Sequenzierung konnte die ZFN-pcDNA<sup>™</sup> 3.1(-) in der Korrektheit ihrer Sequenz bestätigt werden.

Um zu überprüfen ob die ZFN-Plasmide nach Transfektion entsprechende aktive ZFNs exprimierten, wurde eine Proteinexpressionsanalyse durchgeführt. Diese ergab für beide ZFN-Expressionsplasmide, dass jeweils ein Protein der erwarteten Größe von etwa 40 kDa exprimiert wurde. Diese Proteine konnten zudem mit Hilfe von Western Blotting und Detektion mit einem Antikörper, der spezifisch das FLAG-tag der ZFN-Proteine erkennt, nachgewiesen werden (siehe Abb. 8). Das FLAG-tag ist eine bekannte Proteinsequenz, welche in den ZFN-Proteinen enthalten ist. Darüber hinaus zeigte der Western Blot, dass die Bande für die ZFN44 geringfügig höher verläuft als für ZFN28. Dies entspricht den leicht unterschiedlichen Größen der zwei ZFN, die mit 40,081 kDa für die ZFN28 und mit 40,427 kDa für die ZFN44 vorhergesagt waren, und zeigt die hohe Auflösungskapazität der hier gewählten Western Blot Strategie. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die mit ZFN-Plasmiden transfizierten Zellen die jeweilig korrekten ZFN-Proteine exprimieren.

Anhand der stabilen Transfektion von HEK293 Zellen mit dem AAVS1-CAGGS-EGFP-Plasmid lässt sich überprüfen, ob die gewählten Transfektionsbedingungen gut geeignet und



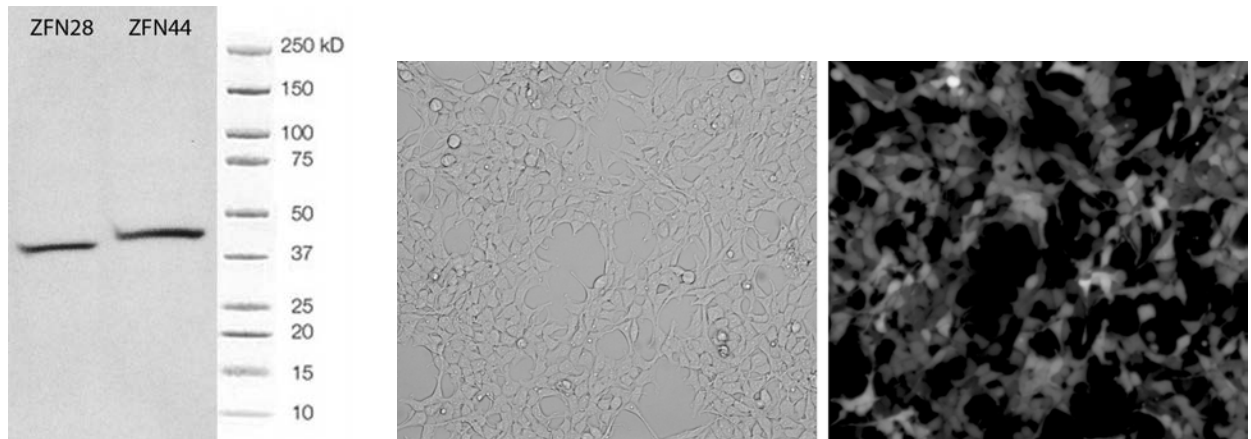


Abbildung 8: Links: Proteinexpressionsanalyse der ZFN-Proteine. Die exprimierten Proteine haben die erwarteten Größen von 40,081 kDa für ZFN28 und 40,427 kDa für ZFN44; Rechts: Mit dem AAVS1-CAGGS-EGFP-Plasmid stabil transfizierte HEK293 Zellen (rechts grün fluoreszierende Zellen des Klons E1, links Referenzaufnahme zur Kontrolle der Zelldichte, beides in 20-facher Vergrößerung).

ob die klonierten ZFN funktional sind. Hierbei zeigte sich, dass in zwei von drei Ansätzen positive, grün fluoreszierende Klone selektioniert werden konnten. Diese beiden Ansätze unterschieden sich in den verwendeten DNA-Mengen: Ansatz 1 mit 20  $\mu\text{g}$ , Ansatz 2 mit 10  $\mu\text{g}$  und Ansatz 3 mit 5  $\mu\text{g}$  DNA.

Im Ansatz 2 konnte der Klon F1 und im Ansatz 3 konnte der Klon E1 beispielhaft expandiert werden. Bei beiden Klonen zeigte sich, dass sie stabil das GFP exprimierten, was sich durch grünes Leuchten aller Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop äußerte (siehe Abb. 8). Darüber hinaus waren Zellen beider Klone resistent für Puromycin.

Bei Verwendung des AAVS1-CAGGS-EGFP-Plasmids ist die Expression des GFP nur möglich, wenn das Plasmid stabil in die DNA der Zelle integriert ist. Die Expression des Puromycin-Resistenzgens *PuroR* ist nur möglich bei Integration des Plasmids in den *AAVS1* Locus, da *PuroR* über den *PPP1R12C* Promoter des *AAVS1* Locus gesteuert wird. Deshalb zeigte dieser Versuch, dass die ZFN-Plasmide in der Zell-DNA aktiv einen DSB erzeugen. Zusätzlich zeigt er, dass das AAVS1-CAGGS-EGFP-Plasmid über die homologen Arme HAL und HAR in den *AAVS1* Locus integriert wird.

#### 4.4 Transfektion - Rate und Erfolg

Um die Transfektionsrate für die einzelnen Zelllinien zu überprüfen und entsprechend optimieren zu können, wurde für jeden Zelltyp eine transiente Transfektion mit dem pEGFP-N1-Plasmid durchgeführt. Als Transfektionsrate wird der prozentuale Anteil der vitalen Zellen verstanden, der nach der erfolgten Transfektion das *eGFP* Gen exprimiert und so das GFP-Protein herstellt.

Je nach Zellart variierte die Transfektionsrate. So war die Transfektionsrate bei den HEK293 Zellen etwas höher als bei den HepG2 Zellen und maßgeblich höher als bei den HUVEC Zellen (siehe Abb. 9). Diese Daten sind weitgehend vereinbar mit der Literatur. Zwar gibt es keine

direkten Vergleiche aller drei Zelltypen, jedoch beschreiben Zhang et al. für die Transfektion von HEK293 Zellen mit einem GFP-tragenden Expressionsvektor eine Effizienzrate von etwa 80 % [58]. Dabei wurde als Transfektionsmedium Lipofectamine™ 2000 verwendet.

Forgues et al. verwendeten den Nucleofector® von Amaxa für die Transfektion von HepG2 Zellen mit einem das Hepatitis-B-Virus-tragenden Plasmid und zeigten eine Transfektionseffizienz von etwa 64 % [59].

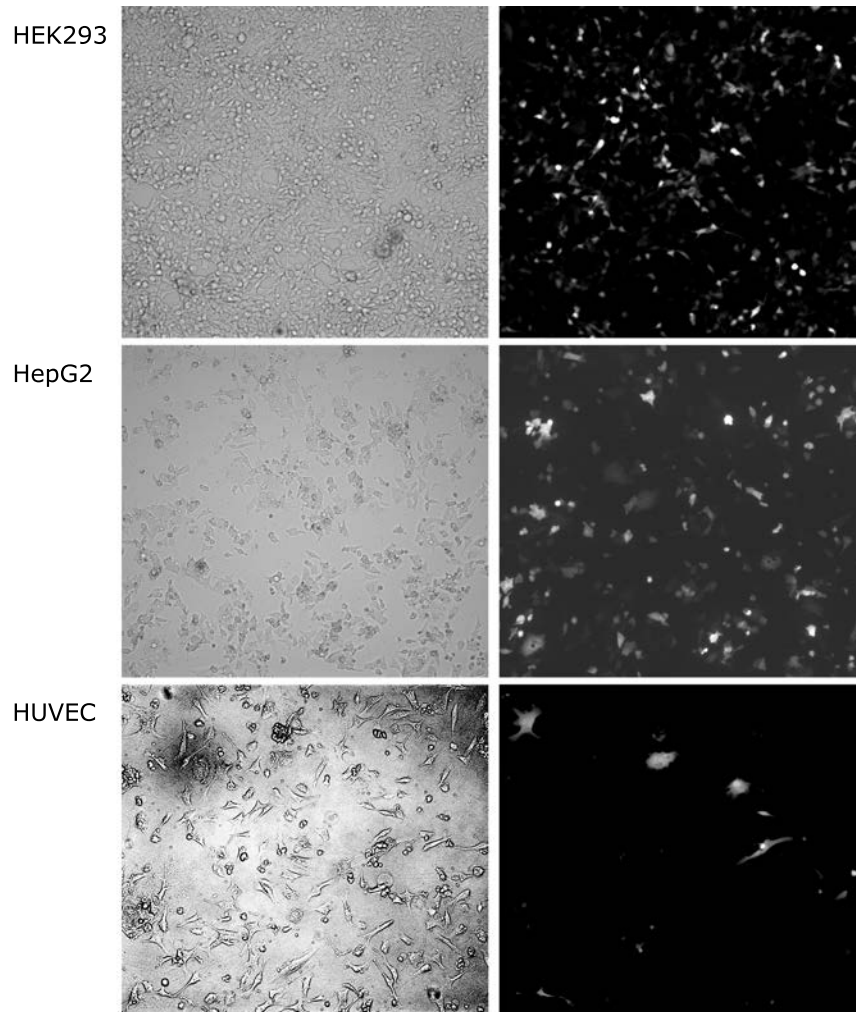


Abbildung 9: Oben: HEK293 Zellen 24h nach Transfektion mit eGFP-N1. Es sind viele vitale Zellen sichtbar und viele Zellen, die bei der Transfektion das GFP-Plasmid in ihr Zytoplasma aufgenommen haben; Mitte: HepG2 Zellen 19h nach Transfektion mit eGFP-N1. Es sind viele vitale Zelle sichtbar und viele Zellen, die bei der Transfektion das GFP-Plasmid in ihr Zytoplasma aufgenommen haben; Unten: HUVEC 24h nach Transfektion mit eGFP-N1. Es sind viele vitale Zellen sichtbar, jedoch konnten nur wenige das Plasmid erfolgreich in ihr Zytoplasma aufnehmen (alle drei in 10-facher Vergrößerung).

In ihren Untersuchungen von HUVEC Zellen zeigten Hunt et al. bei einer Transfektion der Zellen von GFP mittels Lipofectamine™ LTX eine Transfektionseffizienz von 25-41 % nach 24h und 21-25 % nach 48h [56]. Dies liegt somit deutlich unter der beschriebenen Transfektionsrate für HEK293 und HepG2 Zellen.

Somit sind Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vergleichbar mit denen anderer Publikationen: Die Transfektionsrate ist für HEK293 am höchsten, gefolgt von HepG2. HUVEC zeigten

die niedrigste Transfektionsrate aller untersuchten Zellen.

Aus der Transfektionsrate für das pEGFP-N1-Plasmid können Schlussfolgerungen auf die Transfektionsrate für die Vektoren AAVS1-LacZeo2 und AAVS1-M2rtTA gezogen werden. Dies erlaubte eine ungefähre Einschätzung der Transfektionsrate für die Durchführung der stabilen Transfektionen. Durch die Bestimmung der Transfektionsrate konnte weiterhin gezeigt werden, dass alle verwendeten Zelllinien erfolgreich mit einem gewählten Plasmid transfiziert werden und in nachweisbarer Menge Genprodukt bilden können.

#### 4.5 Nachweis stabiler Transfektion des AAVS1-LacZeo2-Vektors

Es musste sichergestellt werden, dass die Transfektion der einzelnen Zellen mit dem AAVS1-LacZeo2-Vektor zu einer stabilen Transfektion führt. Dies war notwendig für die Herstellung von Zelllinien mit im Zellgenom integrierter FRT-Site. Eine im Zellinneren frei vorliegende FRT-Site (in Form des AAVS1-LacZeo2-Plasmids) würde nach wenigen Zellzyklen von zelleigenen Enzymen abgebaut und hätte eine weitere Nutzung der FRT-Site für das FlpIn<sup>TM</sup>-System unmöglich gemacht.

Um Klone mit erfolgreicher stabiler Transfektion des AAVS1-LacZeo2-Vektors von anderen Zellen zu trennen, wurde eine Selektion mit Puromycin durchgeführt. Nur Klone, welche den AAVS1-LacZeo2-Vektor in ihre DNA integriert hatten, tragen ein Puromycin-Resistenzgen und exprimieren die Puromycin-N-Acetyl-Transferase (PAC). Diese inaktiviert das Puromycin und ermöglicht das Überleben und die Vervielfältigung der Klone mit stabil integriertem FRT-LacZeo2-Insert. Klone ohne stabil integriertes FRT-LacZeo2-Insert sterben ab.

Tabelle 15 zeigt die Bilanz der durchgeführten Transfektionen und daraus hervorgegangener Klone. So konnten aus vier Transfektionen von HEK293 Zellen mit dem AAVS1-LacZeo2-Vektor zahlreiche puromycinresistente Klone selektioniert werden. Davon konnten 37 Klone auf eine Größe heranwachsen, bei der sie von der Zellkulturplatte gepickt und weiter expandiert werden konnten. Insgesamt wurden 17 dieser Klone bis auf die Größe einer 10 cm Zellkulturplatte expandiert und davon schließlich 13 Klone kryokonserviert und deren DNA auf FRT-Integration analysiert.

	HEK293	HUVEC	HepG2
Transfektionen mit AAVS1-LacZeo	4	0	1
Gepickte Klone	37		20
Bis 10 cm Platte expandierte Klone	17		11
Kryokonservierung, DNA-Extraktion	13		11
Transfektionen mit AAVS1-LacZeo und M2rtTA	8	12	3
Gepickte Klone	72	17	38
Bis 10 cm Platte expandierte Klone	57	15	21
Kryokonservierung, DNA-Extraktion	33	9	17

Tabelle 15: Bilanz durchgeführter Transfektionen

Durch die komplexe Konstruktion des AAVS1-LacZeo2-Vektors ist davon auszugehen, dass das Puromycin-Resistenzgen (*PuroR*) nur dann exprimiert werden kann, wenn der Vektor in den *AAVS1* Locus integriert wurde. Dies beruht darauf, dass dem *PuroR* kein Promoter vorgeschaltet ist (vergleiche Abb. 4). *PuroR* benötigt einen fremden Promoter, um exprimiert zu werden. Hierfür wird bei korrekter Integration des FRT-LacZeo2-Inserts in den *AAVS1* Locus der *PPP1R12C* Promoter des *AAVS1* Locus verantwortlich. Eine stabile Integration des FRT-LacZeo2-Inserts an anderer Stelle im Genom mit korrektem Abstand zu einem anderen aktiven Promoter ist unwahrscheinlich.

Somit ist davon auszugehen, dass alle puromycinresistenten Klone, welche aus einer Transfektion mit dem AAVS1-LacZeo2-Vektor hervorgehen, mindestens in einem ihrer *AAVS1* Loci ein stabil integriertes FRT-LacZeo2-Insert tragen.

#### 4.6 Nachweis stabiler Transfektion des AAVS1-M2rtTA-Vektors

Zur Sicherstellung, dass die Transfektion der einzelnen Zellen mit dem AAVS1-M2rtTA-Vektor zu einer stabilen Integration des Vektors führt, wurde eine Antibiotika-Selektion der transfizierten Zellen durchgeführt. Die stabile Integration des M2rtTA-Inserts im Zellgenom ist notwendig für die Regulation der Genexpression mittels Tet-Repressor-System. Ein im Zellinneren frei vorliegendes AAVS1-M2rtTA-Plasmid würde nach wenigen Zellzyklen von zelleigenen Enzymen abgebaut und hätte eine weitere Nutzung für das Tet-Repressor-System unmöglich gemacht.

Um Klone mit erfolgreicher stabiler Transfektion des AAVS1-M2rtTA-Vektors von anderen Zellen zu trennen, wurde eine Selektion mit Geneticin (G418) durchgeführt. Nur Klone, welche den AAVS1-M2rtTA-Vektor in ihre DNA integriert hatten, trugen ein Neomycin-Resistenzgen (*NeoR*) und exprimierten die Aminoglykosid- 3'-Phosphotransferase. Diese inaktiviert die Aminoglykosid-Antibiotika G418 und Neomycin und ermöglicht das Überleben und die Vervielfältigung der Klone mit stabil integriertem M2rtTA-Insert. Klone ohne stabil integriertes M2rtTA-Insert sterben ab.

Da der AAVS1-M2rtTA-Vektor stets in Kombination mit dem AAVS1-LacZeo2-Vektor transfiziert wurde, wurde bei derartigen Kotransfektionen eine doppelte Antibiotikaselektion durchgeführt. Tabelle 15 zeigt die Bilanz der durchgeführten Transfektionen und daraus hervorgegangener Klone. So konnten aus 8 Kotransfektionen von HEK293 Zellen mit dem AAVS1-LacZeo2- und dem AAVS1-M2rtTA-Vektor zahlreiche puromycin- und geneticinresistente Klone selektioniert werden. Davon konnten 72 Klone auf eine Größe heranwachsen, bei der sie von der Zellkulturplatte gepickt und weiter expandiert werden konnten. Insgesamt wurden 57 dieser Klone bis auf die Größe einer 10 cm Zellkulturplatte expandiert und davon schließlich 33 Klone kryokonserviert und deren DNA auf FRT-LacZeo2- und die M2rtTA-Integration analysiert.

## 4.7 Nachweis korrekter FRT-Integration

Geht aus der Transfektion einer Zelllinie mit dem AAVS1-LacZeo2-Vektor ein puromycinresistenter Klon hervor, so bedeutet dies, dass das FRT-LacZeo2-Insert stabil in den *AAVS1* Locus dieser Zelle integriert wurde. Eine Zelle besitzt zwei *AAVS1* Loci. Eine Aussage darüber ob das FRT-LacZeo2-Insert in einen oder in beide *AAVS1* Loci integriert wurde, ist anhand der Puromycinresistenz des Klons nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit besteht Notwendigkeit darin, dass das FRT-LacZeo2-Insert nur in einen der beiden *AAVS1* Loci integriert wird. Dies muss durch weitere Analysen nachgewiesen werden.

Zudem ist neben einer Integration des FRT-LacZeo2-Inserts in den *AAVS1* Locus eine Fehlintegration an anderer Stelle im Genom der Zelle möglich. Dies muss durch weitere Analysen der Klone ausgeschlossen werden.

Die Überprüfung der aus den Transfektionen mit dem AAVS1-LacZeo2-Vektor und den Plasmiden ZFN28 und ZFN44 hervorgegangenen Klone erfolgt mehrschrittig. Zunächst wurden die HAR- und die HAL-PCR mit anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte durchgeführt. Damit konnte verifiziert werden, dass das FRT-LacZeo2-Insert in den *AAVS1* Locus integriert wurde. Abbildung 10C zeigt eine schematische Darstellung zur Lokalisation der in der PCR replizierten Abschnitte.

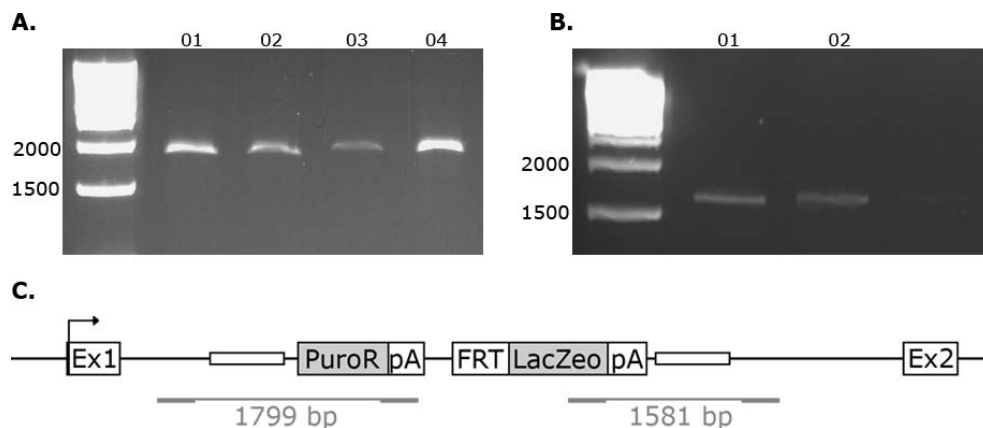


Abbildung 10: Nachweis der Integration der FRT-Site in den *AAVS1* Locus mittels PCR: A. HAL-PCR mit erwarteter Bande bei 1799 bp bei korrekter Integration der FRT-Site in den *AAVS1* Locus; B. HAR-PCR mit erwarteter Bande bei 1581 bp bei korrekter Integration der FRT-Site in den *AAVS1* Locus; in A. und B. sind für alle abgebildeten Klone Banden der erwarteten Größe zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass bei diesen Klonen die Integration des FRT-LacZeo2-Inserts in den *AAVS1* Locus korrekt stattgefunden hat; C. Schematische Darstellung der Lage der PCR-Primer im *AAVS1* Locus mit korrekt integriertem Insert.

Wurde das FRT-LacZeo2-Insert in den *AAVS1* Locus integriert, so entsteht bei der Durchführung einer HAR-PCR mit der DNA des entsprechenden Klons ein PCR-Produkt von 1581 bp (Abb. 10A). In der HAL-PCR entsteht ein PCR-Produkt von 1799 bp (Abb. 10B). Durch die anschließende Sequenzierung des jeweiligen PCR-Produktes kann die Übereinstimmung der Sequenzen nachgewiesen werden. Die Durchführung der HAR-PCR und der HAL-PCR dient dem Ausschluss von Klonen, welche kein FRT-LacZeo2-Insert in ihrem *AAVS1* Locus tragen und welche lediglich durch Fehlintegration des FRT-LacZeo2-Inserts eine Puromy-

cinresistenz erhalten haben. Entsteht bei der HAR- und der HAL-PCR ein PCR-Produkt erwarteter Größe und zeigt sich in der Sequenzierung die erwartete Sequenz, so bedeutet dies, dass in den analysierten Klonen das FRT-LacZeo2-Insert in mindestens einen *AAVS1* Locus korrekt integriert wurde. Dabei lässt sich jedoch nicht zwischen heterozygoter und homozygoter Integration der FRT-Site in den *AAVS1* Locus unterscheiden. Zudem können zusätzliche Fehlintegrationen des FRT-LacZeo2-Inserts nicht ausgeschlossen werden.

Zur weiteren Differenzierung zwischen homo- und heterozygoter Integration des FRT-LacZeo2-Inserts in den *AAVS1* Locus wurde ein Southern Blot durchgeführt. Hierfür wurde die DNA des jeweiligen Klons mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* verdaut. Die DNA-Stücke wurden in einem Gel der Größe nach aufgetrennt und mit einer Sonde markiert. Anhand der im Blot entstehenden Banden kann auf die Integration des Inserts in das Zellgenom geschlossen werden. Abbildung 11 zeigt eine schematische Darstellung der Lage der einzelnen Sonden im *AAVS1* Locus. Dabei sind die Sonden so gewählt worden, dass nach dem Verdau mit *EcoRV* und der Sondenmarkierung die entstehenden Banden gut voneinander abzugrenzen sind. Die 3'AAV-Sonde markiert einen Bereich im *AAVS1* Locus, welcher kurz vor dem Exon 2 gelegen und somit sowohl im Wildtyp als auch bei der Integration eines Inserts (FRT-LacZeo2- oder M2rtTA-Insert) vorhanden ist. Bei Verwendung der 3'AAV-Sonde lässt sich zwischen Wildtyp, heterozygoter und homozygoter Integration des FRT-LacZeo2-Inserts in den *AAVS1* Locus unterscheiden (Abb. 11D).

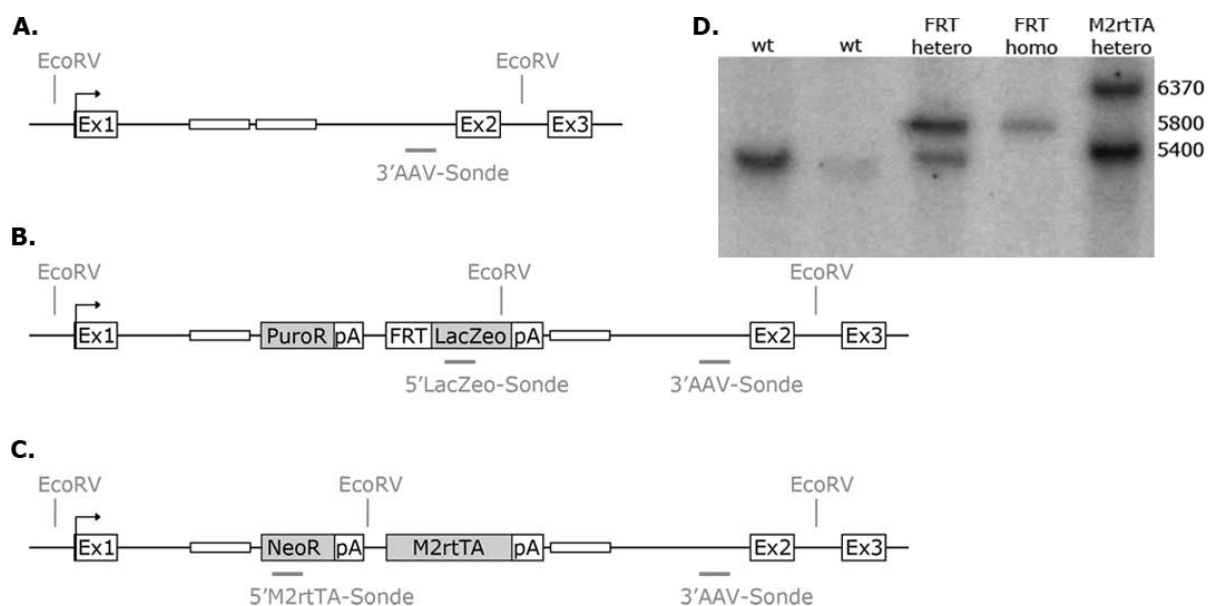


Abbildung 11: Nachweis der Integration der FRT-Site in den *AAVS1* Locus mittels Southern Blot: A-C. Schematische Darstellung der Lage der Southern Blot-Sonden und der Schnittstellen des Restriktionsenzym *EcoRV*. D. Southern Blot mit 3'AAV-Sonde zeigt verschiedene Banden je nach Integration des Inserts in den *AAVS1* Locus, wt = Wildtyp (*AAVS1* Locus ohne Insert), FRT hetero = heterozygote Integration des FRT-LacZeo2-Inserts in den *AAVS1* Locus, FRT homo = homozygote Integration des FRT-LacZeo2-Inserts in den *AAVS1* Locus, M2rtTA hetero = heterozygote Integration des M2rtTA-Inserts in den *AAVS1* Locus.

Die 5'LacZeo2-Sonde markiert einen Bereich im FRT-LacZeo2-Insert. Dieser Bereich ist beim Wildtyp nicht vorhanden und kann deshalb bei der Markierung mit der 5'LacZeo2-

Sonde beim Wildtyp keine Bande im Southern Blot erzeugen. Durch die Verwendung der 5'LacZeo2-Sonde lassen sich neben der korrekten Integration des FRT-LacZeo2-Inserts in den *AAVS1* Locus zusätzlich Integrationen außerhalb des *AAVS1* Locus identifizieren. Abbildung 12 zeigt einen beispielhaften Southern Blot für einen Klon mit heterozygoter Integration des FRT-LacZeo2-Inserts in den *AAVS1* Locus. Bei der Markierung des Klons mit der 3'AAV-Sonde entstehen zwei Banden: eine Wildtyp-Bande von 5400 bp und eine LacZeo2-Integrationsbande von 5800 bp (siehe Abb. 12 oben). Bei der Markierung des Klons mit der 5'LacZeo2-Sonde entsteht beim Wildtyp keine Bande. Bei korrekter LacZeo2-Integration in den *AAVS1* Locus zeigt sich eine Bande bei 4770 bp (siehe Abb. 12 unten). Dies bedeutet, dass der analysierte Klon das FRT-LacZeo2-Insert in genau einen seiner beiden *AAVS1* Loci stabil integriert hat. Da sich bei der Markierung mit der 5'LacZeo2-Sonde keine zusätzlichen Banden zeigen, sind Fehlintegrationen des FRT-LacZeo2-Inserts für den analysierten Klon ausgeschlossen.

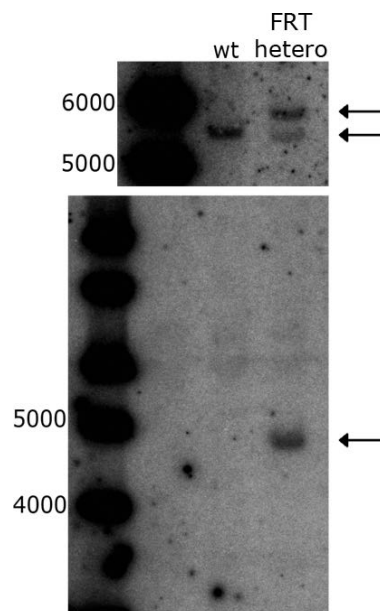


Abbildung 12: Nachweis der Integration des FRT-LacZeo2-Inserts in den *AAVS1* Locus mittels Southern Blot: Oben zeigt die Markierung mittels 3'AAV-Sonde eine Bande von 5400 bp beim Wildtyp (wt, *AAVS1* Locus ohne Insert), für die heterozygote Integration der FRT-Site in den *AAVS1* Locus zeigt sich eine wt-Bande (5400 bp) und eine 5800 bp Bande. Unten zeigt die Markierung mittels 5'LacZeo2-Sonde beim wt keine Bande. Beim Klon mit der heterozygoten FRT-Site-Integration zeigt sich eine Bande bei 4770 bp. Pfeile dienen der Verdeutlichung der Banden.

Es konnte festgestellt werden, dass für jeden transfizierten Zelltyp der Transfektionserfolg der FRT-Site unterschiedlich ist. Tabelle 16 zeigt für die einzelnen Zelllinien die Integrationen der FRT-Site in den *AAVS1* Locus. Es zeigte sich für die HUVEC Zellen, dass von den sieben analysierten Klonen drei heterozygot und einer homozygot für die Integration der FRT-Site in den *AAVS1* Locus waren. Drei Klone hatten die FRT-Site wie gewünscht einmalig in den *AAVS1* Locus ohne weitere Fehlintegrationen eingebaut. Somit ist die korrekte einmalige Integration der FRT-Site in den *AAVS1* Locus mit HUVEC Zellen gelungen.

Dagegen zeigte sich für die HEK293 Zellen ein anderer Transfektionserfolg. Trotz einer

	HEK293	HUVEC	HepG2
Analysierte Klone	32	7	29
FRT-Site in 1 <i>AAVS1</i> Locus	7	3	2
FRT-Site in 2 <i>AAVS1</i> Loci	2	1	0
FRT-Site-Einfachintegration in 1 <i>AAVS1</i> Locus ohne weitere FRT-Site-Integrationen	0	3	0
andere FRT-Site-Integrationen in die Zielzelle	15	0	21
keine FRT-Site nachgewiesen	8	0	6

Tabelle 16: Integration der FRT-Site in den *AAVS1* Locus

deutlich höheren Zahl an durchgeführten Transfektionen und daraus hervorgegangenen und expandierten Klonen (Tab. 15) zeigten nur sieben Klone eine heterozygote Integration der FRT-Site in den *AAVS1* Locus (Tab. 16). Von diesen Klonen wiesen jedoch alle zusätzliche Integration der FRT-Site außerhalb des *AAVS1* Locus auf. Außerdem stellte sich bei acht puromycinresistenten analysierten Klonen ein Fehlen der FRT-Site heraus. Dies wirft die Frage auf wie diese Klone eine Puromycinresistenz erhalten haben ohne das FRT-LacZeo2-Insert stabil zu integrieren. Insgesamt konnte bei den HEK293 Zellen somit keine gewünschte einmalige Integration der FRT-Site in den *AAVS1* Locus (ohne weitere Fehlintegrationen) nachgewiesen werden.

Für die HepG2 Zellen zeigte sich mit 21 von 29 analysierten Klonen eine vergleichbar hohe Rate an Fehlintegrationen der FRT-Site wie bei HEK293. Jedoch wiesen zwei HepG2-Klone eine heterozygote Integration der FRT-Site im *AAVS1* Locus auf. Somit ist die korrekte einmalige Integration der FRT-Site in den *AAVS1* Locus mit HepG2 Zellen gelungen.

Bei der Berechnung der Rekombinationsrate für die einzelnen Zelllinien ergeben sich deutliche Unterschiede. Tabelle 17 zeigt eine Übersicht. Dabei richtet sich für HEK293 und HUVEC die Berechnung der Anzahl der pro Transfektion verwendeten Zellzahl nach den offiziellen Angaben von Invitrogen bezüglich Anzahl vitaler Zellen auf einer Zellkulturplatte bei 100 % Konfluenz und nach der Annahme, dass die Zellen bei Transfektion eine Konfluenz von mindestens 50 % aufwiesen.

Zelllinie	HEK293	HUVEC	HepG2
Transfektionen	12	12	4
Zellen pro Transfektion	$4,4 \times 10^6$	$0,6 \times 10^6$	$10^6$
Analysierte Klone	32	7	29
Klone mit FRT-Integration im <i>AAVS1</i> Locus	9	4	2
maximale Rekombinationsrate	$1,7 \times 10^{-5}$	$5,5 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$

Tabelle 17: Berechnete maximale Rekombinationsrate je nach Zelltyp

Bei der Transfektion der embryonalen Stammzellen (ES Zellen) in Kooperation mit der AG Siemens konnte gezeigt werden, dass bei der Einfachtransfektion der Zellen mit dem *AAVS1*-LacZeo2-Plasmid das FRT-LacZeo2-Insert korrekt in den *AAVS1* Locus integriert wurde. Von 27 aus der Transfektion gewonnenen ES Klonen konnte für acht Klone die kor-



rekte und einmalige Integration der FRT-Site gezeigt werden.

Für die Transfektion von SH-S5SY, SW620 und HPAF in Kooperation mit der AG Landthaler sowie für MCF-7 Zellen in Kooperation mit der AG Löwer lagen zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorliegenden Arbeit noch keine eindeutigen Ergebnisse vor.

Somit konnte gezeigt werden, dass die homologe Integration der FRT-Site in alle drei verwendeten Zelllinien (HEK293, HUVEC, HepG2), ebenso in die ES Zellen möglich ist. Es konnten einzelne Klone identifiziert werden, bei denen die FRT-Site korrekt und einmalig in einen der beiden *AAVS1* Loci integriert wurde. Dies zeigt, dass sich mit Hilfe des *AAVS1*-LacZeo2-Plasmids erfolgreich die FRT-Site in den *AAVS1* Locus integrieren lässt.

#### 4.8 Nachweis korrekter Tet-Repressor-Integration

Geht aus der Transfektion einer Zelllinie mit den Vektoren *AAVS1*-LacZeo2 und *AAVS1*-M2rtTA ein puromycin- und geneticinresistenter Klon hervor, so bedeutet dies, dass das FRT-LacZeo2-Insert stabil in den einen und das M2rtTA-Insert stabil in den anderen *AAVS1* Locus dieser Zelle integriert wurde. Das FRT-LacZeo2-Insert trägt ein Puromycin-Resistenzgen, das M2rtTA-Insert ein Neomycin-Resistenzgen. Diese ermöglichen in Anwesenheit von Antibiotika das Überleben von Klonen mit korrekter Integration der Inserts. Neben dieser Integration sind jedoch Fehlintegrationen der beiden Inserts an anderer Stelle im Genom der Zelle möglich. Diese müssen durch weitere Analysen der Klone ausgeschlossen werden.

Hierfür wurde auf die Konstruktion einer speziellen PCR ähnlich der HAR- und der HAL-PCR verzichtet. Die Analyse der Klone erfolgte durch eine Sondenmarkierung im Southern Blot. Die DNA des jeweiligen Klons wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV verdaut. Die DNA-Stücke wurden in einem Gel der Größe nach aufgetrennt und mit einer Sonde markiert. Anhand der im Blot entstehenden Banden kann auf die Integration der Inserts geschlossen werden. Abbildung 11 zeigt eine schematische Darstellung der Lage der einzelnen Sonden im *AAVS1* Locus. Bei Verwendung der 3'AAV-Sonde lässt sich zwischen Wildtyp und der Integration des LacZeo2- bzw. des M2rtTA-Inserts in den *AAVS1* Locus unterscheiden (Abb. 11D).

Die 5'M2rtTA-Sonde markiert einen Bereich im M2rtTA-Insert. Dieser Bereich ist beim Wildtyp nicht vorhanden und kann deshalb bei der Markierung mit der 5'M2rtTA-Sonde keine Bande im Southern Blot erzeugen. Durch die Verwendung der 5'M2rtTA-Sonde lassen sich neben der korrekten Integration des M2rtTA-Inserts in den *AAVS1* Locus zusätzlich Integrationen außerhalb des *AAVS1* Locus identifizieren.

Abbildung 11D zeigt einen beispielhaften Southern Blot für einen Klon mit heterozygoter Integration des M2rtTA-Inserts in den *AAVS1* Locus. Bei der Markierung des Klons mit der 3'AAV-Sonde entstehen zwei Banden: eine Wildtyp-Bande von 5400 bp und eine M2rtTA-Integrationsbande von 6370 bp (siehe Abb. 11D). Bei der Markierung des Klons mit der 5'M2rtTA-Sonde entsteht beim Wildtyp keine Bande. Bei korrekter M2rtTA-Integration in

den *AAVS1* Locus zeigt sich eine Bande von 3560 bp (Abbildung nicht dargestellt). Dies bedeutet, dass der analysierte Klon das M2rtTA-Insert in genau einen seiner beiden *AAVS1* Loci stabil integriert hat. Zeigen sich bei der Markierung mit der 5'M2rtTA-Sonde keine zusätzlichen Banden, sind Fehlintegrationen des M2rtTA-Inserts für den analysierten Klon ausgeschlossen.

Bei der Analyse der puromycin- und geneticinresistenten Klone zeigten sich unterschiedliche Integrationen für die einzelnen transfizierten Zelllinien. Tabelle 18 zeigt die Bilanz der analysierten Klone.

	HEK293	HUVEC	HepG2
Analysierte Klone	24	7	18
M2rtTA in 1 <i>AAVS1</i> Locus	7	0	3
M2rtTA in 2 <i>AAVS1</i> Loci	0	0	0
M2rtTA-Einfachintegration in 1 <i>AAVS1</i> Locus ohne weitere M2rtTA-Integrationen	0	0	0
andere M2rtTA-Integrationen in die Zielzelle	9	0	3
kein M2rtTA nachgewiesen	8	7	12

Tabelle 18: Integration des Tet-Repressors M2rtTA in den *AAVS1* Locus

Bei HEK293 und HepG2 konnte das M2rtTA-Insert in den *AAVS1* Locus integriert werden (Tab. 18): Bei 7 von 24 analysierten HEK293 Klonen konnte eine heterozygote Integration des M2rtTA-Inserts in den *AAVS1* Locus nachgewiesen werden. Bei den HepG2 Zellen zeigten 3 von 18 analysierten Klonen eine heterozygote Integration des M2rtTA-Inserts in den *AAVS1* Locus. Für keinen der HUVEC Klone konnte eine Integration des M2rtTA-Inserts in den *AAVS1* Locus nachgewiesen werden. Zudem konnte für keinen Zelltyp (HEK293, HUVEC, HepG2) eine korrekte einmalige Integration des M2rtTA-Inserts in den *AAVS1* Locus gezeigt werden, da neben der korrekten Integration des Inserts stets Fehlintegrationen nachweisbar waren.

Für die ES Zellen lagen zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorliegenden Arbeit noch keine Ergebnisse bezüglich der Integration des M2rtTA-Inserts vor.

Bei den untersuchten SH-S5SY Klonen konnte ebenfalls kein Klon identifiziert werden, der das M2rtTA-Insert einmalig in den *AAVS1* Locus integriert hätte. Zwar waren vereinzelt Klone mit M2rtTA-Integration in den *AAVS1* Locus nachweisbar, jedoch wiesen diese Klone neben der korrekten Integration weitere Fehlintegrationen des M2rtTA-Inserts auf.

Insgesamt konnte die Durchführbarkeit der Methode demonstriert und erfolgreiche Ergebnisse erzielt werden.

## 4.9 Nachweis der Funktionalität der FRT-Site in Zellen mit stabil integrierter FRT-Plattform

Um zu zeigen, dass die am *AAVS1* Locus eingebaute Integrationsplattform tatsächlich funktional ist und einen Flp Rekombinase-mediierten DNA-Einbau an der FRT-Site ermöglicht, wurde dies am Beispiel eines FRT-HEK293-Klons nachgewiesen. Dazu wurden HEK293 Zellen, die eine Integration des *AAVS1*-LacZeo2-Donor-Plasmids in beiden *AAVS1* Allelen zeigten, gemäß dem Transfektionsprotokoll für das FlpIn<sup>TM</sup>-System von Invitrogen mit den Vektoren pOG44 und pFRT-GFP transfiziert und anschließend mit 100 µg/ml Hygromycin selektioniert. Der FlpIn<sup>TM</sup>-Mechanismus ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Daraus ist erkennbar, dass unmittelbar Upstream der FRT-Site ein *SV40* Promoter und ein ATG liegen. Das Hygromycin-Resistenzgen ist Bestandteil des pFRT-GFP Vektors. Erfolgt eine ortsspezifische (site-specific) Integration eines Vektors wie z.B. des pFRT-GFP über die FRT-Site in das Genom der Zelle, so wird das Hygromycin-Resistenzgen in frame mit dem ATG integriert und unter die Kontrolle des *SV40* Promoters gestellt. Das GFP dagegen steht unter der Kontrolle eines *CMV* Promoters. Damit ist gewährleistet, dass unter der Hygromycin-Selektion nur solche Zellen überleben, bei denen eine ortsspezifische Integration des Vektors über die FRT-Site stattgefunden hat.

Innerhalb von vier Wochen nach Transfektion zeigten sich unter Selektion Kolonien vitaler Zellen, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop grün fluoreszierten. Abbildung 13 zeigt ein Beispiel für eine derartige Kolonie. Dies zeigte, dass die Zellen den pFRT-GFP-Vektor stabil in ihr Genom integriert haben und nun kontinuierlich GFP exprimieren.

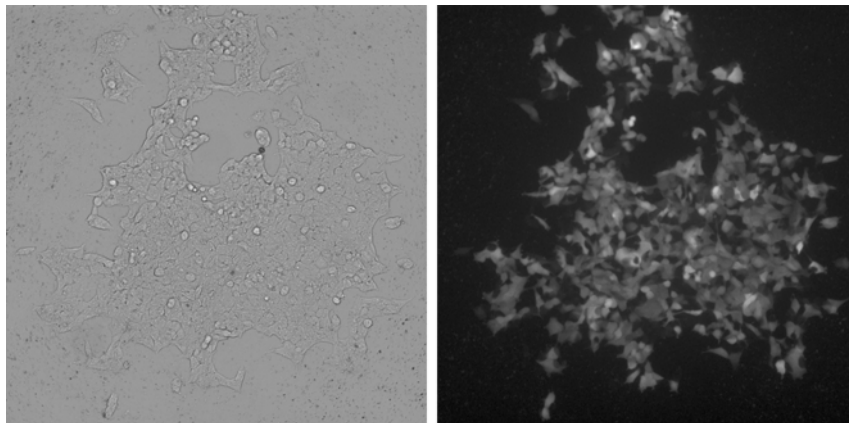


Abbildung 13: FRT-HEK293 Zellen nach Transfektion mit den Vektoren pOG44 und pFRT-GFP gemäß FlpIn<sup>TM</sup>-System und Selektion mit Hygromycin über 4 Wochen. Es sind viele vitale Zelle sichtbar, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop grün fluoreszieren. Dies bedeutet, dass die Zellen den pFRT-GFP stabil in ihr Genom integriert haben und kontinuierlich GFP exprimieren (in 10-facher Vergrößerung).

Dabei ist davon auszugehen, dass alle hygromycinresistenten und fluoreszierenden Zellen das GFP-Insert via ortsspezifischer Integration in ihr Genom eingebaut haben. Dies bedeutet, dass die am *AAVS1* Locus eingebaute FRT-Site funktionell ist.

Damit konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass unter Verwendung des kom-

plexen AAVS1-LacZeo2-Vektors und der ZFN-Plasmide ZFN28 und ZFN44 eine Zelllinie mit FRT-Site im *AAVS1* Locus generiert werden kann. Diese FRT-Site kann nun wie gewünscht über den genaueren und effektiveren Mechanismus der ortsspezifischen Integration angesteuert werden und ein GOI (z.B. *GFP*) über die FRT-Site stabil in das Genom der FRT-Zelle integriert werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Relevanz der Fragestellung

Weltweit stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache dar. Die Therapie besteht bisher in der Reduktion von Risikofaktoren und der Kontrolle von Symptomen. Neben gut erforschten, wenngleich seltenen monogenetischen Ursachen stellt der Bereich der polygenetischen Herz-Kreislaufkrankungen ein bisher unzureichend erschlossenes Gebiet dar. Ein Schwerpunkt aktueller Forschung ist die Entdeckung und Untersuchung von Kandidatengen und deren Interaktion untereinander als mögliche kardiovaskuläre Risikofaktoren. Hierfür werden in der experimentellen Genetik und in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) große Genommengen sequenziert und analysiert. Mit zunehmender Identifizierung und Untersuchung von Kandidatengen steigt auch das Interesse an Gentherapie als kurativer Ansatz für die Behandlung von Herz-Kreislaufkrankungen.

Für die fortführende Untersuchung identifizierter Kandidatengene hat sich die Zellkultur etabliert und ist aktuell eine der wichtigsten Methoden zur Erforschung medizinisch-naturwissenschaftlicher Fragestellungen. Bisher konnte sie durch keine andere Methode ersetzt werden.

Therapeutisch finden Zellen bereits seit Jahrzehnten Einsatz in der Medizin, so bei Bluttransfusionen oder Organtransplantationen. Auch gibt es schon seit langem verschiedene Ansätze für die Entwicklung einer Gentherapie für nicht heilbare oder besonders schwerwiegende Erkrankungen, wobei sich noch keine Methode durchsetzen konnte. Als Zukunftsperspektive wäre eine Gentherapie durch gezielt genetisch veränderte Zellen denkbar und von großem Interesse.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen eine Methode zur Entwicklung von Zellpanels zu entwickeln, welche für die Untersuchung von Kandidatengen verwendet werden können. Das entwickelte System wurde anhand einzelner humaner Zelllinien demonstriert.

### 5.2 Experimentelles System

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Tool für das gezielte Einbringen eines zu untersuchenden Gens (gene of interest, GOI) in einen vordefinierten Locus der humanen Zelle, den *AAVS1* Locus auf Chromosom 19, vorgestellt.

Zunächst wurde gezeigt, dass alle verwendeten Zelllinien den *AAVS1* Locus in ihrem Genom enthalten und die erforderliche ZFN-Erkennungssequenz aufweisen. Es wurden ZFN-Expressionsplasmide hergestellt und gezeigt, dass diese in ihrer Sequenz korrekt sind und ZFNs korrekter Größe und Funktion exprimieren. Außerdem wurde gezeigt, dass unter Anwendung der hergestellten ZFN-Plasmide ein GFP-Insert mittels homologer Rekombination (HR) in den *AAVS1* Locus eingeschleust und anschließend exprimiert werden kann.

Es wurde demonstriert, dass es möglich ist das hochkomplexe *AAVS1*-LacZeo2-Donor-

Plasmid herzustellen und unter Zuhilfenahme von ZFNs in den *AAVS1* Locus verschiedener Zelllinien zu integrieren. Hierbei wurden bei der Konstruktion des Plasmids mehrere Regulationsmechanismen eingebaut, um die korrekte Integration des FRT-LacZeo2-Inserts in den *AAVS1* Locus präziser zu erzielen. Einer dieser Mechanismen ist die Verwendung eines promoterlosen Resistenzgens im Insert und die Selektion der transfizierten Zellen mit Antibiotika. DeKolver et al. demonstrierten 2011 die Integration eines promoterlosen GOI in den *AAVS1* Locus [26]. Bei korrekter Integration wurde dem GOI der aktive *PPP1R12C* Promoter vorgeschaltet und das GOI somit exprimiert. Hierdurch ließen sich Klone mit korrekter Integration des Inserts identifizieren. DeKolver et al. demonstrierten die Methode auch anhand zweier nacheinander geschalteter GOI, von denen das erste ein promoterloses Resistenzgen, das zweite ein promoterkontrolliertes GFP-Gen war [26].

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode noch zusätzlich ausgeweitet. So wurden im *AAVS1*-LacZeo2-Plasmid ebenfalls zwei nacheinander geschaltete GOI vereint. Hierbei stellte das erste ein promoterloses Puromycin-Resistenzgen dar und das zweite die vom *SV40* Promoter kontrollierte FRT-Site als Integrationsplattform.

Diese Integrationsplattform bietet einen entscheidenden Vorteil im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten. Zwar muss für die Erschaffung der FRT-Zelllinie zu Beginn viel Aufwand betrieben werden, jedoch eröffnet eine erfolgreich generierte FRT-Zelllinie anschließend verbesserte Möglichkeiten für die Integration eines zu untersuchenden GOI in den *AAVS1* Locus. Die FRT-Zelllinie besitzt eine aktiv exprimierte FRT-Site im *AAVS1* Locus. Diese kann fortan bequem mittels ortsspezifischer Rekombination via FlpIn<sup>TM</sup>-System angesteuert werden, sodass ein beliebiges GOI in den *AAVS1* Locus integriert werden kann. Somit kann auf homologe Rekombination, deren Erfolgsrate deutlich niedriger ist als die der ortsspezifischen Rekombination, verzichtet werden. In anderen Arbeiten wurde dagegen jedes GOI einzeln und mühsam über homologe Rekombination in den *AAVS1* Locus eingebracht.

Ein weiterer Vorteil der Integrationsplattform ist die Vergleichbarkeit der einzelnen Zelllinien untereinander. Da die erzeugten Zelllinien die FRT-Site stets nur im *AAVS1* Locus enthalten, können zwei derartige Zelllinien nach Integration desselben GOI via FRT-Site in deren *AAVS1* Locus miteinander verglichen werden und die Funktion des zu analysierenden GOI in verschiedenen Zelllinien untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode erfolgreich an verschiedenen humanen Zelllinien des kardiometabolischen Systems demonstriert. Die Ausweitung der Methode auf weitere Zelllinien wird Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

Die Auswahl von Plasmiden als Vektoren und des *AAVS1* Locus als Integrationsort bietet einen entscheidenden Vorteil gegenüber vorangegangenen Arbeiten, die sich mit der stabilen Integration einer Integrationsplattform ins Zellgenom beschäftigen. So integrierten Khandelia et al. 2011 zwar ebenfalls eine Integrationsplattform (Cre-*loxP*-System) in mehrere Zelllinien, jedoch verwendeten sie lentivirale Vektoren [24]. Diese Vektoren bauen sich willkürlich in das Genom der Zielzelle ein und erzeugen so eine Integrationsstelle (*loxP*-Site) für das

spätere Einschleusen eines GOI mittels ortsspezifischer Integration. Dieser willkürliche Einbau der Vektoren ist nicht steuerbar und der Integrationsort des Vektors ist nicht bekannt. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die Integrationsstelle je nach Zelltyp unterschiedlich ist. Dadurch sind einzelne derartig hergestellte Zellen nicht untereinander vergleichbar.

Der Vorteil von Plasmiden gegenüber viralen Vektoren ist deren einfache Vervielfältigung und Verwendung, wenngleich dies zu Lasten der Transfektionseffizienz geht. Dagegen haben virale Vektoren den Nachteil, dass sie bei der Herstellung einen geringen Titer liefern und eine Immunantwort induzieren können. Letzteres macht virale Vektoren für therapeutische Anwendungen ungeeignet.

Auch Ramachandra et al. integrierten 2011 *loxP*-Sites in den *AAVS1* Locus von hESCs. Dabei bedienten sie sich der HR und zeigten die heterozygote Modifikation des *AAVS1* Locus beispielhaft für 3 von 39 Klonen [27]. Für die Integration eines Gens über ortsspezifische Integration nutzten sie baculovirale Vektoren [27]. Sie zeigten somit einen ähnlichen Ansatz. Dabei erwies sich deren Rekombinationsrate als äußerst niedrig: Bei  $2 \times 10^6$  transfizierten Zellen konnten nach Antibiotikaselektion maximal 18 Klone hervorgebracht werden, von denen maximal vier in der PCR positiv waren. Somit beträgt die Rekombinationsrate bei der Methode von Ramachandra et al. höchstens  $0,2 \times 10^{-5}$  [27]. Im Vergleich dazu liegt die Rekombinationsrate der vorliegenden Arbeit mit zwischen  $1,7 \times 10^{-5}$  und  $5,5 \times 10^{-5}$  je nach Zelltyp deutlich höher (vergleiche Tab. 17). Dieser Unterschied ist darin zu erklären, dass Ramachandra et al. keine ZFNs verwendeten und somit auf das gezielte Setzen eines DSBs verzichteten.

Obwohl die Rekombinationsrate der Methode in der vorliegenden Arbeit höher ist als bei Ramachandra et al. zeigt sich wie schwierig sich die Integration eines Inserts via HR gestaltet. In der vorgestellten Methode wies das verwendete Plasmid lange homologe Arme auf, es wurde ein gezielter DSB mittels ZFNs gesetzt und ein promoterloses Resistenzgen gezielt an den *PPP1R12C* Promoter gekoppelt, um über die Antibiotikaresistenz positive Klone zu selektionieren. Dennoch zeigte sich eine relativ niedrige Ausbeute an positiven Klonen. Dies bestärkt die Notwendigkeit einer Integrationsplattform wie der FRT-Site.

DeKolver et al. 2010 transfizierten hESCs gleichzeitig mit zwei verschiedenen Donor-Plasmiden. Sie selektionierten die Zellen zeitgleich mit zwei verschiedenen Antibiotika und demonstrierten neben der separaten Ansteuerung beider *AAVS1* Loci auch die Expressionsinduktion über M2rtTA und Doxycyclin [26]. Bei der Anwendung dieser Methode auf die Zellen der vorliegenden Arbeit ließen sich diese Ergebnisse nicht reproduzieren. Das M2rtTA-Insert zeigte zahlreiche Fehlintegrationen, Mehrfachintegrationen und selten korrekte Integrationen in den *AAVS1* Locus. Dies ist durch die Art der verwendeten Zelllinien zu erklären: DeKolver nutzte hESCs [26], in der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf differenzierte Zelllinien gelegt. Unterschiede in Rekombinationsraten lassen sich unter anderem auf die unterschiedlichen Zelleigenschaften zurückführen. So können je nach Zelltyp der epigenetische Zustand des *AAVS1* Locus und zelleigene DNA-Reparaturmechanismen sowie

ZFN-Expressionslevel unterschiedlich sein.

DeKolver et al. zeigten 2010 bei der Integration eines GOI in den *AAVS1* Locus somatischer Zellen (u.a. HEK293) geringere Transfektionsraten als in ihren Transfektionen von hESCs und iPS Zellen von 2009 (vergleiche Hockemeyer et al. 2009 [44]). Insgesamt konnten nur etwa 3 % der HEK293 Zellen ein GFP-Gen mittels HR stabil integrieren [26]. Dies unterstreicht erneut die geringe homologe Rekombinationsrate somatischer Zellen und die Notwendigkeit einer Integrationsplattform. Van Rensburg et al. zeigten 2012 in einer Untersuchung des *AAVS1* Locus in humanen ES und iPS Zellen deren deutliche Unterschiede zu differenzierten somatischen Zellen auf: Humane ES und iPS haben eine offenere Chromatinstruktur, sind transkriptionell hyperaktiv und dadurch leichter für Genmanipulationen zugänglich als differenzierte somatische Zellen [39]. Dies erklärt die Unterschiede in der Transfektionsrate zwischen der vorliegenden Arbeit und den Experimenten von DeKolver et al.

Ähnliche Ergebnisse lieferten auch die in Kooperation mit der AG Siemens durchgeführten Transfektionen von ES Zellen mit den Plasmiden *AAVS1-LacZeo2*, *ZFN28* und *ZFN44*. Von 27 analysierten Klonen wiesen acht eine einmalige korrekte FRT-Integration in den *AAVS1* Locus auf. Schlussfolgernd ergab sich eine Erfolgsrate von 29,6 %, was deutlich über der Rekombinationsrate somatischer Zellen in der Methode von DeKolver et al. lag [26]. Dies bestätigt die erfolgreichere Transfektion von ES Zellen im Vergleich zu somatischen Zellen.

Die Firmen Invitrogen und Lonza werben für ihre Transfektionsmedien mit hohen Transfektionsraten. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen wurden gemäß Protokollen von Invitrogen und Lonza durchgeführt. Die anfängliche Transfektionsrate wurde mittels des Kontrollvektors *pEGFP-N1* und dem dadurch exprimierten GFP 24 Stunden nach Transfektion kontrolliert. Dabei zeigten sich stets deutlich geringere Transfektionsraten als durch beide Firmen beschrieben. Dies kann unter anderem durch die Größe des transfizierten Vektors begründet werden. Ramachandra et al. zeigten, dass die Frequenz der HR mit zunehmender Länge des einzufügenden Konstruktes um das bis zu Dreifache sinkt [27]. Der von uns verwendete komplexe Vektor hat eine Größe von 10,7 kbp und übersteigt damit deutlich alle Vektoren vergleichbarer Arbeiten. Gleichzeitig konnte jedoch festgestellt werden, dass die anfängliche Transfektionsrate nicht ausschlaggebend für das Auftreten von Klonen ist. So konnten trotz anfänglich niedriger Transfektionsrate Klone auftreten, wie am Beispiel der HUVEC Zellen deutlich erkennbar ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden die transfizierten Zellen mit Antibiotika selektioniert. Dies erlaubt Klone mit fehlender bzw. inkorrektur Integration des *AAVS1-LacZeo2*- bzw. des *AAVS1-M2rtTA*-Donor-Plasmids auszusortieren. Im *AAVS1-LacZeo2*-Plasmid ist dem Resistenzgen *PuroR* kein Promoter vorgeschaltet (vergleiche Abb. 4), sodass das Gen lediglich dann exprimiert werden kann, wenn das FRT-*LacZeo2*-Insert an der vorgesehenen Stelle im *AAVS1* Locus integriert wird. Dieser komplex konstruierte "doppelte" Selektionsmechanismus erlaubt eine noch bessere Kontrolle der Integration des FRT-*LacZeo2*-Inserts in den *AAVS1* Locus.



Es konnte festgestellt werden, dass unsere transfizierten Zellen eine doppelte Selektion schlecht vertragen. Insbesondere bei den fragilen HUVEC Zellen resultierte eine Doppelselektion in massivem Zelltod und dem Ausbleiben von Klonen. Für die Fortführung der dargestellten Methode ist also von einer Doppeltransfektion abzuraten. Stattdessen empfiehlt sich die Durchführung von zwei aufeinander folgenden Transfektionen: Zunächst sollte eine Transfektion mit dem AAVS1-LacZeo2-Plasmid durchgeführt und aus dieser ein puromycin-resistenter heterozygoter FRT-Klon ausgewählt werden. Dieser sollte anschließend mit dem AAVS1-M2rtTA-Plasmid transfiziert werden. Aus einer zweiten Selektion müsste ein G418-resistenter Klon identifiziert werden, welcher die FRT-Site in einen und das M2rtTA-Insert in anderen *AAVS1* Locus enthält.

Der Nachweis der korrekten FRT-Integration erfolgte über mehrere Schritte. Die entwickelten HAL- und HAR-PCR-Nachweise mit Sequenzierung der PCR-Produkte dienen dazu Klone mit FRT-Integration im *AAVS1* Locus auszuwählen. Diese Klone wurden anschließend über Southern Blot weiter analysiert.

Die HAL- und HAR-PCR erlaubt Klone mit alleiniger FRT-Integration außerhalb des *AAVS1* Locus zu erkennen und diese frühzeitig auszusortieren. Die Primer der PCR wurden so konstruiert, dass sie außerhalb der homologen Arme (HAL bzw. HAR) im *AAVS1* Locus auf der einen Seite und im FRT-LacZeo2-Insert auf der anderen Seite binden. Bei Integration des FRT-LacZeo2-Inserts außerhalb des *AAVS1* Locus wäre keine Bildung eines PCR-Produkts möglich.

Es wurde festgestellt, dass die HAL- und die HAR-PCR aufgrund der Größe des PCR-Produktes sehr anfällig sind, sodass in einigen Fällen trotz korrekter Integration des FRT-LacZeo2-Inserts kein PCR-Produkt hervorging. Daher erscheint es nicht ausreichend nur eine der beiden PCR-Reaktionen durchzuführen. Bei Durchführung beider PCR-Reaktionen mit der DNA eines Klones steigt die Chance ein PCR-Produkt zu erhalten und so positive Klone für den anschließenden Southern Blot auszuwählen. Da die Durchführung der PCR-Reaktion zeit- und kosteneffizienter ist als die Durchführung eines Southern Blots, sollten künftig weiterhin alle puromycin-resistenten Klone zunächst einer Untersuchung mittels HAL- und HAR-PCR unterzogen werden.

Zugleich hat sich gezeigt, dass wenn die PCR-Reaktion stattfindet, in allen Fällen eine Bande korrekter Größe entsteht und diese in der Sequenzierung in allen Fällen mit der erwarteten Sequenz übereinstimmt. Die Entstehung von Banden anderer Größe oder Sequenz wurde nicht beobachtet. Deshalb ist methodisch zu erwägen die PCR weiterhin zum Aus-sortieren falsch negativer Klone zu nutzen und die Sequenzierung der PCR-Produkte jedoch zukünftig auszusetzen. So könnte eine höhere Zeit- und Kosteneffizienz erreicht werden.

Zur Untersuchung der puromycin-resistenten Klone mit positiver Testung in der HAL- und/oder HAR-PCR wurde ein Southern Blot durchgeführt. Dieser stellt eine zentrale Analyse-methode dar und erlaubt über die 3'AAV-Sonde die Differenzierung zwischen heterozygoter und homozygoter Integrationen eines Inserts im *AAVS1* Locus. Über die 5'LacZeo-

und die 5'M2rtTA-Sonde lassen sich alle Integrationen des jeweiligen Inserts im gesamten Zellgenom darstellen.

Auch Hockemeyer et al. bedienten sich des Southern Blots als Methode und nutzten dabei eine "externe" Sonde außerhalb des *AAVS1* Locus und eine "interne" Sonde innerhalb des Inserts für die Analyse ihrer Klone [44].

Im Southern Blot zeigte sich ein breites Spektrum an verschiedenen FRT-Integrationen im Genom der Zielzelle. Hierbei ist eine Abhängigkeit von der genutzten Plasmid-Menge zu erkennen. So wiesen HEK293 Klone, bei denen für die Transfektion anfangs 20  $\mu\text{g}$  DNA verwendet wurden, eine deutlich größere Zahl an Mehrfachintegrationen auf als in späteren Transfektionen von HEK293 Zellen, bei denen DNA-Mengen von nur 2,5  $\mu\text{g}$  gewählt wurden.

Eine Erklärung für die Mehrfachintegrationen der FRT-Site außerhalb des *AAVS1* Locus ist die Möglichkeit so genannter off-target DNA-breaks durch ZFNs. Die verwendeten ZFNs erkennen weitere Sequenzen im Zellgenom und erzeugen Doppelstrangbrüche (DSBs) außerhalb des *AAVS1* Locus. Dies ist mit den Ergebnissen von Bibikova et al. vereinbar. Sie konnten zeigen, dass beim Binden zweier ZFNs in einem Abstand zueinander, der geringfügig größer oder geringer als der jeweilige Optimalabstand ist, die Rekombination ebenfalls erfolgt, wenngleich auch nur bei einem geringeren Substratanteil [30]. Pattanayak et al. und Gabriel et al. analysierten 2011 das Verhalten von ZFNs in Bezug auf die Loci *CCR5*, *VEGF-A* und *IL2R $\gamma$* . Sie konnten zeigen, dass einige ZFNs bis zu acht Erkennungsfehler pro 24 bp Erkennungssequenz tolerieren [60, 61].

Die Frequenz der off-target DNA-breaks ist abhängig von der verwendeten Menge an ZFNs. Gupta et al. zeigten 2011 durch ZFN-gesteuerte Manipulation von Zebrafischembryonen, dass mit zunehmender Menge an ZFN sowohl die Frequenz an zielortspezifischen (on-target) DSBs als auch an off-target DSBs steigt [62]. Eine erhöhte Anzahl an off-target breaks geht mit erhöhter Zytotoxizität und Auftreten von Abnormalitäten in der jeweiligen Zelle einher. Dies ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vereinbar. Aus der Transfektion von HEK293 Zellen mit 40  $\mu\text{g}$  Donor-Vektor und je 5  $\mu\text{g}$  ZFN-Plasmid (in Anlehnung an die Transfektionsbedingungen von Hockemeyer et al. [44]) gingen keine Klone hervor. Erst unter Verwendung geringerer ZFN-Mengen von 0,5 bis 2  $\mu\text{g}$  für HEK293 und HepG2 bzw. 0,05 bis 0,25  $\mu\text{g}$  für HUVEC konnten aus den Transfektionen Klone hervorgebracht werden.

Die schlechte Vorhersagbarkeit und Nachweisbarkeit der off-target breaks limitiert die Arbeit mit ZFNs. So untersuchten Pattanayak et al. und Gabriel et al. dieselben ZFNs in derselben Zelllinie auf Lokalisation und Frequenz von off-target breaks und erhielten unterschiedliche Ergebnisse [60, 61]. Zudem sind off-target breaks abhängig von zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen, welche je nach Phase des Zellzyklus und je nach Zelltyp weniger verfügbar sein können.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Funktionsfähigkeit der FRT-Site in den FRT-Zelllinien demonstriert werden. Ein FRT-HEK293-Klon wurde über das FlpIn<sup>TM</sup>-System stabil transfiziert: Unter Verwendung der Vektoren FRT-GFP und pOG44 wurde das *GFP*

Gen mittels ortsspezifischer Integration in den *AAVS1* Locus des erzeugten FRT-HEK293-Klons integriert. Der Erfolg der Transfektion zeigte sich im Auftreten hygromycinresistenter, grün fluoreszierender Klone. Es ist zu erwägen die DNA der GFP-FRT-HEK293-Zelllinie fortführend zu analysieren, um DNA-Veränderungen zu identifizieren. So könnte eine Zweitintegration des GFP-Inserts außerhalb des *AAVS1* Locus und der FRT-Site ausgeschlossen werden.

Als weiterer Schritt muss die FRT-Site im Zusammenhang mit dem M2rtTA-Mechanismus überprüft werden. Dies wird Gegenstand anschließender Arbeiten sein.

### 5.3 Weiterentwicklung der Methode

Die off-target breaks der ZFNs sind ein limitierender Faktor für die Verwendung von ZFNs. Die Tatsache, dass die kommerziell verfügbaren ZFNs einen Spielraum bei der Spezifität der Nukleotidbindung und beim optimalen Bindungsabstand im ZFN-Paar zulässt, bewegt die Entwicklung neuer Methoden zur präzisen Erzeugung eines DSB.

Es gibt neue Ansätze wie die Effektivität der ZFNs gesteigert werden kann. So wurden Zinkfingerproteine mit neuen Enzymdomänen gekoppelt, welche selbstständig DSBs erzeugen und verschließen [63]. Dies vermeidet eine Akkumulation von toxischen DSBs in der Zelle und ermöglicht eine Genomveränderung unabhängig vom Zellzyklus und Zelltyp. Außerdem wurde mittels gerichteter Evolution (directed evolution) eine hyperaktivierte Variante der *FokI*-Nukleasedomäne (genannt Sharkey) geschaffen, welche über 15-mal mehr Aktivität zeigt als altbekannte ZFNs [63]. Schließlich wurde mit der Entwicklung von Zinkfinger-Nickasen (ZFNickasen) eine Möglichkeit erschlossen die Rate an fehlerbehafteter End-zu-End-Reparatur der DNA zu Gunsten von HR zu senken. Dies führt zu weniger off-target breaks als bei konventionellen ZFNs [63].

Ein neueres Tool im Bereich der *in vivo* Manipulation von DNA stellen transcriptional activator-like effector nucleases (TALENs) dar. Dies sind Hybride aus bakteriellen Proteinen mit hoher DNA-Bindungsspezifität (den TALEs) und der *FokI*-Nukleasedomäne. Die hohe DNA-Bindungsspezifität der TALEs beruht auf einem Verhältnis von 1 : 1 zwischen Proteinuntereinheit und Nukleotid [64]. Ähnlich der ZFNs bilden TALENs beim Binden an die DNA in korrektem Abstand zueinander ein aktives Dimer und erzeugen einen DSB. Obwohl die Erfahrungen mit TALENs bisher noch begrenzt sind, konnte bereits beobachtet werden, dass TALENs eine höhere Spezifität für die Erkennung einer potentiellen Schnittstelle aufweisen als ZFNs. So sind TALENs im Gegensatz zu ZFNs in der Lage zwischen den sehr ähnlichen Loci *CCR5* und *CCR2* zu differenzieren [64]. Gleichzeitig geht die Manipulation der humanen Loci *CCR5* und *IL2R $\gamma$*  mit TALENs im Vergleich zu der mit ZFNs mit deutlich weniger Zytotoxizität einher [64]. Bei der Erzeugung von Knockout-Ratten konnte ein höherer Prozentsatz neugeborener Tiere bei der Verwendung von TALENs im Vergleich zu ZFNs erreicht werden. TALENs wurden bereits für die Modifikation von Genen in ver-

schiedenen Zellen, u.a. in induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) und in humaner Zellkultur, eingesetzt [64]. Holkers et al. zeigten 2013, dass eine Ansteuerung des *AAVS1* Locus mit TALENs möglich ist [65]. Dabei nutzten sie adenovirale Vektoren als Trägersystem. Mit zunehmender Erforschung der TALENs konnte sich dieses System etablieren und ist aufgrund fortschreitender Entwicklung und zunehmender Vorteile der TALENs gegenüber ZFNs zukünftig auch für unser Projekt von Interesse.

Ein neueres System zur Erzeugung gentechnisch veränderter Zellen ist das CRISPR/Cas-System. CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) sind sich wiederholende DNA-Abschnitte, welche im Genom vieler Bakterien aufzufinden sind und diesen eine erworbene Immunität gegen Viren und Plasmide verleihen. Dieser Prozess beruht auf RNA-vermittelter sequenzspezifischer DNA-Spaltung mittels Cas-Endonukleasen und ist mittlerweile ähnlich gut verstanden wie ZFNs [63]. Mali et al. zeigten 2013 die Anwendbarkeit des CRISPR/Cas-Systems zur Ansteuerung des *AAVS1* Locus und integrierten ein *GFP* Gen mittels HR in den *AAVS1* Locus [66]. In der FACS Analyse zeigte sich eine HR-Rate von 3 bis 8 % [66], was der HR-Rate bei der Verwendung von TALENs oder ZFNs nicht nachsteht. Allerdings wurde das Genom der manipulierten Zellen nicht auf Fehlintegrationen untersucht, weshalb der *AAVS1* Locus nicht als alleiniger Integrationsort für das *GFP* Gen garantiert werden kann. Obwohl das CRISPR/Cas-System großes Potential für die gezielte Genommanipulation birgt, ist es noch unzureichend erforscht und seine Anwendbarkeit in der Gentherapie ist unklar. In repräsentativen Vergleichen zwischen CRISPR/Cas-System und ZFNs bzw. TALENs konnten eindeutige Vorteile gegenüber ZFNs nachgewiesen werden. Somit ist das CRISPR/Cas-System für die Generierung weiterer Zelllinien mit integrierter FRT-Plattform von großem Interesse.

Die Problematik der off-target breaks ist bei der Verwendung von ZFNs gut bekannt. Trotz permanenter Modifikation der ZFNs und der Verbesserung ihrer Expression und DNA-Bindungsspezifität sowie der Entwicklung ZFN-ähnlicher Technologien ist es unwahrscheinlich, dass sich off-target Effekte in Zukunft komplett vermeiden lassen. Jedoch werden ZFNs bereits in mehreren Studien als therapeutischer Ansatz für HIV- (siehe Studiennummern NCT00842634, NCT01044654, NCT01252641 unter [43]) und Krebspatienten (siehe NCT01082926 unter [43]) angewandt. Diese Entwicklungen deuten darauf hin, dass die Erforschung und Nutzung von ZFNs noch nicht abgeschlossen ist und neuere ZFNs auch für unser Projekt von Interesse sein könnten.

Die Nachfrage nach differenzierter somatischer Zellkultur ist in der Forschung weiterhin groß. Bisher konnten die vorhandenen Zelllinien nicht durch Abkömmlinge von ES Zellen oder induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) ersetzt werden. Dies bedeutet, dass die in dieser Arbeit demonstrierte Integration der FRT-Site in den *AAVS1* Locus auf weitere differenzierte somatische Zelllinien ausgeweitet werden sollte. So wäre es sinnvoll eine herzspezifische Zelllinie als Ergänzung zu den anderen Zelllinien des kardiometabolischen Systems zu generieren. Dabei ließe sich z.B. an die Forschung von Guo und Schäfer et al. anknüpfen

[07] und das RBM20-Protein gewebespezifisch in geeigneten Zelllinien untersuchen.

Ebenso wäre es von großem Interesse iPS Zellen mit einer FRT-Site zu versetzen. Die iPS Zellen wurden erstmals 2006 in der Arbeitsgruppe von Shinya Yamanaka hergestellt und 2012 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet [67]. Sie stellen pluripotente Stammzellen dar, welche aus somatischen Zellen produziert wurden. Damit unterliegen sie nicht dem Embryonenschutzgesetz und ermöglichen die wissenschaftliche Arbeit an humanen pluripotenten Stammzellen. Die Integration einer FRT-Site in den *AAVS1* Locus einer iPS Zelle könnte im Zusammenspiel mit der rasanten wissenschaftlichen Entwicklung im Bereich der iPS weitere neue Möglichkeiten für die Erforschung von GOI schaffen.

Grundsätzlich ist festzustellen, dass die Methode der stabilen Integration einer FRT-Site in den *AAVS1* Locus mit Hilfe von ZFNs durch die Arbeit der AG Hübner sowie der kooperierenden Arbeitsgruppen des Max-Delbrück Zentrums Berlin-Buch maßgeblich vorangebracht werden konnte. Das vorgestellte Verfahren stellt einen Anfang für weitere Anwendung in der kardiovaskulären Forschung dar. Anhand der Zelllinien HEK293, HepG2, HUVEC und von ES Zellen konnte die Methode demonstriert werden. Sie wird zukünftig weiter optimiert und auf weitere Zelllinien ausgeweitet werden. Doch obwohl erste entscheidende Erfolge erzielt werden konnten, wurden auch Grenzen und Schwierigkeiten in der Methodik sichtbar. Diese zu bewältigen wird Gegenstand weiterer Forschung sein.

## 6 Abbildungsverzeichnis

1	A. entnommen aus dem CompoZr <sup>®</sup> -Integration Kit-Manual (Sigma Aldrich); B. Schemazeichnung . . . . .	10
2	entnommen dem FlpIn <sup>™</sup> -System Manual (Invitrogen); 15.06.2011 11:19h .	13
3	orientiert an Figure 2 aus Tet-Off <sup>®</sup> and Tet-On <sup>®</sup> Gene Expression Systems User Manual, Clontech [68] . . . . .	14
4	Schemazeichnung . . . . .	16
5	orientiert an Figure 3 aus DeKolver RC et al. Genome Res. 2010 [26] . . . .	18
6	A. Gel vom 08.12.2011 13:11h; B. Schemazeichnung . . . . .	41
7	Gel vom 15.04.2011 11:20h . . . . .	42
8	links Western Blot vom 11.05.2011, Belichtungszeit 5 Min; rechts Zellen foto- grafiert am 19.03.2012 um 13.12h . . . . .	44
9	HEK293 fotografiert am 10.11.2011 um 15:24h; HepG2 fotografiert am 29.11.2011 um 10:40h; HUVEC fotografiert am 25.10.2011 um 10:16h . . . . .	45
10	A. Gel vom 02.03.2012 18:00h; B. Gel vom 08.12.2011 13:11h; C. Schemazei- chnung . . . . .	48
11	A-C. Schemazeichnung; D. Southern Blot vom 19.09.2011 nach 5 Tagen Ex- position . . . . .	49
12	oben: Southern Blot vom 13.03.2012 nach 8 Tagen Exposition; unten: Southern Blot vom 19.04.2012 nach 12 Tagen Exposition. . . . .	50
13	GFP-FRT-HEK293 fotografiert am 27.01.2012 um 13:20h . . . . .	54

## 7 Literaturverzeichnis

- [01] Holmes MV, Harrison S, Talmud PJ, et al. *Utility of genetic determinants of lipid and cardiovascular events in assessing risk*. Nat. Rev. Cardiol. 2011 Apr;8(4):207-21
- [02] Wellcome Trust Case Control Consortium *Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls*. Nature. 2007 Jun 7;447(7145):661-78
- [03] O'Donnell CJ, Nabel EG *Genomics of Cardiovascular Disease*. N Engl J Med. 2011 Dec 1;365(22):2098-109

- [04] Mijašljović MD, Shulga O, Bloch S et al. *Clinical consequences of aspirin and clopidogrel resistance: an overview*. Acta Neurol Scand. 2013 Feb 21
- [05] Musunuru K, Strong A, Frank-Kamenetsky M et al. *From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus*. Nature. 2010 Aug 5;466(7307):714-9
- [06] MacRae CA, McKenna WJ *Splicing and Dilated Cardiomyopathy: One Gene to Rule Them All?* J Am Coll Cardiol. 2009 Sep 1;54(10):942-3
- [07] Guo W, Schäfer S, Greaser ML et al. *RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing*. Nat Med. 2012 May;18(5):766-73
- [08] Fredj S, Sampson KJ, Liu H, Kass RS *Molecular basis of ranolazine block of LQT-3 mutant sodium channels: evidence for site of action*. Br J Pharmacol. 2006 May;148(1):16-24
- [09] Mustafa H, Strasser B, Rauth S, Irving RA, Wark KL *Identification of a functional nuclear export signal in the green fluorescent protein asFP499*. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Apr 21;342(4):1178-82
- [10] Amar L, Desclaux M, Faucon-Biguët N, Mallet J, Vogel R *Control of small inhibitory RNA levels and RNA interference by doxycycline induced activation of a minimal RNA polymerase III promoter*. Nucleic Acids Res. 2006 Mar 6;34(5):e37
- [11] Weiser K, Barton M, Gershony D, Dasgupta R, Cardozo T *HIV's Nef Interacts with  $\beta$ -Catenin of the Wnt Signaling Pathway in HEK293 Cells*. PLoS One. 2013 Oct 10;8(10):e77865
- [12] Park HJ, Zhang Y, Georgescu SP, Johnson KL, Kong D, Galper JB *Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis*. Stem Cell Rev. 2006;2(2):93-102
- [13] Imaizumi T, Itaya H, Nasu S et al. *Expression of vascular endothelial growth factor in human umbilical vein endothelial cells stimulated with interleukin-1 $\alpha$ —an autocrine regulation of angiogenesis and inflammatory reactions*. Thromb Haemost. 2000 Jun;83(6):949-55
- [14] Yamamizu K, Furuta S, Hamada Y et al.  *$\kappa$  Opioids inhibit tumor angiogenesis by suppressing VEGF signaling*. Sci Rep. 2013 Nov 14;3:3213
- [15] Ha CE, Ha JS, Theriault AG, Bhagavan NV *Effects of statins on the secretion of human serum albumin in cultured HepG2 cells*. J Biomed Sci. 2009 Mar 16;16:32

- [16] Notarnicola M, Messa C, Refolo MG, Tutino V, Miccolis A, Caruso MG *Synergic effect of eicosapentaenoic acid and lovastatin on gene expression of HMGCoA reductase and LDL receptor in cultured HepG2 cells*. *Lipids Health Dis*. 2010 Nov 30;9:135
- [17] Li W, Li DM, Chen K et al. *Development of a gene therapy strategy to target hepatocellular carcinoma based inhibition of protein phosphatase 2A using the  $\alpha$ -fetoprotein promoter enhancer and pgk promoter: an in vitro and in vivo study*. *BMC Cancer*. 2012 Nov 23;12:547
- [18] Mersch-Sundermann V, Knasmüller S, Wu XJ, Darroudi F, Kassie F *Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents*. *Toxicology*. 2004 May 20;198(1-3):329-40
- [19] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7
- [20] Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R. *Endothelial cells derived from human embryonic stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 2;99(7):4391-6
- [21] Porteus M *Using homologous recombination to manipulate the genome of human somatic cells*. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2007;24:195-212
- [22] Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM et al. *Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery*. *Nat Biotechnol*. 2007 Nov;25(11):1298-306
- [23] Adar S, Izhar L, Hendel A, Geacintov N, Livneh Z *Repair of gaps opposite lesions by homologous recombination in mammalian cells*. *Nucleic Acids Res*. 2009 Sep;37(17):5737-48
- [24] Khandelia P, Yap K, Makeyev EV. *Streamlined platform for short hairpin RNA interference and transgenesis in cultured mammalian cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 2;108(31):12799-804
- [25] Urnov FD, Miller JC, Lee YL et al. *Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases*. *Nature*. 2005 Jun 2;435(7042):646-51
- [26] DeKolver RC, Choi VM, Moehle EA et al. *Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome*. *Genome Res*. 2010 Aug;20(8):1133-42
- [27] Ramachandra CJ, Shahbazi M, Kwang TW et al. *Efficient recombinase-mediated cassette exchange at the AAVS1 locus in human embryonic stem cells using baculoviral vectors*. *Nucleic Acids Res*. 2011 Sep 1;39(16):1-13



- [28] Lieber MR, Gu J, Lu H, Shimazaki N, Tsai AG *Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans*. Subcell Biochem. 2010;50:279-96
- [29] van Nierop GP, de Vries AA, Holkers M, Vrijksen KR, Gonçalves MA *Stimulation of homology-directed gene targeting at an endogenous human locus by a nicking endonuclease*. Nucleic Acids Res. 2009 Sep;37(17):5725-36
- [30] Bibikova M, Carroll D, Segal DJ et al. *Stimulation of Homologous Recombination through Targeted Cleavage by Chimeric Nucleases*. Mol Cell Biol. 2001 Jan;21(1):289-97
- [31] Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ et al. *Site-specific integration by adeno-associated virus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Mar;87(6):2211-5
- [32] Grossman Z, Mendelson E, Brok-Simoni F et al. *Detection of adeno-associated virus type 2 in human peripheral blood cells*. J Gen Virol. 1992 Apr;73 ( Pt 4):961-6
- [33] Linden RM, Ward P, Giraud C et al. *Site-specific integration by adeno-associated virus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 15;93(21):11288-94.
- [34] Kotin RM, Linden RM, Berns KI *Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination*. EMBO J. 1992 Dec;11(13):5071-8
- [35] Henckaerts E, Linden RM *Adeno-associated virus: a key to the human genome?* Future Virol. 2010 Sep 1;5(5):555-574
- [36] Casola S. *Mouse models for miRNA expression: the ROSA26 locus*. Methods Mol Biol. 2010;667:145-63
- [37] Irion S, Luche H, Gadue P et al. *Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol. 2007 Dec;25(12):1477-82
- [38] Lombardo A, Cesana D, Genovese P et al. *Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer*. Nat Methods. 2011 Aug 21;8(10):861-9
- [39] van Rensburg R, Beyer I, Yao XY et al. *Chromatin structure of two genomic sites for targeted transgene integration in induced pluripotent stem cells and hematopoietic stem cells*. Gene Ther. 2013 Feb;20(2):201-14
- [40] Porteus M *Design and Testing of Zinc Finger Nucleases for Use in Mammalian Cells*. Methods Mol Biol. 2008;435:47-61
- [41] Klug A. *The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation*. Annu Rev Biochem. 2010;79:213-31

- [42] Moehle EA, Rock JM, Lee YL et al. *Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 27;104(9):3055-60
- [43] <https://clinicaltrials.gov/>, betrieben von U.S. National Institutes of Health, (accessed 13.07.2013 09:48h)
- [44] Hockemeyer D, Soldner F, Beard C et al. *Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases*. Nat Biotechnol. 2009 Sep;27(9):851-7
- [45] Broach JR *The yeast plasmid 2 mu circle*. Cell. 1982 Feb;28(2):203-4
- [46] Golic KG, Lindquist S. *The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the Drosophila genome*. Cell. 1989 Nov 3;59(3):499-509
- [47] Craig NL *The Mechanism of Conservative Site-Specific Recombination*. Annu Rev Genet. 1988;22:77-105
- [48] Broach JR, Guarascio VR, Jayaram M *Recombination within the yeast plasmid 2μ circle is site-specific*. Cell. 1982 May;29(1):227-34
- [49] InvitrogenLife Technologies, FlpIn™ -System, Version C, Cat. No. K6010, [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com), 15.06.2011 11:19h
- [50] Gossen M, Bujard H *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jun
- [51] Aleksandrov A, Schuldt L, Hinrichs W, Simonson T *Tet Repressor Induction by Tetracycline: A Molecular Dynamics, Continuum Electrostatics and Crystallographic Study*. J Mol Biol. 2008 May 9;378(4):898-912
- [52] Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells*. Science. 1995 Jun 23;268(5218):1766-9
- [53] Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W *Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jul 5;97(14):7963-8
- [54] Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK *Identification and Classification of Bacterial Plasmids*. Microbiol Rev. 1988 Sep;52(3):375-95
- [55] Lipps G *Plasmids: Current Research And Future Trends*. Caister Academic Press, Mai 2008, ISBN-13 978-1904455356, pp vii, pp 1-4

- [56] Hunt MA, Currie MJ, Robinson BA, Dachs GU *Optimizing Transfection of Primary Human Umbilical Endothelial Cells Using Commercially Available Chemical Transfection Reagents*. J Biomol Tech. 2010 Jul;21(2):66-72
- [57] [http://mutationdiscovery.com/md/MD.com/home\\_page.jsp](http://mutationdiscovery.com/md/MD.com/home_page.jsp), betrieben von Transgenomic, Inc., www.transgenomic.com (accessed 28.05.2012 09:53h)
- [58] Zhang W, Zheng X, Wang Y et al. *Establishment of a cell line carrying single copy of an exogenous mutant reporter gene for assaying the biological activity of ZFNs*. J Biotechnol. 2012 Dec 31;162(2-3):191-6
- [59] Forgues M, Difilippantonio MJ, Linke SP et al. *Involvement of Crm1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles*. Mol Cell Biol. 2003 Aug;23(15):5282-92
- [60] Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR *Revealing Off-Target Cleavage Specificities of Zinc Finger Nucleases by In Vitro Selection*. Nat Methods. 2011 Aug 7; 8(9):765-770
- [61] Gabriel R, Lombardo A, Arens A et al. *An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity*. Nat Biotechnol. 2011 Aug 7;29(9):816-23
- [62] Gupta A, Meng X, Zhu LJ et al. *Zinc finger protein-dependent and -independent contributions to the in vivo off-target activity of zinc finger nucleases*. Nucleic Acids Res. 2011 Jan;39(1):381-92
- [63] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd *ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering*. Trends Biotechnol. 2013 Jul;31(7):397-405
- [64] Mussolino C, Cathomen T. *TALE nucleases: tailored genome engineering made easy*. Curr Opin Biotechnol. 2012 Oct;23(5):644-50
- [65] Holkers M, Maggio I, Liu J et al. *Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells*. Nucleic Acids Res. 2013 Mar 1;41(5):e63
- [66] Mali P, Yang L, Esvelt KM et al. *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. Science. 2013 Feb 15;339(6121):823-6
- [67] [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2012/press.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/press.html), betrieben von Nobel Media AB, www.nobelprize.org (accessed 01.12.2012 12:32h)
- [68] Clontech Laboratories Inc., Tet-Off<sup>®</sup> and Tet-On<sup>®</sup> Gene Expression Systems User Manual, PT3001-1 (100912), Published October 2012, www.clontech.com, 16.11.2012 13:20h

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
AAV	humaner Adeno-assoziiertes Virus
<i>AAVS1</i>	adeno-associated virus integration site 1
AG	Arbeitsgruppe
bp	Basenpaar(e)
BGH	bovine growth hormone
BSA	Bovine serum albumin
CIP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CMV	Cytomegalievirus
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton, Einheit für Molekülmasse
DMEM	Dulbecco's modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleotidtriphosphate
DSB	double-strand break; Doppelstrangbruch
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetat
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ES	Embryonale Stammzellen
FCS	fetal calf serum; fetales Kälberserum
FRT	Flp recombination target
g	Gramm
G418	Geneticin
GFP	green fluorescent protein
GOI	gene of interest
GWAS	genomweite Assoziationsstudie(n)
h	Stunde(n)
$\text{H}_2\text{O}$	Wasser
HCl	Salzsäure
HEK293	Human Embryonic Kidney 293 Cell Line
HepG2	Human Liver Hepatocellular Carcinoma Cell Line
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HR	homologe Rekombination
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell Line
iPS	induced pluripotent cells, induzierte pluripotente Zellen
kb	Kilobase(n)
kbp	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
LDL	low density lipoprotein
M	Molar
mA	Milliampere
M2rtTA	tetracycline reverse transactivator
MCS	multiple cloning site
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
ORF	open reading frame; offener Leserahmen
pA	Polyadenylierungssignal
PAC	Puromycin N-Acetyl-Transferase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
<i>PPP1R12C</i>	protein phosphatase 1 regulatory subunit 12C
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	rotation per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SA	Splice Acceptor
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TetR	Tet-Repressor
U	Unit(s)
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
VLDL	very low-density lipoprotein

VP16	Virionprotein 16
wt	wild type; Wildtyp
ZFN	Zinkfinger Nuklease

## 8.2 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Anna Bobenko, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: “Generierung eines humanen isogenen FlpIn<sup>TM</sup>-Expressions-Zelllinienpanels mit Hilfe von AAVS1-Zinkfinger Nukleasen zur Untersuchung von Kandidatengeneten bei kardiometabolischen Erkrankungen” selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe “Uniform Requirements for Manuscripts (URM)” des ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

### **8.3 Curriculum Vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## 8.4 Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich an Herrn Prof. Norbert Hübner richten, für die Überlassung des Themas, für die verständnisvolle Betreuung und für kritische und konstruktive Kommentare über den gesamten Zeitraum der Arbeit hinweg. Unter seiner Anleitung konnte ich umfangreiches Wissen in den Bereichen der wissenschaftlichen Arbeit aufbauen. Darüber hinaus hat er es mir auch durch die stets persönliche und freundschaftliche Atmosphäre leichtgemacht mich für eine Zukunft in diesem Bereich zu begeistern.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Henrike Maatz für die tatkräftige Unterstützung, die stetige Hilfsbereitschaft und für die ausgezeichnete praktische Ausbildung bedanken.

Besten Dank an Dr. Emanuel Wyler und Dr. Katrin Schrenk-Siemens für die freundliche Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hübner für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die vielen konstruktiven Diskussionen und fachliche Diskurse. Insbesondere danke ich Anita Müller für die stetige Unterstützung im Labor und Deimante Simaite und Katharina Grunz für Kollegialität und Freundschaft.

Extern danke ich Herrn Prof. Torsten Zuberbier für das ausgezeichnete studiumsbegleitende Mentoring. Danke an Nora, Katrin, Max und Nikoletta, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich stets motivierten.

Schließlich gilt mein Dank meinen Eltern Prof. Alexander und Nataliya Bobenko sowie meinen Brüdern Nikolai und Konstantin. Ihre bedingungslose Unterstützung hat mir zur Fertigstellung der Arbeit verholfen.