

Tierärztliche Hochschule Hannover

Friedrich-Loeffler-Institut

**Strategie zur Erstellung eines Fanconi-Anämie Modells im Schwein mittels
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)**

These

Zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

vorgelegt von

Ronja Apfelbaum

aus Nordhorn

Hannover, Germany 2018

Betreuer: Prof. Dr. Wilfried Kues

Betreuungsgruppe: Prof. Dr. Wilfried Kues

Prof. Dr. Maren von Köckritz-Blickwede

Prof. Dr. Reinhard Schwinzer

1. Gutachten: **Prof. Dr. Wilfried Kues**, Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Nutztiergenetik, Neustadt am Rübenberge

Prof. Dr. Maren von Köckritz-Blickwede, Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Physiologische Chemie, Hannover

Prof. Dr. Reinhard Schwinzer, Medizinische Hochschule Hannover, Transplantationslabor, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Hannover

2. Gutachten: **Prof. Dr. Angelika Schnieke**, Technische Universität München, Lehrstuhl für Biotechnologie der Nutztiere, WZW Weihenstephan, Liesel-Beckmann Str. 1, 85354 Freising

Datum der Disputation: 09.04.2018

Förderung: Deutsche Forschungsgemeinschaft

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Poster:

R. Apfelbaum, H. Niemann, E. Grueso, Z. Ivics, P. Hassel, H. Eylers, R. Becker, W. Kues, *Strategy Toward the Development of a Fanconi Anemia Animal Model in the Pig by Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)*, 10th Graduate School Days, Bad Salzdetfurth (2017), 02.12.2017.

R. Apfelbaum, H. Niemann, E. Grueso, Z. Ivics, P. Hassel, H. Eylers, R. Becker, W. Kues, *Strategy Toward the Development of a Fanconi Anemia Animal Model*, 3rd Annual Genome Editing Congress, London (2017), 09.-10.11.2017.

R. Apfelbaum, H. Niemann, E. Grueso, Z. Ivics, P. Hassel, H. Eylers, R. Becker, W. Kues, *Strategy Toward the Development of a Fanconi Anemia Animal Model*, Junior Scientist Symposium, Braunschweig (2017), 20.-22.09.2017.

Vortrag:

R. Apfelbaum, H. Niemann, E. Grueso, Z. Ivics, W. Kues, *Gene Editing in Parthenogenetic Porcine Embryos*, Tag des Virtuellen Zentrum für Reproduktionsmedizin, Hannover (2017), 19.07.2017.

R. Apfelbaum, W. Garrels, A. Mukherjee, M. Ziegler, H. Niemann, E. Grueso, Z. Ivics, W. Kues, *Introducing Fanconi-Anemia in Pigs via Advanced Genome Editing*, 9th Graduate School Days, Hannover (2016), 26.11.2016.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	X
2	Summary	XII
3	Einleitung.....	1
3.1	DNA-Replikation	1
3.2	Fanconi-Reparaturmechanismus.....	3
3.1	Fanconi-Anämie	5
3.1.1	Ätiologie/molekulare Ursache	6
3.1.2	Therapiemöglichkeiten.....	8
3.2	Krankheitsmodelle für die Fanconi-Anämie	9
3.2.1	Mausmodelle.....	9
3.2.2	Alternative Säugermodelle	10
3.3	Homologe Rekombination	11
3.4	Somatischer Zellkerntransfer (SCNT).....	12
3.5	Genetische Editierung	13
3.5.1	Zinkfingernukleasen (ZFN).....	13
3.5.2	TALEN (Transcription activator-like effector nuclease).....	15
3.5.3	CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein).....	16
3.5.3.1	Zielsetzung	18
4	Material und Methoden.....	19
4.1	Material.....	19
4.1.1	Molekularbiologische Medien und Puffer	19
4.1.2	Medien und Puffer in der Zellkultur	20
4.1.3	Medien und Puffer im Umgang mit parthenogenetischen porzinen Embryonen	21
4.1.3.1	Oozytengewinnung.....	21

4.1.3.2	Reifungsmedium	22
4.1.3.3	Kumulusentfernung	23
4.1.3.4	Mikroinjektion	24
4.1.3.5	Aktivierung und Kultivierung	24
4.1.3.6	Hoechst-Färbung.....	25
4.1.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
4.1.5	DNA-Größenstandard	28
4.1.6	Protein-Größenstandards	28
4.1.7	Plasmide	29
4.1.7.1	pT2Venus.....	29
4.1.7.2	pCMV/SB100.....	29
4.1.7.3	pJoker.....	30
4.1.7.4	pX330	30
4.1.7.5	p119 C-Check	30
4.1.7.6	pX458.....	31
4.1.7.7	pX459.....	31
4.1.8	Antikörper.....	32
4.1.9	Bakterien.....	32
4.1.10	Genutzte Laborgeräte	32
4.2	Methoden	35
4.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	35
4.2.1.1	Gelelektrophorese	35
4.2.1.2	DNA-Extraktion aus Blastozysten.....	35
4.2.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Blastozysten-Pools.....	35
4.2.1.4	DNA-Extraktion aus Zellkulturen	37
4.2.1.5	T7 Endonuklease I-Assay.....	37
4.2.1.6	Sequenzierung	38
4.2.1.7	Proteinextraktion und Fraktionierung.....	38

4.2.1.8	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
4.2.1.9	Western Blot.....	39
4.2.1.10	Immundetektion	40
4.3	Mikroinjektion.....	41
4.3.1.1	Kultivierung von parthenogenetischen porzinen Embryonen.....	44
4.3.2	Methoden mit eukaryotischen Zellen	46
4.3.2.1	Zellkultivierung	46
4.3.2.2	Elektroporation	47
4.3.2.3	Durchflusszytometrische Erfassung der Transfektionsrate.....	47
4.3.2.4	Off-Target Analyse	48
4.3.3	Methoden mit prokaryotischen Zellen	50
4.3.3.1	Bakterienkultur	50
4.3.3.2	Mini- und Maxipräparation von Plasmiden.....	50
4.3.3.3	Ligation von Plasmiden	51
4.3.3.4	Klonierung in das pGEM T-Easy-Vektor-System.....	52
4.3.4	Bioinformatische Software	55
5	Ergebnisse	56
5.1	Versuchsaufbau.....	56
5.2	Erstellung der C-Check-, pX458- und pX459-Konstrukte für die spezifische INDEL-Bildung mit dem CRISPR/Cas9-System.....	58
5.3	Spezifische FANCA-Mutationen in porzinen STE- und primären Zellen.....	62
5.3.1	Transfektion von STE- und primären Zellen mit den C-Check- und pX458-Konstrukten.....	62
5.3.1.1	Transfektion von porzinen STE- und iPS-Zellen mit den pX459-Konstrukten.....	68
5.4	Analyse der mit den C-Check, pX458 und pX459 transfizierten Zellen	69
5.5	Optimierung der Mikroinjektion in parthenogenetischen Schweineezellen .	74

5.6 Spezifische FANCA INDEL-Bildung in parthenogenetischen porzinen Embryonen	80
5.6.1 Mikroinjektion in parthenogenetische Embryonen mit den C-Check-Konstrukten	80
5.6.1.1 Mikroinjektion mit Cas9, C-Check_Exon7 und sgRNA_Exon7	84
5.6.1.2 Mikroinjektion mit Cas9, C-Check_Exon9 und sgRNA_Exon9	86
5.6.1.3 Mikroinjektion mit Cas9, C-Check_Exon10 und sgRNA_Exon10 ...	89
5.6.2 Mikroinjektion in parthenogenetische Embryonen mit den pX458-Konstrukten	91
5.6.2.1 Mikroinjektion mit pX458Faex7	93
5.6.2.2 Mikroinjektion mit pX458Faex9	95
5.6.2.3 Mikroinjektion mit pX458Faex10	98
5.7 Off-Target Analyse	101
5.8 Austestung von anti-FANCA-Antikörpern für den Nachweis eines FANCA-Protein-Knockouts	103
6 Diskussion	105
6.1 Spezifische FANCA-INDEL-Bildung in porzinen Zellen	105
6.2 Optimierung der Mikroinjektion	110
6.3 Spezifische FANCA-INDEL-Bildung in parthenogenetischen porzinen Embryonen	112
6.4 Off-Target-Analyse	115
6.5 Zusammenfassung und Ausblick	116
7 Literaturverzeichnis	124
8 Eidesstattliche Erklärung	141
9 Anhang	142
9.1 Sequenzen und Namen der Off-Targets	142
9.2 Durchflusszytometrische Messungen von STE-Zellen transfiziert mit C-Check und pX458	148
9.3 Ungeschnittene Agarosegele der STE- und iPS-Zellen	155

9.4	Elektropherogramme der Off-Target-Analyse.....	157
9.4.1	Off-Targets der sgRNA für Exon7 des FANCA-Gens	157
9.4.2	Off-Targets der sgRNA für Exon9 des FANCA-Gens	160
9.4.3	Off-Targets der sgRNA für Exon10 des FANCA-Gens	168

Abkürzungsverzeichnis

6-DMAP	6-Dimethylaminopurin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
Cas	CRISPR-associated protein
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DMEM	Dubecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Faktor
FA	Fanconi-Anämie
FANCA	Fanconi A
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
hPa	Hektopascal
HRP	Meerrettichperoxidase
ICL	Interstrand crosslink
IGF1	Insulin-like growth factor 1
INDEL	Insertion/Deletion
iPS	Induzierte pluripotente Stamm(zellen)
kb	Kilobasen
LGC	Laboratory of the Gouvernement Chemist
mA	Milliampere
NBCS	Newborn calf serum
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PCR	Polymerase chain reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pl	Pikoliter
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PMSG/HCG	Pregnant mare's serum gonadotropin/humanes Choriongonadotropin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PZM	Porzines Zygoten-Medium
rpm	Umdrehungen pro Minute
SCNT	Somatischer Zellkerntransfer
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sgRNA	Single guide RNA
STE	Swine testis epitheloid
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepuffertes Salz
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMR	Tetramethylrhodamin
ZFN	Zinkfingernuklease
β-FGF	Basic fibroblast growth factor

1 Zusammenfassung

Strategie zur Erstellung eines Fanconi-Anämie Modells im Schwein mittels
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)

Ronja Apfelbaum

Die Fanconi-Anämie (FA) ist eine seltene rezessive Erkrankung des Menschen, die bei ca. einer von 100000 Geburten auftritt. Dabei kommt es neben einer kleinen Statur, zu verschiedenen Geburtsfehlern, einer erhöhten Tumorentstehung und zum Knochenmarksversagen. Verantwortlich dafür sind unterschiedliche Mutationen in einem der FA-Gene. Am häufigsten betroffen ist hierbei das FANCA-Gen. 60-70% der Erkrankten haben eine Mutation in diesem Genlocus. Die Mutationen führen zu einer verminderten oder nicht vorhandenen Expression des FANCA-Proteins. Dieses ist Bestandteil im sogenannten Fanconi-Reparaturmechanismus. In diesem Mechanismus aktiviert der Fanconi-Kernkomplex eine Reparaturkaskade, um Interstrand-Crosslinks (ICL) zu reparieren. Bei einer Mutation im FANCA-Gen wird der Fanconi-Kernkomplex nicht vollständig gebildet und ICLs der DNA nicht repariert. Dadurch kommt es zu Problemen bei der DNA-Replikation. Besonders auffällig ist dies bei sich stark replizierenden Zellen, z.B. den hämatopoetischen Stammzellen. Die durchschnittliche Lebenserwartung von unbehandelten Erkrankten liegt bei ca. 24 Jahren. Die Therapiemöglichkeiten sind begrenzt, das Knochenmarkversagen kann durch eine Knochenmarktransplantation behandelt werden. Für nachfolgende Symptome, wie die Ausbildung von Tumoren, gibt es derzeit keine Therapie. Die bisherigen Mausmodelle haben auch ihre Grenzen, da sie die phänotypischen Merkmale nur begrenzt aufweisen und insbesondere das Knochenmarksversagen nicht entwickeln. Aus diesem Grund fokussiert sich diese Arbeit auf die Generierung eines FANCA-Modells in porzinen Zellen und parthenogenetischen Embryonen, da das Schwein in der Physiologie und Pathologie dem Menschen sehr ähnlich ist. Dafür wurde das CRISPR/Cas9-System verwendet. Dieses System ermöglicht es, gezielt an einer Position in Genom Doppelstrangbrüche herbeizuführen. Diese werden mittels nicht-homologer Endverknüpfung (NHEJ) repariert, was oft zur Insertionen und Deletionen (INDELS) führt. In dieser Arbeit wurden spezifische CRISPR/Cas9-Genschere für die Exone 7, 9 und 10 des FANCA-Gen des Schweins entwickelt.

Es wurden verschiedene Zelltypen untersucht, darunter immortalisierte STE-Zellen, porcine induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) und parthenogenetische porcine Embryonen. Es hat sich gezeigt, dass INDELS in allen drei Zelltypen gebildet werden konnten. Dabei war dies in den STE-Zellen und Embryonen erfolgreicher als in den iPS-Zellen. Zudem zeigte sich eine leichte Tendenz, dass eine INDEL-Bildung in den Exonen 7 und 10 einfacher zu generieren ist, als in Exon 9. Diese Arbeit ist ein vielversprechender Anfang für die Erstellung eines FANCA-Schweinmodells, um mögliche Therapien evaluieren zu können.

2 Summary

Strategy toward the Development of a Fanconi Anemia Model in the pig by Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)

Ronja Apfelbaum

The Fanconi anemia (FA) is a rare human disease, with a prevalence of one of 100 000 births. Phenotypic symptoms are a short stature, malformations and a bone marrow failure. Responsible for the disease are different mutations in one of the FA genes. Most often, the FANCA gene is mutated in 60-70% of all patients. The disease occurring mutations lead to a reduced or absent expression of the FANCA protein, which is part of the Fanconi core complex of the Fanconi repair pathway. In this pathway, the core complex activates the repair cascade of interstrand crosslinks (ICL). In case of a mutation in the FANCA gene the FA core complex is not completely active and ICLs will not be repaired. This leads to problems during the DNA replication. Most susceptible are highly replicative cells, such as the hematopoietic stem cells. The mean life expectancy of untreated FA patients is about 24 years. Currently, the therapeutic options are limited, and the bone marrow failure may be treated by a bone marrow transplantation. For other symptoms, like the enhanced tumour formation, no specific therapies are available. Existing mouse models of the Fanconi anemia are not mimicking the phenotype, particularly not the bone marrow failure. This study focusses on the generation of a FA model in porcine cells and parthenogenetic embryos, because of the high similarity between the human and porcine physiology and pathology. For this purpose, the molecular scissor CRISPR/Cas9 has been used. With this molecular scissor it is possible to introduce a specific double strand break in a genome. Double strand breaks will be repaired via non-homologous end-joining (NHEJ), which is error prone and often leads to insertions and deletions (INDELs). In this work, specific CRISPR/Cas molecules targeting the FANCA exons 7, 9 and 10 have been developed. This study shows that it is possible to introduce INDELs in cells and embryos using the CRISPR/Cas9 system. The INDEL formation efficiency was slightly more efficient in STE cells and embryos than in iPS cells. Furthermore, the tendency to introduce INDELs seems to be more efficient in the exons 7 and 10. Nevertheless, this study is a promising baseline for the production of a FANCA pig model for further therapy research.

3 Einleitung

3.1 DNA-Replikation

Bei der Zellteilung wird zunächst die chromosomale DNA repliziert, sodass nach der Zellteilung in den Tochterzellen derselbe Chromosomensatz vorliegt. Dieser Prozess wird DNA-Replikation genannt. Die DNA-Replikation erfolgt mittels DNA-Polymerasen. Diese nehmen einzelsträngige DNA (ssDNA) als Vorlage und synthetisieren einen komplementären Strang. Der komplementäre Strang bildet eine Watson-Crick-Paarung mit der Vorlage, wodurch sich die DNA-Doppelhelix ausbildet. Während der Replikation von doppelsträngiger DNA wird diese lokal aufgeschmolzen, es bilden sich sogenannte Replikationsgabeln. Die DNA-Polymerase repliziert die DNA mit dem Startpunkt an den Replikationsgabeln. Sie findet gleichzeitig in beide Richtungen statt. Auf dem sogenannten Leitstrang erfolgt die kontinuierliche Replikation in 5'-3'-Richtung. Auf dem dazu komplementären Folgestrang hingegen erfolgt eine diskontinuierliche Replikation unter Zuhilfenahme sogenannter Okazaki-Fragmenten (Abb. 1). Diese werden schließlich von einer DNA-Ligase verknüpft. Insgesamt liegt eine semikontinuierliche Replikation vor^[1].

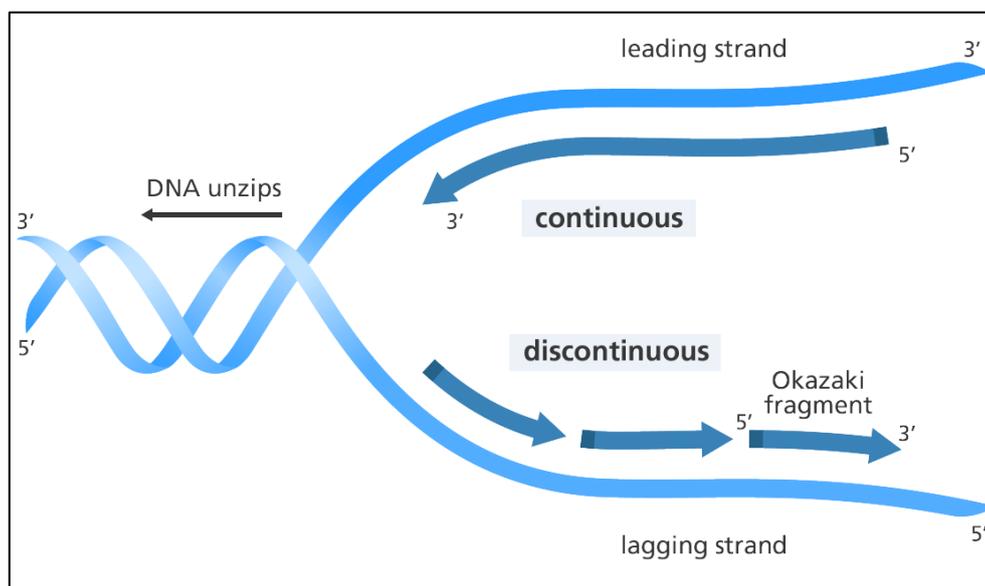


Abb. 1: Schematische Darstellung der semikontinuierlichen DNA-Replikation^[2].

An der DNA-Replikation sind mehrere DNA-Polymerasen beteiligt. Es finden sich mindestens 13 verschiedene DNA-Polymerasen in Säugerzellen. An der Replikation der Kern-DNA sind beispielsweise die Polymerasen α , δ und ϵ beteiligt. Diese drei Polymerase wirken zusammen. Dabei dient die Polymerase ϵ

der Replikation des Leitstrangs und die Polymerasen α und δ replizieren zusammen den Folgestrang. Dabei generiert die Polymerase α zusammen mit einem Enzym namens Primase die Okazaki-Fragmente und die Polymerase δ verbindet diese miteinander. In Säugerzellen liegt zusätzlich das Problem vor, dass das äußerste 5'-Ende des Folgestrangs nicht repliziert werden kann. Die Enden, auch Telomere genannt, bestehen aus einer einfachen, guanin-reichen Sequenz, die durch das Enzym Telomerase synthetisiert und aufrechterhalten wird. Fehlt die Telomerase, verkürzen sich die Chromosomen bei der DNA-Replikation. Dies kommt beim Alterungsprozess der Zellen in natürlicher Weise vor^[1].

Die Replikation kann fehlerhaft verlaufen und so zu Mutationen führen. Punktmutationen können durch reaktive Sauerstoffspezies entstehen, die über den Zellstoffwechsel entstehen. Hierbei kann Guanin zu 8-Oxoguanin oxidiert werden, was dazu führt, dass bei der DNA-Replikation eine Paarung mit Cytosin oder Adenin entstehen kann. Dadurch kann es zu einer G·C \rightarrow A·T-Transition kommen. Diese Mutationen können durch verschiedene Mechanismen repariert werden.

Bei Doppelstrangbrüchen kann eine Reparatur über den Mechanismus der nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) und der homologen Rekombination erfolgen. Das NHEJ repariert Doppelstrangbrüche. Die homologe Rekombination findet statt, wenn homologe DNA-Sequenzen vorliegen und als Vorlage für den mutierten Bereich dienen können. Bei einer fehlerhaften homologen Rekombination können jedoch Insertionen und Deletionen entstehen. Treten Mutationen in den Keimzellen auf, können diese vererbt werden und so zu genetischen Erkrankungen, wie der Fanconi Anämie, führen^[1].

3.2 Fanconi-Reparaturmechanismus

Der Fanconi-Reparaturmechanismus ist ein Reparaturmechanismus, der vorwiegend Zwischenstrang-Querverbindungen repariert^[3, 4]. Es wird zwischen Querverbindungen zwischen verschiedenen DNA-Strängen (interstrand) und innerhalb eines DNA-Strangs (intrastrand) unterschieden (Abb. 2).

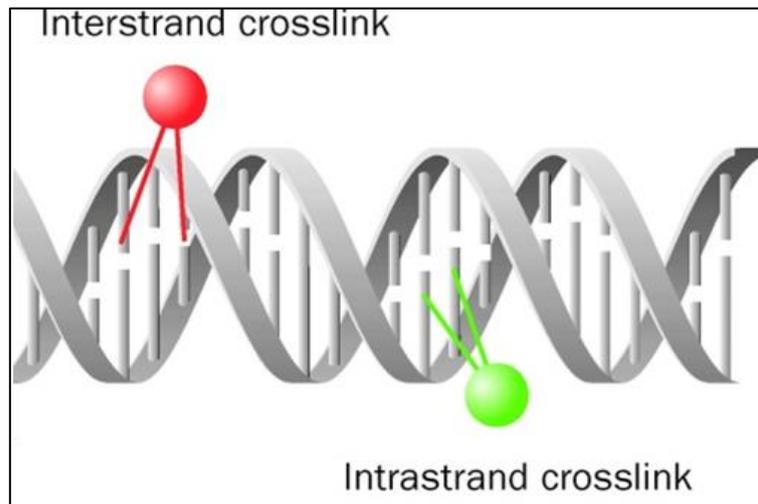


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Interstrand- und Intrastrand-Crosslinks^[5]. Die Abbildung wurde modifiziert.

Die Querverbindungen können durch Chemikalien, Umwelteinflüsse oder auch durch Metaboliten des Zellstoffwechsels entstehen. Interstrand-Crosslinks werden oft in der Chemotherapie herbeigeführt. Das Chemotherapeutikum Cisplatin reagiert bevorzugt mit dem Stickstoff an siebter Position im Guanin. Dadurch kommt es zu einer Verknüpfung von zwei Guaninen. Der Abstand der beiden Stränge der DNA-Helix wird verkürzt^[6]. Alternativ führt Cisplatin auch zu Intrastrand-Crosslinks. Auch hierbei kommt es zu einer Verknüpfung von zwei Guaninen. Intrastrand-Crosslinks treten zudem häufig bei oxidativen Stress, also bei Kontakt der DNA mit freien Sauerstoffradikalen, auf. Dabei reagiert der achte Kohlenstoff im Guanin mit der an der fünften Position im Thymin befindlichen Methyl-Gruppe^[7, 8]. Die Bildung von Interstrand- und Intrastrand-Crosslinks führt dazu, dass die DNA-Replikation und Transkription gehemmt werden und zu strukturellen Veränderungen in der DNA führen^[9]. Chemotherapeutika bedienen sich dieses Verhaltens und werden eingesetzt, um die DNA-Replikation in Tumorzellen zu hemmen^[10]. Der Fanconi-Reparaturmechanismus repariert Interstrand Crosslinks (ICL).

Am Fanconi-Reparaturmechanismus sind mindestens 19 Proteine beteiligt. Diese lassen sich in drei Kategorien einteilen^[11]: den Fanconi-Kernkomplex (FA-Komplex), den FANCI/FANCD2-Komplex (ID-Komplex) und den nachgeschalteten Proteinen. Zum FA-Komplex gehören acht FANC-Proteine (FNACA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL und FANCM) und drei assoziierende Proteine (FAAP20, FAAP24 und FAAP100)^[3, 4]. Der ID-Komplex besteht aus zwei FANC-Proteinen (FANCI und FANCD2) und bildet den zentralen Punkt des Reparaturmechanismus'. Der Fanconi-Reparaturmechanismus wird durch die Anwesenheit von ICLs aktiviert. Diese Aktivierung signalisiert dem FA-Komplex den ID-Komplex zu monoubiquitinieren, um mit den ICLs interagieren zu können^[12]. Die dritte Kategorie sind die nachgeschalteten Proteine. Dies sind FANCD1 (BRCA2), FANCI (BRIP1), FANCL (PALB2), FANCO (RAD51), FANCP (SLX4), FANCF (XPF), FANCG (RAD51) und FANCS (BRCA1). Diese sind im weiteren Verlauf an der Reparatur der ICLs beteiligt^[13]. Sie reparieren die DNA mittels homologer Rekombination^[14]. Eine Darstellung wie der Fanconi-Reparaturmechanismus abläuft, ist in Abb. 3 zu sehen.

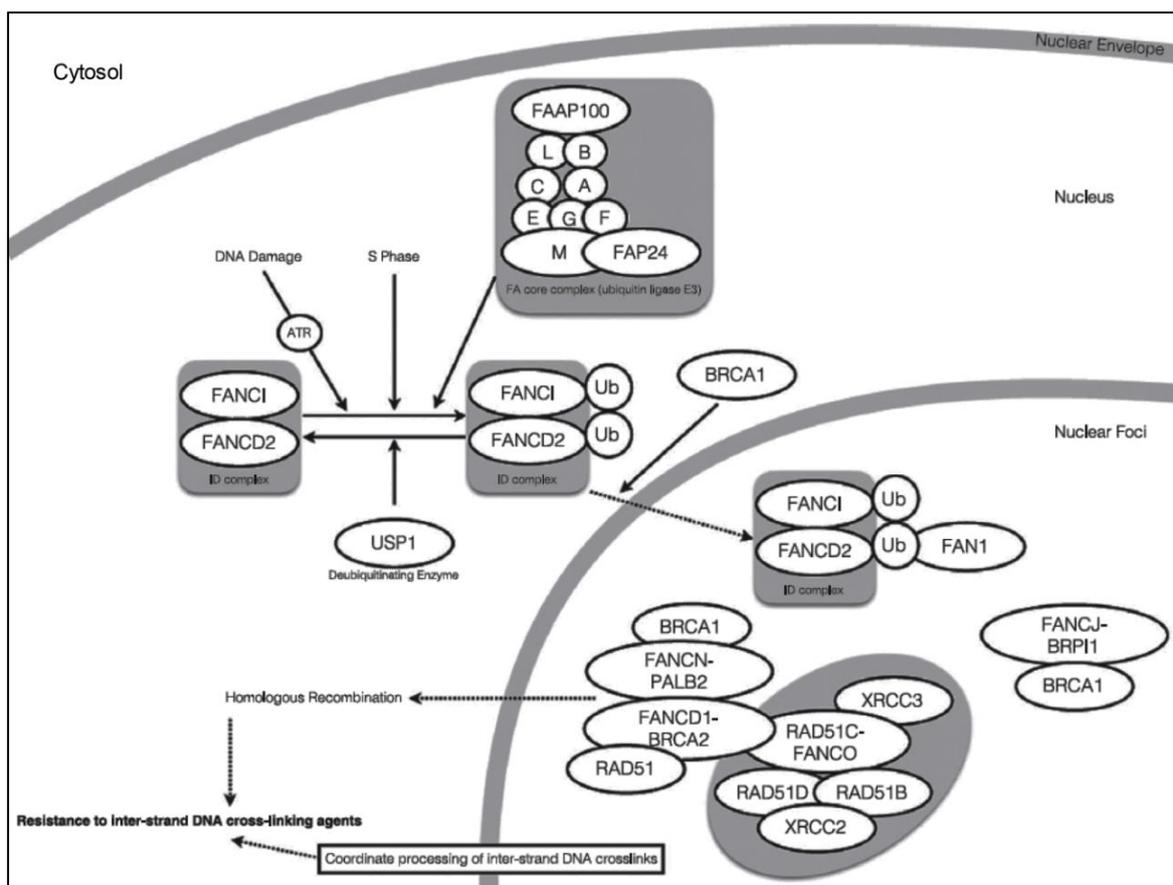


Abb. 3: Darstellung des Fanconi-Reparaturmechanismus. Der FA-Komplex (A, C, F, G, E) erkennt ICLs und agiert daraufhin als Ubiquitinligase E3, wodurch der ID-Komplex (FANCD2, FANCI) ubiquitiniert wird. Dieser Komplex reagiert mit weiteren Proteinen, wodurch es zur DNA-Reparatur mittels homologer Rekombination kommt^[14].

3.1 Fanconi-Anämie

Bei der Fanconi-Anämie (FA) handelt es sich um eine seltene, rezessive Erbkrankheit des Menschen, welche bei ca. einer von 100000 Geburten auftritt. Die FA wurde nach dem Schweizer Kinderarzt Guido Fanconi benannt, welcher diese Erkrankung erstmals im Jahre 1927 beschrieben hat^[15]. Bisher wurden 19 Gene entdeckt, in denen auftretende Mutationen zur FA führen. Die meisten Mutationen in diesen Genen entwickeln einen FA-assoziierten Phänotyp mit Geburtsfehlern, einem früh einsetzendem Knochenmarksversagen, einer Veranlagung zur Entwicklung einer aplastischen Anämie, sowie festen Tumoren. Bei einigen Mutationen in FANCA-Genen zeigen sich nur wenige dieser phänotypischen Merkmale^[16]. In den 70er Jahren wurde entdeckt, dass Zellen mit Mutationen in einem der FA-Gene sensibel auf Reagenzien reagieren, die zu ICLs führen (z.B. Mitomycin C oder Diethoxybutan)^[17-22]. Daher wird angenommen,

dass es bei der FA nicht möglich ist, ICLs zu reparieren^[17, 19]. Die meisten Mutationen treten in den Genen von FANCA, FANCC und FANCG auf, welche Proteine des Fanconi-Kernkomplexes codieren. Mutationen in diesen Genen sorgen für 85 % aller FA-Erkrankungen, wobei Mutationen im FANCA-Gen mit einer Häufigkeit von 60 % aller FA-Erkrankungen am Häufigsten sind^[23, 24].

3.1.1 Ätiologie/molekulare Ursache

Unter Betrachtung des FANCA-Gens, auf das der Schwerpunkt in dieser Arbeit liegt, wurden bisher bereits über 100 pathogene Mutationen entdeckt^[25, 26]. Ungefähr ein Drittel der Mutationen sind Deletionen^[27, 28]. In der Proteinstruktur des FANCA wurde gezeigt, dass die Region des Proteins zwischen den Aminosäuren 1046-1320, die von den Exonen 32-39 kodiert wird, essentiell für die Funktionalität des Proteins ist. Viele Mutationen wurden bei Patienten in diesem Bereich gefunden^[25, 26]. Der komplette Verlust des FANCA-Proteins führt zu einem ausgeprägten Phänotypen, während kleinere Veränderungen im Protein zu einem milderen Phänotyp und im fortgeschrittenen Alter zu einer Veranlagung zur Entwicklung einer aplastische Anämie führen^[29]. Im Laufe der letzten Jahre wurden mehrere Studien über die molekulare Ursache einer FA, basierend auf einem Defekt im FANCA-Gen, gemacht. Bisher wurde beobachtet, dass es ein verstärktes Auftreten der FA bei bestimmten ethnischen Gruppen gibt, wie den spanischen Roma^[30], den aschkenasischen Juden^[31] und Afrikaander aus Südafrika^[32]. Es wurden unter anderem israelische^[33], spanische^[34] und italienische^[26] Patienten untersucht.

Von 32 untersuchten israelischen Patienten konnte bei 15 Mutationen im FANCA-Gen nachgewiesen werden. Eine Auflistung der Mutationen ist in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Auflistung von FANCA-Mutationen in israelischen Patienten^[33]. Die Tabelle wurde modifiziert.

Mutation	Kultureller Ursprung
2574C>G	Indisch-jüdisch
2172-2173+G	Marokkanisch-jüdisch
890-893del	Tunesisch-jüdisch
4257delT	Marokkanisch-jüdisch
IVS42-2GC	Arabisch
Val229Ile	Arabisch
Del ex6-31	Arabisch

Tamary et al. weisen bei den jüdischen Patienten auf einen möglichen ethnisch-zuzuordnenden Zusammenhang hin.

Bei den spanischen Patienten wurden 130 mutierte Allele bei 67 Patienten gefunden, von denen 52 Mutationen zur Ausbildung der Fanconi-Anämie führten. Dafür wurden die 43 Exone des FANCA-Gens untersucht. Es lagen hauptsächlich Punktmutationen und kleine Insertionen, sowie Deletionen vor. Es wird vermutet, dass die meisten durch das Abrutschen der DNA-Polymerase während der Replikation entstanden sind. Die Mutationen liegen in den Exonen, den Introns und auch in nicht-kodierenden Bereichen der DNA vor^[34]. Die 67 untersuchten Patienten gehören alle der ethnischen Gruppe der spanischen Roma an. Es wurden verschiedene Mutationen gefunden, darunter auch die Mutation 3788_3790delTCT, welche die häufigste Mutation (20.7%) bei den spanischen Roma ist. Bei dieser Mutation wurden zwischen den Basen 3788 und 3790 drei Basen deletiert. Sie liegt in Exon 38 des FANCA-Gens. Sie gehört nicht nur zur häufigsten Mutation in Spanien, sondern auch zur häufigsten Mutation weltweit^[34].

Bei den italienischen Patienten wurden ebenfalls alle 43 Exone des FANCA-Gens von 38 Patienten untersucht. Dabei wurden zehn unterschiedliche Mutationen

entdeckt. Darunter waren drei Nonsense-Mutationen, vier Änderungen der Splicestellen, eine Duplikation, eine Insertion und vier Missense-Substitutionen^[26].

Anhand der Studien über die Mutationen in FA-Patienten ist eindeutig, dass es zahlreiche Mutationen im FANCA-Gen gibt, die ursächlich für eine Erkrankung an der FA sind. Davon sind hier nur wenige beispielhaft dargestellt.

3.1.2 Therapiemöglichkeiten

Für die Fanconi-Anämie (FA) ist bisher keine ursächliche Therapie möglich. Symptomatische Therapien sind die Knochenmarktransplantation, die Transplantation von Nabelschnurblut, sowie die Verwendung von Medikamenten, die eine Knochenmarktransplantation jedoch nicht unabwendbar macht. Bei der Knochenmarktransplantation gibt es eine Überlebensrate von bis zu 90% bei gut passenden Spendern^[35]. Dennoch kann es nach erfolgreicher Transplantation zur Entwicklung bösartiger Tumore kommen^[36]. Die Verwendung von Nabelschnurblut zusammen mit optimierten Protokollen und der Verwendung von Fludarabin als Zytostatikum erreicht eine hohe Überlebensrate^[37-40]. Mit diesen Therapien kann jedoch die Ursache der Erkrankung nicht behandelt werden.

Aus diesem Grund wird daran geforscht, bei hämatopoetischen Vorläuferzellen und Fibroblasten eine Gentherapie durchzuführen. Die Fibroblasten werden dafür zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) reprogrammiert. Dies geschieht durch eine Transduktion mit Reprogrammierungsfaktoren, wie *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *cMyc*. Eine Korrektur solcher Zellen hat gezeigt, dass die FANCA-Proteinexpression wiederhergestellt werden kann^[41, 42].

Die hämatopoetischen Vorläuferzellen sollen hingegen mit genom-verändernden Nukleasen korrigiert werden. Eine vielversprechende Therapiemöglichkeit ist hier die Verwendung des neuartigen CRISPR/Cas9-Systems, mit dem bisher FANCA-Mutationen in humanen Fibroblasten korrigiert werden konnten^[43]. Es wurde eine Cas9-Nickase verwendet. Diese begünstigt die homolog-gerichtete Reparatur von Einzelstrang-Brüchen. In der Studie von Osborn et al. wurden Fibroblasten von FA-Patienten verwendet, welche mit der Cas9-Nickase transformiert wurden^[43]. Es wurde festgestellt, dass die Verwendung der Cas9-Nickase zu einer Wiederherstellung der FANCA-Proteinexpression führt. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass in den Fibroblasten die untersuchte Mutation korrigiert werden konnte. Allerdings würde sich für eine Anwendung dieser Methode als

Therapiemöglichkeit die Verwendung von hämatopoetischen Vorläuferzellen besser eignen^[43].

Eine schematische Darstellung der Reprogrammierung von Fibroblasten und die Genkorrektur von hämatopoetischen Vorläuferzellen ist in Abb. 4 dargestellt.

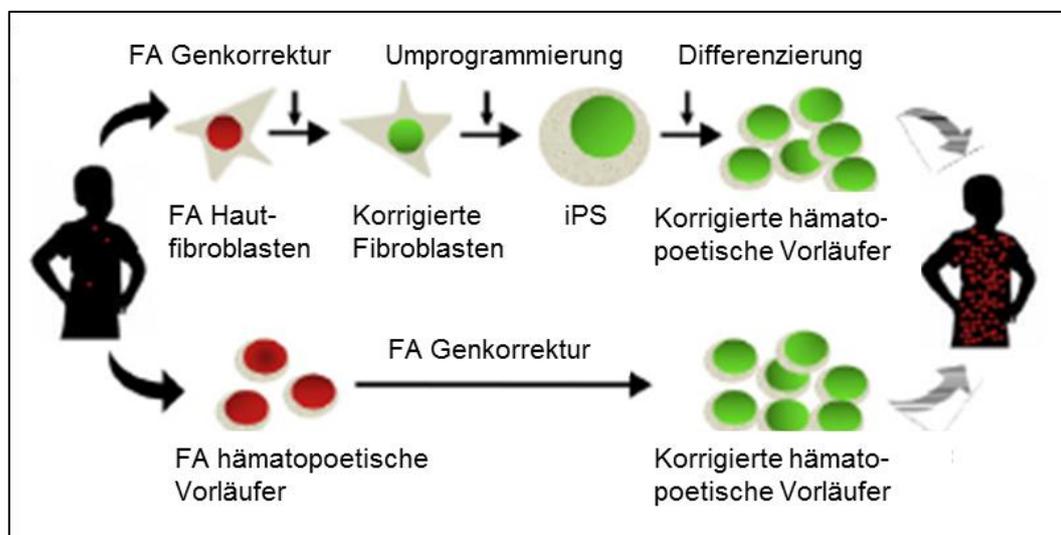


Abb. 4: Mögliche Zell- und Gentherapiestrategien in der Fanconi-Anämie^[44]. Die Abbildung wurde modifiziert.

3.2 Krankheitsmodelle für die Fanconi-Anämie

Damit eine Ursachen- und Therapieforschung stattfinden kann, sind Tiermodelle notwendig. Für die Fanconi-Anämie (FA) wurden Mausmodelle generiert^[45-50]. Diese Modelle repräsentieren jedoch nicht den humanen Phänotyp. Daher ist ein alternatives Tiermodell notwendig.

3.2.1 Mausmodelle

Die erstellten Mausmodelle wurden mittels embryonaler Stammzellen und homologer Rekombination erstellt. Im *FancA*-Gen der Mäuse wurden die Exone 4-7 durch einen *lacZ-Neo*-Marker ausgetauscht, was zu einem Knockout des *FancA*-Proteins geführt hat^[45]. Das *FancA*^{-/-}-Modell zeigt eine verringerte Fruchtbarkeit sowie eine erhöhte Sensitivität gegen ICL-induzierende Reagenzien, wie Mitomycin C. Allerdings ist kein Knochenmarkversagen zu beobachten^[51]. Durch Zugabe von ICL-induzierenden Reagenzien konnte bei den Modellen ein Knochenmarkversagen hervorgerufen werden^[47]. Einen Vergleich des humanen Phänotypen zum Phänotyp im *FancA*^{-/-}-Mausmodell ist in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Phänotyp des FancA-Mausmodells im Vergleich zu Fanconi-Anämie-Patienten^[52].

Phänotyp	Mausmodell (FancA^{-/-})	Mensch
Knochenmark	Kein Knochenmarkversagen	Knochenmarkversagen, Aplastische Anämie, Hypoplasie
Entwicklungsdefekte	Mikrophthalmie, Mikrozephalie	Kleine Statur, kongenitale Missbildungen vom zentralen Nervensystem; Mikrophthalmie und Mikrozephalie
Tumorentwicklung	Lymphome, Sarkome und Eierstocktumoren nach 15 Monaten	Akute myeloische Leukämie, schuppenartige Zellkarzinome
Mitomycin C-Sensitivität	Hypersensitivität	Hypersensitivität

Allerdings gibt es neben den homozygoten FA-Modellen auch doppelt-mutierte FA-Mausmodelle. So wurden FancA^{-/-}, FancC^{-/-}-Doppelmutanten erstellt, welche jedoch keinen veränderten Phänotyp zeigen, wohingegen eine FancC^{-/-}, FancG^{-/-}-doppelmutante Mauslinie eine Myelodysplasie und ein Knochenmarkversagen entwickelt^[53, 54]. Bei der humanen Erkrankung kommt es jedoch nicht zu Mutationen in verschiedenen FA-Genen. Daher sind die Mausmodelle nur begrenzt geeignet für die Ursachen- und Therapieforschung der humanen Erkrankung.

3.2.2 Alternative Säugermodelle

Eine mögliche Alternative stellt das Schwein dar. Im Schwein wurde bereits erfolgreich eine Krankheit modelliert, die, ebenso wie die FA, keinen zutreffenden Phänotyp in den Mausmodellen hervorruft. Bei dieser Krankheit handelt es sich um die Mukoviszidose^[55]. Es wurde erfolgreich eine Mukoviszidose in Schweinen^[56] induziert, welche spontan die Lungenerkrankung als hauptsächlichen Phänotyp entwickelt haben. Zudem kam es zur Erkrankung der Pankreas, der Gallenblase und des Darms^[57, 58]. Somit konnte das Multiorganversagen, welche auch beim humanen Phänotyp auftritt, reproduziert

werden. Folglich ist es möglich, diese Modelle für Therapieansätze, wie für stammzell-basierende oder genom-editierende Therapien, zu verwenden^[59-61].

Aufgrund der eingeschränkten Repräsentation der Fanconi-Anämie (FA) im Mausmodell, ist es notwendig, ein alternatives Tiermodell zu generieren. Dafür können andere Säuger, wie das Schwein verwendet werden^[62]. Dieses zeigt eine große physiologische und pathologische Ähnlichkeit mit dem Menschen. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit porcine Zellen und parthenogenetischen Embryonen verwendet, bei denen spezifische Mutationen im FANCA-Gen eingeführt werden.

3.3 Homologe Rekombination

Die erste gezielte genetische Veränderung erfolgte 1983 mittels homologer Rekombination (HR) in Hefe^[63]. Capecchi et al. integrierten erstmals fremde DNA in das Genom von somatischen Mäusezellen mittels HR^[64]. Hierfür wurde der Ansatz gewählt, bei dem ein Gen mit zwei homologen Armen in eine Zielsequenz integriert wurde (Abb. 5). Im Jahr 1985 publizierte Smithies et al. die erfolgreiche HR im humanen chromosomalen β -Globin-Gen. Dabei wurde eine 0.001%ige Erfolgswahrscheinlichkeit der Modifikation festgestellt^[65]. Dies wurde 1986 in einer Publikation von Thomas et al. bestätigt^[66]. Im Jahr 1989 publizierten Capecchi et al. schließlich die homologe Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen^[67].

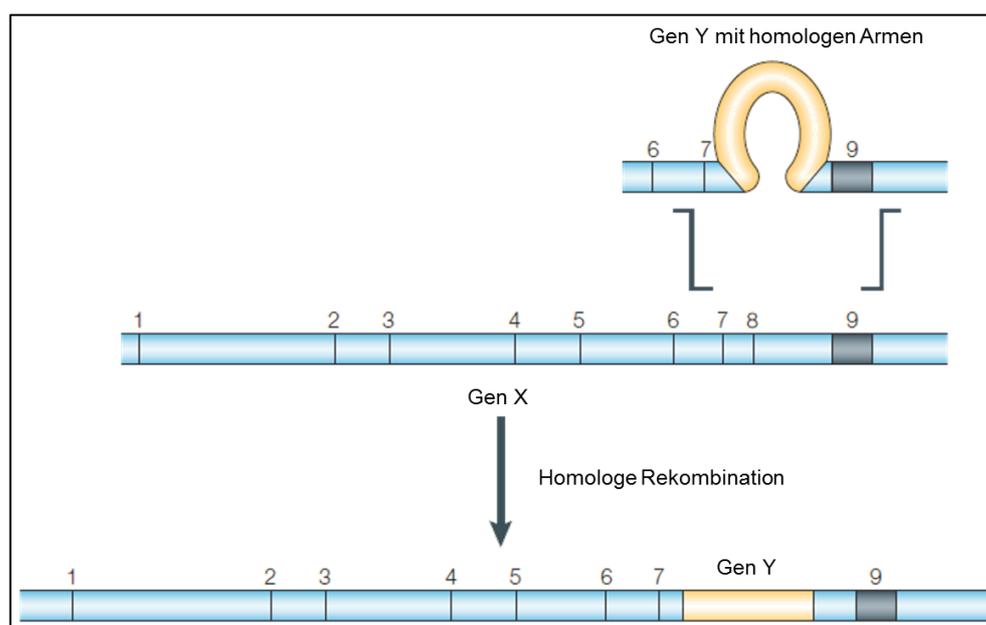


Abb. 5: Schematische Darstellung der homologen Rekombination^[68].

Es wurde festgestellt, dass längere homologe Arme die Effizienz der HR erhöhen^[67]. Da es aber auch Spezies gibt, bei denen es bisher nicht möglich war, embryonale Stammzellen zu generieren (z.B. Schwein), ist diese Methode nicht für alle Säuger anwendbar^[69].

3.4 Somatischer Zellkerntransfer (SCNT)

Der somatische Zellkerntransfer (SCNT) stellt eine Möglichkeit dar, eine gezielte genetische Veränderung bei Säugerspezies hervorzurufen, von denen keine embryonalen Stammzellen generiert werden können. Hierfür werden eine somatische Zelle und eine enukleierte Eizelle miteinander fusioniert. Das daraus entstehende Tier ist ein Klon des Tieres, von dem die somatische Zelle gewonnen wurde. Das erste aus einer somatischen Zelle geklonte Tier war 1997 das Schaf Dolly^[70].

Für den SCNT sind zwei Komponenten notwendig, eine somatische Zelle und eine gereifte Oozyte ohne Zellkern. Die Oozyte kommt von einem Spendertier. Diese Eizelle wird gereift und anschließend enukleiert, d.h. der Polkörper wird mit der Metaphasen-II-Platte entfernt. Somit enthalten die Eizellen, abgesehen von mitochondrialer DNA, keine eigene DNA. Von einem Gewebezellen-Spender werden die somatischen Zellen entnommen. Diese werden so kultiviert, dass der Zellzyklus der Zellen in der G0/G1-Phase stagniert. Es wird schließlich eine somatische Zelle in den perivitellinen Raum platziert. Dabei wird die Zelle nahe der Oozytenmembran platziert. Es folgt die Fusionierung der Zellen mittels eines elektrischen Impulses. Dadurch entsteht ein rekonstruierter Embryo. Nach einem weiteren elektrischen Impuls, durch den der Embryo aktiviert wird, kommt es zur Spaltungsteilung der Eizelle. Die Embryonen werden bis zum Blastozystenstadium kultiviert^[70-73]. Eine Darstellung des SCNT ist in Abb. 6 dargestellt.

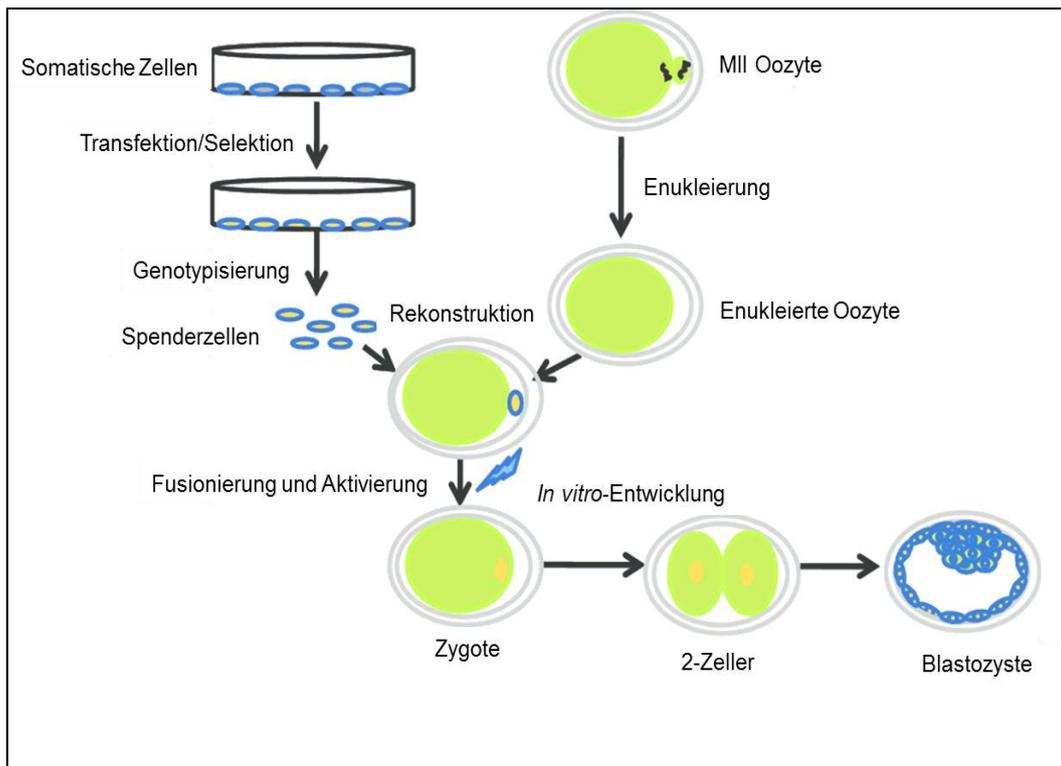


Abb. 6: Schematische Darstellung des somatischen Zellkerntransfers^[74]. Die Abbildung wurde modifiziert.

Im Durchschnitt entwickeln sich bei Klonen von Schweinen ca. 1 % der rekonstruierten Embryonen zu Ferkeln^[75]. Es gibt nur wenige Publikationen in denen dieser Wert überschritten wurde^[76, 77].

3.5 Genetische Editierung

Neben der gezielten Veränderung eines Genoms mittel homologer Rekombination und somatischen Zellkerntransfer besteht die Möglichkeit, moderne Genschere für die genetische Editierung zu verwenden. Darunter fallen Zinkfinger nukleasen, TALEN und das CRISPR/Cas9-System^[78]. Von diesen drei Nukleasen wurden die Zinkfinger nukleasen zuerst entwickelt. Da die Herstellung von TALEN jedoch einfach und günstiger war, wurden die ZFN von den TALEN abgelöst^[79]. In Jahr 2012 wurde das CRISPR/Cas9-System für die genetische Editierung in Säugern zugänglich gemacht^[80].

3.5.1 Zinkfinger nukleasen (ZFN)

Im Jahr 1985 wurde erstmals ein Zinkfinger (ZF)-Protein in *Xenopus*-Oozyten beschrieben^[81]. Die typische ZF-Struktur Cys_2Hys_2 gehört zu den häufigsten DNA-bindenden Motiven. Ein ZF enthält 30 Aminosäuren, die zwei anti-parallele β -

Faltblätter bilden, die entgegengesetzt einer α -Helix angeordnet sind^[82]. Die α -Helix bindet hierbei spezifisch an drei Basenpaare^[83]. Die Spezifität von Zinkfinger-Proteinen erhöht sich, wenn wenigstens drei ZF hintereinander angeordnet werden.

Zinkfingernukleasen (ZFN) sind Fusionsproteine aus Zinkfingern und der Endonuklease *FokI*. Die ZF bilden den spezifischen DNA-bindenden Bereich, während die *FokI* eine Restriktionsendonuklease ist, die DNA schneidet. Da die *FokI* nur bei einer Dimerisierung DNA schneiden kann, sind zwei ZFN für eine genetische Modifikation notwendig^[84]. Dabei entsteht an der Zielsequenz ein Doppelstrangbruch mit einem 5-7 Basen-Überhang (Abb. 7).

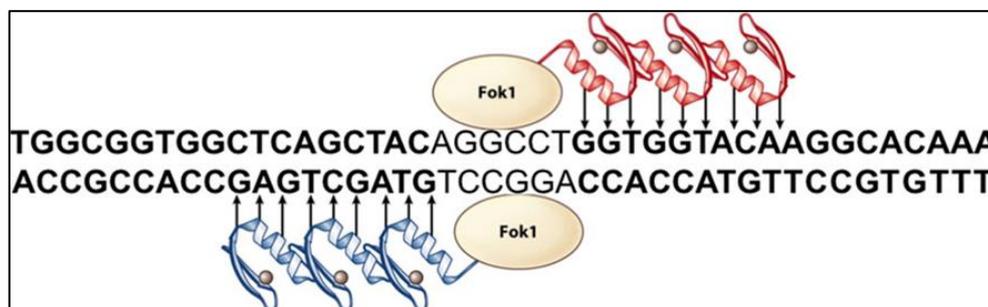


Abb. 7: Schematische Darstellung einer ZFN^[79].

ZFN werden mittels Transfektion oder Mikroinjektion in Zellen oder Embryonen eingebracht^[85]. Eine Inkubation der Zellen bei 30°C erhöht die Aktivität der ZFN^[86]. Obwohl ZFN sehr spezifisch sind, besteht die Möglichkeit sogenannte Off-Target-Ereignisse zu erhalten. Das sind Regionen in Genom, an die die ZFN ebenso binden kann wie am Ziellocus. Um Off-Targets ausschließen zu können, ist immer eine Off-Target-Analyse notwendig.

Nach dem Schnitt durch die ZFN in der DNA entsteht ein Doppelstrangbruch (DSB), der über zwei unterschiedliche Reparaturmechanismen repariert werden kann. Diese Mechanismen sind die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) oder die homolog-gerichtete Reparatur (HDR). Diese sind in Abb. 8 dargestellt.

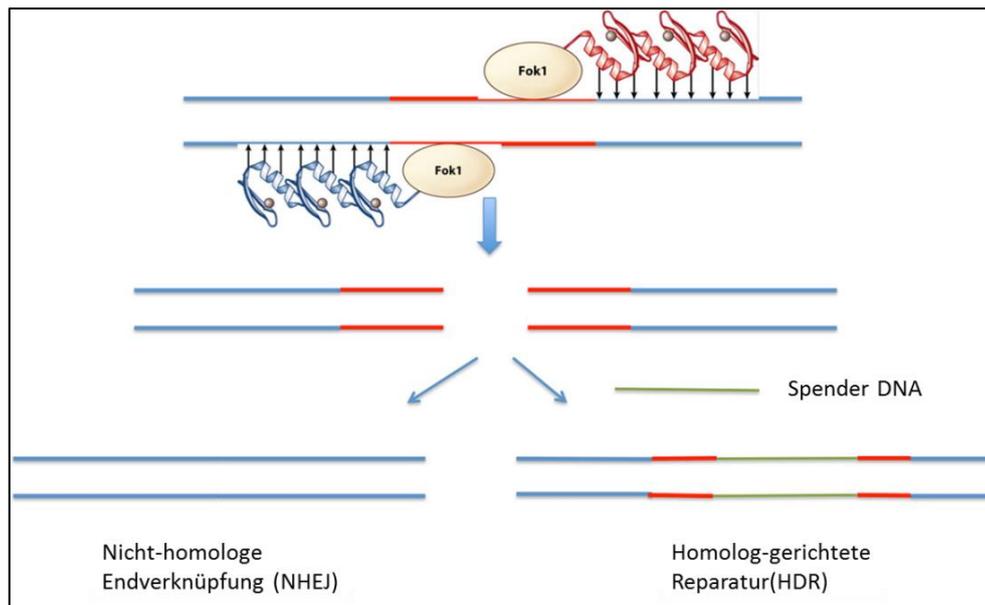


Abb. 8: Schematische Darstellung der Reparaturmöglichkeiten nach einem Doppelstrangbruch mittels ZFNs^[79]. Die Abbildung wurde modifiziert.

Die NHEJ ist stark fehlerbehaftet und führt oft zu Mutationen weniger Basenpaare^[87]. Diese können zu einer Leserasterverschiebung oder der Unterbrechung eines Gens führen. Dadurch kann ein Knock-out des Gens erzielt werden. Wenn zusätzlich zur ZFN eine Spender-DNA transfiziert wird, die homologe Arme zu beiden Seiten des DSB enthält, kann alternativ die HDR erfolgen. Die Spender-DNA enthält eine DNA-Sequenz flankiert von zwei homologen Armen. Dies wird während der Reparatur in die Sequenz kopiert^[88]. Die homologen Arme benötigen bei Säugetieren eine Länge von 500-1000 bp für eine spezifische homologe Rekombination^[89].

3.5.2 TALEN (Transcription activator-like effector nuclease)

Die Transcription activator-like effector (TALE) kommen in Pflanzenpathogenen wie *Xanthomonas* vor^[90]. Sie wirken als Transkriptionsfaktoren und aktivieren die Expression pflanzlicher Gene. Sie bestehen aus Wiederholungen von 33-35 Aminosäuren mit zwei Polymorphismen an Position 12 und 13. Diese werden repeat variable diresidues (RVD) genannt. Die RVDs binden spezifisch an ein Nukleotid, wodurch eine direkte Protein-DNA-Interaktion herbeigeführt wird^[90, 91].

Die Fusion von TALEs mit der Endonuklease *FokI* führte zur Entwicklung der Transcription activator-like effector nuclease (TALEN). Die Darstellung einer TALEN ist in Abb. 9 zu sehen.

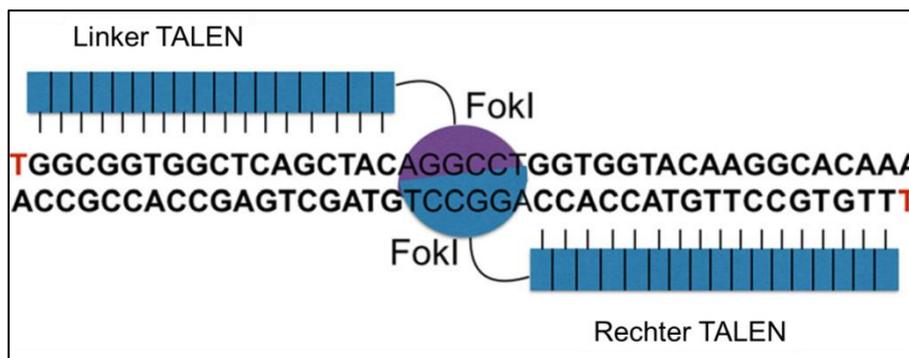


Abb. 9: Schematische Darstellung einer TALEN^[79].

Mit Hilfe von TALENs können Sequenzen gezielt und effizient geschnitten werden. Wie bei den ZFNs kann die Reparatur des entstandenen DSBs über NHEJ oder HDR erfolgen. Die Verwendbarkeit der TALENs ist mannigfaltig. Die Effektivität wurde bereits in Labormäusen, Ratten, Rindern und Schweinen ausgetestet^[92, 93]. Die hauptsächlichen Unterschiede zwischen TALENs und ZFNs sind die Herstellung, der Abstand sowie die Anzahl an Wiederholungen. Zudem ist der Abstand, wo der Schnitt stattfindet, bei den TALENs variabel. Weiterhin ist die Herstellung von TALENs einfacher als die der ZFNs. Dementsprechend ist die Generierung von TALENs der der ZFNs überlegen, da sie einfacher, günstiger und schneller vonstattengeht. Dennoch ist auch bei der Verwendung von TALENs eine Off-Target-Analyse unabdingbar.

3.5.3 CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein)

Das CRISPR/Cas-System ist im Vergleich zu den ZFNs und TALENs eine einfache und effiziente Alternative. In Bakterien und Archaeen ist dieses System ein RNA-gesteuerter Mechanismus, der eine Immunität gegen fremde DNA herbeiführt, indem diese geschnitten wird^[78, 94]. Im Bakterium *Streptococcus pyogenes* besteht das CRISPR-System aus der Nuklease Cas9, der tracrRNA und der crRNA. Die crRNA hybridisiert mit der tracrRNA, um so die Cas9 zur Zielsequenz zu führen, sodass dort ein spezifischer Schnitt herbeigeführt werden kann^[95, 96]. Zur weiteren Vereinfachung des CRISPR-Systems wurde eine single-guided RNA (sgRNA) entwickelt, die die Eigenschaften der tracrRNA und crRNA in sich vereint (Abb. 10).

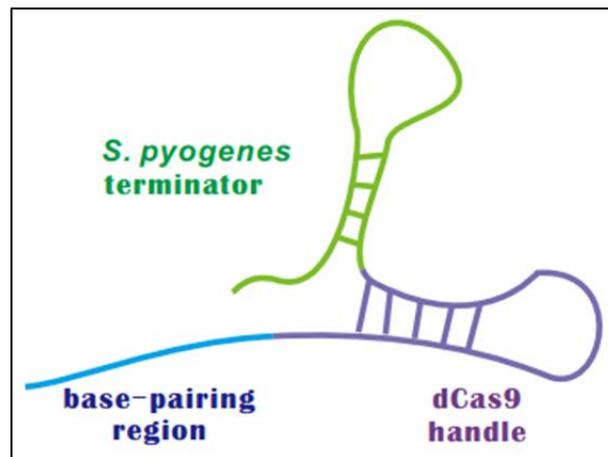


Abb. 10: Schematische Struktur der sgRNA von *Streptococcus pyogenes*. Die sgRNA teilt sich auf in die 20 bp große bindende Region (blau) und dem Scaffold, bestehend aus dem Cas9-bindenden Abschnitt (violett) und dem *Streptococcus pyogenes* Terminator (grün)^[97].

Dadurch ist es möglich die Cas9 zu binden, als auch die DNA Zielsequenz zu erkennen. Damit kann prinzipiell jede genomische Sequenz als Zielsequenz verwendet werden. Direkt anschließend an die Zielsequenz muss sich allerdings ein sogenanntes Protospacer benachbartes Motiv (PAM) befinden. Die PAM ist eine essentielle Komponente zum Erkennen der Zielsequenz. Bei Cas9 besteht die PAM aus den Nukleotiden NGG, wobei N jede beliebige Base sein kann. Drei Basen entfernt von der PAM erfolgt ein Schnitt in der DNA, wodurch ein DSB entsteht. Dieser wird über die Reparaturmechanismen des NHEJ oder der HDR repariert. Dadurch ist auch bei diesem System eine Off-Target-Analyse notwendig. Werden mehrere sgRNA verwendet, können zeitgleich mehrere Zielloci anvisiert werden. Die sgRNA können nach Klonierung in kommerziell erwerblichen CRISPR/Cas9-Vektoren verwendet werden (Abb. 11).

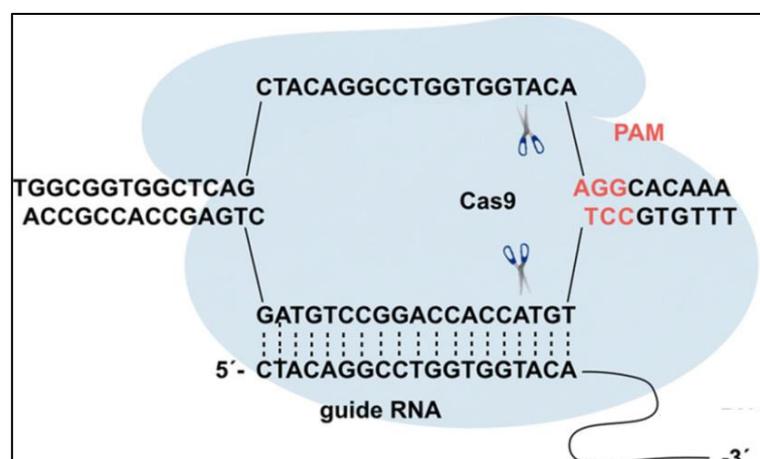


Abb. 11: Schematische Darstellung der CRISPR/Cas9^[79].

Im Vergleich zu ZFNs und TALENs ist das CRISPR/Cas-System einfach und günstig herzustellen. Zur Vermeidung möglicher Off-Targets, kann anstatt einer Cas9-Nuklease eine Cas9-Nickase verwendet werden^[98].

3.5.3.1 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems Mutationen im FANCA-Gen in porzinen Zellen und parthenogenetische Embryonen eingeführt werden. Dadurch sollen erste Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob es möglich ist, die Fanconi Anämie im Schwein zu induzieren, sodass dies als Grundlage für die Erstellung eines Schweinemodells für die Erkrankung genutzt werden kann. Hierfür werden verschiedene Exone im porzinen FANCA-Gen gezielt modifiziert. Die CRISPR/Cas9-Komponenten werden mittels Elektroporation oder Mikroinjektion in Zellen oder Embryonen eingeführt. Die transfizierten Zellen oder Embryonen werden schließlich auf spezifische Mutationen im FANCA-Gen und auf die Häufigkeit unerwarteter Off-Target-Ereignisse analysiert.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Molekularbiologische Medien und Puffer

Tab. 3: Verwendete Puffer für die PCR.

Komponente	TBE-Puffer
Tris-HCl	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2.5 mM

Tab. 4: Verwendete Puffer für die Antikörperinkubation.

Komponente	WB-TBS-Puffer
Tris-HCl	50 mM
NaCl	0.15 mM
Tween 20	0.1 %

Tab. 5: Verwendete Puffer für die Fraktionierung von Proteinen.

Komponente	Zytoplasmatischer Extraktionspuffer, pH 7.9	Nuklearer Extraktionspuffer, pH 7.9
Tris-HCl	-	-
EDTA	1 mM	0.2 mM
NaCl	-	4.6 M
HEPES	10 mM	5 mM
MgCl ₂	1.5 mM	1.5 mM
KCl	10 mM	-
DTT	0.5 mM	0.5 mM
Igepal	0.05 %	-
Glycerin	-	26 %
Volumen	100 ml	100 ml

Elutionspuffer für die DNA-Extraktion

10 mM Tris-HCl, pH8.5

4.1.2 Medien und Puffer in der Zellkultur

Tab. 6: Zusammensetzung der DMEM-Stocklösung für die Herstellung der Zellkulturmedien.

Komponente	DMEM-Stock
DMEM	500 ml
L-Glutamin	2 mM
β-Mercaptoethanol	0.1 mM

Tab. 7: Verwendete Medien für die Zellkultur.

Komponente	D10 Medium	T3 Medium	D10 mit Puromycin	Pen/Strep-freies T3
DMEM-Stock	87 ml	67 ml	86.35 ml	68 ml
FCS	10 ml	30 ml	10 ml	30 ml
100x Pen/Strep	1 ml	1 ml	1 ml	-
100x Natriumpyruvat	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Nicht-essentielle Aminosäuren	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Puromycin	-	-	1.3 µg/ml	-

Tab. 8: Verwendeter Lysispuffer für die Lyse von STE-Zellen.

Komponente	Zell-Lysispuffer
10% SDS	20 µl
Proteinase K	50 µl
1M Tris-HCl, pH 8.4	200 µl
H ₂ O	9.73 ml

Tab. 9: Verwendetes ES-Zellmedium für die Kultivierung von iPS-Zellen^[99].

Komponente	ES-Zellmedium
DMEM-Stock + 20% Knockout-Replacement	
L-Glutamin	1 mM
Nicht-essentielle Aminosäuren	0.1 mM
β-Mercaptoethanol	0.1 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
β-FGF	4 ng/ml

4.1.3 Medien und Puffer im Umgang mit parthenogenetischen porzinen Embryonen

4.1.3.1 Oozytengewinnung

Tab. 10: Verwendeter Puffer bei der Oozytengewinnung.

Komponente	Oozyten- Waschpuffer
NaCl	1 M
KCl	0.1 M
KH ₂ PO ₄	3.5 mM
MgSO ₄	4 mM
NaHCO ₃	0.25 M
HEPES	1.25 M
Na-Pyruvat	2 mM
Ca-Lactat	40 mM
Gentamycin	10 mg
BSA	1 g
Volumen	1 l

Ovarien-Waschpuffer

NaCl 0.9 %
 Pen/Strep 0.06 g/0.131 g pro Liter

4.1.3.2 Reifungsmedium

Tab. 11: Zusammensetzung der DMEM/F12-Stocklösung.

Komponente	DMEM/F12- Stock
DMEM/F12	50 ml
Penicillin G	3 mg
Streptomycin	2.5 mg

DMEM1

DMEM/F12-Stock 9 ml
 Glutamin 2.5 mM
 FCS 10 %

Tab. 12: Verwendetes DMEM-Medium für die Reifung der Oozyten.

Komponente	DMEM2
DMEM1	1.9 ml
EGF	50 ng/ml (in PBS + 0.1 % BSA lösen)
PMSG/HCG	Je 10 I.E./ml
IGF1	100 ng/ml (in PBS + 0.1 % BSA lösen)
β-FGF	5 ng/ml (in PBS + 0.1 % BSA lösen)

4.1.3.3 Kumulusentfernung

Tab. 13: Zusammensetzung der TL-Hepes-Stocklösung.

Komponente	TL-Hepes + Ca ²⁺ - Stocklösung
NaCl	114 mM
KCl	3.2 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O*	2 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0.4 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0.5 mM
NaHCO ₃ *	2 mM
HEPES	10 mM
Na-Lactat (60%)	10 mM
Penicillin G	100 U/l
Streptomycin	50 mg/l
Volumen	1 l

Tab. 14: Verwendete Puffer für die Kumulusentfernung.

Komponente	TL-Hepes 321 + Ca ²⁺	TL-Hepes 296 + Ca ²⁺
Na-Pyruvat	0.25 mM	0.25 mM
Sucrose	57 mM	32 mM
BSA Frakt. V	0.4 %	0.4 %
TL-Hepes + Ca ²⁺ - Stocklösung	Auf 100 ml auffüllen	Auf 100 ml auffüllen

Waschpuffer für die Kumulusentfernung

TL-Hepes 321 + Ca ²⁺	2 ml
Hyaluronidase	0.1 %

4.1.3.4 Mikroinjektion

Tab. 15: Verwendeter Puffer für die Mikroinjektion.

Komponente	Injektionspuffer
Tris	10 mM
EDTA	0.125 mM
Volumen	50 ml

Lagerungspuffer

2.3 ml TL-Hepes 296 + 2 mM Ca²⁺

Tetramethylrhodamin-Dextran

Dextran ist ein hydrophiles Polysaccharid, welches biologisch inert ist aufgrund einer ungewöhnlichen Poly-(α -D-1,6-glucose)-Bindung. Tetramethylrhodamin (TMR) ist ein fluoreszierender Farbstoff mit einem Anregungswellenmaximum von 555 nm und einem Emissionswellenmaximum von 580 nm. Das TMR und das Dextran werden über eine Succinimidyl-Kopplung aneinander gebunden. Dabei entsteht ein Succinimidylester. Das TMR-Dextran ist bei ThermoFisher erhältlich^[100].

4.1.3.5 Aktivierung und Kultivierung

Waschpuffer 296

7 ml TL-Hepes 296 + 2 mM Ca²⁺

Aktivierungsmedium

6-DMAP 2 mM

PZM 1.5 ml

Tab. 16: Verwendeter Puffer für die Aktivierung.

Komponente	Aktivierungspuffer Sor2
Sorbitol	0.25 M
Ca-Acetat	0.1 mM
Mg-Acetat	0.5 mM
BSA Frakt. V	0.1 %
Volumen	1 l

Tab. 17: Verwendeter Puffer für die Kultivierung.

Komponente	Kulturmedium PZM
NaCl	108 mM
KCL	10 mM
KH ₂ PO ₄	0.35 mM
MgSO ₄	0.4 mM
NaHCO ₃ *	25 mM
Na-Pyruvat	0.2 mM
Ca-Lactat	2 mM
L-Glutamin	1 mM
Hypotaurin	5 mM
BME	2 ml/100ml
MEM	1 ml/100ml
Gentamicinsulfat	0.05 mg/ml
BSA	3 mg/ml
Volumen	1 l

*getrennt lösen

4.1.3.6 Hoechst-Färbung

5 µg/ml Hoechst 33342

4.1.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tab. 18: Verwendete Substanzen für die Erstellung eines Trenngels.

Komponente	SDS- PAGE
Acrylamid/ Bisacrylamid	30 % / 0.8 %
Tris-HCl, pH 6.8	1.5 M
10% SDS	100 µl
10% APS	50 µl
TEMED	5/10 µl
H ₂ O	Auf 10 ml auffüllen

Tab. 19: Verwendete Substanzen für die Erstellung eines Sammelgels.

Komponente	SDS- PAGE
Acrylamid/ Bisacrylamid	30 % / 0.8 %
Tris-HCl, pH 8.8	0.5 M
10% SDS	100 µl
10% APS	50 µl
TEMED	5/10 µl
H ₂ O	Auf 10 ml auffüllen

Tab. 20: Verwendeter Auftragspuffer für die SDS-Gelelektrophorese.

Komponente	SDS- Ladepuffer
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml
10% SDS	2 ml
H ₂ O	3.55 ml
Glycerin	2.5 ml
0.5% Bromphenolblau	0.2 ml
β-Mercaptoethanol	50 µl

10x Laufpuffer, pH 8.3

Natriumlaurylsulfat	10 g
Tris	30.3 g
Glycin	144 g

Tab. 21: Verwendete Puffer für den Semi-Dry Blot.

Komponente	Kathodenpuffer, pH 10.4	Anodenpuffer A, pH 10.4	Anodenpuffer B, pH 9.4
Tris	25 mM	300 mM	25 mM
Methanol	20 %	20 %	20 %
6-Amino- Hexansäure	40 mM	-	-
Volumen	1 l	1 l	1 l

4.1.5 DNA-Größenstandard

100 bp DNA Ladder, #N3231, New England Biolabs

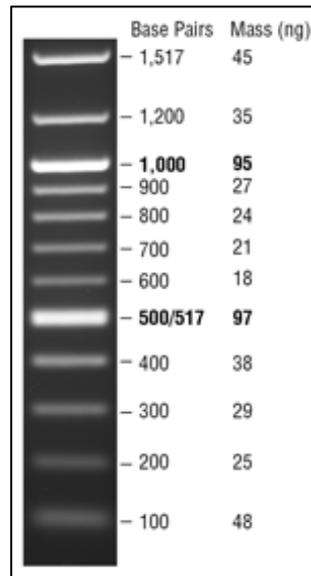


Abb. 12: Verwendeter 100 bp DNA-Größenstandard.

4.1.6 Protein-Größenstandards

ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range, #P7711S, New England Biolabs

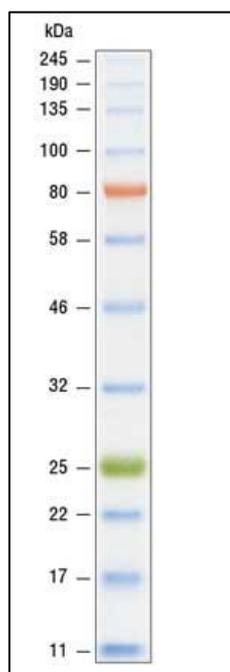


Abb. 13: Verwendeter vorgefärbter Protein-Größenstandard.

WB-MASTER Protein Standard, M00521, GenScript

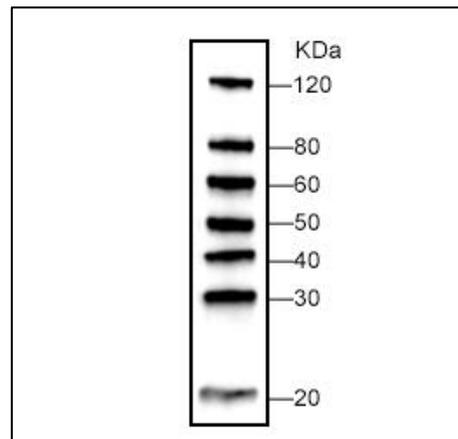


Abb. 14: Verwendeter Western Blot Protein-Größenstandard.

4.1.7 Plasmide

4.1.7.1 *pT2Venus*

Das Plasmid *pT2Venus* ist ein Reporter-Plasmid. Das fluoreszierende Protein Venus ist auf dem Plasmid kodiert. Der Reporter wird durch den CAGGS-Promoter angetrieben. Weiterhin finden sich zwei sich wiederholende Bereiche im Plasmid (Inverted Terminal Repeats, ITR), welche den CAGGS-Promoter und den Venus Bereich flankieren. Das Plasmid wird als Reporter verwendet, um mittels Fluoreszenz die Transfektionsrate und -effizienz zu analysieren. Die Fluoreszenz wird transient exprimiert. Wird das Plasmid zusammen mit *pCMV/SB100* verwendet, wird der Reporter integriert. Dieses Plasmid wurde für die Vorversuche zur Mikroinjektion in parthenogenetische porcine Embryonen verwendet.

4.1.7.2 *pCMV/SB100*

Das Plasmid *pCMV/SB100* kodiert die Sleeping Beauty (SB) Transposase, welche für die Integration des Bereiches zwischen den beiden ITRs des *pT2Venus*-Plasmid benötigt wird. Die Transposase erkennt TA-Dinukleotide im Genom und fügt dort ein Transposon (hier: Venus-Reporter) ein. Das Plasmid findet Anwendung in den Optimierungsversuchen der Mikroinjektion. Dort wird mit Hilfe des *pCMV/SB100* der Venus-Reporter von *pT2Venus* in das Genom von parthenogenetischen porcinen Embryonen eingefügt, um mittels Fluoreszenz die Transfektionsrate und -effizienz zu analysieren.

4.1.7.3 pJoker

In den Klonierungsvektor pJoker kann die sgRNA, die für die Anvisierung der Zielsequenz und die Führung der Cas9 notwendig ist, ligiert werden. Das Plasmid kann zusammen mit einem Vektor, der die Cas9 kodiert, für Transfektionsversuche verwendet werden. Das Plasmid pJoker wird für die FANCA-INDEL-Bildung verwendet. Das Plasmid pJoker wurde zusammen mit p119 C-Check sowie pX330 verwendet. Es wurde sowohl für die Mikroinjektion von porzinen parthenogenetischen Embryonen als auch für die Transfektion von STE-Zellen verwendet.

4.1.7.4 pX330

Auf dem Plasmid pX330 wird die Nuklease Cas9 kodiert. Diese ist notwendig für das CRISPR/Cas9-System (siehe 3.5.3). Weiterhin besteht die Möglichkeit die Sequenz für die sgRNA in das Plasmid zu klonieren und somit eine gleichzeitige Expression der sgRNA und der Cas9 zu gewährleisten. Das Plasmid pX330 wird für die FANCA-INDEL-Bildung verwendet. Das Plasmid pX330 wurde zusammen mit p119 C-Check sowie pJoker transfiziert. Es wurde sowohl für die Mikroinjektion von porzinen parthenogenetischen Embryonen als auch für die Transfektion von STE-Zellen verwendet.

4.1.7.5 p119 C-Check

Das p119 C-Check-Plasmid kann als Abbild-Vektor für die genomische Zielsequenz dienen. Es kodiert zwei unterschiedliche fluoreszierende Proteine. Ein Reporter ist asRed, welcher dauerhaft exprimiert wird. Der andere Reporter ist eGFP. Dieser ist aufgeteilt in zwei Abschnitte. Beide sind 600 bp groß (1-600 bp, 100-700 bp), welche inaktiv sind. Weiterhin ist auf dem Plasmid die Zielsequenz kodiert, welche von der sgRNA erkannt wird. Dadurch wird ein Doppelstrangbruch (DSB) in dem Plasmid herbeigeführt. Danach erfolgt die Reparatur des DSBs. Diese erfolgt durch homologe Rekombination, da die eGFP-Abschnitte einen Überlapp von 500 bp enthalten. Die Reporterfluoreszenz wird dadurch aktiviert. Es ist, je nach erstelltem Plasmid, eine andere Sequenz eingefügt. Die Sequenzen entsprechen den Zielsequenzen, die von den sgRNAs der drei Exone (Exon7, Exon9, Exon10) anvisiert werden. Die Sequenzen für die entsprechenden Zielsequenzen lauten wie folgt.

Exon7: 5'- **gtcg**CACCGACGTCGCCAGAGCTGTGCTGAC - 3'

Exon9: 5'- **gtcg**TCCCCACAGATCGCGGCTGATGTCCTG - 3'

Exon10: 5'- **gtcg**GAGGCGTCAGCGGCGTACAAGGCGGTG - 3'

Hervorgehoben ist die Sequenz, die für die Ligation ins Plasmid notwendig ist. Die PAM ist in den Sequenzen unterstrichen.

Diese wurden sowohl für die Mikroinjektion von parthenogenetischen porzinen Embryonen als auch für die Transfektion von STE-Zellen verwendet.

4.1.7.6 pX458

Das Plasmid pX458 kodiert die Cas9-cDNA. Weiterhin kodiert es die Sequenz für die sgRNA für die knock-out Ziele. Auf dem Plasmid ist das fluoreszierende Protein eGFP kodiert. Dadurch ist eine Transfektion mittels Reporter nachzuvollziehen. Es ist, je nach Ziel-Exon, eine andere Sequenz für eine sgRNA eingefügt. Die Sequenzen lauten wie folgt.

Exon7: 5'- **caccg**ACGTCGCCAGAGCTGTGCTG - 3'

Exon9: 5'- **caccg**ACAGATCGCGGCTGATGTCC - 3'

Exon10: 5'- **caccg**GGCGTCAGCGGCGTACAAGG - 3'

Das Plasmid pX458 wurde sowohl bei der Mikroinjektion in parthenogenetische porzine Embryonen als auch bei der Transfektion von STE-Zellen verwendet.

4.1.7.7 pX459

Das Plasmid pX459 kodiert die Cas9 für CRISPR/Cas9. Weiterhin kodiert es die Sequenz für die sgRNA. Auf dem Plasmid ist eine Puromycin-Resistenz kodiert, um eine Selektion positiver Zellen zu ermöglichen. Es ist je nach Ziel-Exon eine andere Sequenz für eine sgRNA eingefügt. Die Sequenzen lauten wie folgt.

Exon7: 5'- **caccg**ACGTCGCCAGAGCTGTGCTG - 3'

Exon9: 5'- **caccg**ACAGATCGCGGCTGATGTCC - 3'

Exon10: 5'- **caccg**GGCGTCAGCGGCGTACAAGG - 3'

Das Plasmid pX459 wurde bei der Transfektion von STE- und primären Zellen verwendet.

4.1.8 Antikörper

FANCA Antikörper – N-terminale Region (ARP41678_P050), 0.5 mg/ml, Aviva Systems Biology

Polyclonaler FANCA1 Antikörper (A0401) aus Kaninchen, der gegen den N-terminalen Rest des humanen FANCA-Proteins gerichtet ist. Bereitgestellt von der Fanconi Assoziation.

Polyclonaler anti-FANCD2 Antikörper (D0408), der gegen das C-terminale Ende des humanen FANCD2-Proteins (FA-assoziativ) gerichtet ist. Bereitgestellt von der Fanconi Assoziation.

4.1.9 Bakterien

DH5 α , *Escherichia coli*, NEB; Genotyp: *fhuA2* Δ (*argF-LacZ*)*U169 phoA glnV44* ϕ 80 Δ (*lacZ*)*m15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

4.1.10 Genutzte Laborgeräte

Tab. 22: Verwendete Laborgeräte.

Gerät	Gerät im Labor
Cryostat	CM 3050 S, Leica
Durchflusszytometer	MACSQuant [®] Analyzer 10, Miltenyi Biotec
Elektrophoresegerät	EPS 600, Pharmacia Biotech PowerPac Basic, Biorad MiniProtein III, Biorad
Elektroporationssystem	Gene Pulser Xcell [™] , Biorad Neon [™] Transfektionssystem, Thermo Fisher
Emissionsfilter	#100, spring yellow, Lee Filter Bandpass Ex 450-490 nm, Em 520-550 nm Bandpass 505-530
Geldokumentationsgerät	Vilber Lourmat, Vilber
Inkubator	HERA cell 150i CO ₂ incubator, Thermo Scientific HERA cell 150 CO ₂ incubator, Thermo

	Scientific
	FunctionLine, Heraeus
Kamera	Digital sight DS-U3, Nikon
	Powershot, Canon
	12 CCD
Kommerzielle Kits und Enzyme	GeneJet Plasmid Miniprep, Thermo Scientific
	ECL™ Prime Westerns Blotting Detection Reagent, GE Healthcare
	GoTaq G2 HotStart, Promega
	Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen
	Neon™ 100µl Kit, Invitrogen
	PureYield™ Plasmid Maxiprep System, Promega
LED Flutlicht	FL5 (blue), Eurolight
Lichtquelle	KL 1500, LCD
Lichtquelle für Fluoreszenz	X-Cite 120 Q, Excelitas Technologies
Laser	Argon (488 nm, 21 %)
	Helium-Neon (633 nm, 89 %)
Mikroinjektor	FemtoJet, Eppendorf
	TransferMan, Eppendorf
Mikropipettenzieher	Flaming/Brown, Model P-87, Sutter Instruments
	Heat: 945, Pull: 115, Vel.: 90, Time: 115
Mikroskop	DMIL LED, Leica
	SMZ-2B, Nikon
	Axiovert 35M, Zeiss
	LSM 510, Zeiss
Mikroschmiede	MF-100 Narishige, Bachofer
	Laboratoriumsgeräte
	Haltenadel: 4-5 Teilstriche,
	Transportnadel: 8 Teilstriche
	(1 Teilstrich = 0.025 mm)

	Okular: WF10X-S, Bachofer Laboratoriumsgeräte
Nadeln für die Mikroinjektion	Injektionsnadel Kapillaren 1.0 OD x 0.78 ID x 100 L mm, HARVARD Apparatus, 30-0038 Transport-, Halte- und Blastozystennadel Schmelzpunktbestimmungsröhrchen, 90 x 1.5 mM Ø, Assistent
Objektive	HI PLAN 10x/0.25 Ph1, Leica HI PLAN 20x/0.30 Ph1, Leica Plan-Apochromat 20x/0.75 Plan-Neofluar 10x/0.3 objective SDF PLFL 0.3x
Photometer	ND-1000, NanoDrop
Semi-Dry-Elektroblotter	PerfectBlue™, PEQLAB Biotechnologie GmbH
Stereozoommikroskop	SZX16, Olympus
Thermocycler	PTC-200, MJ Research
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf KS 4000i control, IKA
Vortex	VF2, Junke & Klunkel IKA-Labortechnik
Waage	BP 3100S, Sartorius
Zentrifugen	5417R, Eppendorf Multifuge X1R, Thermo Scientific 1-14, Sigma Biofuge pico, Heraeus Instruments Megafuge 1.0R, Heraeus Sepatech

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese erfolgt eine Auftrennung von DNA-Molekülen nach Größe. Das Agarosegel wirkt wie ein Sieb. Kleine Moleküle wandern schneller durch das Gel als große. Negativ geladene Moleküle wandern in Richtung Anode, positiv geladene in Richtung Kathode. Um die zu untersuchenden Moleküle später visualisieren zu können, wird das Agarosegel mit Ethidiumbromid (0.2 µg/ml) versetzt. Durch das Ethidiumbromid werden DNA-Moleküle mittels Anregung mit ultraviolettem Licht als eine fluoreszierende Bande erkennbar. Das Gel wird bei einer festgelegten Belichtungszeit belichtet. Für die Visualisierung wird eine Fotokamera mit integrierter UV-Lampe (Vilber Lourmat) von Vilber verwendet.

4.2.1.2 DNA-Extraktion aus Blastozysten

Nach der Kultivierung der parthenogenetischen Embryonen zu Blastozysten wurden drei bis fünf Blastozysten an Tag 6 der Entwicklung in einem Zentrifugen-Gefäß zusammengefügt. Zu diesen wurde anschließend 15 µl Proteinase K (10 mg/ml) hinzugefügt. Die Blastozysten wurden bei 55 °C eine Stunde lysiert. Danach wurde die Proteinase K bei 95 °C für zehn Minuten hitzeinaktiviert. Die Blastozysten wurden über Nacht im Gefriertrockner getrocknet. Zuletzt wurden die Blastozysten in Elutions-Puffer gelöst. Dabei entsprach die Elutionsmenge der Anzahl an Blastozysten je Zentrifugen-Gefäß (drei Blastozysten entsprechen 3 µl Elutions-Puffer).

4.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Blastozysten-Pools

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der spezifischen Amplifikation einer Gensequenz. Dabei wird mittels spezifischer Primer ein Amplikon generiert. Mögliche Mutationen können durch eine Sequenzierung des Amplikons festgestellt werden.

Für die Untersuchung genomischer DNA, welche das Fanconi-Anämie A Gen enthält, wurden die PCR-Reaktionen nach folgendem Ansatz pipettiert.

Tab. 23: Verwendete Substanzen und Zusammensetzung für die PCR von Blastozysten-Pools.

Komponente	Konzentration	Volumen
DNA	10 ng/µl	1 µl
Primer 1	10 pmol/µl	1.25 µl
Primer 2	10 pmol/µl	1.25 µl
dNTP's	25 mM	1 µl
MgCl ₂	50 mM	3 µl
PCR Puffer	5x	10 µl
Taq Polymerase	5 U/µl	0.2 µl
H ₂ O		32.3 µl

Dabei wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet.

Tab. 24: Verwendetes Temperaturprogramm für die PCR von Blastozysten-Pools.

FANCA		
1.)	95 °C	2 min
2.) Denaturierung	95 °C	30 sec
3.) Hybridisierung	55 – 65 °C*	30 sec
4.) Elongation	72 °C	1 min
5.)	72 °C	5 min
6.)	8 °C	dauerhaft
Zyklen	40	

*Die Hybridisierungstemperatur war bei der PCR von Exon7 55 °C, von Exon9 60 °C und von Exon10 65 °C.

Tab. 25: Verwendete Primer.

Primer	Sequenz (5'-3')
Exon7_fw2	ACCATCTTTGCTGTGGGTGG
Exon7_bw2	CGACACAACGATCGGGTAGG
Exon9_fw2	TTGCCAGTCCAGAATCGGTG
Exon9_bw2	CTGTCAAGCTGCCAGTGTCT
Exon10_fw2	GAAGCTGAGGAGCCCGTAAA
Exon10_bw2	ATACGTGTGTCTGCCGAACG

Nach der PCR werden die zu analysierenden Proben auf ein 0.8%iges TBE-Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 90 V über 35 min. Die Visualisierung erfolgt mit einer Fotokamera mit integrierter UV-Lampe (Vilber Lourmat) mit einer Belichtungszeit von 2 s.

Die PCR genomischer DNA aus Zellkulturen erfolgte nach demselben Protokoll. Es wurden jedoch 32 statt 40 Zyklen verwendet.

4.2.1.4 DNA-Extraktion aus Zellkulturen

Die DNA-Extraktion aus STE- oder iPS-Zellen erfolgte mit einer konfluent bewachsenen T25-Flasche (25 cm²). Das Medium wurde entfernt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Lysis-Puffer auf die Zellen gegeben. Die Lyse erfolgte über Nacht bei 38 °C unter einer Atmosphäre mit 5 % CO₂. Nach der Lyse wurde die im Puffer enthaltene Proteinase K über 12 min bei 95 °C hitzeinaktiviert.

4.2.1.5 T7 Endonuklease I-Assay

Der T7 Endonuklease I-Assay (T7-Assay) dient der Identifikation von DNA-Fehlpaarungen. Hierfür wurden 12 µl eines PCR-Produkts mit 2 µl NEB Puffer 2 und 5 µl H₂O gemischt. Die DNA-Fragmente wurden im folgenden Programm denaturiert und renaturiert.

Tab. 26: Hybridisierungsprogramm beim T7-Assay.

95 °C	10 min
2 °C/s	auf 85 °C
0.1 °C/s	auf 25 °C
8 °C	dauerhaft

Nach der Hybridisierung wurde 1 µl T7 Endonuklease (10 U/µl) hinzugegeben. Es wurde für 15 min bei 37 °C verdaut. Der Verdau wurde anschließend mit 1.5 µl 0.25 M EDTA abgestoppt. Zuletzt erfolgte eine Elektrophorese bei 80 V über 1 Std. mit einem 1.5 % TBE-Agarosegel.

4.2.1.6 Sequenzierung

Nach der PCR wurde das PCR-Produkt mittels eines Kits (Invisorb®Fragment CleanUp, Stratec) aufgereinigt. Amplikons wurden von der Firma LGC Genomics sequenziert (notwendige Konzentration: 10 - 20 ng/µl).

4.2.1.7 Proteinextraktion und Fraktionierung

Zur Proteinextraktion aus Zellkulturen wurde zu Beginn eine konfluent bewachsene T25-Flasche (25 cm²) über Nacht lysiert und die lysierten Zellen in ein 1.5 ml Zentrifugen-Gefäß überführt. Die Zelllösung wurde bei 2100 rpm (560xg) für 4 min zentrifugiert. Das enthaltene Zellpellet wurde auf Eis gelagert und alle weiteren Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 300 µl zytoplasmatischem Extraktionspuffer resuspendiert. Zur Inhibition von Proteasen wurden zusätzlich 3 µl PMSF (100 mM) hinzugegeben. Die resuspendierten Zellen inkubierten 10 min auf Eis. Danach wurde die Suspension bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, das entstandene Pellet wurde in 80 µl des nuklearen Extraktionspuffers resuspendiert. Zur Inhibition von Proteasen wurden zusätzlich 1 µl PMSF hinzugegeben. Die Suspension inkubierte 10 min auf Eis und wurde anschließend bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Das entstandene Pellet wurde in 30 µl Ladepuffer resuspendiert. Nach der Proteinextraktion waren drei verschiedene Extrakte vorhanden: der zytoplasmatische Extrakt, der nukleare Extrakt und der Extrakt aus den Zellresten.

4.2.1.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wird für die größenspezifische Auftrennung von Proteinen aus einem Proteinextrakt verwendet. Das Gel wirkt wie ein Sieb, durch welches kleine Proteine schneller hindurch wandern. Es wird ein Salzpuffer verwendet (1:10 Verdünnung 10x Elektrodenpuffer). Das fertige Gel wird anschließend mit Coomassie angefärbt. Dadurch werden die aufgetrennten Proteine angefärbt. Für die Visualisierung wird eine Fotokamera (Vilber Lourmat) mit integrierter Weißlichtlampe von Vilber verwendet.

Für die Detektion von Proteinen mittels Western Blot wurde zuvor eine SDS-PAGE erstellt. Es wurden unterschiedliche Prozentigkeiten im Trenngel einer SDS-PAGE verwendet.

Tab. 27: Zusammensetzung des Trenngels der SDS-PAGE bei 7% und 10%.

Prozentigkeit	H ₂ O (ml)	Acrylamid/ Bisacrylamid (ml)	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (ml)	10% SDS (ml)	TEMED (μ l)	10% APS (μ l)
7%	5.1	2.3	2.5	0.1	5	50
10%	4.1	3.3	2.5	0.1	5	50

Tab. 28: Zusammensetzung des Sammelgels der SDS-PAGE.

Prozentigkeit	H ₂ O (ml)	Acrylamid/ Bisacrylamid (ml)	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (ml)	10% SDS (ml)	TEMED (μ l)	10% APS (μ l)
5%	5.7	1.7	2.5	0.1	10	50

Für die Detektion des FANCA-Proteins wurde ein 7%iges Trenngel verwendet. Die Gele wurden mit den Proteinproben beladen. Die Elektrophorese erfolgte über 45 min bei 200 V.

4.2.1.9 Western Blot

Zur Detektion von Proteinen mittels spezifischer Antikörper wurde ein Western Blot verwendet. Hierfür wurde zuerst ein SDS-PAGE durchgeführt. Die im SDS-PAGE enthaltenen Proteine wurden mit einem Semi-Dry-Transfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)- Membran übertragen. Dieser erfolgte bei 200 mA über 35 min.

Bei einem Semi-Dry-Transfer wird das Proteingel auf die PVDF-Membran gelegt und zwischen mehreren Lagen Whatman-Papier platziert. Zuvor wurden zwei Whatman-Papiere im Anodenpuffer A, ein Whatman-Papier im Anodenpuffer B und drei Whatman-Papiere im Kathodenpuffer für 5 min inkubiert. Der Aufbau eines Semi-Dry-Transfers ist in Abb. 15 dargestellt.

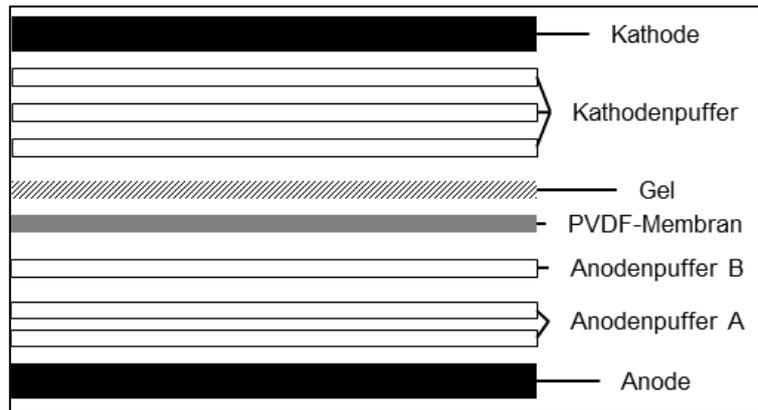


Abb. 15: Schematische Darstellung eines Semi-Dry-Transfers.

4.2.1.10 Immundetektion

Die PVDF-Membran wurde mit 1.5%iger Milchpulverlösung (in TBS-Puffer gelöst) über Nacht bei 4 °C oder für 1 Std. bei Raumtemperatur geblockt. Die Membran wurde mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit dem primären Antikörper (FANCA: 1:250, Tubulin: 1:500) benetzt. Der Antikörper inkubierte 1 Std. bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran dreimal mit TBS-Puffer gewaschen und mit dem passenden sekundären Antikörper (1:10000) benetzt. Der sekundäre Antikörper inkubierte 1 Std. bei Raumtemperatur. Die Membran wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen und die Proteinsignale wurden mittels ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent Kit visualisiert.

Die Visualisierung mittels ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent Kit bedient sich der Chemilumineszenz. Der sekundäre Antikörper ist mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiert. Das Kit enthält eine Luminollösung und eine Peroxidlösung, welche im Verhältnis 1:1 gemischt werden. Unter Einfluss der HRP reagiert das Luminol mit dem Peroxid, was schließlich zur Freisetzung von N_2 , Aminophthalat und Licht führt. Die Chemilumineszenz wurde mit einer gekühlten CCD-Kamera (Vilber Lourmat) visualisiert. Um die optimale Belichtungszeit des Blots zu ermitteln, erfolgte eine vorläufige Bildaufnahme, an der die Belichtungszeit abgeschätzt werden konnte. Die optimale Belichtungszeit betrug im Durchschnitt 5 min.

4.3 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion ist eine mechanische Methode um Eizellen mit Plasmiden zu transfizieren. Für die Transfektion wird eine Injektionsnadel verwendet, die zuvor mit der Transfektionslösung befüllt wird. Die Eizellen werden mit einer Transportnadel in die Kulturschale, aber auch auf das Mikroskop pipettiert. Auf dem Mikroskop sorgt eine Haltenadel dafür, dass die Eizellen eine fixe Position innehaben. Die Halte- und die Transportnadel wurden mit einer Mikroschmiede (MF-100 Narishige, Bachofer Laboratoriumsgeräte) hergestellt. Die Haltenadel hatte eine Größe von 4-5 Teilstrichen und die Transportnadel eine Größe von 8 Teilstrichen (1 Teilstrich = 0.0025 mm). Die Injektionsnadel wurde mit einem Mikropipettenzieher (Flaming/Brown, Model P-87, Sutter Instruments) hergestellt. Die optimalen Parameter für die Injektionsnadel zur Mikroinjektion von porzinen Eizellen lauteten wie folgt: Heat: 945, Pull: 115, Velocity: 90, Time: 115.

Für die Mikroinjektion wurde ein Mikroinjektor, bestehend aus einem Zeiss-Mikroskop (Axiovert 35M), einem FemtoJet (Eppendorf) und einem TransferMan (Eppendorf), verwendet. Diese sind in Abb. 16 und Abb. 17 dargestellt.



Abb. 16: Mikroskop für die Mikroinjektion in parthenogenetische porcine Embryonen.



Abb. 17: FemtoJet für die Mikroinjektion in parthenogenetische porcine Embryonen.

Die Injektions- und Haltenadel wurden anschließend so in den Mikroinjektor eingespannt, dass sie dicht beieinander lagen (Abb. 18).

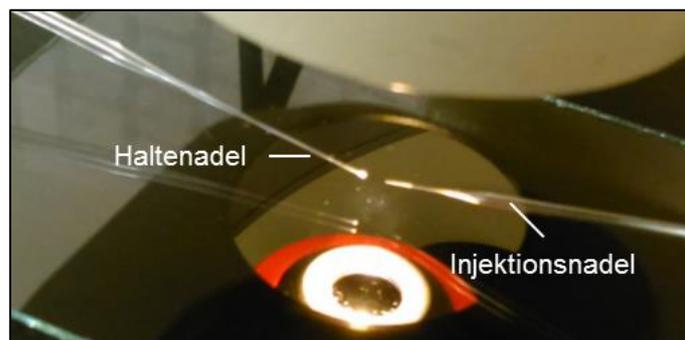


Abb. 18: Aufbau und Ausrichtung der Halte- und Injektionsnadel für die Mikroinjektion.

Danach erfolgte die Feinjustierung der Nadeln unter 32-facher Vergrößerung. Die zu injizierenden Eizellen wurden zwischen Halte- und Injektionsnadel positioniert. Hierbei fixierte die Haltenadel die Position der Eizellen, während die Injektionsnadel in das Zytoplasma der Eizellen eingebracht wurde (Abb. 19).

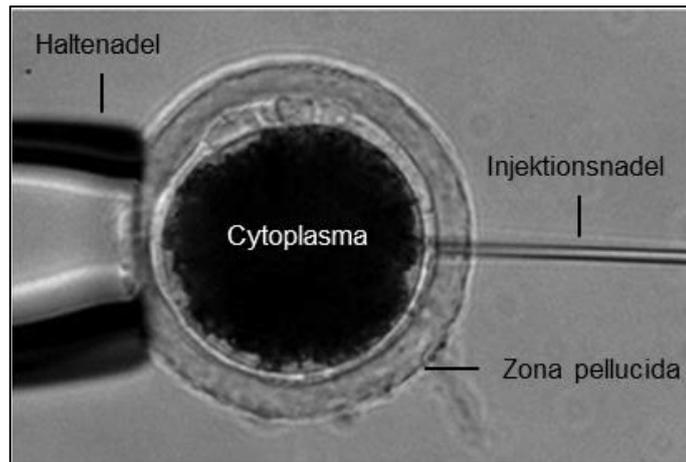


Abb. 19: Mikroinjektion in das Zytoplasma einer parthenogenetischen porzinen Oozyte. Die Haltenadel fixiert die Position der Eizellen, während die Injektionsnadel die Zona pellucida und die Zellmembran durchdringt, um die zu transfizierende Lösung in das Zytoplasma der Eizelle zu injizieren^[101].

Der verwendete Injektionsdruck variierte je nach Öffnungsgröße der Injektionsnadel. Er reichte von 250 hPa bis 1000 hPa. Es wurden ungefähr 10 pl Plasmidlösung injiziert. Die Mikroinjektion erfolgte auf einer Heizplatte mit 30 °C in 750 µl TL-Hepes 296 Ca²⁺.

4.3.1.1 Kultivierung von parthenogenetischen porzinen Embryonen

4.3.1.1.1 Ovarienpunktion

Die Ovarien für die Gewinnung von Oozyten sind Material aus dem Schlachthaus. Bevor die Follikel, welche die Eizellen enthielten, punktiert und somit die Eizellen gesammelt wurden, wurden die Ovarien in einer Lösung aus 0.9 % NaCl + Pen/Strep gewaschen. Die Follikel wurden mit einer 18G Kanüle punktiert. Eine Follikelpunktion ist in Abb. 20 dargestellt.

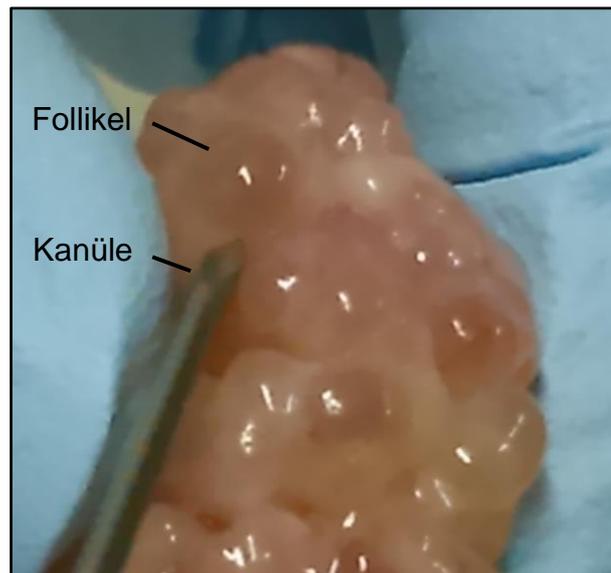


Abb. 20: Punktion eines Follikels mit Hilfe einer 18G Kanüle.

Die gesammelten Oozyten wurden nach der Punktion mit PXM + 1 % NBCS gewaschen. Für die Reifung geeignete Oozyten werden schließlich in steril filtriertem PXM + 1 % NBCS gesammelt.

4.3.1.1.2 Reifung

Die Reifung der gesuchten Oozyten erfolgte im Reifungsmedium (2.DMEM). Das Medium wurde zuvor für wenigstens eine Stunde equilibriert, damit es auf 38,5 °C vorgewärmt und die Atmosphäre von 5 % CO₂ annimmt. Die gesammelten Oozyten wurden anschließend in einer Kulturschale (d = 35 mm) über 40-42 Std. bei 38,5 °C unter einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert.

4.3.1.1.3 Aktivierung

Die Aktivierung der Oozyten erfolgte im ersten Schritt mittels elektrischen Impulses. Hierfür wurden die Oozyten von TL-Hepes 296 Ca²⁺ in eine 1:1-Mischung von TL-Hepes 296 Ca²⁺ und Sor2 Ca²⁺ und schließlich in Sor2 Ca²⁺

überführt. Bei jedem Schritt inkubierten die Oozyten 1 min in dem Puffer. Nach der Inkubation in Sor2 Ca^{2+} wurden die Oozyten (max. 40 Oozyten) in eine Kammer pipettiert, die zwei Elektroden mit einem Zwischenraum von 0.2 mm hat. In diesen Zwischenraum werden die Oozyten positioniert. Anschließend erfolgte die elektrische Aktivierung bei 24 V über 45 μs . Die elektrisch aktivierten Oozyten wurden, in umgekehrter Reihenfolge, in den verschiedenen Puffern inkubiert, sodass diese nach der elektrischen Aktivierung erneut in TL-Hepes 296 Ca^{2+} vorlagen. Nach der elektrischen Aktivierung erfolgte eine chemische Aktivierung. Hierfür wurden die Oozyten in 2 mM 6-DMAP über 3 Std bei 38 °C und einer Atmosphäre mit 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend folgte die Kultivierung.

4.3.1.1.4 Kultivierung

Die Kultivierung aktivierter Oozyten erfolgte in PZM. Hierfür wurden 3x 100 μl Tropfen in eine Kulturschale (d = 35 mm) gegeben und mit Paraffinöl überschichtet. Je Tropfen wurden max. 30 Oozyten kultiviert. Für jede Versuchs- und Kontrollgruppe gab es jeweils eine Schale mit jeweils 3x 100 μl PZM. Die Kultivierung erfolgte für 6 Tage bei 39 °C und einer Atmosphäre von 5 % O_2 und CO_2 .

4.3.1.1.5 Fluoreszenz-Mikroskopie

Eine visuelle Beurteilung der Entwicklungsstadien erfolgte an Tag 1, Tag 3, Tag 5 und Tag 6. Eine fotografische Aufzeichnung erfolgte von den 8-Zell-Stadien (Tag 3) und Blastozysten (Tag 5 & 6). Weiterhin erfolgte an Tag 6 eine Hoechst-Färbung von 10 % der dokumentierten Blastozysten. Bei den Weißlichtbildern wurden die Aufnahme mit „Auto Exposure“ gemacht. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden unter Anregung einer Halogen-Metalldampflampe bei einer Belichtungszeit von 2 s und einer 4-fachen Signalverstärkung gemacht. Dabei wurden sowohl Fluoreszenzaufnahmen bei einer Anregung von 460 - 490 nm als auch Fluoreszenzaufnahmen mit einer Anregung von 520 - 560 nm aufgenommen. Für die Bildaufnahmen wurde das Programm NIS-Elements BR 4.30.01 64 bit von Nikon verwendet. Es wurde das Mikroskop DMIL LED von Leica benutzt.

Die Hoechst-Aufnahmen wurden bei einer Belichtungszeit von 400 ms bei einer 1-fachen Signalverstärkung angefertigt. Alle Aufnahmen wurden unter der Einstellung „Phase“ getätigt. Das verwendete Programm war NIS-Elements BR

von Nikon. Alle übrigen Blastozysten der experimentellen Gruppen wurden als Pools von 3-5 Blastozysten zur DNA-Analyse verwendet.

4.3.2 Methoden mit eukaryotischen Zellen

4.3.2.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung von STE-Zellen begann mit dem Aussähen von kryokonservierten Zellen, die bei -196 °C gelagert wurden. Diese wurden mit 5 ml D10-Medium in einer T25-Flasche kultiviert bis diese nach 48 h konfluent bewachsen war. Die Zellen wurden anschließend mit 0.02%igem EDTA/Trypsin von der T25-Flasche abgelöst und auf vier neue T25-Flaschen aufgeteilt. Bei der Aufteilung erfolgte eine 1:10-Verdünnung. Nach anschließendem subkonfluenten Bewuchs wurden die Zellen für die Elektroporation verwendet.

Nach der Elektroporation wurden die transfizierten Zellen über 24 h in Pen/Strep-freiem T3-Medium kultiviert. Nach 24 h wurde bei den Zellen, welche mit einem fluoreszierenden Reporterplasmid transfiziert wurden, das Medium gewechselt. Die fluoreszierenden Zellen wurden weitere 24 h in D10-Medium kultiviert. Nach 48h Kultivierung wurden $0.15 \cdot 10^6$ Zellen je Transfektionsversuch für durchflusszytometrische Messungen verwendet. Weitere $0.15 \cdot 10^6$ Zellen je Transfektionsversuch wurden auf einer T25-Flasche ausgesät und für 48 h kultiviert. Von der T25-Flasche wurden $1.0 \cdot 10^6$ Zellen mit dem Zelllysispuffer über Nacht bei 37 °C lysiert. Die lysierten Zellen wurden für weitere Analysen verwendet. Weitere $2.0 \cdot 10^6$ Zellen je Transfektionsversuch wurden auf eine T25-Flasche ausgesät und für 48 h kultiviert. Die Zellen der konfluent bewachsenen T25-Flasche wurden mit 0.02%igem EDTA/Trypsin abgelöst und in D10-Medium, versetzt mit 10 % DMSO, eingefroren.

Bei den Zellen, die aufgrund der Transfektion eine Puromycinresistenz erhalten haben, wurde das Medium von T3 zu D10-Medium mit 1300 ng/µl Puromycin gewechselt. Die Kultivierung erfolgte über 7 Tage. Nach Ablauf der 7-tägigen Kultivierung wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden in D10-Medium für 48 h kultiviert. Anschließend wurden 50 % der Zellen für die Lysierung verwendet und 50 % der Zellen auf eine T25-Flasche ausgesät. Die lysierten Zellen wurden für weitere Analysen verwendet. Die ausgesäten Zellen wurden für weitere 48h kultiviert und abschließend in D10-Medium, versetzt mit 10 % DMSO, eingefroren.

Es wurden zudem putative porcine induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) kultiviert. Die iPS-Zellen wurden in einer früheren Arbeit generiert^[99]. Die Kultivierung erfolgte ebenfalls wie beschrieben^[99]. Kurz zusammengefasst wurden die iPS-Zellen in humanem embryonischem Stammzellmedium (ES-Medium) bei einer Temperatur von 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf eine gelatinisierte Platte ausgesät. Bei dieser Kultivierung beginnen sich kleine Kolonien zu bilden. Jeden zweiten Tag werden die Kolonien trypsiniert und mit einer Verdünnung von 1:2 bis 1:4 auf gelatinisierte Platten aufgeteilt.

4.3.2.2 Elektroporation

Die Elektroporation von STE-Zellen wurde mit dem Neon™ Transfektionssystem (Thermo Fisher) durchgeführt. Dafür wurden 2*10⁶ Zellen (1/4 T25-Flasche konfluent bewachsen) in 200 µl Resuspensionspuffer (Neon™ 100µl Kit) aufgenommen. Daraufhin wurden maximal 20 µl an Plasmid für die Transfektion verwendet. Es wurde eine Gesamtmenge von 10 µg je Plasmidmischung genutzt. Die Zellsuspension wurde in eine 100 µl Elektroporationsküvette gefüllt. Diese wurde in die Küvette eingefügt, welche 3 ml Elektroporationspuffer (Neon™ 100 µl Kit) enthielt. Die Elektroporation der STE-Zellen fand bei 1600 V mit 3 Impulsen je 10 ms statt^[102]. Die elektroporierten Zellen wurden in T3-Medium ohne Pen/Strep überführt und schließlich auf eine 6-Well-Platte überführt.

Die iPS-Zellen wurden mit dem Elektroporator Gene Pulser Xcell™ von Biorad elektroporiert. Die Zellen wurden mit 150 V bei einem 10 ms Impuls elektroporiert. Anschließend folgte die Kultivierung.

4.3.2.3 Durchflusszytometrische Erfassung der Transfektionsrate

Die Durchflusszytometrie dient der Untersuchung von Zellsuspensionen auf Oberflächenantigenen mittels fluoreszenz-gekoppelter Antikörper oder auch auf Reporter-Fluorophore. Sie wird zusammen mit einer Trägerflüssigkeit ins Zytometer injiziert. Im Zytometer kommt es in einem Zerstäuber zu einer Fokussierung der Zellsuspension, sodass nur einzelne Zellen zur Anregung durch einen Laserstrahl wandern. Beim Laser angekommen wird die vorhandene Fluoreszenz angeregt und als Signal von einem Detektor erkannt. Ebenso wird gestreutes Licht detektiert, was einen Hinweis darauf gibt, welche Art von Zelle

verwendet wurde^[103, 104]. Eine schematische Darstellung der Funktion eines Durchflusszytometers ist in Abb. 21 dargestellt.

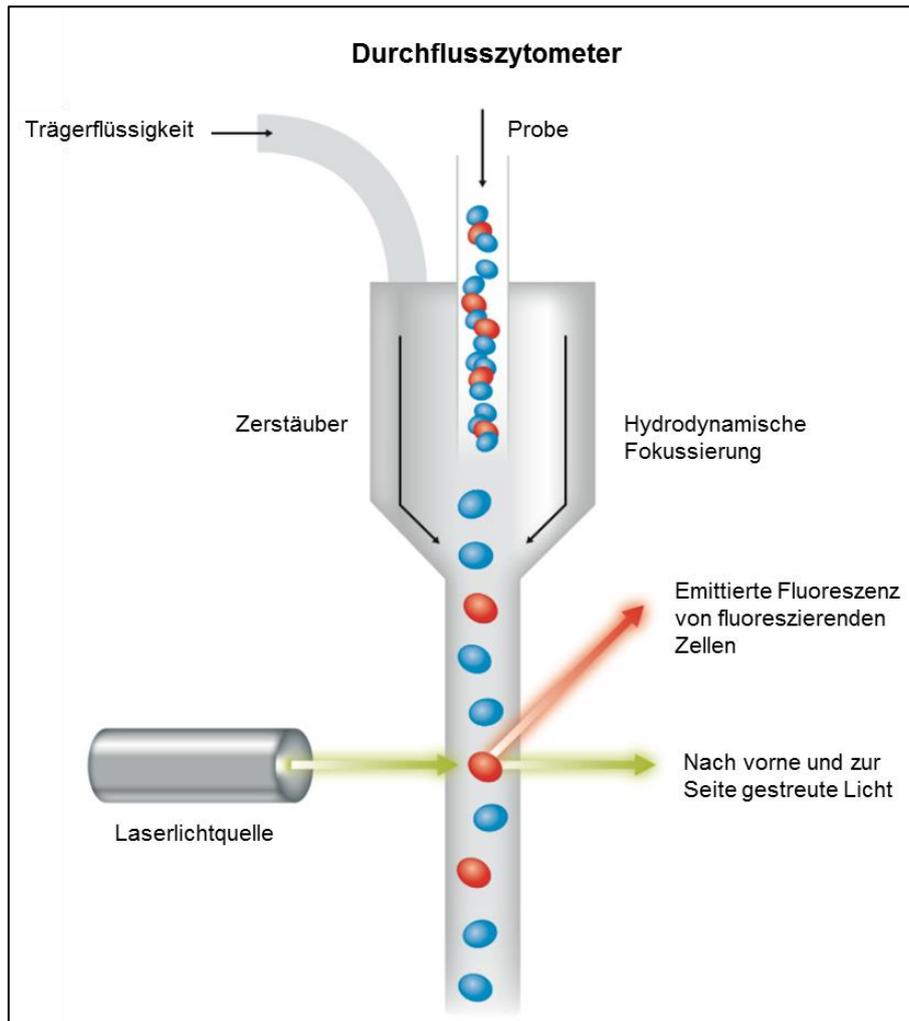


Abb. 21: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers^[103].

Als Durchflusszytometer wurde der MACSQuant[®] Analyzer 10 von Miltenyi Biotec verwendet.

4.3.2.4 Off-Target Analyse

Durch eine Off-Target Analyse wird überprüft, ob die sgRNA neben der anvisierten Zielsequenz auch andere Sequenzen, die von der sgRNA erkannt werden kann, anvisiert und ein Knockout induziert wurde. Diese ist bei der Verwendung von Cas9 zur Erstellung eines Knockouts notwendig. Dafür wurden mit Hilfe des Browserprogramms Crispor^[105] eine Liste mit möglichen Off-Targets für die sgRNA angefertigt. Aus dieser Liste wurden die zehn Off-Targets ausgewählt, die am wahrscheinlichsten von der sgRNA erkannt würden. Die Off-Target-Sequenzen wurden mit den Sequenzen aus dem Genom des Schweins verglichen^[106]. Mit

Hilfe des Browserprogramms Primer-Blast^[107] wurde für jede Off-Target-Sequenz ein Primerpaar identifiziert. Die Primerpaare wurden auf die optimale Annealingtemperatur überprüft. Insgesamt wurden für die Exone7-10 zehn Off-Target-Sequenzen mittels PCR analysiert. Dabei haben sich drei unterschiedliche Temperaturen herauskristallisiert. Diese waren 55 °C, 60 °C und 63 °C. Eine Auflistung der Primerpaare für die entsprechende Annealingtemperatur ist in Tab. 29 zu sehen.

Tab. 29: Auflistung der Off-Target-Primer nach der optimalen Annealingtemperatur.

Annealingtemperatur 55 °C	Annealingtemperatur 60 °C	Annealingtemperatur 63 °C
Ex7OTPrimer8	Ex9OTPrimer2	Ex7OTPrimer1_2
Ex7OTPrimer10	Ex10OTPrimer1	Ex7OTPrimer2
Ex9OTPrimer1	Ex10OTPrimer10	Ex7OTPrimer3
Ex9OTPrimer5		Ex7OTPrimer4
Ex9OTPrimer7		Ex7OTPrimer5
Ex9OTPrimer8		Ex7OTPrimer6
Ex9OTPrimer9		Ex7OTPrimer7
		Ex7OTPrimer9
		Ex9OTPrimer3
		Ex9OTPrimer4
		Ex9OTPrimer6
		Ex9OTPrimer10
		Ex10OTPrimer2
		Ex10OTPrimer4
		Ex10OTPrimer6
		Ex10OTPrimer7
		Ex10OTPrimer8
		Ex10OTPrimer9

Für die PCR wurde dasselbe Protokoll verwendet wie in Abschnitt 4.2.1.3 beschrieben.

4.3.3 Methoden mit prokaryotischen Zellen

4.3.3.1 Bakterienkultur

Die Bakterienkultur dient zur Vermehrung von rekombinanten Plasmiden in Bakterien. Es wurden DH5 α , *Escherichia coli* (*E.coli*) mit dem Genotyp *fhuA2* Δ (*argF-LacZ*)*U169 phoA glnV44 ϕ 80* Δ (*lacZ*)*m15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* verwendet. Die Transformation in die Bakterien erfolgte mittels Hitzeschock. Hierfür wurden 800 ng Plasmid mit 50 μ l kompetenten Bakterien vermischt. Die Mischung inkubierte 30 min auf Eis. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C über 30 sec. Daraufhin wurden die Bakterien 2 min auf Eis inkubiert. Das gesamte Volumen wurde auf eine Agarplatte ausgestrichen, versetzt mit einem Antibiotikum, dessen Resistenzgen auf dem Plasmid kodiert war. Die Agarplatte inkubierte über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Tag wurden für die Anreicherung geeignete Kolonien gepickt und in 5 ml LB-Medium überführt, welchem Antibiotikum (Spectinomycin: 50 μ g/ml, Ampicillin: 100 μ g/ml) zugegeben wurde. Die Kultivierung erfolgte für 12-16 Std bei 230 rpm und 37 °C.

4.3.3.2 Mini- und Maxipräparation von Plasmiden

Die Mini- und Maxipräparation von Plasmiden dient der Aufreinigung von Plasmiden, die mittels einer Bakterienkultur vermehrt wurden. Bei der Minipräparation wurden 5 ml LB-Medium mit 5 μ l Antibiotikum (Spectinomycin: 50 μ g/ml, Ampicillin: 100 μ g/ml) versetzt. Nach 12-16 stündiger Kultivierung erfolgte die Aufreinigung mittels GeneJet Plasmid Miniprep Kit von Thermo Scientific. Die Elution erfolgte mit 52 μ l des dem im Kit beigefügten Elutionspuffers.

Bei der Maxipräparation wurden 50 ml LB-Medium mit 50 μ l Antibiotikum (Spectinomycin: 50 μ g/ml, Ampicillin: 100 μ g/ml) versetzt. Nach 12-16stündiger Kultivierung erfolgte die Aufreinigung mittels PureYield™ Plasmid Maxiprep System Kit von Promega. Die Elution erfolgte mit 1 ml des dem im Kit beigefügten Elutionspuffers.

4.3.3.3 Ligation von Plasmiden

4.3.3.3.1 C-Check_Exon7, 9 und 10

Die Ligation der Zielsequenzen für die sgRNAs in das Plasmid C-Check_Exon erfolgte nach dem Protokoll von Zhou et al ^[108]. Das detaillierte Protokoll ist im zusätzlichen Material unter der Datei neun zu finden. Die Ligation von C-Check_Exon7 und Exon10 erfolgte über ein Programm im Thermocycler, während bei der Ligation von C-Check_Exon9 das Plasmid zuerst über Restriktionsenzyme linearisiert wurde und anschließend die Ligation erfolgte (Tab. 30). Als Restriktionsenzym wurde Bsal benutzt. Es wurden folgende Sequenzen ligiert.

Tab. 30: Ligationsprogramm von C-Check.

37 °C	5 min	} 10 Zyklen
22 °C	10 min	
37 °C	30 min	
75 °C	15 min	
4°C	dauerhaft	

Exon7: 5'- **caccg**ACGTCGCCAGAGCTGTGCTG - 3'

Exon9: 5'- **caccg**ACAGATCGCGGCTGATGTCC - 3'

Exon10: 5'- **caccg**GGCGTCAGCGGCGTACAAGG - 3'

Am darauffolgenden Tag wurden die weißen Kolonien für eine Minipräparation verwendet. Es wurde mittels Sequenzierung untersucht, ob die Ligation ins Plasmid erfolgreich war.

4.3.3.3.2 pX458Faex7, 9 und 10 und pX459Faex7, 9 und 10

Die Ligation der sgRNA-Sequenzen in die Plasmide pX458 und pX459 erfolgte nach dem Protokoll von Ran et al ^[109]. Jedoch wurde statt der T7-Ligase eine T4-Ligase (4000 U/μl) von ThermoFisher verwendet. Es wurde ein 10x Ligasepuffer (10 mM) verwendet, der DTT und ATP enthält. Dabei wurden folgende Sequenzen ligiert.

Exon7: 5'- **caccg**ACGTCGCCAGAGCTGTGCTG - 3'

Exon9: 5'- **caccg**ACAGATCGCGGCTGATGTCC - 3'

Exon10: 5'- **caccg**GGCGTCAGCGGCGTACAAGG - 3'

Es wurde mittels Sequenzierung überprüft, ob die Sequenzen erfolgreich ins Plasmid ligiert wurden.

4.3.3.4 Klonierung in das pGEM T-Easy-Vektor-System

Das pGEM T-Easy Vektor System wird verwendet, um PCR-Produkte zu klonieren, welche sequenziert werden sollen. Dadurch ist es möglich, die unterschiedlichen Sequenzen, die in einem PCR-Produkt enthalten sind, voneinander zu trennen und mittels bakterieller Einzelklone getrennt voneinander sequenzieren zu lassen. Hiermit können einzelne Mutationen analysiert werden.

Für die Klonierung eines PCR-Produkts in den pGEM T-Easy Vektor wurde das PCR-Produkt mittels Stratec Invisorb Fragment CleanUp Kit aufgereinigt und die DNA-Konzentration bestimmt. Um aus der DNA-Konzentration die Menge zu bestimmen, die vom PCR-Produkt für die Ligation verwendet werden musste, wurde zuvor ein Umrechnungsfaktor bestimmt. Dieser setzt sich wie folgt zusammen.

$$\text{Umrechnungsfaktor} = \frac{50\text{ng} \cdot x \text{ kb PCR-Produkt}}{3 \text{ kb Vektor}} \cdot 5$$

Tab. 31: PCR-Produkt-Größe der zu untersuchenden Zielloci.

PCR-Produkt	Größe PCR-Produkt [kb]
Exon7	0,432
Exon9	0,267
Exon10	0,455

Die einzusetzende Menge ergibt sich aus den Quotienten Umrechnungsfaktor/Produktkonzentration. Für die Ligation wurde folgender Ansatz verwendet.

Tab. 32: Verwendete Substanzen und Zusammensetzung für die Ligation mit dem pGEM T-Easy-Vektor-System.

Komponente	Volumen [μl]
PCR-Produkt	Umrechnungsfaktor/ Produktkonzentration
2x Ligasepuffer	5
pGEM T-Easy Vektor	1
T4-Ligase	1
H ₂ O	Auf 10 auffüllen

Der Ligationsansatz inkubierte über 2 Std. bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 3 μ l des Ligationsansatzes in 50 μ l kompetente Bakterien überführt. Diese inkubierten über 40 min bei 4 °C. Daraufhin folgte ein Hitzeschock bei 42 °C über 30 sec. Die Bakterien wurden danach 2 min bei 4 °C gekühlt, ehe sie in 800 μ l warmes LB-Medium überführt wurden. Die Bakterienkultur inkubierte unter Schütteln 2 Std. bei 37 °C. Nach der Inkubation wurden 50 μ l der Bakterienkultur auf eine mit Ampicillin versetzte Agarplatte (100 μ g/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Inkubator kultiviert. Am darauf folgenden Tag wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Während die Kolonie-PCR vorbereitet wurde, wurde für jede zu pickende Kolonie ein Kulturröhrchen mit 3 ml LB-Medium, versetzt mit Ampicillin (100 μ g/ml), angesetzt. Es wurden je Platte zehn Kolonien gepickt. Es wurde mit einer 100 μ l Pipettenspitze gepickt. Diese wurde nach dem Picken kurz in ein Kolonie-PCR-Gefäß getaucht, welches die Kolonie-PCR-Lösung enthielt. Anschließend wurde die Pipettenspitze in ein Kulturröhrchen überführt. Die Kolonie-PCR wurde danach gestartet. Währenddessen wurden die Kulturröhrchen im Schüttler bei 37 °C über Nacht kultiviert. Für die PCR wurde folgender Ansatz verwendet.

Tab. 33: Verwendete Substanzen und Zusammensetzung für die Kolonie-PCR.

Substanz	Konzentration	Volumen [μl]
H ₂ O		15,4
PCR Puffer	5x	5
MgCl ₂	25 mM	1,5
Primer1	10 pmol/ μ l	0,75
Primer2	10 pmol/ μ l	0,75
dNTP's	10 mM	0,5
GoTaq	5 U/ μ l	0,1
Total		24

Für die Kolonie-PCR wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet.

Tab. 34: Verwendetes Temperaturprogramm für die Kolonie-PCR.

FANCA		
1.)	95 °C	2 min
2.) Denaturierung	95 °C	30 sec
3.) Hybridisierung	55 – 65 °C*	30 sec
4.) Elongation	72 °C	1 min
5.)	72 °C	5 min
6.)	8 °C	dauerhaft
Zyklen	30	

*Die Hybridisierungstemperatur war bei den Primern von Exon7 55 °C, von Exon9 60 °C und von Exon10 65 °C. Es wurden dieselben Primer wie unter Tab. 25 verwendet.

Nach der PCR folgte eine Gelelektrophorese. Die Gelelektrophorese wurde mit einem 0.8%igen TBE-Agarosegel bei 90 V über 35 min durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe einer Fotokamera mit integriertem UV-Licht (Vilber Lourmat) visualisiert. Die Proben, welche ein Amplikon enthielten, das den erwarteten Banden entsprach, wurden am darauf folgenden Tag aufgereinigt. Dafür wurde 1 ml der Bakterienkultur mit dem GeneJet Plasmid-Miniprep-Kit aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde abschließend bestimmt und die Probe wurde zum Sequenzieren verschickt.

4.3.4 Bioinformatische Software

Als bioinformatische Software wurde Geneious®R10 (<https://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012) verwendet. Die Elektropherogramme, welche nach der Sequenzierung vorlagen, wurden in das Programm geladen. Die Sequenzen konnten untersucht und die INDEL-Bildung analysiert werden.

Die Sequenzen des humanen und porcinen FANCA-Gens sind von Ensembl (www.ensembl.org, Ensembl release 91) heruntergeladen worden^[110, 111].

Die Analyse der Off-Target-Sequenzen erfolgte über das Onlineprogramm Crispor^[112].

Die Erstellung von spezifischen Primerpaaren für die Analyse der Exone 7, 9 und 10 sowie der Off-Target-Sequenzen erfolgte über Primer-BLAST^[113].

5 Ergebnisse

5.1 Versuchsaufbau

In dieser Arbeit wird untersucht, inwiefern es möglich ist, gezielt das FANCA-Gen im porcinen Genom zu modifizieren. Es wird analysiert, wie effizient die INDEL-Bildung im FANCA-Gen unter Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems abläuft, mit dem Ziel einen Gen-Knockout zu erreichen. Hierfür werden zwei Plasmidkompositionen verwendet. Bei der einen wird die Cas9 (pX330) und die sgRNA(pJoker) auf zwei unterschiedlichen Plasmiden kodiert. Zusätzlich zu den beiden Plasmiden wird das Reporterplasmid C-Check verwendet. Das Plasmid C-Check enthält die Zielsequenz, die von der sgRNA erkannt wird. Durch die Cas9 erfolgt ein Doppelstrangbruch in C-Check, welcher durch homologe Rekombination repariert und somit eGFP-Reporterfluoreszenz sichtbar wird. So kann über den eGFP-Reporter der Anteil an homologer Rekombination und folglich der Anteil an möglichen INDELS analysiert werden. Diese Plasmidkomposition wird im Folgenden als C-Check bezeichnet. Bei der zweiten Plasmidkomposition handelt es sich um Plasmide, die in einem Plasmid die Cas9, die sgRNA und eine eGFP-Reporterfluoreszenz kodieren. Diese Plasmide werden im folgenden pX458 und pX459 genannt.

Es werden porcine Zellen mittels Elektroporation und parthenogenetische porcine Embryonen mittels Mikroinjektion mit den Plasmidkompositionen transfiziert (Abb. 22).

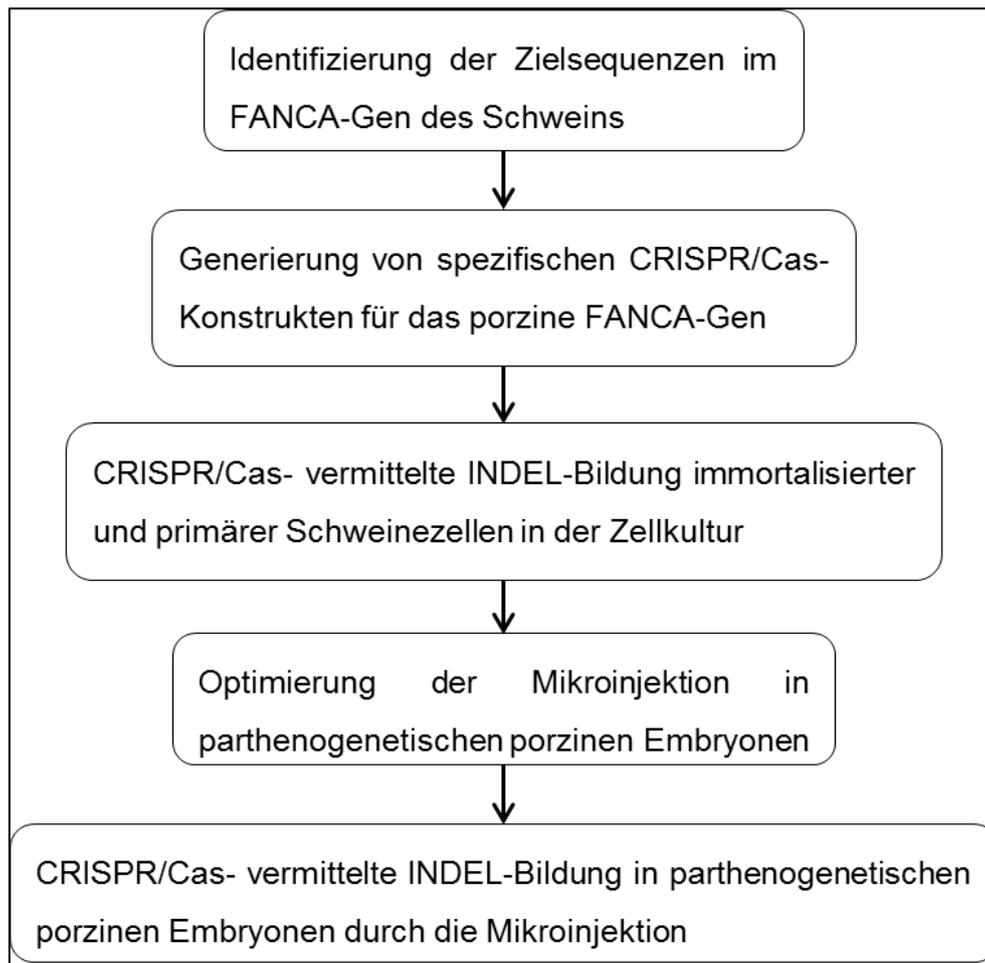


Abb. 22: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

Zudem wird untersucht, ob der Injektionszeitpunkt der Mikroinjektion der parthenogenetischen Embryonen einen Einfluss auf die Entwicklungs- und Transfektionseffizienz hat. Es werden zwei Injektionszeitpunkte untersucht, „Vor der Aktivierung“ (vAkt) und „Nach der Aktivierung“ (nAkt). Bei diesen Versuchen werden die Plasmide pT2Venus mit Venus-Reporterfluoreszenz und pCMV/SB100 zusammen mit dem chemischen Farbstoff TMR-Dextran in parthenogenetische Embryonen injiziert. Das Plasmid pCMV/SB100 kodiert die Transposase *Sleeping Beauty*, mit deren Hilfe der Venus-Reporter von pT2Venus in das Genom der Embryonen integriert. Dieser zeigt an, ab welchem Entwicklungsstadium der Reporter ins Genom integriert und exprimiert wird. Der Farbstoff TMR-Dextran hingegen zeigt an, ob und welches Volumen injiziert wurde, da dessen Fluoreszenz trotz des opaken Zytoplasmas erkennbar ist.

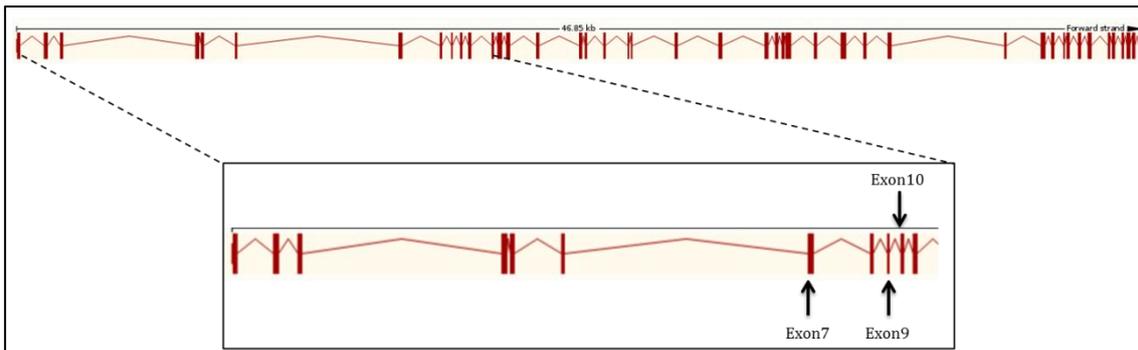


Abb. 23: Sequenz des FANCA-Gens im Schwein^[111]. Die Exone sind als rote Rechtecke, die Introne als Linie dargestellt. Schwarze Pfeile markieren die Zielsequenzen in den Exonen 7, 9 und 10.

Als Zielsequenzen für die Induktion eines FANCA-Knockouts wurden im porzinen FANCA-Gen drei Exone ausgewählt. Dies sind die Exone 7, 9 und 10 (Abb. 23). Diese befinden sich in dem Bereich des porzinen Gens, der den Bereich repräsentiert, wo die am häufigsten betroffenen Exonen im humanen FANCA-Gen vorliegen.

5.2 Erstellung der C-Check-, pX458- und pX459-Konstrukte für die spezifische INDEL-Bildung mit dem CRISPR/Cas9-System

Zu Beginn der Arbeit wurden die unterschiedlichen Plasmide für die Transfektionen generiert. Dies sind die Plasmide C-Check_Exon7, Exon9 und Exon10 (CCEx7, 9 & 10) sowie die Plasmide pX458Faex10 und pX459Faex10. Die Ligation der C-Check-Konstrukte erfolgte über einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *Bsa*I, die des pX458- und pX459-Konstruktes über einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *Bbs*I. Anschließend erfolgte die Ligation mittels einer T4-Ligase. Die Plasmide wurden nach der Ligation in *E.coli* transformiert. Danach wurde von einigen Kolonien eine Bakterienkultur angelegt. Diese wurden mit dem GeneJet Plasmid Miniprep-Kit aufgereinigt und das Plasmid sequenziert.

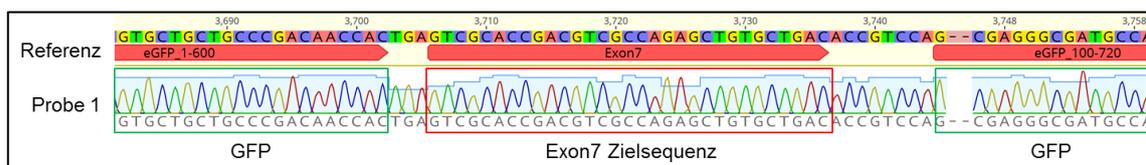


Abb. 24: Integrierte Zielsequenz für die sgRNA für Exon 7 im Plasmid C-Check_Exon7^[114]. Rot gekästelt: ligierte FANCA Exon7 Zielsequenz, grün gekästelt: Teile der flankierenden eGFP-Bereiche.

Beispielhaft ist in Abb. 24 das Ligationsprodukt von C-Check_Exon7 dargestellt. Die ligierte Zielsequenz wird von zwei eGFP-Abschnitten flankiert, von denen 500 bp homolog sind; das eGFP-Gen ist in dieser Konstellation nicht funktionell. Die Zielsequenz wird von der sgRNA erkannt, die daraufhin an die Sequenz hybridisiert. Die Cas9-Nuklease induziert einen Doppelstrangbruch in der Zielsequenz, wodurch die homologe Rekombination der 500 bp überlappenden Bereiche zu einer funktionellen Rekonstitution des Reportergens führt.

Weiterhin wurden pX458- und pX459-Plasmide generiert. In Abb. 25 ist die Sequenz von pX458Faex10 gezeigt.

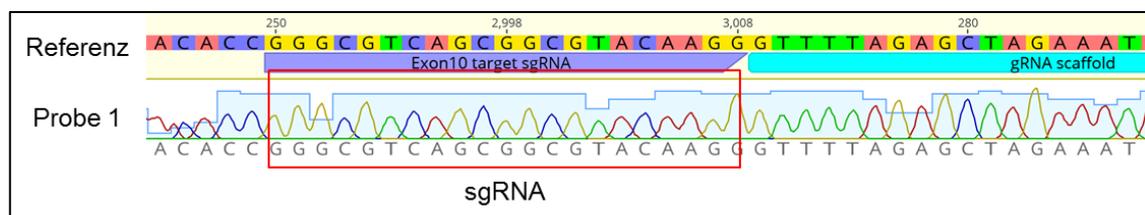


Abb. 25: Integrierte sgRNA im Plasmid pX458Faex10^[114]. Rot gekästelt: ligierte sgRNA des FANCA Exon7.

Das Plasmid pX458 kodiert einen eGFP-Reporter und die Cas9, während pX459 eine Puromycin-Resistenz als Selektionsmarker und die Cas9 kodiert. Zusätzlich wurde in beide Plasmide die sgRNA für die entsprechende Zielsequenz im Schweinegenom ligiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tab. 35 zusammengefasst.

Tab. 35: Verwendete Plasmide zur spezifischen INDEL-Bildung im porzinen FANCA-Gen.

Plasmid	Reporter/Selektionsmarker	Verwendungszweck	Herkunft
pT2Venus	Venus-Transposon	Optimierung Mikroinjektion	Im Labor vorhanden
pCMV/SB100	SB-Transposase	Optimierung Mikroinjektion	Im Labor vorhanden
pX330	Cas9-Expression	FANCA-Knockout, mit pJoker und C-Check; Zellkultur und parthenogenetische Embryonen	Im Labor vorhanden
pJoker (Exon7)	sgRNA-Expression	FANCA-Knockout, mit pX330 und C-Check; Zellkultur und parthenogenetische Embryonen	Ligation im Labor von Zoltán Ivics
pJoker (Exon9)	sgRNA-Expression	FANCA-Knockout, mit pX330 und C-Check; Zellkultur und parthenogenetische Embryonen	Ligation im Labor von Zoltán Ivics
pJoker (Exon10)	sgRNA-Expression	FANCA-Knockout, mit pX330 und C-Check; Zellkultur und parthenogenetische Embryonen	Ligation im Labor von Zoltán Ivics
CCEx7	asRed/eGFP	FANCA-Knockout, mit pJoker und pX330; Zellkultur und parthenogenetische Embryonen	Eigene Ligation
CCEx9	asRed/eGFP	FANCA-Knockout,	Eigene Ligation

		mit pJoker und pX330; Zellkultur und parthenogenetische Embryonen	
CCEx10	asRed/eGFP	FANCA-Knockout, mit pJoker und pX330; Zellkultur und parthenogenetische Embryonen	Eigene Ligation
pX458Faex7	eGFP	FANCA-Knockout; Zellkultur und parthenogenetische Embryonen	Ligation im Labor von Zoltán Ivics
pX458Faex9	eGFP	FANCA-Knockout; Zellkultur und parthenogenetische Embryonen	Ligation im Labor von Zoltán Ivics
pX458Faex10	eGFP	FANCA-Knockout; Zellkultur und parthenogenetische Embryonen	Eigene Ligation
pX459Faex7	Puromycin	FANCA-Knockout; Zellkultur	Ligation im Labor von Zoltán Ivics
pX459Faex9	Puromycin	FANCA-Knockout; Zellkultur	Ligation im Labor von Zoltán Ivics
pX459Faex10	Puromycin	FANCA-Knockout; Zellkultur	Eigene Ligation

Alle Sequenzen konnten in ihr Zielplasmid ligiert werden. Dabei hat die Ligation in den C-Check-Vektor Probleme bereitet. Diese musste bei den Plasmiden CCEx9 und 10 mehrfach wiederholt werden.

5.3 Spezifische FANCA-Mutationen in porzinen STE- und primären Zellen

Nachdem alle erforderlichen Plasmide kloniert wurden, wurden mit diesen porzine immortalisierte STE- und primäre Zellen transfiziert. Die Transfektion dient der Untersuchung, ob es möglich ist in porzinen Zellen eine spezifische INDEL-Bildung im FANCA-Gen zu induzieren. Die STE-Zellen dienen hierbei als Modell, um die Effizienz zu überprüfen. Die primären Zellen dienen als Grundlage für mögliche SCNT-Versuche. Bei erfolgreicher Transfektion kann aus diesen eine klonale Zelllinie gewonnen werden.

5.3.1 Transfektion von STE- und primären Zellen mit den C-Check- und pX458-Konstrukten

Die Zellen, die mit C-Check und pX458 transfiziert wurden, wurden nach 48h mittels Durchflusszytometrie auf ihre Transfektions- und Knockouteffizienz untersucht. Dabei wurde zwischen positiven Zellen, d.h. fluoreszierenden Zellen, und negativen Zellen unterschieden.

Auf dem Plasmid C-Check sind zwei Reporter kodiert (Abb. 26). Der asRed-Reporter zeigt an, dass die Zellen mit dem Plasmid transfiziert wurden. Der eGFP-Reporter ist geteilt und inaktiv. Zwischen den beiden eGFP-Bereichen wurde die Zielsequenz der entsprechenden sgRNA ligiert. Wird diese von der sgRNA erkannt und von der Cas9 geschnitten, erfolgt eine homologe Rekombination des eGFP-Reporters. Dadurch werden in den Zellen die homologen Rekombinationsereignisse angezeigt.

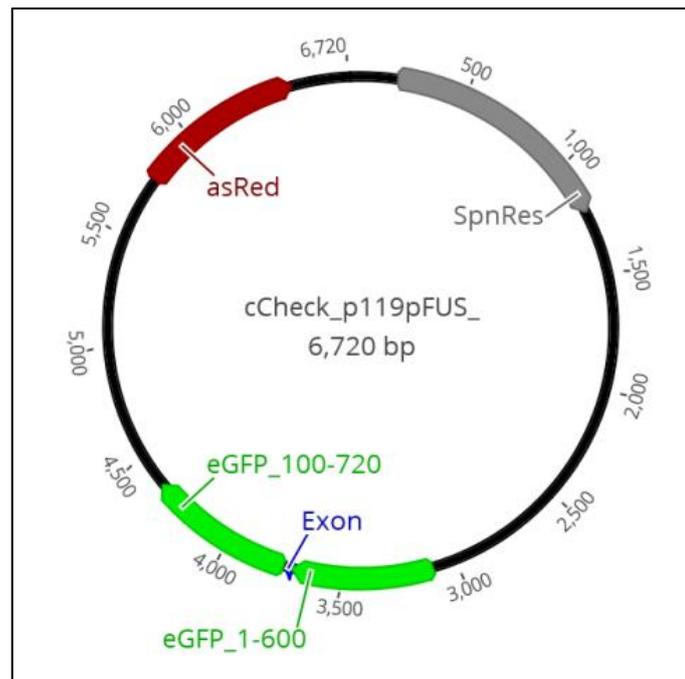


Abb. 26: Plasmidkarte von p119 C-Check. Hervorgehoben sind die Spectinomycinresistenz (SpnRes), die eGFP-kodierenden Bereiche, der asRed-kodierender Bereich und der Bereich, in dem die Zielsequenz für die sgRNA eingefügt wurde (Exon).

Die Cas9, die im Plasmid C-Check sowie im FANCA-Gen zu einem Doppelstrangbruch führen soll, wird auf dem Plasmid pX330 kodiert (Abb. 27).

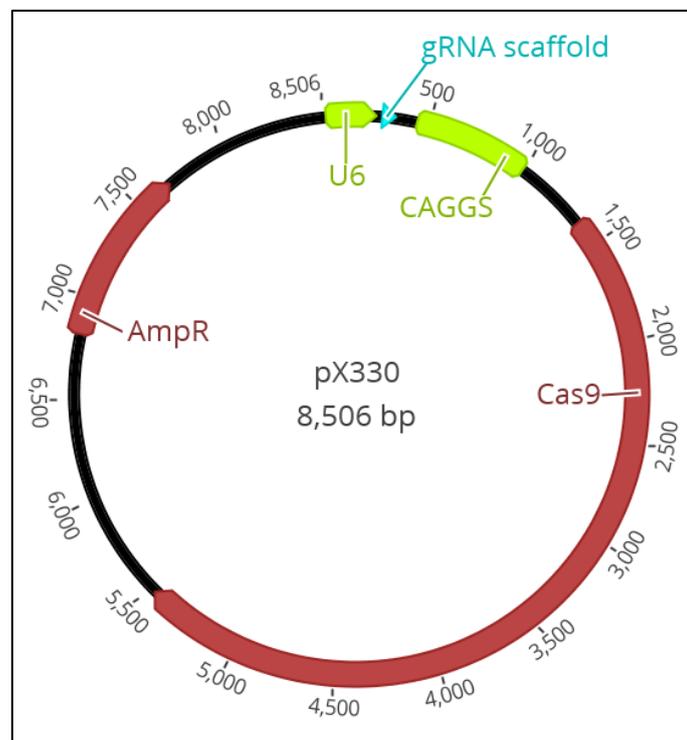


Abb. 27: Plasmidkarte von pX330. Hervorgehoben sind die Ampicillinresistenz (AmpR), der Cas9-kodierende Bereich sowie der Bereich, in dem die sgRNA eingefügt werden kann (gRNA scaffold).

Die für die Zielführung notwendige sgRNA wird auf dem Plasmid pJoker kodiert (Abb. 28).

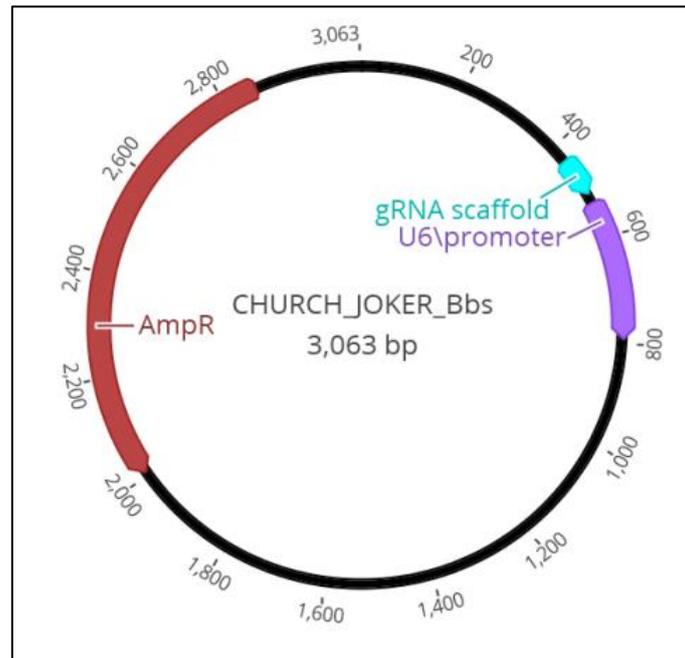


Abb. 28: Plasmidkarte vom Klonierungsvektor pJoker. Hervorgehoben sind die Ampicillinresistenz (AmpR) und der Bereich, in dem die sgRNA für das porcine FANCA-Gen integriert ist (gRNA scaffold).

Bei der Transfektion mit C-Check werden die Plasmide pX330, pJoker und C-Check zusammen in die Zellen transfiziert. Über das Plasmid C-Check ist es möglich, mit der eGFP-Reporterfluoreszenz, die Ereignisse der homologen Rekombination abzuschätzen, um somit einen Rückschluss auf Insertions- und Deletionsbildungen im FANCA-Gen zu ziehen.

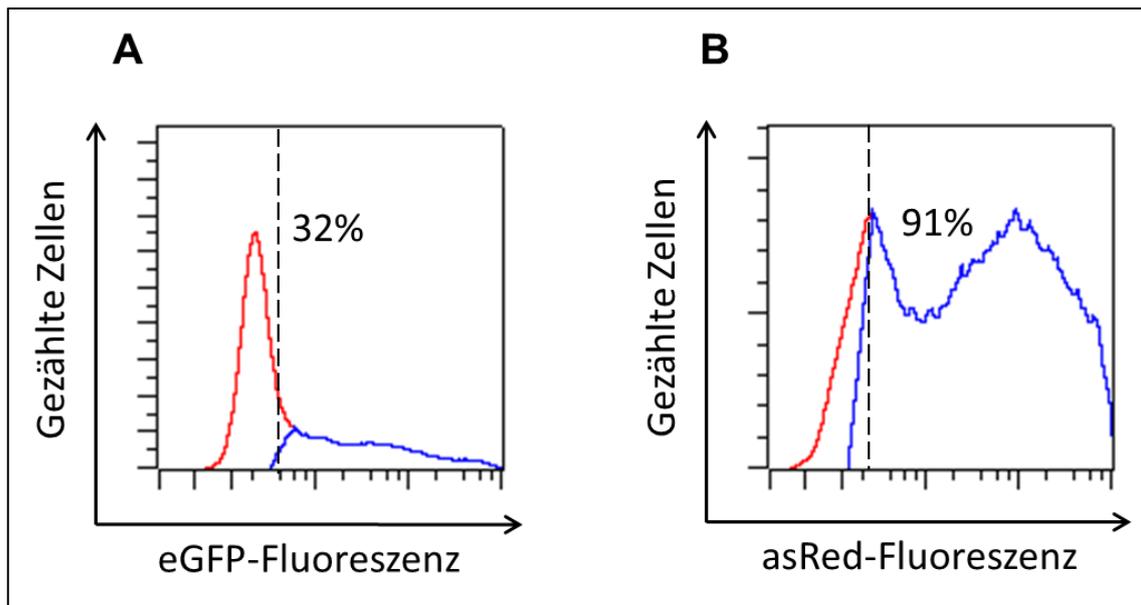


Abb. 29: Spezifische eGFP (A)- und asRed-Fluoreszenz (B) der mit C-Check_Exon7, pX330 und pJoker (Exon7) transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung. In rot ist die negative Population, in blau die positive Population dargestellt, die die homologen Rekombinationsereignisse in dem FANCA-Plasmid anzeigt. Der dargestellte Wert zeigt den prozentualen Anteil an positiven Zellen, $n = 3$.

Die Transfektion der STE-Zellen mit CCEX7 zeigt eine Transfektionsrate von 91% (Abb. 29 B). Dies entspricht der Anzahl an gezählten Zellen, die eine asRed-Fluoreszenz aufweisen. Die Rate an homologen Rekombinationsereignissen wird durch die eGFP-Fluoreszenz dargestellt. Diese beträgt bei CCEX7 32% (Abb. 29 A). Abb. 29 ist repräsentativ für die Transfektion mit allen C-Check-Konstrukten. Die Transfektions- und Mutationsrate bei der Transfektion mit CCEX9 und CCEX10 entspricht der von CCEX7. Die Differenz von transfizierten und homolog-rekombinant-positiven Zellen beruht wahrscheinlich darauf, dass die Alternative zu homologer Rekombination, der NHEJ-Reparaturmechanismus, zu einer Ligation des Plasmids führt, die die Funktionalität des eGFP-Reporters nicht wiederherstellt. Die Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen der C-Check-Konstrukte sind im Anhang in Abschnitt 9.2 aufgeführt.

Anschließend folgten die durchflusszytometrischen Messungen der STE-Zellen, die mit pX458-Konstrukten transfiziert wurden.

Das Plasmid pX458 kodiert die Cas9, die sgRNA und einen Reporter in einem Plasmid (Abb. 30). Es handelt sich um einen eGFP-Reporter, der anzeigt, dass das Plasmid in die Zellen transfiziert werden konnte.

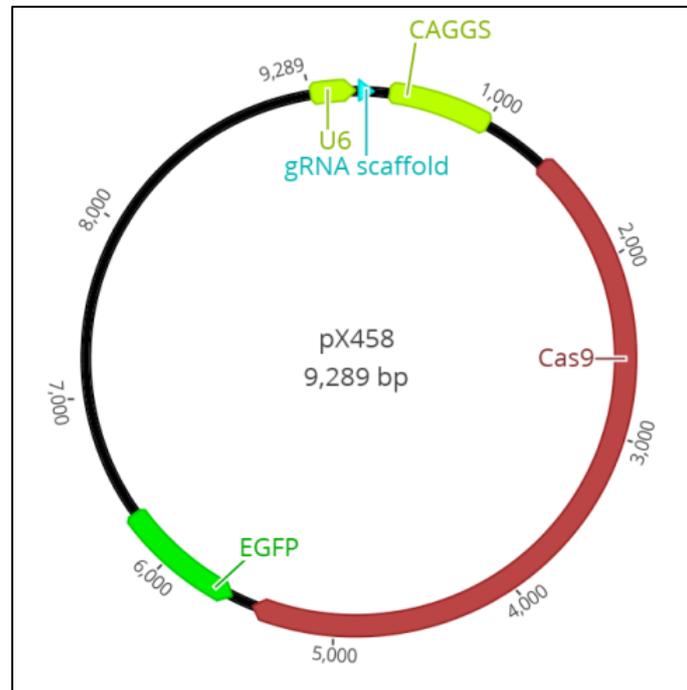


Abb. 30: Plasmidkarte von pX458. Hervorgehoben sind der Cas9-kodierende Bereich, der EGFP-Reporter, der über ein 2A-Element mit der Cas9-cDNA co-exprimiert wird, und der Bereich, in dem die sgRNA für das porcine FANCA-Gen eingefügt wurde (gRNA scaffold).

Die Verwendung von einem Plasmid, das alle, für das CRISPR/Cas-System benötigte, Komponenten kodiert, hat den Vorteil, dass bei einer Transfektion nur ein Plasmid in die Zellen eingebracht werden muss, was die Transfektionseffizienz erhöhen sollte.

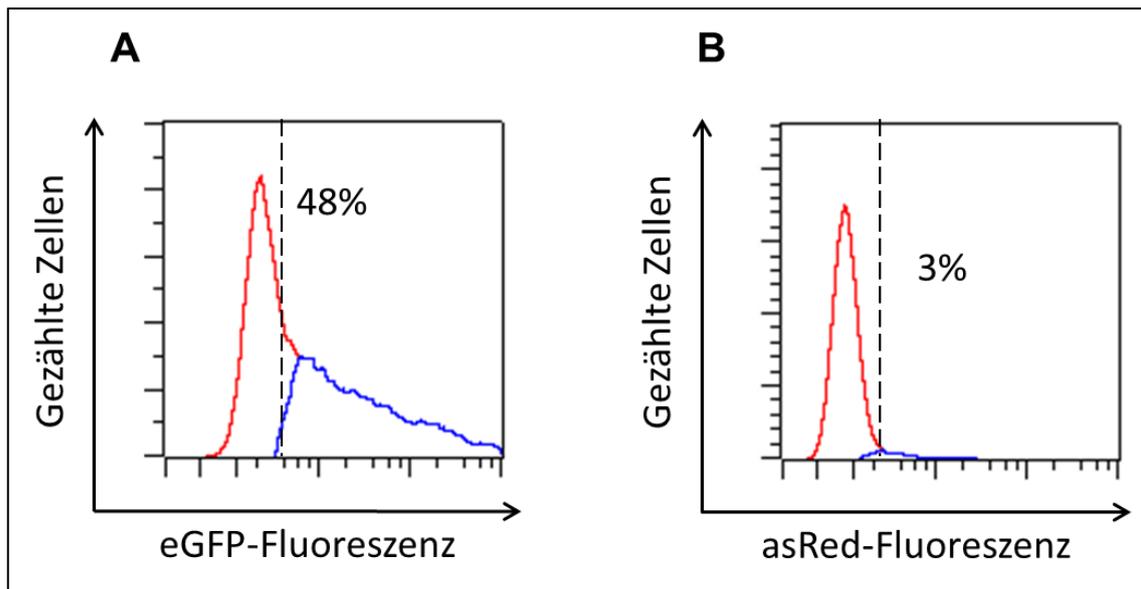


Abb. 31: Spezifische eGFP (A)- und asRed-Fluoreszenz (B) der mit pX458Faex7 transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung. In rot ist die negative Population, in blau die positive Population dargestellt. Der dargestellte Wert zeigt den prozentualen Anteil an positiven Zellen, $n = 3$.

In Abb. 31 sind repräsentativ die durchflusszytometrischen Messungen der mit pX458Faex7 transfizierten STE-Zellen dargestellt. Es ist zu beobachten, dass 48 % der Zellen eine eGFP-Fluoreszenz aufweisen. Dies entspricht einer Transfektionsrate von 48% (Abb. 31 A). Da pX458 im Gegensatz zu C-Check keine asRed-Reporter enthält, sollte keine asRed-Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 31 B). Die Transfektionsrate von pX458Faex9 und pX458Faex10 entspricht der von pX458Faex7. Es fällt auf, dass die Transfektion mit den pX458-Plasmiden eine 50 % schlechtere Transfektionsrate aufweist als bei der Verwendung von C-Check, pX330 und pJoker. Eine mögliche Ursache dafür kann in der eingesetzten Plasmidkonzentration zu finden sein. Bei den Transfektionen wurde eine Gesamtmenge von 10 μg Plasmid verwendet. Bei der Verwendung dreier Plasmide, die äquimolar eingesetzt wurden, lag bei C-Check-Plasmid somit nur ein Drittel der Konzentration vor als bei den pX458-Plasmiden. Bei dem C-Check-Plasmid hingegen hatte die eingesetzte Menge keine toxischen Effekte, sodass knapp 100 % der Zellen transfiziert werden konnten.

Die Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen der pX458-Konstrukte sind im Anhang in Abschnitt 9.2 aufgeführt.

5.3.1.1 Transfektion von porzinen STE- und iPS-Zellen mit den pX459-Konstrukten

Schließlich wurden die porzinen STE- und iPS-Zellen mit dem Plasmid pX459 transfiziert. Das Plasmid pX459 kodiert die Cas9, die sgRNA und einen Selektionsmarker in einem Plasmid (Abb. 32). Es handelt sich um einen Puromycin-Selektionsmarker, mit dem es möglich ist, über Antibiotika-Selektion transfizierter Zellen zu kultivieren, während nicht-transfizierte Zellen in dem antibiotika-haltigem Medium nicht kultiviert werden können und absterben.

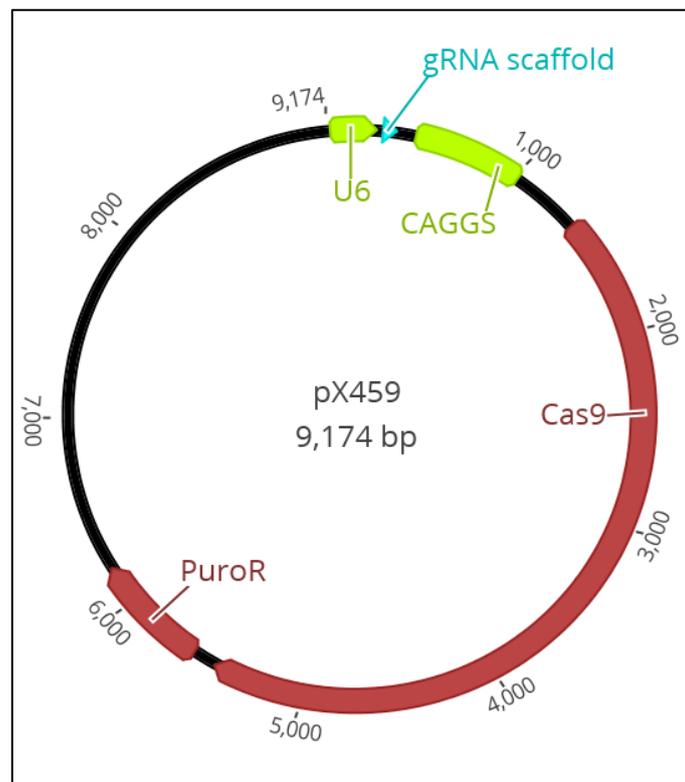


Abb. 32: Plasmidkarte von pX459. Hervorgehoben sind die Puromycinresistenz (PuroR), der Cas9-kodierende Bereich und der Bereich, in dem die sgRNA für das porcine FANCA-Gen eingefügt wurde (gRNA scaffold).

Die Verwendung von einem Plasmid, das alle, für das CRISPR/Cas-System benötigten Komponenten kodiert, hat den Vorteil, dass bei einer Transfektion nur ein Plasmid in die Zellen eingebracht werden muss, was die Transfektionseffizienz erhöhen sollte. Im Gegensatz zu pX458 ist keine Anreicherung über Zellsortierung möglich, dafür aber über den Selektionsmarker.

Die STE-Zellen konnten erfolgreich mit dem pX459-Plasmid transfiziert werden. Es konnten INDELS in den Transfektionen mit pX459Faex7, 9 und 10 gefunden werden. Bei pX459Faex7 konnte eine Mutation, bei pX459Faex9 zwei Mutationen

und bei pX459Faex10 eine Mutation identifiziert werden. In den iPS-Zellen konnten nur bei der Transfektion mit pX459Faex10 spezifische INDELS gebildet werden.

5.4 Analyse der mit den C-Check, pX458 und pX459 transfizierten Zellen

Ein Teil der transfizierten Zellen wurde anschließend lysiert und für eine DNA-Analyse mittels PCR verwendet. Die Zellen, die mit pX459 transfiziert wurden, wurden nach der Kultivierung lysiert und anschließend mittels PCR analysiert. Bei den untersuchten STE -Zellen handelt es sich um Zellpools, bei den iPS-Zellen um Zellklone.

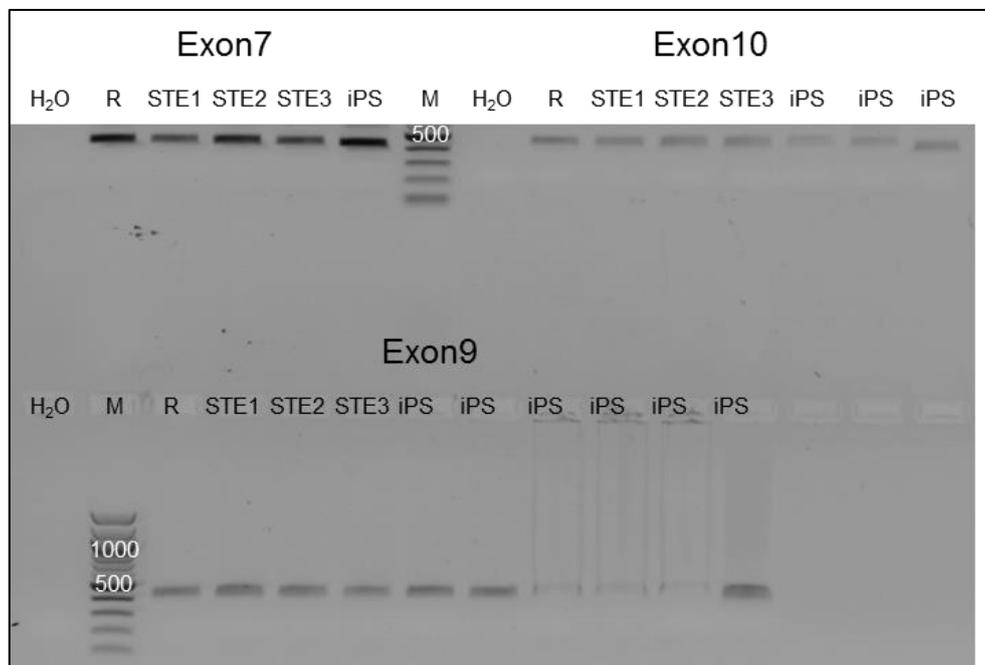


Abb. 33: Agarosegel zur PCR von STE- und iPS-Zellen. Dargestellt sind die Amplikons der lysierten Zellen, bei denen eine Transfektion durchgeführt wurde. Als negative Kontrolle wurde H₂O, als positiv Kontrolle eine unbehandelte Referenz-Probe verwendet. WT: unbehandelte Referenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS: iPS-Zellen mit pX459 transfiziert, M: 100 bp Leiter.

Die PCR-Analyse zeigt, dass in den transfizierten STE- und iPS-Zellen die Zielsequenzen der Exone 7, 9 und 10 nachweisbar sind (Abb. 33). Ausgenommen davon sind drei iPS-Kulturen, die mit pX459Faex9 transfiziert wurden. Möglicherweise liegen hier größere Deletionen vor, wodurch eine der Primer-Bindungsstellen entfernt wurde. Die nachgewiesenen Amplikons zeigen, dass keine Insertionen oder Deletionen (INDELS) vorliegen, die Einfluss auf die Größe

des Amplikons haben. Daraus lässt sich vermuten, dass es sich bei den möglichen vorhandenen Mutationen um kleinere INDELS handelt.

Um eine Aussage treffen zu können, ob in den amplifizierten Zellpools Mutationen vorliegen, wurde mit den Amplikons ein T7-Assay durchgeführt.

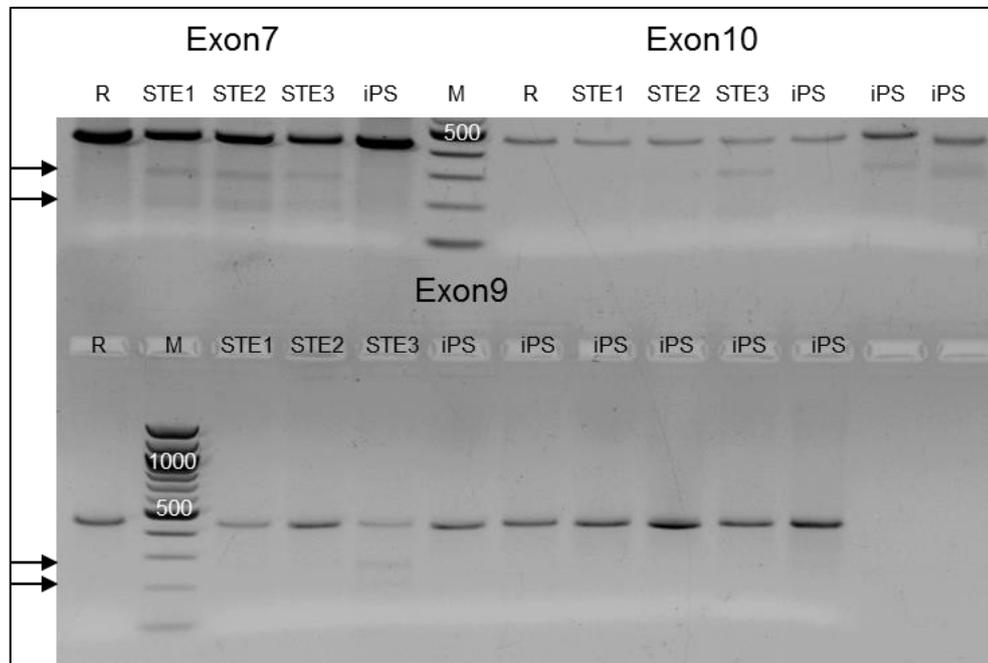


Abb. 34: Agarosegel zum T7-Assay von STE- und iPS-Zellen. Dargestellt sind die Amplikons der lysierten Zellen. Als negative Kontrolle wurde eine unbehandelte Referenz-Sequenz verwendet. R: unbehandelte Referenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS: iPS-Zellen mit pX459 transfiziert, M: 100 bp Leiter.

Im T7-Assay ist zu sehen, dass die Zellen, die mit CCEX7, pX458Faex7, pX459Faex7, pX459Faex9, pX458Faex10, pX459Faex10 sowie zwei iPS-Zellkulturen, die mit pX459Faex10 transfiziert wurden, wahrscheinlich Mutationen im Exon7 des FANCA-Gens aufweisen (Abb. 34). Die Mutationen werden durch die Banden dargestellt, die in der Abbildung mit den Pfeilen markiert sind.

Die Sequenzierungsdaten wurden mit Hilfe des Programms Geneious®R10 als Elektropherogramme dargestellt. Dabei werden zunächst die FANCA-Exone im Zellpool sequenziert. Durch Überlagerungen der Sequenzierungen in den Zielsequenzen sind hier die CRISR/Cas-induzierte Mutationen im Vergleich zur Referenz-Sequenz zu erkennen.

Diese waren STE-Zellen, die mit pX459Faex9 und pX459Faex10 transfiziert wurden, sowie zwei iPS-Kulturen, die mit pX459Faex9 transfiziert wurden, und eine, die mit pX459Faex10 transfiziert wurde.

Die Sequenzierung der STE- und iPS-Zellen, die Mutationen im FANCA Exon7 aufweisen können, ist aufgrund eines technischen Fehlers nicht auswertbar. Es folgte die Auswertung der Sequenzierung der spezifischen Mutationen im FANCA Exon9.

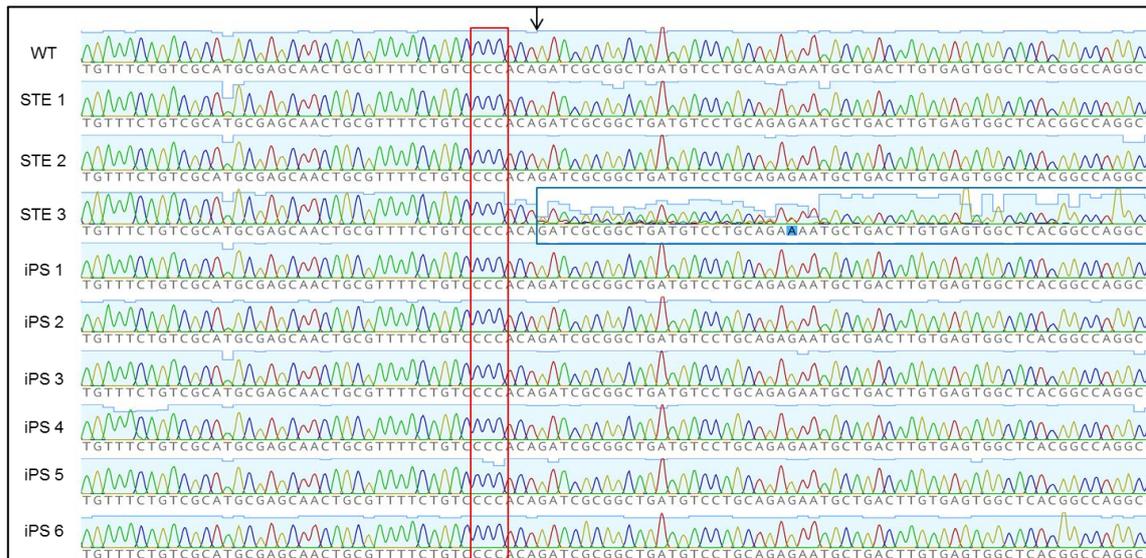


Abb. 35: Elektropherogramm der Sequenzierung transfizierter STE- und iPS-Zell-Pools in Exon9. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS: iPS-Zellen mit pX459 transfiziert, roter Kasten: PAM, Pfeil: Cas9-Schnittstelle, blauer Kasten: mutierte Sequenz^[114].

Bei den mit pX459Faex9 transfizierten STE-Zellen ist eine Sequenzüberlagerung zu erkennen (Abb. 35). Diese liegt rechts der PAM-Sequenz (Pfeil). Die Sequenzüberlagerung gibt einen Hinweis darauf, dass in dem Zellpool eine Mutation in der sgRNA-Zielsequenz vorliegt. Bei den anderen transfizierten Zellen liegen, aufgrund der Zellpool-Sequenzen, keine genetischen Mutationen vor. Der Zellpool, der eine Sequenzüberlagerung aufweist, wurde im Anschluss für eine Einzelklonsequenzierung verwendet.

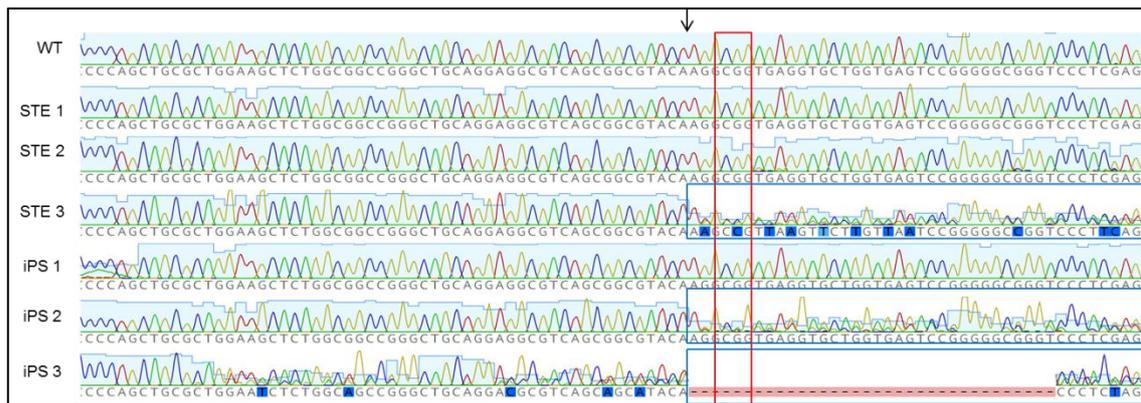


Abb. 36: Elektropherogramm der Sequenzierung transfizierter STE- und iPS-Zell-Pools in Exon10. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS: iPS-Zellen mit pX459 transfiziert, roter Kasten: PAM, Pfeil: Cas9-Schnittstelle, blauer Kasten: mutierte Sequenz^[114].

In den Sequenzen der mit pX459Faex10 transfizierten STE-Zellen sowie zweier mit pX459Faex10 transfizierten iPS-Zellen sind Sequenzüberlagerungen bzw. bei einer iPS-Kultur eine Deletion von 34 bp erkennbar (Abb. 36). Die Zellpools, die eine Sequenzüberlagerung aufwiesen, wurden im Anschluss für eine Einzelklonsequenzierung verwendet. Bei der Einzelklonsequenzierung wird das Amplikon aus der PCR in den Vektor pGEM-T Easy ligiert und in *E-coli* DH5 α -Zellen transformiert.

Da die Sequenzierungen und der T7-Assay unterschiedliche Aussagen über mögliche spezifische Mutationen im FANCA-Gen haben, wurden acht Proben für eine Einzelklonsequenzierung verwendet. Dies sind STE-Zellen transfiziert mit CCEx7, pX458Faex7 und pX459Faex7, die nur im T7-Assay positiv auf mögliche Mutationen getestet wurden. Weiterhin STE-Zellen, die mit pX458Faex9 und pX459Faex9, sowie iPS-Zellen, die mit pX459Faex9 transfiziert wurden. Hierbei waren die mit pX459Faex9 transfizierten STE-Zellen sowohl im T7-Assay als auch bei der Zellpool-Sequenzierung positiv auf spezifische Mutationen. Schließlich wurden mit pX459Faex10 transfizierte STE- und iPS-Zellen für eine Einzelklonsequenzierung ausgewählt. Diese zeigten sowohl im T7-Assay als auch in der Zellpool-Sequenzierung ein positives Ergebnis auf spezifische Mutationen.

Tab. 36: Mutationen in den Einzelklonsequenzen von Exon7 des FANCA-Gens.

WT	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	C	A	C	C	G	A	C	G	T	C	G	C	C	A	G	A	G	C	T	G			
C1	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	C	A	C	C	G	A	C	<u>G</u>	G	T	C	G	C	C	A	G	A	G	C	T	G		
C2	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	C	A	C	C	G	A	C	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	G	T	C	G	C	C	A	G	A	G	C	T	G
C3	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	C	A	C	C	G	A	C	<u>G</u>	G	T	C	G	<u>I</u>	C	A	G	A	G	C	T	G		

WT: Referenzsequenz, C1 - C3: drei Kolonien, die eine Mutation aufwiesen. Punktmutationen und Insertionen sind unterstrichen. Die PAM ist in rot dargestellt.

Die Sequenzen in Exon7 zeigen eine Gemeinsamkeit, die Einführung von 1-3 bp (Tab. 36). Die Insertion der 3 bp erfolgte bei der Transfektion mit pX458Faex7 (Tab. 36, C2). Zusätzlich gab es bei der Transfektion mit pX459Faex7 eine Punktmutation (Tab. 36, C3). Von 18 sequenzierten Einzelkolonien enthielten drei eine Mutation. Dies entspricht einer Effizienz von 17 %.

Tab. 37: Mutationen in den Einzelklonsequenzen von Exon9 des FANCA-Gens.

WT	C	T	G	T	C	C	C	A	C	A	G	A	T	C	G	C	G	G	C	T	G	A	T	G	T	C	C	T	G	C	A	G	A	G					
C1	C	T	G	T	C	-	-	-	-	-	-	G	A	T	C	G	C	G	G	C	T	G	A	T	G	T	C	C	T	G	C	A	G	A	G				
C2	C	T	G	T	C	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-	G	C	G	G	C	T	G	A	T	G	T	C	C	T	G	C	A	G	A	G				
C3	C	T	G	T	C	C	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	C	A	G	A	G

WT: Referenzsequenz, C1 - C3: drei Kolonien, die eine Mutation aufwiesen. Die PAM ist in rot dargestellt. -: deletierte Nukleotide.

Die Einzelklonsequenzierung von Exon9 hat mehrere Deletionen ergeben (Tab. 37). Es liegen Deletionen von 6 bp, 7 bp und 20 bp vor. Die kleineren Deletionen sind bei der Transfektion mit pX459Faex9 aufgetreten (Tab. 37, C1+C2). Die größere Deletion trat bei der Transfektion mit pX458Faex9 (Tab. 37, C3) auf. Von 17 sequenzierten Einzelkolonien enthielten drei eine Mutation. Dies entspricht einer Effizienz von 18 %.

Tab. 38: Mutationen in den Einzelklonsequenzen von Exon10 des FANCA-Gens.

WT	G	C	A	G	G	A	G	G	C	G	T	C	A	G	C	G	G	C	G	T	A	C	A	A	G	G	C	G	G	T	G	A	G	G	T			
C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	T

WT: Referenzsequenz, C1: eine Kolonie, die eine Mutation aufwies. Die PAM ist in rot dargestellt.

-: deletierte Nukleotide.

Die Transfektion mit pX459Faex10 hat zu einer Deletion von 37 bp geführt (Tab. 38). In der Analyse der transfizierten iPS-Zellen konnten keine weiteren Mutationen identifiziert werden. Von 5 sequenzierten Einzelkolonien enthielt eine Kolonie eine Mutation. Dies entspricht einer Effizienz von 20 %.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass es in den STE-Zellen möglich ist, mit den verwendeten sgRNAs Mutationen in den FANCA-Exonen 7, 9 und 10

einzuführen. Bei den iPS-Zellen war dies nicht möglich, da hier bei der PCR mehrfach keine Amplikons amplifiziert werden konnten. Dies könnte darauf hinweisen, dass in diesen Zellen größere Deletionen generiert wurden. Für einen Nachweis müssten neue, weiter entfernt liegende PCR-Primer entwickelt werden.

5.5 Optimierung der Mikroinjektion in parthenogenetischen Schweineezellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es möglich ist, Mutationen in porzinen Zellen einzuführen, soll überprüft werden, ob dies auch in parthenogenetischen porzinen Embryonen möglich ist. Bei erfolgreicher INDEL-Induktion könnte dieser Ansatz direkt auf fertilisierte Oozyten übertragen werden. Kritische Parameter für die Eizelleninjektion sind das Entwicklungsstadium, die Konzentration der CRISPR/Cas9-Plasmide und das Injektionsvolumen.

Die Eizellen stammen aus Schlachthof-Ovarien. Über die *in vitro*-Reifung gelangen die Eizellen in die MII-Phase. Die Parthenogenese wird durch einen elektrischen Impuls oder mittels chemischer Substanzen aktiviert. Die Aktivierung der MII-Oozyten dient als Orientierungspunkt für die Mikroinjektion in parthenogenetische porzine Embryonen. Durch die Aktivierung wird in der unbefruchteten Eizelle die Embryonalentwicklung artifiziell herbeigeführt. Hier sollte zunächst untersucht werden, ob der Injektionszeitpunkt einen Einfluss auf die Erfolgsrate der Injektion hat. Als Zeitpunkt wurde die Injektion unmittelbar vor der elektrischen Aktivierung und unmittelbar nach der chemischen Aktivierung ausgewählt. Dabei wurde untersucht, ob die Entwicklungs- und Transfektionsrate der injizierten parthenogenetischen Embryonen zu den beiden Zeitpunkten unterschiedlich ist. Die beiden Versuchsgruppen werden im Folgenden „Vor der Aktivierung“ (vAkt) und „Nach der Aktivierung“ (nAkt) genannt.

Bei der Injektion der Versuchsgruppen vAkt und nAkt wurde eine Injektionslösung mit pT2Venus, pCMV/SB100 und TMR-Dextran verwendet. Das Plasmid pT2Venus ist ein Reporterplasmid, welches einen Venus-Reporter kodiert (Abb. 37 A).

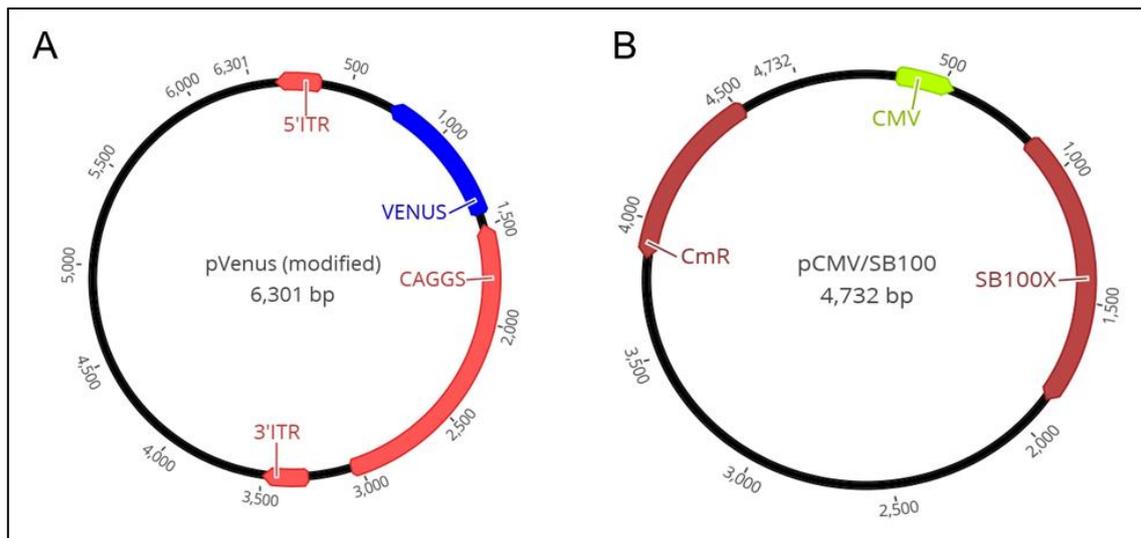


Abb. 37: Plasmidkarte von pT2Venus (A) und pCMV/SB100 (B). Hervorgehoben sind der CAGGS-Promoter, die Inverted Terminal Repeats und der Venus-kodierende Bereich.

Es befinden sich zwei sich wiederholende Bereiche im Plasmid (Inverted Terminal Repeats, ITR), welche den Venus-Reporter flankieren. Das Plasmid wird als Reporter verwendet, um mittels Fluoreszenz die Transfektionsrate und –effizienz zu analysieren. Zudem wird das Plasmid pCMV/SB100 verwendet (Abb. 37 B). Auf diesem ist die *Sleeping Beauty* Transposase kodiert.

Liegen die Plasmide pT2Venus und pCMV/Sb100 in Kombination vor, kann der Venus-Reporter in das Genom integriert werden. Dadurch wird in den parthenogenetischen porzinen Embryonen angezeigt, ab welchem Entwicklungszustand die injizierten Plasmide aktiv sind. Dies wird durch die Venus-Fluoreszenz dargestellt. Weiterhin wurde der Farbstoff TMR-Dextran injiziert, der darstellt, ob die Injektionslösung injiziert wurde und ob die Injektion gleichmäßig erfolgte. Die Plasmide hatten eine Gesamtkonzentration von 18 ng/μl und der Farbstoff TMR-Dextran eine Konzentration von 2 ng/μl.

Es wurden für die Kulturkontrolle als auch für die Versuchsgruppen vAkt und nAkt parthenogenetische porzine Oozyten mikroinjiziert und untersucht. Die Kulturkontrolle bestand Eizellen, die ohne Mikroinjektion pipettiert und kultiviert wurden. Sie geben einen Hinweis auf die Entwicklungsfähigkeit der Eizellen. Anschließend wurden die Entwicklungsstadien aufgezeichnet, sowie die Embryonen, welche Fluoreszenz aufwiesen. Abb. 38 zeigt die Kulturkontrolle, in der wie erwartet keine Fluoreszenz detektierbar war.

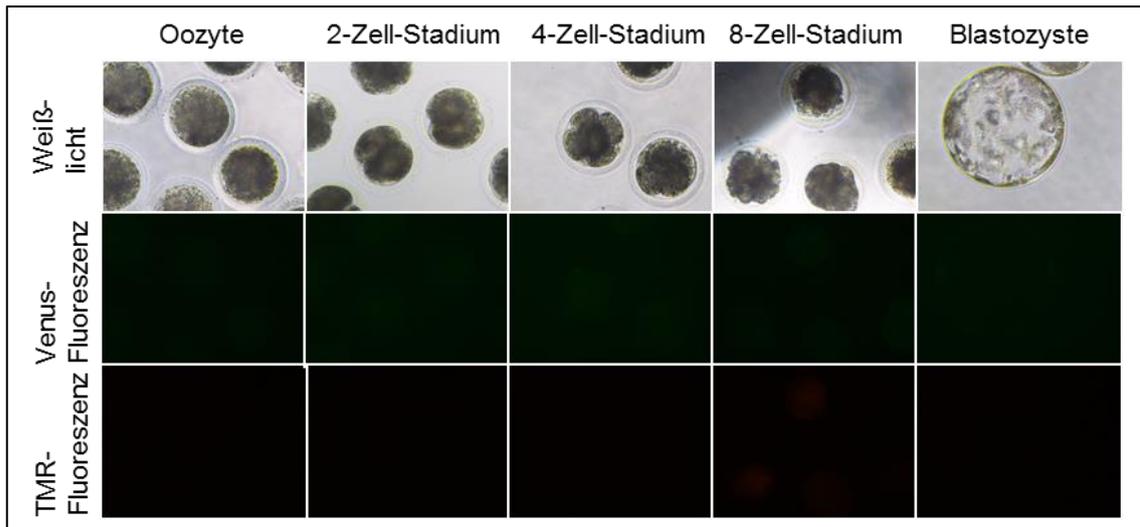


Abb. 38: Kulturkontrolle der parthenogenetischen porcinen Embryonen bei der Optimierung der Mikroinjektion. Dargestellt sind Oozyten, 2-Zell-Stadium, 4-Zell-Stadium, 8-Zell-Stadium und Blastozysten als Weißlicht- und als Fluoreszenzaufnahme.

Die Entwicklung der Embryonen in der Kulturkontrolle dienen als Standard für die Versuchsgruppen vAkt und nAkt.

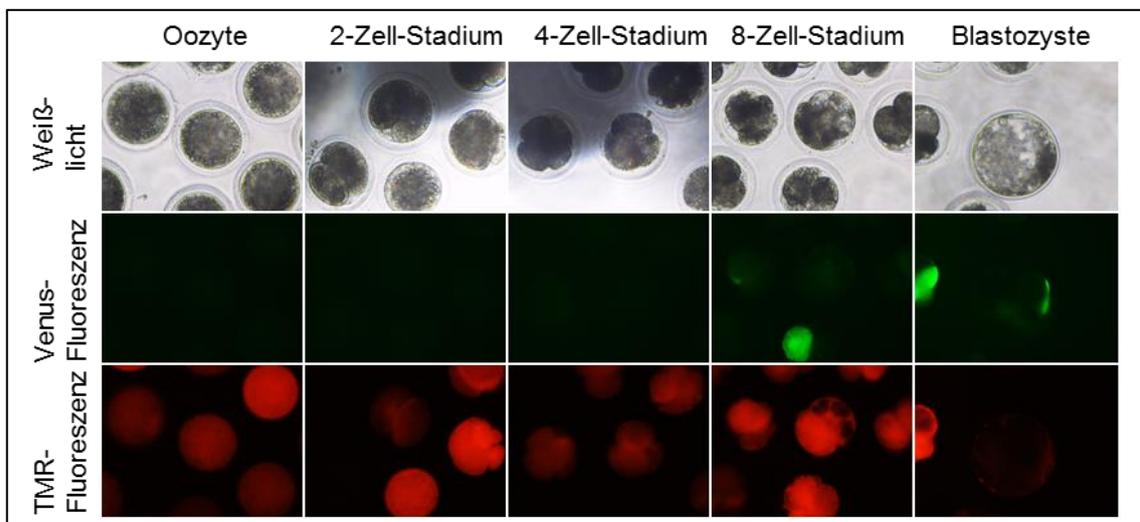


Abb. 39: Injektion vor der Aktivierung von parthenogenetischen porcinen Embryonen. Dargestellt sind Oozyten, 2-Zell-Stadium, 4-Zell-Stadium, 8-Zell-Stadium und Blastozysten als Weißlicht- und als Fluoreszenzaufnahme.

In Abb. 39 sind die Entwicklungsstadien und die detektierte Fluoreszenz der Versuchsgruppe vAkt dargestellt. Die Entwicklung verlief wie bei der Kulturkontrolle. Die Venus-Fluoreszenz ist ab dem 8-Zell-Stadium in den Embryonen erkennbar, während die TMR-Fluoreszenz ab dem Injektionszeitpunkt detektierbar ist. Die Venus-Fluoreszenz zeigt an, dass injizierte Reporter ab dem

8-Zell-Stadium in parthenogenetischen Embryonen erkennbar exprimiert werden. Die TMR-Fluoreszenz zeigt die unterschiedlichen Injektionsvolumina an.

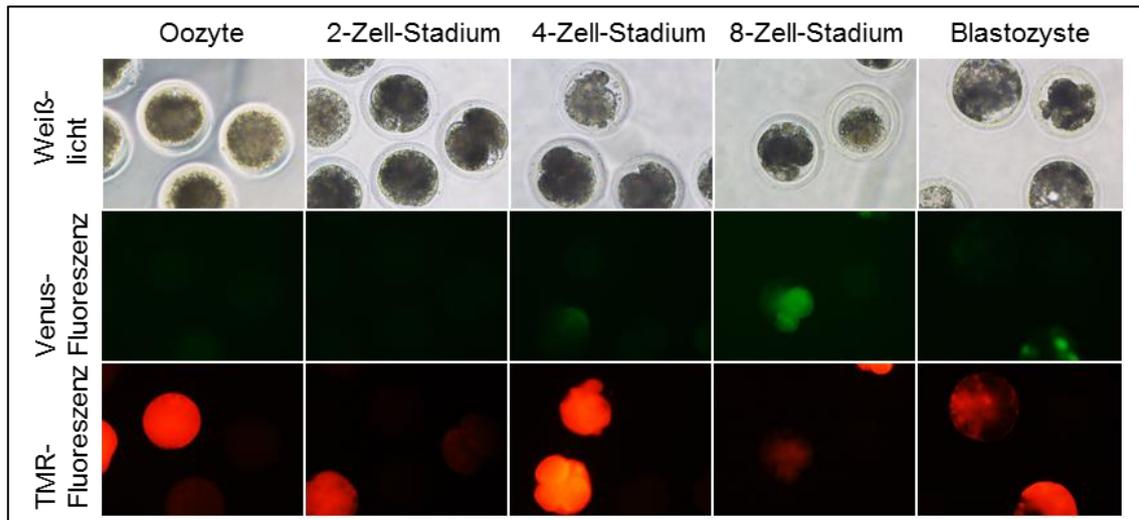


Abb. 40: Injektion nach der Aktivierung von parthenogenetischen porzinen Embryonen. Dargestellt sind Oozyten, 2-Zell-Stadium, 4-Zell-Stadium, 8-Zell-Stadium und Blastozysten als Weißlicht- und als Fluoreszenzaufnahme.

In Abb. 40 sind die Entwicklungsstadien und die detektierte Fluoreszenz der Versuchsgruppe nAkt dargestellt. Es ist bereits ab dem 4-Zell-Stadium eine Venus-Fluoreszenz zu beobachten. Dies zeigt, dass ab dem 4-Zell-Stadium der Reporter erkennbar exprimiert wird. Die TMR-Fluoreszenz ist in allen Entwicklungsstadien erkennbar, jedoch gibt es bei der Injektion nAkt eine Verteilung innerhalb der injizierten Embryonen. Die Variationen der Injektionsvolumina werden durch unterschiedliche Fluoreszenz-Intensitäten dargestellt.

Zwischen den Versuchsgruppen gibt es morphologische Unterschiede in den Entwicklungsstadien. Bei der Versuchsgruppe vAkt sind die Entwicklungsstadien morphologisch gut zu unterscheiden und einzuordnen, während die bei der Versuchsgruppe nAkt ab dem 4-Zell-Stadium erschwert war. Weiterhin war die spezifische Venus-Fluoreszenz im Versuch vAkt ab dem 8-Zell-Stadium erkennbar, bei dem Versuch nAkt jedoch schon am dem 4-Zell-Stadium. Es fällt jedoch auch auf, dass die Variation der Injektionsvolumina bei dem Versuch vAkt weniger verteilt war, als bei dem Versuch nAkt. Bei der Injektion in der Versuchsgruppe nAkt gab es zudem das Problem, dass 5 – 10 % der injizierten

Eizellen zum Zeitpunkt 3 Std. nach Aktivierung bereits im 2-Zell-Stadium waren, wodurch die Mikroinjektion erschwert wurde.

Insgesamt wurden in der Kulturkontrolle 195 Oozyten, in der Versuchsgruppe vAkt 204 Oozyten und in der Versuchsgruppe nAkt 204 Oozyten eingesetzt und für die Kultivierung und Analyse verwendet (Abb. 41).

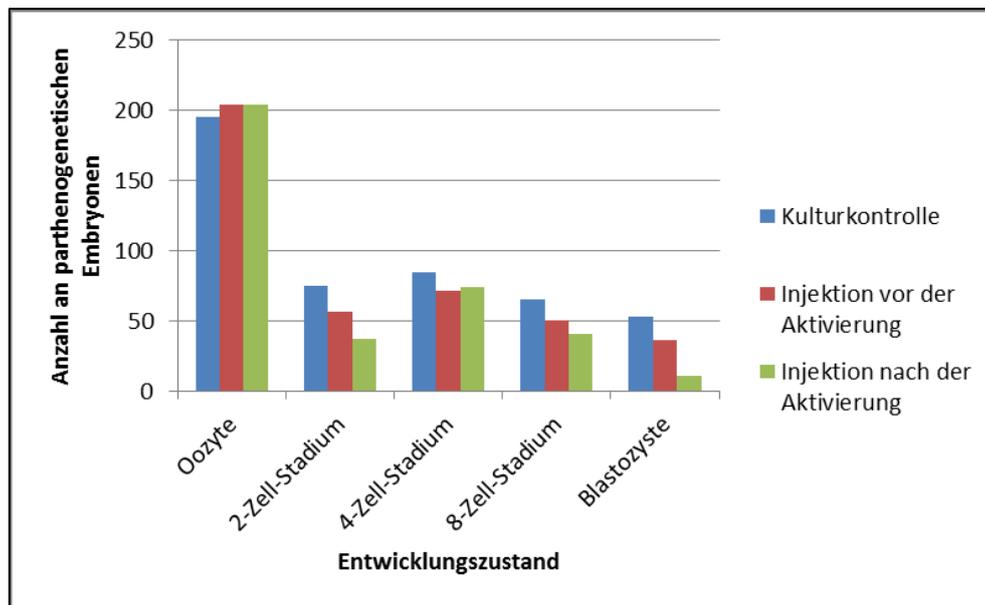


Abb. 41: Entwicklungsunterschiede zwischen verschiedenen Versuchsgruppen bei der Optimierung der Mikroinjektion in parthenogenetischen porcinen Embryonen. Im Vergleich sind die Kulturkontrolle, sowie die Versuchsgruppen vAkt und nAkt dargestellt, n = 4.

Es wurde eine Teilungsrate von 38 % in der Kulturkontrolle, von 27 % in der Versuchsgruppe vAkt und von 18 % in der Versuchsgruppe nAkt beobachtet. Weiterhin haben sich 27 % der Oozyten der Kulturkontrolle zu Blastozysten entwickelt, während dieses bei der Versuchsgruppe vAkt 18 % der Oozyten waren und 5 % bei der Versuchsgruppe nAkt (Abb. 41). Durch die Mikroinjektion entwickelten sich in den Versuchsgruppen weniger Embryonen als bei der Kulturkontrolle. Zudem wurde ermittelt, wie hoch die Rate der sich entwickelten fluoreszierenden Embryonen war.

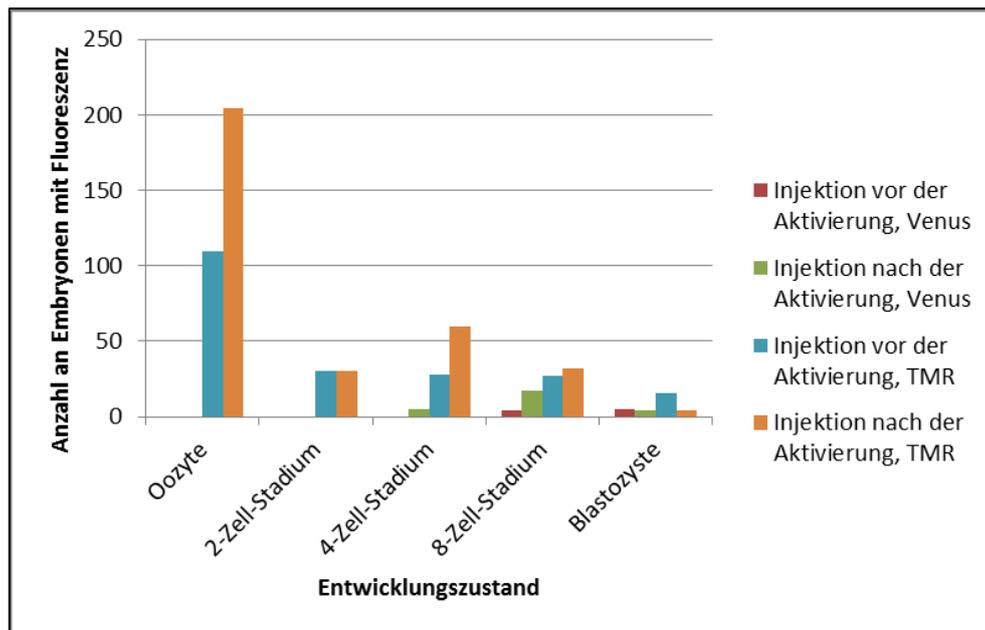


Abb. 42: Fluoreszenznachweis zwischen verschiedenen Versuchsgruppen bei der Optimierung der Mikroinjektion in parthenogenetischen porzinen Embryonen. Im Vergleich sind die Kulturkontrolle sowie die Versuchsgruppen vAkt und nAkt dargestellt, $n = 4$.

Es zeigten 2 % der sich entwickelten Embryonen im 8-Zell-Stadium (Tag 3 nach der Injektion) und 14 % der sich entwickelten Blastozysten (Tag 6 nach der Injektion) der Versuchsgruppe vAkt eine Venus-Fluoreszenz. In der Versuchsgruppe nAkt hingegen zeigten 7 % der sich entwickelten Embryonen im 8-Zell-Stadium (Tag 3 nach der Injektion) und 36 % der sich entwickelten Blastozysten (Tag 6 nach der Injektion) eine Venus-Fluoreszenz (Abb. 42). Die TMR-Fluoreszenz ist in jedem Entwicklungsstadium erkennbar. Während der Entwicklung nimmt die TMR-Intensität ab, durch die Spaltungsteilungen der Embryonen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass es zwischen den Versuchsgruppen vAkt und nAkt an Tag 0 der Entwicklung, im Oozyten-Stadium einen Unterschied in der Detektion der TMR-Fluoreszenz gab. In der Versuchsgruppe nAkt konnte direkt nach der Injektion in mehr Oozyten eine TMR-Fluoreszenz nachgewiesen werden als in der Versuchsgruppe vAkt. Dieser Unterschied glich sich in dem Zeitraum zwischen Oozyten-Stadium und 2-Zell-Stadium aus. Ansonsten konnte kein Unterschied in der Entwicklungs- und Transfektionsfähigkeit festgestellt werden.

5.6 Spezifische FANCA INDEL-Bildung in parthenogenetischen porzinen Embryonen

5.6.1 Mikroinjektion in parthenogenetische Embryonen mit den C-Check-Konstrukten

Nach der Optimierung des Zeitpunktes der Mikroinjektion wurde mit der Mikroinjektion von C-Check-Plasmiden begonnen. Hierbei wurde zwischen den Plasmiden C-Check_Exon7 (CCEx7), C-Check_Exon9 (CCEx9) und C-Check_Exon10 (CCEx10) unterschieden. Neben den C-Check-Plasmiden wurde auch pX330 und pJoker injiziert. Das Plasmid pX330 kodiert die Cas9 und pJoker die sgRNA. Dies ermöglicht die Induktion eines Doppelstrangbruchs in den entsprechenden Exonen. Das C-Check-Plasmid enthält zwei Reporter. Es wird ein asRed-Reporter kodiert, dessen Fluoreszenz die Transfektionseffizienz anzeigt. Weiterhin kodiert das Plasmid einen eGFP-Reporter. Dieser ist geteilt in zwei Sequenzen unterschiedlicher Größe (1 – 600 bp und 100 – 720 bp), die die FANCA-Zielsequenzen für die sgRNA flankieren. Die Kombination aus Cas9 und sgRNA ermöglicht die Einführung eines Doppelstrangbruchs in der Zielsequenz. Da die eGFP-Bereiche einen 500 bp-langen homologen Bereich haben, wird der Doppelstrangbruch mittels homologer Rekombination repariert, was zu einem funktionellen eGFP-Reporter und somit zu einer eGFP-Fluoreszenz führt. Dadurch kann die Rate an erfolgten Doppelstrangbrüchen und somit die Rate der homologen Rekombination ermittelt werden. Dies gibt einen Hinweis auf den prozentualen Anteil der Embryonen, in denen das Reporterplasmid einer homologen Rekombination unterliegt. Neben den Versuchsgruppen gab es eine Kulturkontrolle und eine Injektionskontrolle. Bei der Injektionskontrolle wurde Injektionspuffer injiziert, die Kulturkontrolle blieb unbehandelt. Es wurden Aufnahmen von den Zellstadien Oozyte, 8-Zell-Stadium und Blastozyste gemacht.

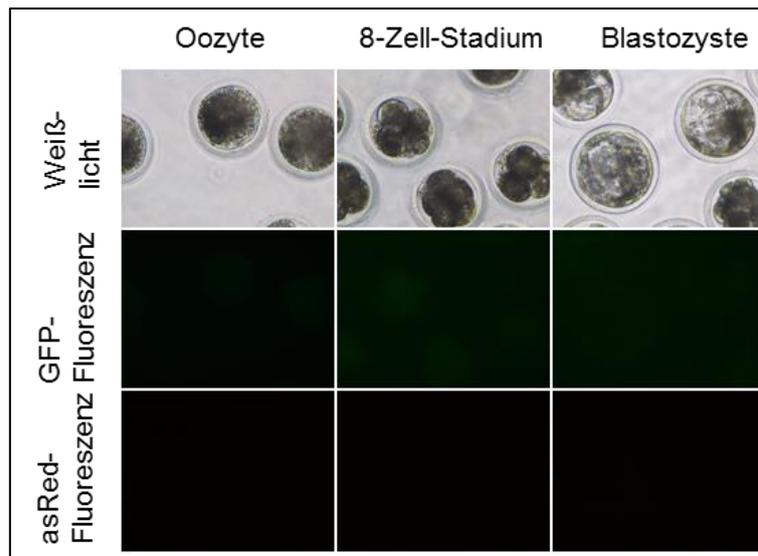


Abb. 43: Kulturkontrolle von parthenogenetischen porzinen Embryonen mit der Injektion von C-Check. Dargestellt sind Oozyten, 8-Zell-Stadium und Blastozysten als Weißlicht- und als Fluoreszenzaufnahme.

In Abb. 43 ist die Kulturkontrolle dargestellt, die bei der Versuchsgruppe mit der Injektion von CCEX7 angelegt wurde. Wie erwartet, ist keine Fluoreszenz erkennbar. Die Entwicklung der Zellstadien dient den Injektionen als Kontrolle.

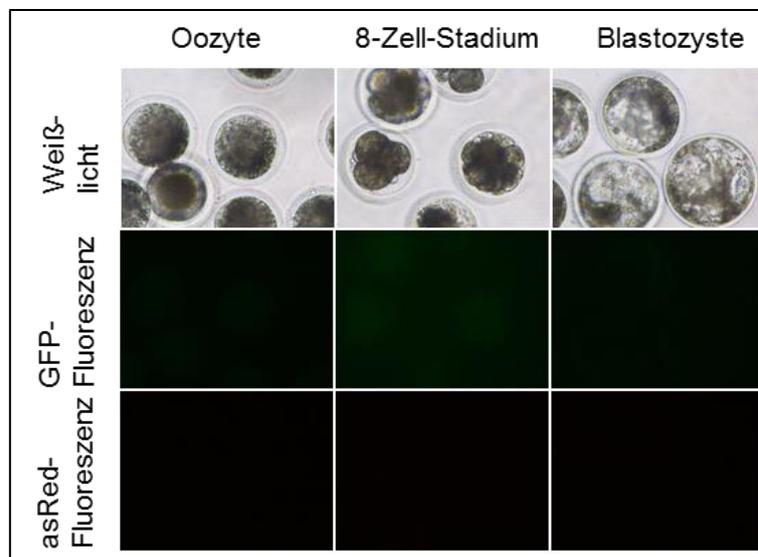


Abb. 44: Injektionskontrolle von parthenogenetischen porzinen Embryonen mit der Injektion von C-Check. Dargestellt sind Oozyten, 8-Zell-Stadium und Blastozysten als Weißlicht- und als Fluoreszenzaufnahme.

Weiterhin ist in Abb. 44 die Injektionskontrolle dargestellt, die bei der Versuchsgruppe mit der Injektion von CCEX7 angelegt wurde. Die Injektionskontrolle zeigt ebenfalls, wie erwartet, keine Fluoreszenz, da diese nur

mit Injektionspuffer injiziert wurde. Die Entwicklung der Embryonen nach der Injektion mit dem Injektionspuffer entspricht der Entwicklung in der Kulturkontrolle.

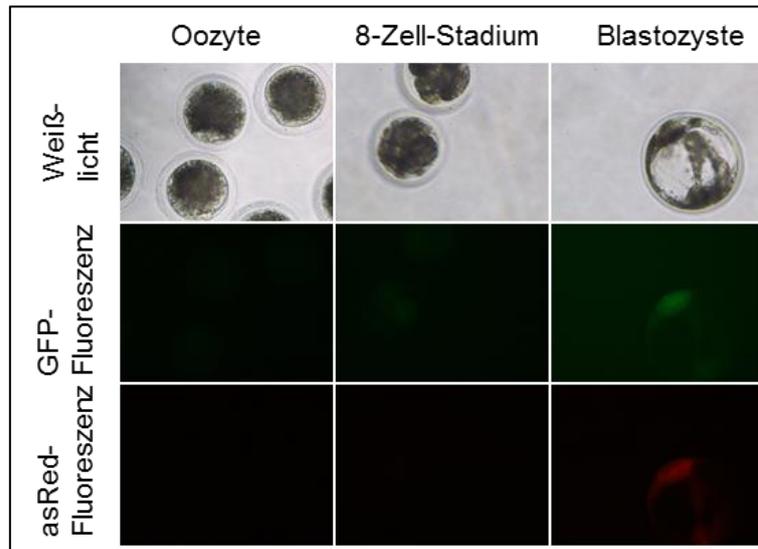


Abb. 45: Injektion von C-Check von parthenogenetischen porcinen Embryonen. Dargestellt sind Oozyten, 8-Zell-Stadium und Blastozysten als Weißlicht- und als Fluoreszenzaufnahme.

Schließlich wurde in der Versuchsgruppe CCEx7 in den Blastozysten die spezifische eGFP- und asRed-Fluoreszenz festgestellt (Abb. 45). Die asRed-Fluoreszenz zeigt, dass die Transfektion der Oozyte erfolgreich war. Die eGFP-Fluoreszenz zeigt hingegen, dass es im C-Check-Plasmid zur homologen Rekombination kam. Dies zeigt, dass sowohl Cas9 als auch sgRNA im Embryo exprimiert wird und aktiv ist. Es lässt sich vermuten, dass in der Blastozyste mit eGFP-Fluoreszenz auch eine genetische Modifikation im Exon7 des FANCA-Gens im Genom erfolgt ist.

Im Weiteren wurde die Anzahl der parthenogenetischen Embryonen im entsprechenden Entwicklungszustand gezählt und die Anzahl der Embryonen, welche eine oder beide der spezifischen Fluoreszenzen enthielt, dokumentiert. Für die Versuche mit den C-Check-Plasmiden wurden folgende Injektionslösungen verwendet (Tab. 39).

Tab. 39: Verwendete Plasmidlösungen für die Mikroinjektion mit C-Check.

Injektionslösung	Gesamt- konzentration (ng/μl)	Anzahl an Experimen- taltagen
Cas9 + C-Check_Exon7 + pJoker (Exon7)	49	4
Cas9 + C-Check_Exon9 + pJoker (Exon9)	53/49	5
Cas9 + C-Check_Exon10 + pJoker (Exon10)	55/53	6

Die zytoplasmatische Injektion von CCEx7, 9 und 10 dient der Überprüfung, inwiefern es möglich ist, im FANCA-Gen mit der Injektion einer Injektionslösung bestehend aus drei unterschiedlichen Plasmiden INDELS zu bilden und diese mit dem C-Check-Plasmid nachverfolgen zu können.

5.6.1.1 Mikroinjektion mit Cas9, C-Check_Exon7 und sgRNA_Exon7

Die Versuchsgruppe CCEX7 diente der Untersuchung der zytoplasmatischen Mikroinjektion für die Induktion einer genetischen Modifikation in Exon7 im FANCA-Gen. Es wurde untersucht, wie effizient sich bei der Verwendung von pX330 mit pJoker (Exon7) eine genetische Modifikation in der Zielsequenz des Exons7 des FANCA-Gens induzieren lässt. Hierfür wurden in der Kulturkontrolle 239 Oozyten, in der Injektionskontrolle 228 Oozyten und in der Injektionsgruppe 205 Oozyten injiziert, aktiviert und für die Kultivierung und Analyse verwendet.

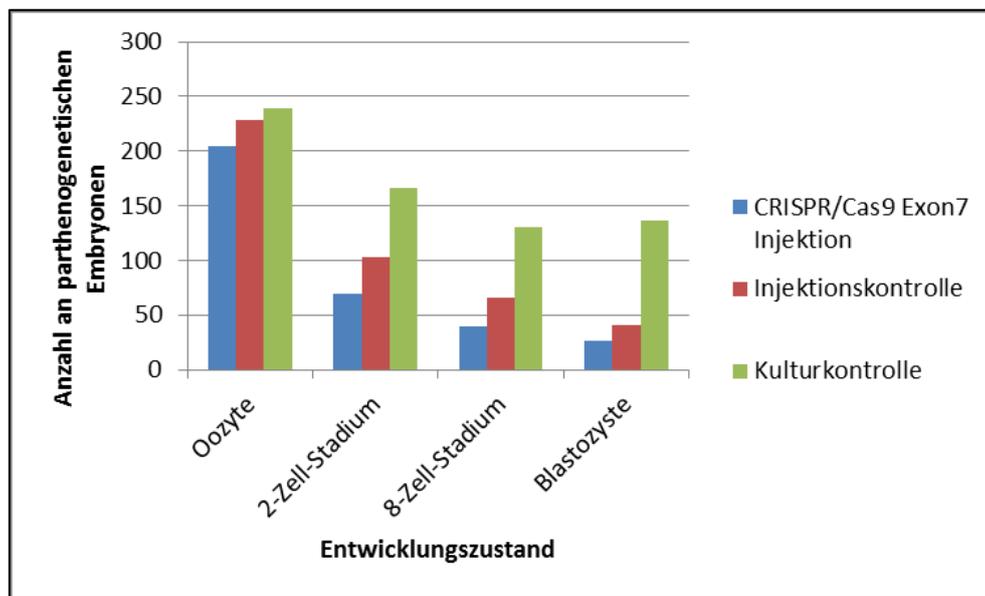


Abb. 46: Entwicklungsunterschiede zwischen der Kulturkontrolle, der Injektionskontrolle und der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit der Cas9-Nuklease, C-Check_Exon7 und der sgRNA_Exon7, n = 4.

In der Kulturkontrolle wurde eine Teilungsrate von 69 % und in der Injektionskontrolle von 45 % beobachtet. Die Versuchsgruppe CCEX7 zeigt eine Teilungsrate von 34 %. Weiterhin haben sich 57 % der Oozyten der Kulturkontrolle zu Blastozysten entwickelt. Bei der Injektionskontrolle haben sich 18 % der Oozyten und bei der Versuchsgruppe CCEX7 13 % der Oozyten zu Blastozysten entwickelt (Abb. 46). Die Mikroinjektion führt zu einer geringeren Entwicklungsrate im Vergleich zur Kulturkontrolle.

Zudem wurde ermittelt, wie viele der sich entwickelten Embryonen eine spezifische asRed- und eGFP-Fluoreszenz des C-Check-Reporters aufweisen.

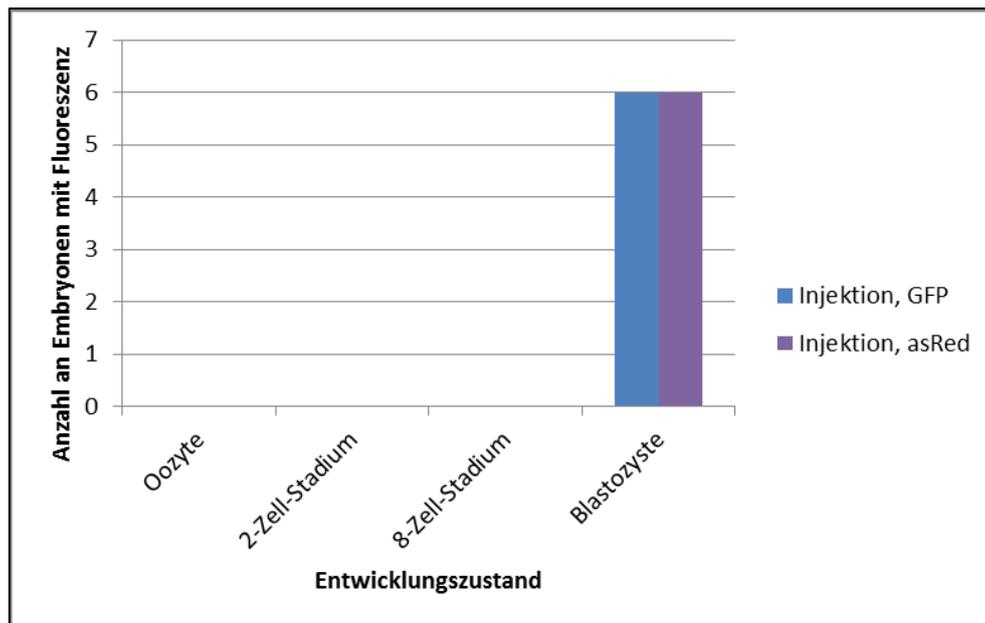


Abb. 47: Fluoreszenznachweis in der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit der Cas9-Nuklease, C-Check_Exon7 und der sgRNA_Exon7, n = 4.

Während in der Kultur- und Injektionskontrolle keine Fluoreszenz nachweisbar war, zeigten 23 % der sich entwickelten Blastozysten aus der Injektion mit CCEX7 sowohl eine eGFP- als auch eine asRed-Fluoreszenz (Abb. 47). Durch die eGFP-Fluoreszenz wird gezeigt, dass es im C-Check-Plasmid zur homologen Rekombination kam. Dementsprechend ist es wahrscheinlich, dass diese Blastozysten auch im Genom spezifisch mutagenisiert wurden.

Anschließend wurden die Blastozysten in Pools lysiert. Es folgte eine PCR. Das daraus entstandene Amplikon wurde in den pGEM-T Easy-Vektor ligiert und in *E.coli* DH5 α transformiert. Es wurden zehn *E.coli*-Kolonien sequenziert. Dabei konnten verschiedene Mutationen im FANCA-Gen identifiziert werden.

Tab. 40: Einzelkolonie-Sequenzen nach der Mikroinjektion mit C-Check_Exon7.

WT	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	C	A	C	C	G	A	C	G	T	C	G	C	C	A	G	A	G	C	T	G	T	G	C			
C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	A	G	A	-	-	T	G	T	-	-		
C2	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	C	A	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	G	C	C	A	G	A	G	C	T	G	T	G	C
C3	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	C	A	C	-	-	A	-	-	T	C	G	C	C	A	G	A	G	C	T	G	T	G	C			
C4	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	C	A	C	-	-	-	-	-	T	C	G	C	C	A	G	A	G	C	T	G	T	G	C			

WT: Referenz-Sequenz, C1 – C4: vier Kolonien mit Mutationen. Die PAM ist in rot dargestellt.

-: deletierte Nukleotide.

Die identifizierten Mutationen sind in Tab. 40 im Vergleich zur Referenz-Sequenz (Tab. 40, WT) aufgetragen. Es wurden vier verschiedene Mutationen identifiziert (Tab. 40, C1-C4). Dabei handelt es sich um Deletionen. Diese haben eine Größe

von 4 bp, 5 bp, 6 bp und 40 bp. Von 21 sequenzierten Einzelkolonien konnte in vieren eine Mutation nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Mutationseffizienz von 19 %.

Somit lässt sich schlussfolgernd sagen, dass es möglich ist, unter Verwendung von pX330 und pJoker (Exon7) eine genetische Veränderung im Exon7 des porzinen FANCA-Gens zu induzieren.

5.6.1.2 Mikroinjektion mit Cas9, C-Check_Exon9 und sgRNA_Exon9

Anschließend folgte die Mikroinjektion von CCEX9. Damit wurde untersucht, wie effizient sich bei der Verwendung von pX330 mit pJoker (Exon9) eine genetische Veränderung in der Zielsequenz des Exons9 des FANCA-Gens induzieren lässt. Für die Analyse wurden 320 Oozyten in der Kulturkontrolle, 318 Oozyten in der Injektionskontrolle und 326 Oozyten in der Versuchsgruppe mit der Injektion von CCEX9 injiziert, aktiviert und kultiviert.

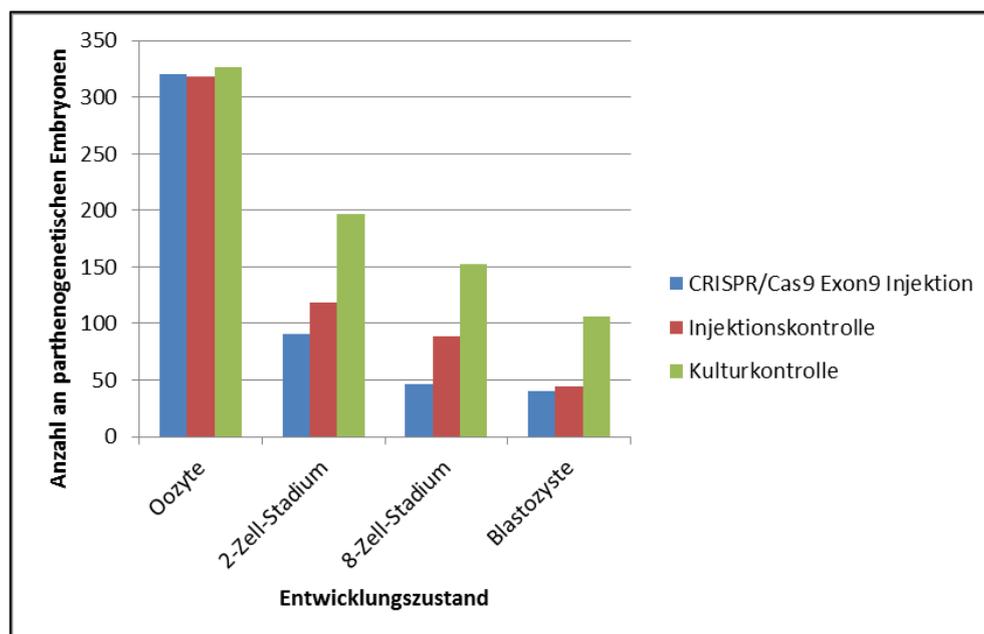


Abb. 48: Entwicklungsunterschiede zwischen der Kulturkontrolle, der Injektionskontrolle und der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit der Cas9-Nuklease, C-Check_Exon9 und der sgRNA_Exon9, n = 6.

Von den Oozyten in der Kulturkontrolle haben sich 60 % geteilt, in der Injektionskontrolle waren es 37 % und in der Versuchsgruppe 28 %. Zu Blastozysten entwickelt haben sich 33 % der Oozyten der Kulturkontrolle, 14 % der Oozyten der Injektionskontrolle und 13 % der Oozyten aus der

Versuchsgruppe (Abb. 48). Die Mikroinjektion führt zu einer geringeren Entwicklungsrate im Vergleich zur Kulturkontrolle.

Zusätzlich wurde neben den Teilungs- und Entwicklungsraten auch bestimmt, welche spezifische Fluoreszenz erkennbar ist.

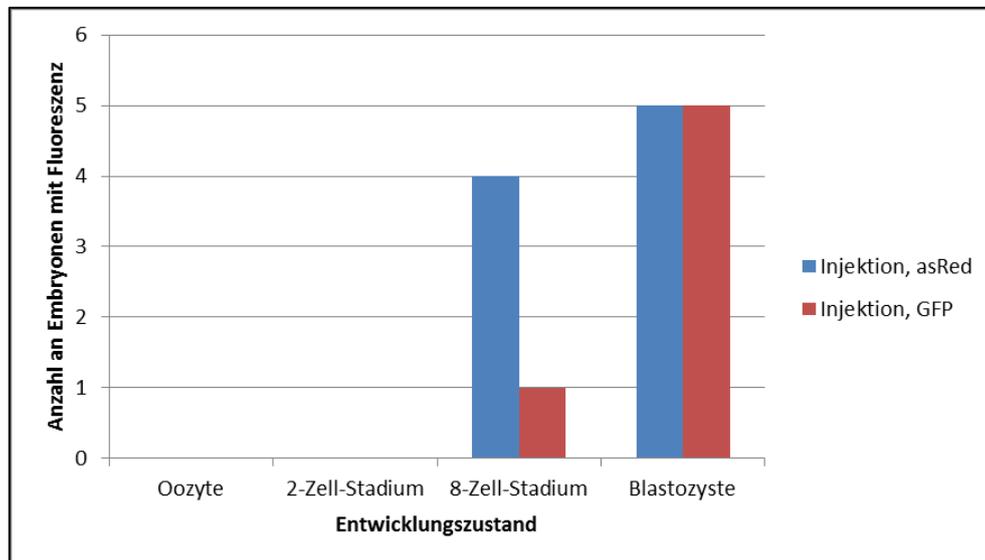


Abb. 49: Fluoreszenznachweis in der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit der Cas9-Nuklease, C-Check_Exon9 und der sgRNA_Exon9, n = 6.

Es zeigen 2 % der sich entwickelten Embryonen im 8-Zell-Stadium nach der Injektion mit CCEX9 eine eGFP-Fluoreszenz und 4 % eine asRed-Fluoreszenz. Bei den Blastozysten zeigen 13 % eine eGFP- und asRed-Fluoreszenz. Es wurden somit insgesamt 4 % der injizierten Oozyten, die sich bis zum 8-Zell-Stadium entwickelt haben, und 13 % der Blastozysten erfolgreich mit CCEX9 transfiziert, was durch die asRed-Fluoreszenz erkennbar ist. Bei 13 % der sich entwickelten Blastozysten kam es zur homologen Rekombination, was durch die eGFP-Fluoreszenz dargestellt wird. In diesen Blastozysten ist vermutlich eine genetische Veränderung entstanden.

Anschließend wurden die sich entwickelten Embryonen im 8-Zell-Stadium und die Blastozysten, die eine GFP-Fluoreszenz aufwiesen, lysiert. Es wurden bakterielle Einzelklone generiert und sequenziert. Dabei konnten verschiedene Mutationen im FANCA Exon9 identifiziert werden.

Tab. 41: Einzelkolonie-Sequenzen nach der Mikroinjektion mit C-Check_Exon9.

WT	C	T	G	T	C	C	C	C	A	C	A	G	A	T	C	G	C	G	G	C	T	G	A	T	G	T	C	C	T	G	C	A	G	A	G
C1	C	T	G	T	C	C	C	C	A	C	A	-	A	T	C	G	C	G	G	C	T	G	A	T	G	T	C	C	T	G	C	A	G	A	G
C2	C	T	G	T	C	C	C	C	A	-	-	-	A	T	C	G	C	G	G	C	T	G	A	T	G	T	C	C	T	G	C	A	G	A	G

WT: Referenz-Sequenz, C1 + C2: zwei Kolonien mit Mutationen. Die PAM ist in rot dargestellt.

-: deletierte Nukleotide.

Die identifizierten Mutationen sind in Tab. 41 im Vergleich zur Referenz-Sequenz (Tab. 41, WT) aufgetragen. Es konnten zwei verschiedene Mutationen identifiziert werden (Tab. 41, C1, C2). Dabei handelt es sich um Deletionen mit einer Größe von 1 bp und 3 bp. Von 13 sequenzierten *E.coli*-Kolonien konnte in zweien eine Mutation nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Mutationseffizienz von 15 %.

Es lässt sich schlussfolgern, dass es unter Verwendung von pX330 und pJoker (Exon9) möglich ist, eine genetische Veränderung im Exon9 des porzinen FANCA-Gens zu induzieren.

5.6.1.3 Mikroinjektion mit Cas9, C-Check_Exon10 und sgRNA_Exon10

Schließlich erfolgte die zytoplasmatische Injektion mit CCEX10. Damit wurde untersucht, wie effizient bei der Verwendung von pX330 mit pJoker (Exon10) sich eine genetische Veränderung in der Zielsequenz des Exons10 des FANCA-Gens induzieren lässt. Insgesamt wurden in der Kulturkontrolle 234 Oozyten, in der Injektionskontrolle 230 Oozyten und in der Versuchsgruppe 233 Oozyten injiziert, aktiviert und kultiviert.

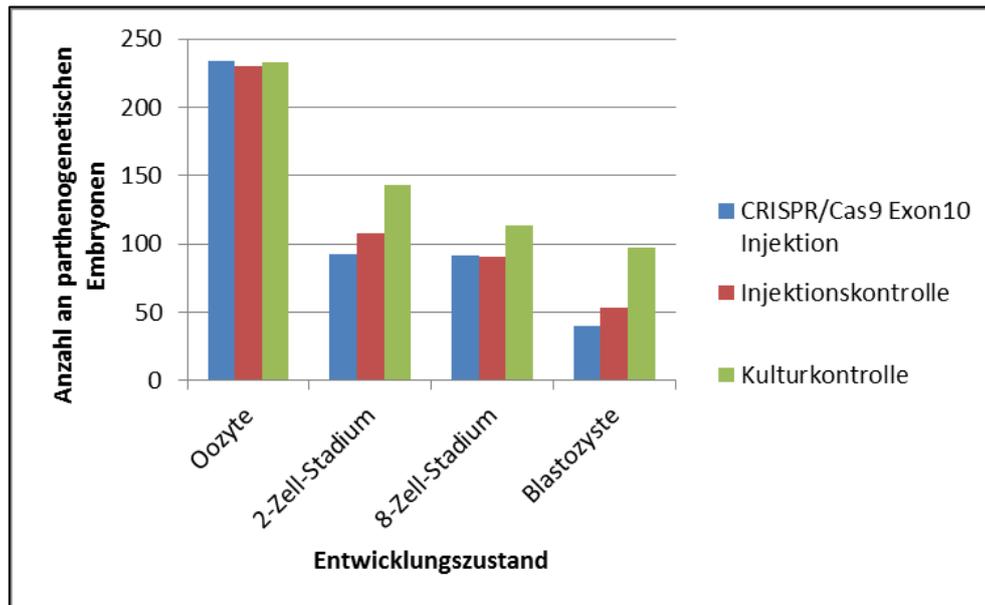


Abb. 50: Entwicklungsunterschiede zwischen der Kulturkontrolle, der Injektionskontrolle und der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit der Cas9-Nuklease, C-Check_Exon10 und der sgRNA_Exon10, n = 5.

In der Kulturkontrolle teilten sich 61 % der Oozyten, in der Injektionskontrolle 47 % der Oozyten und in der Versuchsgruppe 40 % der Oozyten. Zudem haben sich 42 % der Oozyten der Kulturkontrolle, 23 % der Oozyten der Injektionskontrolle und 17 % der Oozyten der Versuchsgruppe zu Blastozysten entwickelt (Abb. 50). Die Mikroinjektion führt zu einer verringerten Entwicklungsrate im Vergleich zur Kulturkontrolle.

Es wurde auch ermittelt, wie hoch die Transfektions- und Mutationsrate in den sich entwickelten Embryonen ist.

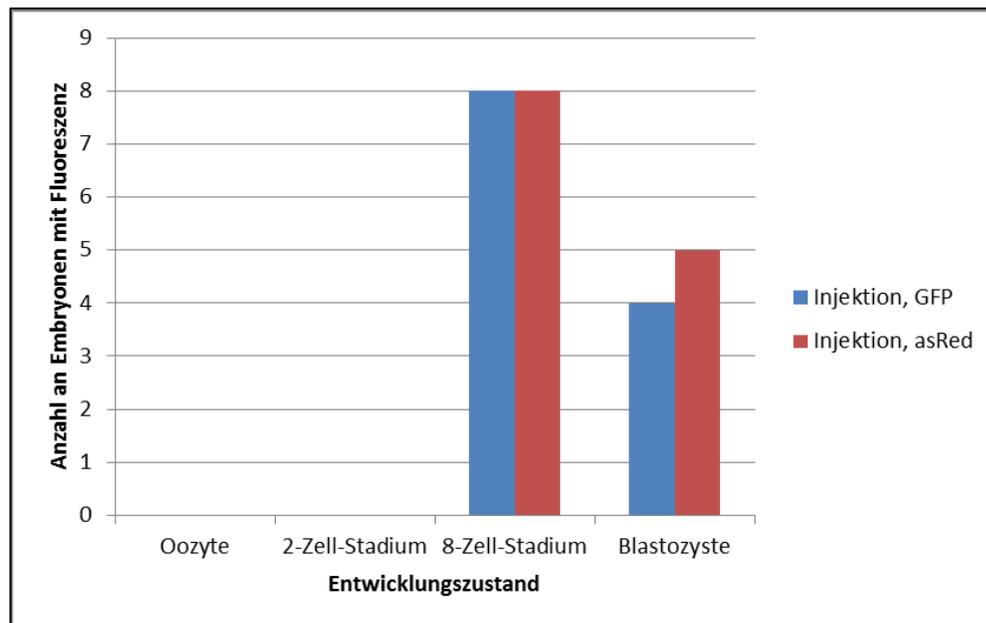


Abb. 51: Fluoreszenznachweis in der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit der Cas9-Nuklease, C-Check_Exon10 und der sgRNA_Exon10, n = 5.

In der Versuchsgruppe haben 9 % der sich entwickelten Embryonen im 8-Zell-Stadium eine eGFP- und asRed-Fluoreszenz gezeigt. Bei den Blastozysten zeigen 10 % eine eGFP-Fluoreszenz und 13 % eine asRed-Fluoreszenz (Abb. 51). Somit wurde in 9 % der sich entwickelten Embryonen im 8-Zell-Stadium die Injektionslösung transfiziert (asRed-Fluoreszenz). Diese zeigen über die eGFP-Fluoreszenz an, dass eine homologe Rekombination in dem Abbild-Vektor der Zielsequenz stattfand. Es wurde vermutlich auch eine genetische Veränderung induziert. Bei den Blastozysten wurden 13 % erfolgreich transfiziert, jedoch ist nur bei 10 % der Blastozysten ein Hinweis auf eine homologe Rekombination im Reporterplasmid erkennbar (eGFP-Fluoreszenz).

Die fluoreszierenden Embryonen im 8-Zell-Stadium und Blastozysten wurden in Pools lysiert. Nach einer PCR wurden die Amplikons in den pGEM-T Easy-Vektor ligiert und in *E.coli* DH5 α transformiert. Es wurden Einzelkolonien sequenziert. Dabei konnten verschiedene Mutationen im FANCA Exon10 identifiziert werden.

Tab. 42: Einzelkolonie-Sequenzen nach der Mikroinjektion mit C-Check_Exon10.

WT	G	C	A	G	G	A	G	G	C	G	T	C	A	G	C	G	G	C	G	T	A	C	A	A	G	G	C	G	G	T	G	A	G	G	T				
C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	G	T	
C2	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	G	T
C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	T	

WT: Referenz-Sequenz, C1 – C3: drei Kolonien mit Mutationen. Die PAM ist in rot dargestellt.

-: deletierte Nukleotide.

Die identifizierten Mutationen sind in Tab. 42 im Vergleich zur Referenz-Sequenz (Tab. 42, WT) dargestellt. Es konnten drei Mutationen identifiziert werden (Tab. 42, C1-C3). Die Deletionen haben eine Größe von 43 bp. Von 9 sequenzierten *E.coli*-Kolonien konnte in dreien eine Mutation nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Mutationseffizienz von 33 %.

Somit ist es möglich, unter Verwendung von pX330 und pJoker (Exon10) eine genetische Modifikation im Exon10 des porzinen FANCA-Gens einzuführen.

5.6.2 Mikroinjektion in parthenogenetische Embryonen mit den pX458-Konstrukten

Nach der Mikroinjektion mit C-Check wurde mit pX458 injiziert. Dabei handelt es sich um ein Plasmid, welches sowohl die Cas9 als auch einen eGFP-Reporter kodiert. Der eGFP-Reporter stellt dar, wie effizient sich die parthenogenetischen Embryonen transfizieren ließen. Im Gegensatz zu C-Check enthält pX458 keine zusätzlichen Reporter, mit dem eine homologe Rekombination, und somit ein Hinweis auf spezifische Mutationen, dargestellt wird. In das Plasmid pX458 wurde zudem die sgRNA für die jeweiligen Exone, die im FANCA-Gen modifiziert werden sollen, ligiert. Die so entstandenen Plasmide kodieren so auch die entsprechende sgRNA. Die Plasmide werden im folgenden pX458Faex7, pX458Faex9 und pX458Faex10 genannt.

Neben den Versuchsgruppen mit der zytoplasmatischen Injektion von pX458Faex7, pX458Faex9 und pX458Faex10 gab es eine Kulturkontrolle und eine Injektionskontrolle. Bei der Injektionskontrolle wurde Injektionspuffer injiziert, die Kulturkontrolle wurde ohne Injektion aktiviert und kultiviert. Es wurden Aufnahmen von den Zellstadien Oozyte, 8-Zell-Stadium und Blastozyste gemacht. Für die Bestimmung der Transfektionsrate wurde die eGFP-Fluoreszenz untersucht. Zudem wurde für den Vergleich mit den C-Check-Injektionslösungen die asRed-Fluoreszenz aufgenommen. Diese sollte bei der Injektion mit pX458 negativ sein. Die Kulturkontrolle und die Injektionskontrolle zeigten, wie erwartet, keine Fluoreszenz.

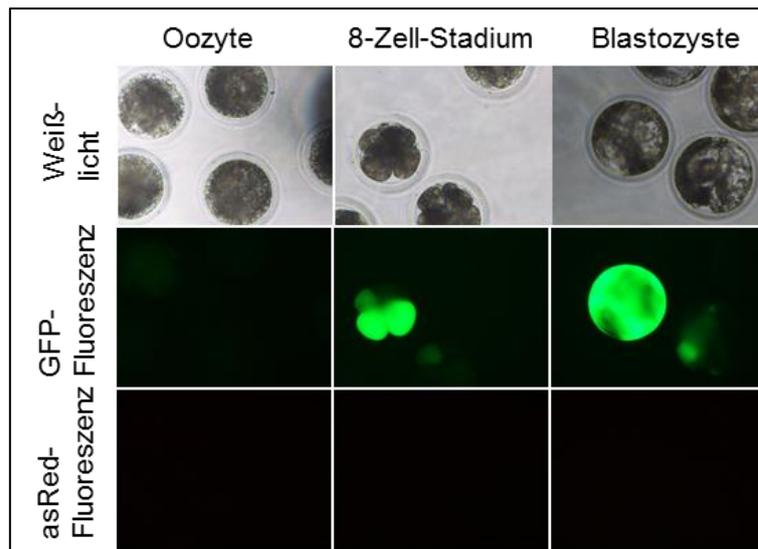


Abb. 52: Injektion von pX458 in parthenogenetische porcine Embryonen. Dargestellt sind Oozyten, 8-Zell-Stadium und Blastozysten als Weißlicht- und als Fluoreszenzaufnahme. Der GFP-Reporter ist auf dem sgRNA- und Cas9-Plasmid lokalisiert.

Nach der Injektion mit pX458Faex7 zeigten die Embryonen im 8-Zell-Stadium sowie die Blastozysten eine eGFP-Fluoreszenz. Die Fluoreszenz zeigt an, dass die Embryonen erfolgreich transfiziert wurden.

Zudem wurde die Anzahl der parthenogenetischen Embryonen im entsprechenden Entwicklungszustand gezählt und die Anzahl der Embryonen, welche die spezifische Fluoreszenz enthielt, dokumentiert. Für die Versuche mit den pX458-Plasmiden wurden folgende Injektionslösungen verwendet (Tab. 43).

Tab. 43: Verwendete Plasmidlösungen für die Mikroinjektion von pX458.

Injektionslösung	Gesamtkonzentration (ng/µl)	Anzahl Experimentaltagen	an
pX458Faex7	53/52	6	
pX458Faex9	52	8	
pX458Faex10	52	4	

Die zytoplasmatische Injektion von pX458Faex7, 9 und 10 dient der Überprüfung, inwiefern es möglich ist, in dem FANCA-Gen mit der Injektion eines Plasmids, welches alle notwendigen Komponenten für eine genetische Modifizierung mit dem CRISPR/Cas9-System enthält, spezifische Mutationen einzuführen.

5.6.2.1 Mikroinjektion mit pX458Faex7

Die Versuchsreihe der Mikroinjektion mit pX458-Plasmide startete mit der zytoplasmatischen Injektion von pX458Faex7. Es wurde untersucht, wie effizient sich bei der Verwendung von pX458 eine genetische Modifikation in der Zielsequenz des Exons7 des FANCA-Gens induzieren lässt und ob die Verwendung von einem Plasmid, das die Cas9, die sgRNA und einen Reporter kodiert, effizienter ist, als die Verwendung von einem Cas9-Plasmid, einem sgRNA-Plasmid und einem Reporterplasmid. Für die Analyse wurden 324 Oozyten in der Kulturkontrolle, 321 Oozyten in der Injektionskontrolle und 325 Oozyten in der Versuchsgruppe injiziert, aktiviert und kultiviert.

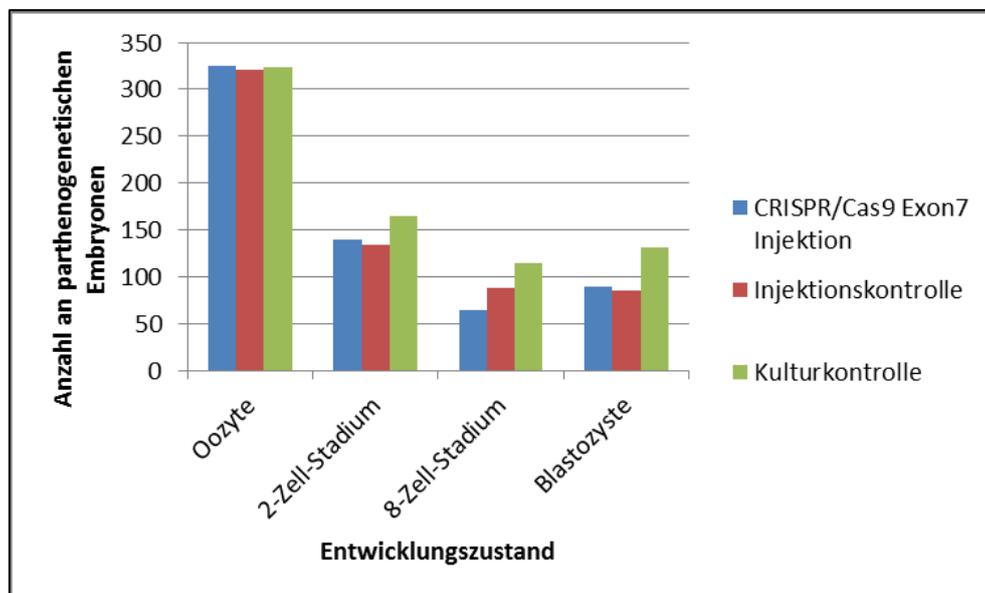


Abb. 53: Entwicklungsunterschiede zwischen der Kulturkontrolle, der Injektionskontrolle und der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit pX458Faex7, n = 6.

In der Kulturkontrolle wurde eine Teilungsrate von 51 %, in der Injektionskontrolle von 42 % und in der Versuchsgruppe von 43 % festgestellt. Zu Blastozysten entwickelten sich 41 % der Oozyten in der Kulturkontrolle, 27 % in der Injektionskontrolle und 28 % in der Versuchsgruppe (Abb. 53). Durch die Mikroinjektion wird die Entwicklungsrate verringert.

Die sich entwickelten Embryonen wurden auf eine spezifische Fluoreszenz hin untersucht.

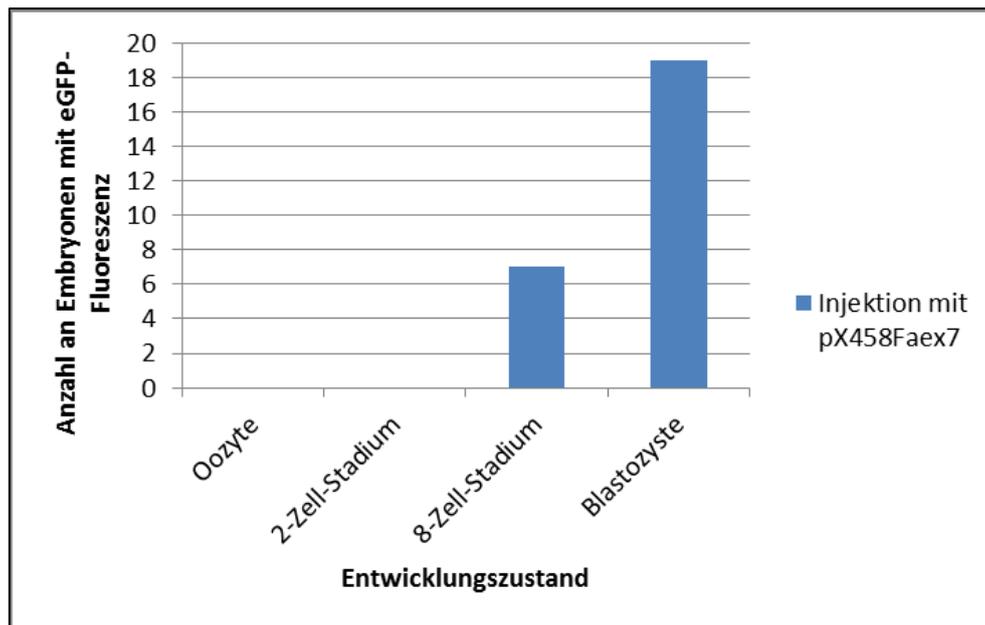


Abb. 54: eGFP-Expression in der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit pX458Faex7, n = 6.

Es zeigten 11 % der sich entwickelten Embryonen im 8-Zell-Stadium und 21 % der Blastozysten eine eGFP-Fluoreszenz (Abb. 54). Da die eGFP-Fluoreszenz anzeigt, wie viele Embryonen erfolgreich transfiziert wurden, lässt sich schlussfolgern, dass 21 % der sich entwickelten Oozyten erfolgreich mit dem pX458-Plasmid transfiziert wurden und den darauf kodierte Reporter exprimieren, dieses ist hier ein Indikator für die Cas9- und die sgRNA-Expression.

Die fluoreszierenden Embryonen im 8-Zell-Stadium und Blastozysten wurden anschließend lysiert. Es folgte eine PCR, dessen Amplikon in den pGEM-T Easy-Vektor ligiert und in *E.coli* DH5 α transformiert wurde. Die entstandenen Einzelkolonien wurden sequenziert. Dabei konnten verschiedene Mutationen im FANCA Exon7 identifiziert werden (Tab. 44).

Tab. 44: Einzelkolonie-Sequenzen nach der Mikroinjektion mit pX458Faex7.

WT	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	C	A	C	G	A	C	G	T	C	G	C	C	A	G	A	G	C	T	G	T	G	C	
C1	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	C	A	C	G	G	A	C	G	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	C	A	C	G	G	A	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	C	A	C	G	G	A	C	G	-	-	-	-	A	G	A	G	C	T	G	T	G	C	

WT: Referenz-Sequenz, C1 – C3: drei Kolonien mit Mutationen. Die PAM ist in rot dargestellt.

-: deletierte Nukleotide.

Die genetisch modifizierten Sequenzen wurden im Vergleich zur Referenz-Sequenz (Tab. 44, WT) aufgetragen. Dabei sind drei unterschiedliche Mutationen identifiziert worden (Tab. 44, C1-C3). Es handelt sich um Deletionen mit einer

Größe von 5 bp und 31 bp. Die Mutation C2 tritt in den sequenzierten Einzelkolonien zweimal auf. Von 50 sequenzierten *E.coli*-Kolonien konnte in dreien eine Mutation nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Mutationseffizienz von 8 %.

Dies zeigt, dass es möglich ist unter Verwendung von pX458Faex7 spezifische Mutationen im Exon7 des porzinen FANCA-Gens zu induzieren. Im Vergleich zur Injektion von CCEX7 ist erkennbar, dass die Teilungs- und Entwicklungsrate bei der Injektion mit pX458Faex7 tendenziell besser verläuft als bei CCEX7. Bei der Transfektionseffizienz ist kein Unterschied erkennbar, jedoch in der Effizienz der INDEL-Bildung (Tab. 45).

Tab. 45: Vergleich der Mutationseffizienz unterschiedlicher CRISPR/Cas9-Plasmide in Exon7.

Injektionslösung	Effizienz der INDEL-Bildung
pX330 + pJoker + CCEX7	19 %
pX458Faex7	8 %

Die Effizienz der INDEL-Bildung war bei der Verwendung von drei Plasmiden doppelt so hoch, wie bei der Verwendung einem Plasmid. Ein möglicher Grund kann in der Qualität der Eizellen liegen, sodass sich weniger Blastozysten entwickelt haben, die analysiert werden konnten. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die extrahierte DNA-Menge nicht für eine PCR-Amplifikation ausreichend war, sodass bei der Injektion mit pX458Faex7 weniger Mutationen erkannt werden konnten.

5.6.2.2 Mikroinjektion mit pX458Faex9

Nach der Injektion mit pX458Faex7 folgte die Injektion mit pX458Faex9. Dabei wurde untersucht, wie effizient sich eine genetische Veränderung über die zytoplasmatische Injektion mit pX458Faex9 in der Zielsequenz des Exons9 des FANCA-Gens induzieren lässt. Zudem wird verglichen, ob die Verwendung von einem Plasmid, das die Cas9, die sgRNA und einen Reporter kodiert, effizienter ist, als die Verwendung von einem Cas9-Plasmid, einem sgRNA-Plasmid und einem Reporterplasmid zur Einführung spezifischer Mutationen in Exon9 des FANCA-Gens.

Zur Analyse wurden in der Kulturkontrolle 414 Oozyten, in der Injektionskontrolle 387 Oozyten und in der Injektionsgruppe 422 Oozyten injiziert, aktiviert und kultiviert.

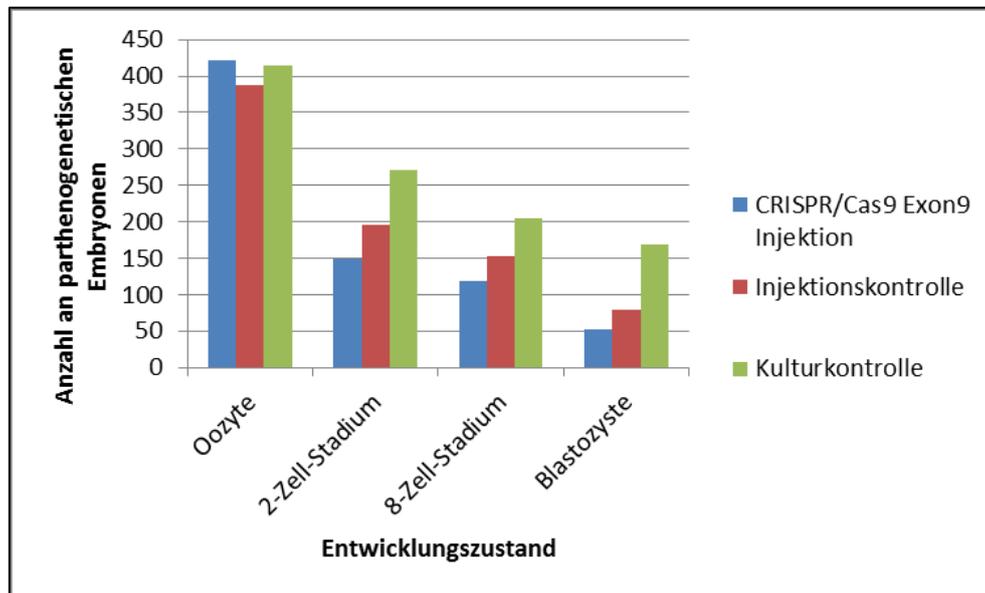


Abb. 55: Entwicklungsunterschiede zwischen der Kulturkontrolle, der Injektionskontrolle und der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit pX458Faex9, n = 8.

Es teilten sich 65 % der Oozyten in der Kulturkontrolle, 51 % der Oozyten in der Injektionskontrolle und 35 % der Oozyten in der Versuchsgruppe. Zu Blastozysten entwickelten sich 41 % der Oozyten der Kulturkontrolle, 20 % der Oozyten der Injektionskontrolle und 13 % der Oozyten der Versuchsgruppe (Abb. 55). Daraufhin wurde untersucht, wie viele der sich entwickelten Embryonen im 8-Zell-Stadium und Blastozysten eine spezifische eGFP-Fluoreszenz aufwiesen.

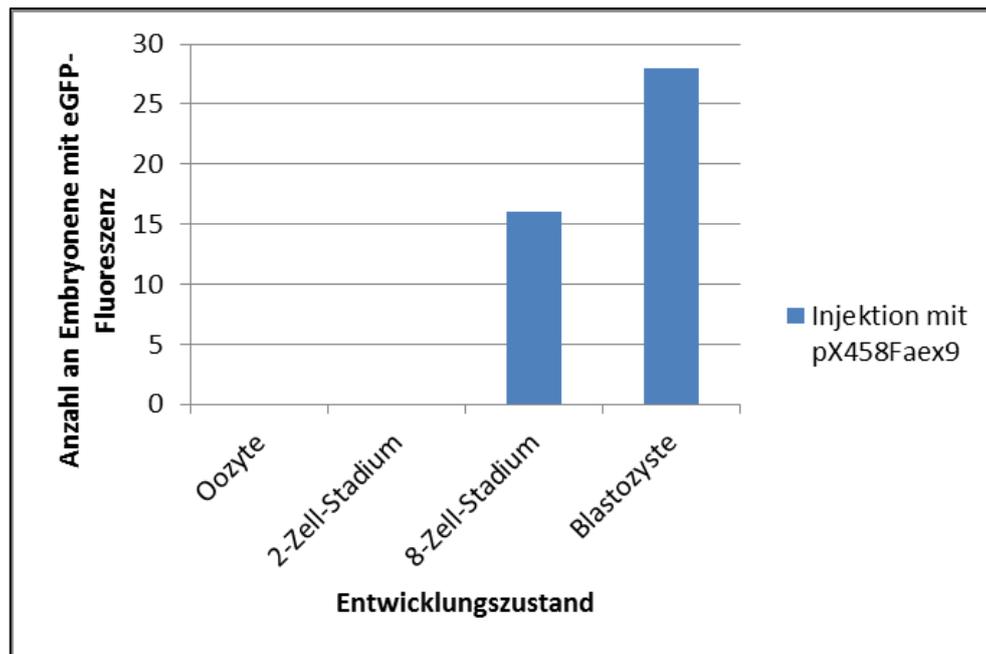


Abb. 56: eGFP-Expression in der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit pX458Faex9, n = 8.

Es zeigten 13 % der sich entwickelten Embryonen im 8-Zell-Stadium und 53 % der Blastozysten eine eGFP-Fluoreszenz (Abb. 56). Somit wird in 53 % der sich aus den mit pX458Faex9 injizierten Blastozysten der Reporter und wahrscheinlich auch die Cas9 und die sgRNA exprimiert.

Die fluoreszierenden Embryonen im 8-Zell-Stadium und Blastozysten wurden lysiert. Es folgte eine PCR, dessen Amplikon in den pGEM-T Easy-Vektor ligiert und in *E.coli* DH5 α transformiert wurde. Die entstandenen Einzelkolonien wurden sequenziert. Dabei konnten verschiedene Mutationen im FANCA Exon9 identifiziert werden (Tab. 46).

Tab. 46: Identifizierte Mutationen nach der Mikroinjektion mit pX458Faex9.

WT	C	T	G	T	C	C	C	C	A	C	A	G	A	T	C	G	C	G	G	C	T	G	A	T	G	T	C	C	T	G	C	A	G	A	G
C1	C	T	G	T	C	C	C	C	A	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C2	C	T	G	T	C	C	C	C	A	C	A	G	A	T	C	G	-	G	G	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

WT: Referenz-Sequenz, C1 + C2: zwei Kolonien mit Mutationen. Die PAM ist in rot dargestellt.

-: deletierte Nukleotide.

Die genetisch modifizierte Sequenzen wurden im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz (Tab. 46, WT) aufgetragen. Dabei sind zwei unterschiedliche Mutationen identifiziert worden (Tab. 46, C1, C2). Es handelt sich um Deletionen mit einer Größe von 21 bp und 45 bp. Von 2 sequenzierten *E.coli*-Kolonien konnte in zwei eine Mutation nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Mutationseffizienz von 100 %.

Zusammengefasst lassen sich unter Verwendung von pX458Faex9 spezifische Mutationen im Exon9 des porzinen FANCA-Gens induzieren. Im Vergleich zur Injektion von C-Check_Exon9 weichen Teilungs- und Entwicklungsrate nicht voneinander ab. Jedoch ist die Transfektionseffizienz viermal höher als bei der Injektion mit CCEX9. Auch die Effizienz zur INDEL-Bildung ist knapp siebenmal größer (Tab. 47).

Tab. 47: Vergleich der Mutationseffizienz unterschiedlicher CRISPR/Cas9-Plasmide in Exon9.

Injektionslösung	Effizienz der INDEL-Bildung
pX330 + pJoker + CCEX9	15 %
pX458Faex9	100 %

Ein möglicher Grund kann in der Qualität der Eizellen liegen, sodass sich weniger Blastozysten entwickelt haben, die analysiert werden konnten. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die extrahierte DNA-Menge nicht für eine PCR-Amplifikation ausreichend war, sodass bei der Injektion mit CCEX9 weniger Mutationen erkannt werden konnten.

5.6.2.3 Mikroinjektion mit pX458Faex10

Schließlich erfolgte die Mikroinjektion mit pX458Faex10. Es wurde untersucht, wie effizient eine genetische Modifikation unter Verwendung von pX458Faex10 in der Zielsequenz des Exons10 des FANCA-Gens einzuführen ist und ob die Verwendung von einem Plasmid effizienter ist als die Verwendung von drei Plasmiden. Es wurden in der Kulturkontrolle 198 Oozyten, in der Injektionskontrolle 196 Oozyten und in der Versuchsgruppe 197 Oozyten injiziert, aktiviert und kultiviert.

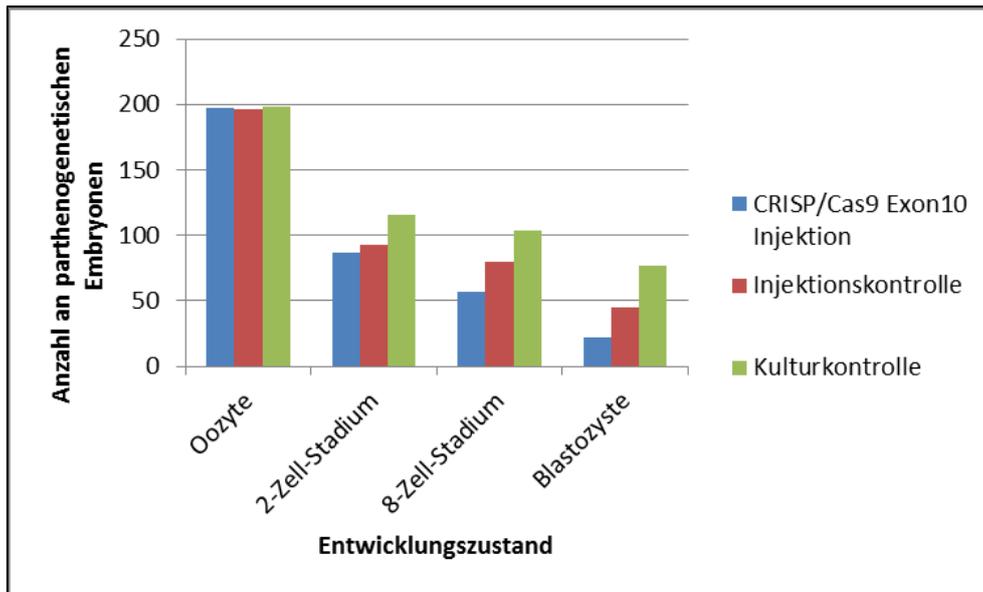


Abb. 57 Entwicklungsunterschiede zwischen der Kulturkontrolle, der Injektionskontrolle und der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit pX458Faex10, n = 4.

Es wurde eine Teilungsrate von 59 % in der Kulturkontrolle, von 47 % in der Injektionskontrolle und von 44 % in der Versuchsgruppe beobachtet. Weiterhin haben sich 39 % der Oozyten der Kulturkontrolle zu Blastozysten entwickelt, während dieses bei der Injektionskontrolle 23 % der Oozyten waren und 11 % bei der Versuchsgruppe (Abb. 57). Die Entwicklungsrate wurde durch die Mikroinjektion verringert. Die Entwicklungsstadien wurden auf eine spezifische eGFP-Fluoreszenz hin untersucht.

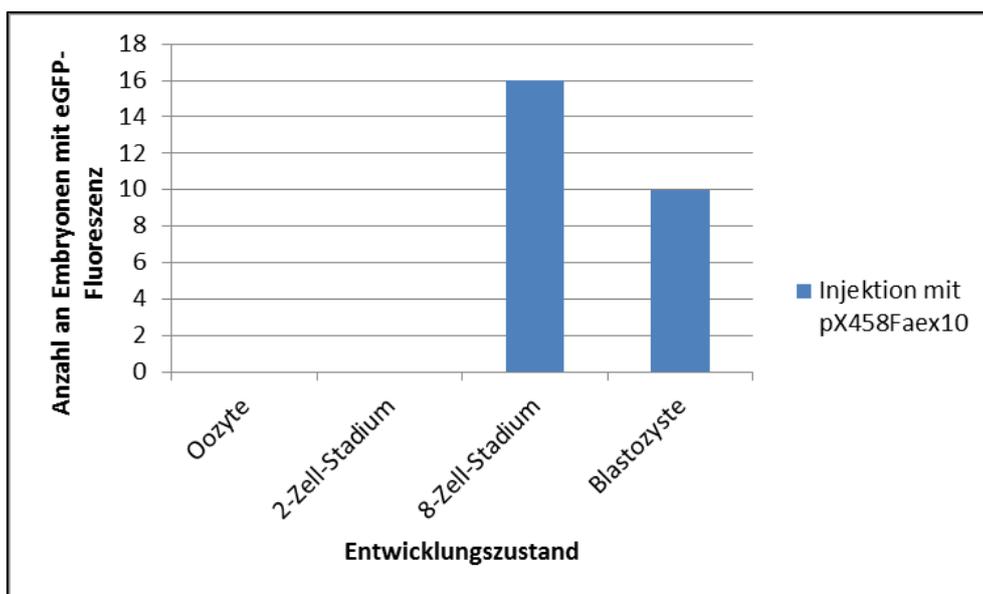


Abb. 58: eGFP-Expression in der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit pX458Faex10, n = 4.

Von den Embryonen, die mit pX458Faex10 injiziert wurden, zeigten 28 % der im 8-Zell-Stadium befindlichen Embryonen und 45 % der Blastozysten eine eGFP-Fluoreszenz (Abb. 58).

Diese fluoreszierenden Embryonen wurden lysiert. Es folgte eine PCR, dessen Amplikons in den pGEM-T Easy-Vektor ligiert und in *E.coli* DH5 α transformiert wurden. Die Einzelkolonien wurden sequenziert. Dabei konnten verschiedene Mutationen im FANCA Exon10 identifiziert werden (Tab. 48).

Tab. 48: Identifizierte Mutationen nach der Mikroinjektion mit pX458Faex10.

WT	G	C	G	G	C	G	T	A	C	A	A	G	G	C	G	T	G	A	G	G	T	G	C	T	G	G	T	G	A	G	T	C	C	
C1	G	C	G	G	C	G	T	A	C	A	<u>A</u>	A	G	G	C	G	T	G	A	G	G	T	G	C	T	G	G	T	G	A	G	T	C	C
C2	G	C	-	-	-	G	<u>C</u>	-	-	-	-	-	-	-	G	T	G	A	G	G	T	G	C	T	G	G	T	G	A	G	T	C	C	
C3	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	G	G	T	G	C	T	G	G	T	G	A	G	T	C	C
C4	G	C	G	G	C	G	-	<u>G</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	G	G	T	G	C	T	G	G	T	G	A	G	T	C	C

WT: Referenz-Sequenz, C1 – C4: vier Kolonien mit Mutationen. Punktmutationen und Insertionen sind unterstrichen. Die PAM ist in rot dargestellt. -: deletierte Nukleotide.

Die genetisch modifizierten Sequenzen wurden im Vergleich zur Referenz-Sequenz (Tab. 48, WT) aufgetragen. Die PAM-Sequenz ist in rot dargestellt. Dabei sind vier unterschiedliche Mutationen identifiziert worden (Tab. 48, C1-C4). Es handelt sich um Deletionen mit einer Größe von 13 bp und 43 bp sowie um Insertionen von 1 bp und Punktmutationen in C2 und C4. Von 10 sequenzierten *E.coli*-Kolonien konnte in vieren eine Mutation nachgewiesen werden. Das entspricht einer Mutationseffizienz von 40 %.

Die Sequenzen zeigen, dass es unter Verwendung von pX458Faex10 möglich ist, spezifische Mutationen im Exon10 des porzinen FANCA-Gens zu induzieren. Im Vergleich zur Injektion von CCEX10 weichen Teilungs- und Entwicklungsrate nicht voneinander ab. Jedoch ist die Transfektionseffizienz knapp viermal höher als bei der Injektion mit CCEX10. Die Effizienz zur Bildung von INDELS ist bei beiden Plasmidsystemen nahezu gleich (Tab. 49).

Tab. 49: Vergleich der Mutationseffizienz unterschiedlicher CRISPR/Cas9-Plasmide in Exon10.

Injektionslösung	Effizienz der INDEL-Bildung
pX330 + pJoker + CCEX10	33 %
pX458Faex10	40 %

5.7 Off-Target Analyse

Durch die Off-Target Analyse der STE- und primären Zellen wird überprüft, ob neben der anvisierten Zielsequenz auch INDELS in anderen genomischen Stellen unspezifisch eingeführt werden. Dies kann z.B. durch identische Sequenzabschnitte mit der Zielsequenz erfolgen.

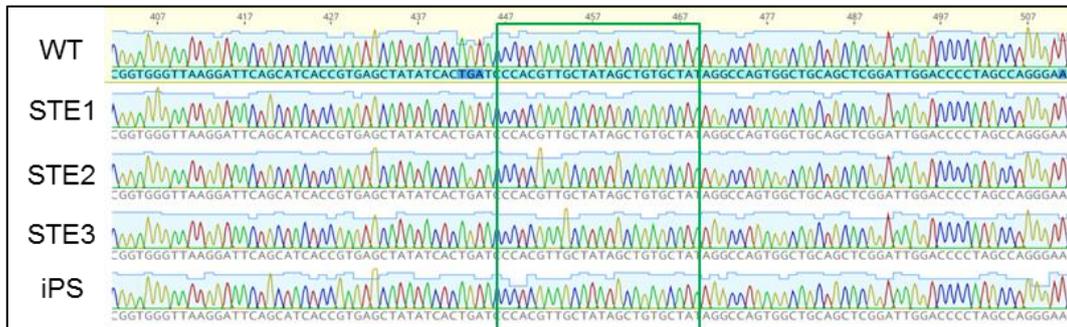


Abb. 59: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 2 der sgRNA für Exon7. In grün-gekästelt ist die Off-Target Sequenz dargestellt. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS: iPS-Zellen mit pX459 transfiziert^[114].

Mit dem Programm Crispor^[112] wurde nach möglichen Off-Target-Sequenzen im Schweinegenom gesucht. Für die sgRNA_Exon7 wurden insgesamt 836 Off-Target-Sequenzen gefunden. Davon wurden die zehn Sequenzen ausgewählt, die die höchste Wahrscheinlichkeit aufwiesen, von der sgRNA erkannt zu werden. Diese Sequenzen hatten 2 - 4 Fehlpaarungen relativ zu der Zielsequenz im FANCA Exon7. Zur Analyse wurden für die zehn Off-Targets Primerpaare ausgetestet, wovon bei acht ein Amplikon erzeugt werden konnte. Diese acht Off-Targets wurden in den STE- und iPS-Zellpools amplifiziert und sequenziert. In Abb. 59 ist die Sequenzierung einer Off-Target-Sequenz der sgRNA_Exon7 dargestellt.

Für die sgRNA_Exon9 wurden 38 Off-Target-Sequenzen, bei der sgRNA_Exon10 42 Off-Target-Sequenzen gefunden. Die zehn Sequenzen, die die höchste Wahrscheinlichkeit aufwiesen, dass die sgRNA diese erkennt, wurden für die Analyse ausgewählt. Die Sequenzen wiesen alle 4 Fehlpaarungen auf. Es wurden für die Sequenzen entsprechende Primerpaare bestellt und getestet. Bei den Off-Targets der sgRNA_Exon9 konnten alle amplifiziert werden, während bei den Off-Targets der sgRNA_Exon10 nur acht amplifiziert werden konnten. Es konnten sechs Off-Target-Ereignisse gefunden werden (Tab. 50).

Tab. 50: Analyierte Off-Target-Sequenzen der sgRNA_Exon7, 9 und 10.

sgRNA	Untersuchte Off-Targets	Off-Target-Position*	Sequenzierte Off-Target-Sequenzen	Fehlpaarungen	Off-Target-Ereignisse	Nicht auswertbar
Exon7	10	Chr. 1 (2x), 2, 3, 4, 13, 14 (2x), 15	8	2 - 4	1	2
Exon9	10	Chr. 2, 3 (2x), 6, 13 (3x), 15, X	10	4	1	3
Exon10	10	Chr. 4, 6, 10, 12 (2x), 14 (2x), 15, 17	8	4	4	-

*Position der Off-Target-Sequenz auf Chromosom X, Chr.: Chromosom.

Vier Off-Target-Sequenzen konnten nicht analysiert werden. Dabei handelt es sich um die Sequenzen 1 und 4 der sgRNA_Exon7, sowie um die Sequenzen 4 und 10 der sgRNA_Exon9. Die Sequenzierung war womöglich aufgrund zu geringer DNA-Mengen nicht erfolgreich. Zudem kann ein technischer Fehler vorliegen. Insgesamt lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit verwendeten sgRNAs nur zu sehr wenigen Off-Target-Ereignissen führen.

Die Genloci und Sequenzen der Off-Targets sind im Anhang aufgelistet.

5.8 Austestung von anti-FANCA-Antikörpern für den Nachweis eines FANCA-Protein-Knockouts

Die Erzeugung spezifischer Mutationen in porzinen FANCA-Gen kann zu einer verringerten oder nicht mehr vorhandenen Expression des FANCA-Proteins führen. Die Expression eines Proteins kann unter Verwendung spezifischer Antikörper detektiert werden.

Für das FANCA-Protein sind nur human-spezifische Antikörper erhältlich. Es wurden ein polyklonaler und ein monoklonaler anti-human FANCA-Antikörper auf eine Kreuzreaktivität mit dem porzinen FANCA-Protein getestet.

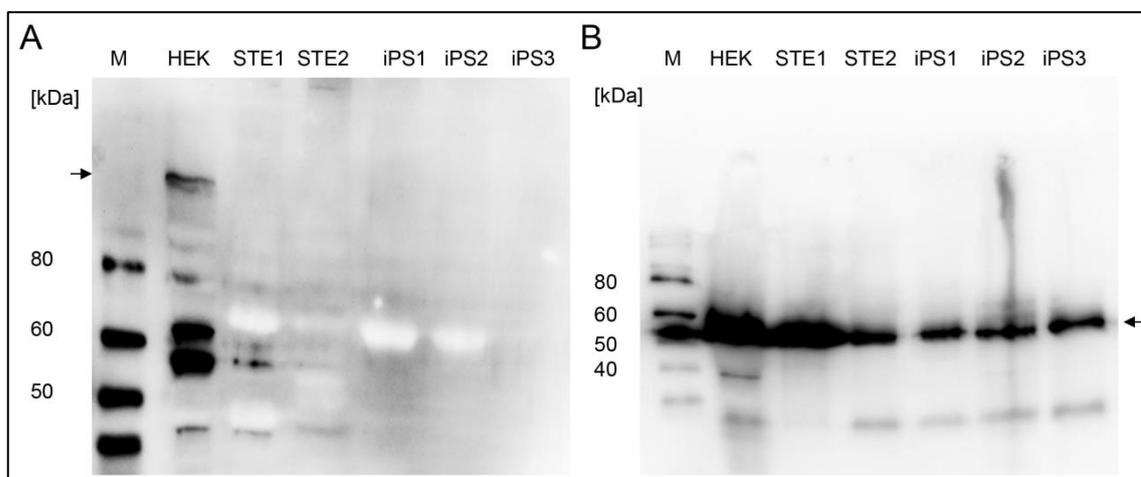


Abb. 60: Western Blot humaner und porziner Zellen mit dem polyklonalen FANCA-Antikörper (A) und mit einem Tubulin-Antikörper (B). HEK: menschliche embryonale Nierenzellen, STE1: mit CC transfizierte STE-Zellen, STE2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, iPS1 – 3: mit pX459 transfizierte iPS-Zellen.

Unter Verwendung des polyklonalen FANCA-Antikörpers konnte in den humanen HEK-Zellen das FANCA-Protein nachgewiesen werden, bei den porzinen STE- und iPS-Zellen hingegen nicht (Abb. 60 A). Zur Kontrolle wurde mit einem anti-Tubulin-Antikörper gearbeitet, der mit dem humanen und porzinen Tubulin reagiert (Abb. 60 B).

Bei der Verwendung des monoklonalen FANCA-Antikörpers wurden die Zellextrakte in zwei Fraktionen aufgeteilt, der zytoplasmatischen und der nuklearen Fraktion. Das FANCA-Protein wird im Zellkern exprimiert und sollte somit in der nuklearen Fraktion vorliegen. Es wurden zu Beginn murine Testis-Teratokarzinom-Zellen (F9) und humane embryonale Nierenzellen (HEK) auf eine FANCA-Expression hin überprüft. Der verwendete Antikörper sollte laut

Herstellerinformationen zu 92 % spezifisch an das murine FANCA-Protein binden und zu 100 % an das humane und das porcine FANCA-Protein.

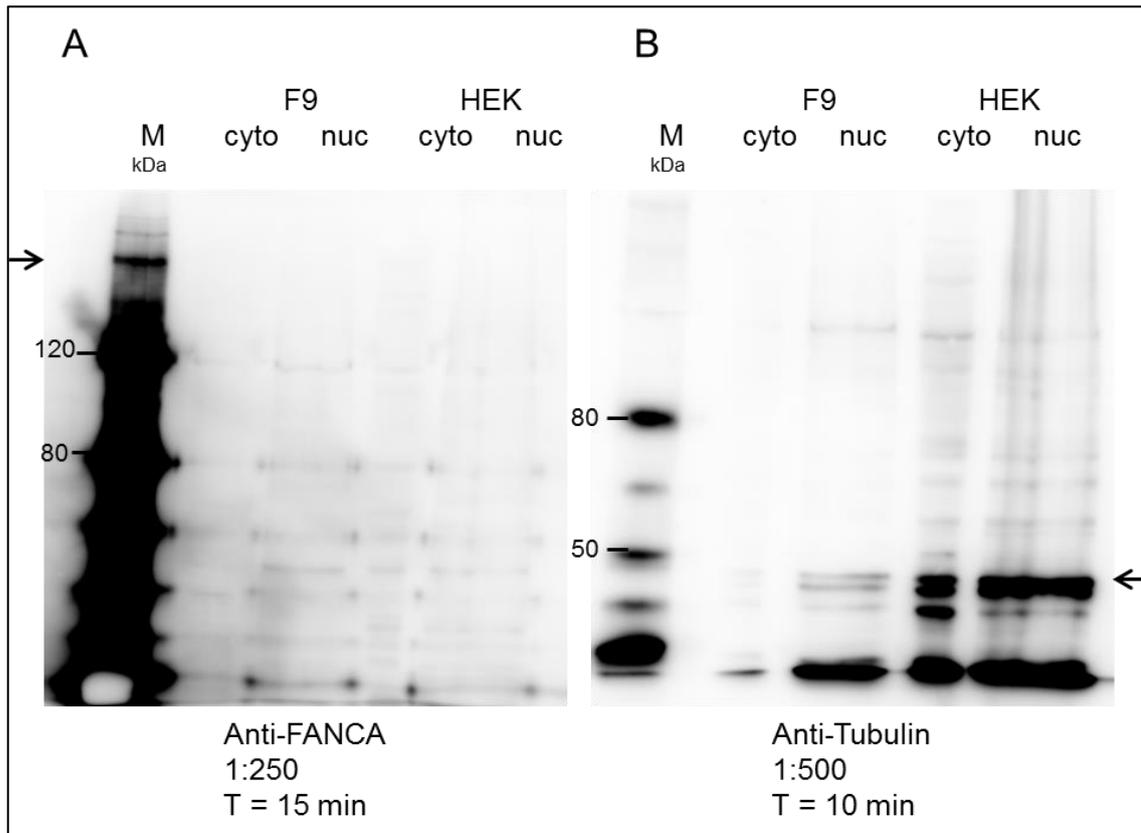


Abb. 61: Western Blot muriner und humaner Zellen mit dem monoklonalen FANCA-Antikörper (A) und mit einem Tubulin-Antikörper (B). F9: murine Testis-Teratokarzinom-Zellen, HEK: menschliche embryonale Nierenzellen, Cyto: zytoplasmatische Fraktion, nuc: nukleare Fraktion, T = Zeit.

Es wurde ein Western Blot des FANCA-Proteins (Abb. 61 A) und als Vergleich von Tubulin (Abb. 61 B) angefertigt. Das FANCA-Protein hat ein Gewicht von 161 kDa, Tubulin von 55 kDa. Im Vergleich dazu ist die Tubulin-Expression in den Zellen dargestellt. Es kann eine Tubulin-Expression in den HEK-Zellen erkannt werden. Da es sich bei den HEK-Zellen um humane Zellen handelt und die anti-FANCA-Antikörper eine Spezifität von 100 % angeben, sollte das Protein in der nuklearen Fraktion detektierbar sein. Dies ist nicht zu erkennen. Das FANCA-Protein konnte nicht detektiert werden.

Es lässt sich schlussfolgern, dass die verwendeten Antikörper für eine Detektion des FANCA-Proteins in porcinen Wildtyp-Zellen nicht geeignet sind.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, ein CRISPR/Cas9-System zu entwickeln, das spezifisch INDELS im porzinen FANCA-Gen generiert, um eine Grundlage für ein Großtier-Modell für die Fanconi-Anämie zu schaffen. Zur Beobachtung der Mutationsrate in den Zellen wurden Reporterplasmide ligiert, die mittels Reporterfluoreszenz einen Hinweis darauf geben, inwiefern die verwendeten sgRNAs zur Bildung von Insertionen und Deletionen (INDELS) verwendbar sind. Es wurden porzine STE- und iPS-Zellen verwendet, um Transfektionseffizienzen, Mutationsrate und mögliche Off-Target-Ereignisse zu bestimmen. Die Übertragung auf parthenogenetische porzine Embryonen sollte im weiteren Verlauf der Arbeit einen Eindruck darüber vermitteln, wie effizient eine genetische Veränderung im FANCA-Gen von porzinen Eizellen möglich ist. Dies ermöglicht einen Vergleich und eine Aussage darüber, ob die Mikroinjektion, mit anschließendem Embryonentransfer, ebenso, wie das klassische SCNT, für die Generierung eines FANCA-defizienten Schweins verwendet werden kann. Insgesamt war es möglich, sowohl in den porzinen STE- und iPS-Zellen, als auch in den parthenogenetischen porzinen Embryonen spezifische Mutationen zu erzeugen. Dabei konnte in den STE- und iPS-Zellen eine Effizienz von 17 – 20 % ermittelt werden. Aufgrund der geringen Anzahl an analysierten Blastozysten sind die Effizienzen hier variabel.

6.1 Spezifische FANCA-INDEL-Bildung in porzinen Zellen

Zur spezifischen INDEL-Bildung im FANCA-Gen des porzinen Genoms wurden unterschiedliche Plasmidkonstrukte generiert. Es wurde ein Mehrplasmid-System verwendet, welches aus pX330, pJoker und C-Check besteht, sowie ein Einplasmid-System, namentlich pX458 und pX459. Das Mehrplasmid-System enthält den Reportervektor C-Check, der einen asRed-Reporter und einen eGFP-Reporter kodiert. Die asRed-Fluoreszenz zeigt die Transfektionseffizienz an. Der eGFP-Reporter ist in zwei Abschnitte unterteilt, die einen homologen Überhang von 500 bp aufweisen. Zwischen den Bereichen ist die Zielsequenz der entsprechenden sgRNA ligiert. Der eGFP-Reporter wird aktiv, wenn die Zielsequenz durch eine aktive sgRNA (pJoker) und Cas9 (pX330) geschnitten und der Reporter durch homologe Rekombination repariert wird. Das C-Check-Reporterplasmid ist eine Alternative zu anderen Reporterplasmiden, die auf eine Reparatur über NHEJ basieren^[115-117]. Dabei ist der Reporter so konstruiert, dass

bei einer INDEL-Bildung im Plasmid ein Reporter aktiv wird, sodass, wie bei C-Check, die Einführung spezifischer Mutationen dargestellt werden kann^[117]. Das Einplasmid-System hingegen kodiert auf einem Plasmid alle Komponenten für das CRISPR/Cas9-System. Zudem ist ein eGFP-Reporter vorhanden, dessen Fluoreszenz die Transfektionseffizienz darstellt. Der Vorteil des Einplasmid-Systems gegenüber einem Mehrplasmid-System liegt in der einfacheren Handhabung. Sind alle Komponenten auf einem Plasmid kodiert, werden diese zu gleichen Teilen in den Zellen exprimiert. Die Einplasmid-Systeme zur INDEL-Bildung mit dem CRISPR/Cas9-System wurden von Cong et al. entwickelt, um die genetische Modifizierung mit der Cas9-Nuklease zu vereinfachen, sodass nicht alle drei notwendigen Komponenten (tracrRNA, crRNA und Cas9) des CRISPR/Cas9-Systems getrennt in Zellen eingebracht werden müssen^[95]. Porzine immortalisierte STE-Zellen wurden mit beiden Plasmid-Systeme transfiziert. Die iPS-Zellen wurden mit einem Einplasmid-System transfiziert. Es wurde überprüft, ob und mit welchen Effizienzen die identifizierten sgRNAs zu spezifischen Mutationen im FANCA-Gen führen. Es konnten spezifische INDELS in das FANCA-Gen eingeführt werden. Die Transfektionseffizienzen entsprechen denen in der Literatur^[108, 109], obwohl für die Etablierung des C-Check- und pX458-Reporterplasmids anstelle von humanen Zellen porzine verwendet wurden. Zudem war die verwendete Zellzahl unterschiedlich. Bei Zhou et al. werden $1.5 \cdot 10^6$ Zellen verwendet^[108], bei Ran et al $0.03 \cdot 10^6$ Zellen^[109]. In dieser Arbeit wurden bei der Transfektion der STE-Zellen $0.75 \cdot 10^6$ Zellen verwendet. Spezifische Mutationen konnten mit einer Effizienz von 17 – 20 % in STE- und iPS-Zellen induziert werden. Die erzeugten Mutationen sind Insertionen, Deletionen und Punktmutationen. Hier werden spezifisch Insertionen von 1 – 3 bp, Deletionen von 6 – 20 bp und eine Punktmutation im FANCA-Gen gesetzt. Bei humanen Patienten wurden in den am häufigsten betroffenen Exonen des FANCA-Gens auch kleinere INDELS und Punktmutationen gefunden. Genotypisch entsprechen die hier induzierten spezifischen INDELS denen, die in humanen Patienten auftreten^[34].

Es konnte festgestellt werden, dass verschiedene Analysemethoden unterschiedliche Aussagen über eine INDEL-Bildung generieren. Im T7-Assay wurde bei mehr Zellpools Mutationen identifiziert als bei der Poolsequenzierung. Da eine Sequenzierung im Allgemeinen als genauer betrachtet wird, liegt die

Vermutung nahe, dass es beim T7-Assay zu technischen Fehlern kam. Durch Sequenzierung konnten in den Zellpools INDELs identifiziert werden. Dabei wurde mit dem Mehrplasmid-System eine Insertion eingeführt, während die Einplasmid-Systeme insgesamt zu 6 INDELs in den STE-Zellen und zu einer Deletion in den iPS-Zellen geführt haben. Diese Mutationen konnten mit Hilfe des pGEM-T Easy-Vektor-Systems bestimmt werden. Durch Einzelkolonie-Sequenzierung konnten die in einer Zellpopulation gefundenen Sequenzüberlagerungen so voneinander getrennt werden, dass in den vereinzelt Kolonien unterschiedliche Sequenzen des Zellpools vorhanden sind. Die Analyse mit dem T7-Assay gefolgt von einer bakteriellen Einzelkoloniegenerierung wird standardmäßig durchgeführt, wenn eine INDEL-Bildung untersucht wird^[118-120]. So konnten die INDELs in Großtiermodellen^[118, 120], aber auch bei genetisch veränderten Affen nachgewiesen werden^[119].

Bei der INDEL-Bildung im FANCA Exon7 und Exon9 konnte so eine Mutationseffizienz von 17 % ermittelt werden. Im FANCA Exon10 liegt eine Mutationseffizienz von 20 % vor. Die Transfektionseffizienz, sowie die Anzahl der homologen Rekombinationsereignisse in den STE-Zellen wurden zudem durchflusszytometrisch bestimmt. Im Mehrplasmid-System konnten Transfektionseffizienzen von bis zu 99 % nachgewiesen werden. In maximal 45 % der mit dem Mehrplasmid-System transfizierten Zellen konnten über die eGFP-Fluoreszenz homologe Rekombinationsereignisse bestimmt werden. Dies steht im Kontrast zu den Sequenzierungsergebnissen. Eine Erhöhung der Rate an homologen Rekombinationsereignissen in den sequenzierten Zellen hätte durch eine Anreicherung mit Hilfe eines Durchflusszytometers kombiniert mit einem Sortierer (FACS) erreicht werden können. Es wird beschrieben, dass bei der Verwendung von Reportersystemen dadurch eine 7.4-fache Erhöhung der Mutationsrate möglich ist^[117]. Zellen, in denen eine Mutation aufgrund der fehlenden spezifischen Fluoreszenz von vornherein ausgeschlossen werden kann, werden so bei einer Sequenzierung nicht mit erfasst. Dies kann auch zu einer gezielten INDEL-Bildung von bis zu 100 % unter Zuhilfenahme des C-Check-Reporterplasmids^[108] führen. Weiterhin ist unklar, in welchem Verhältnis die Reporterplasmide zur genomischen DNA vorliegt, und inwiefern die Zielsequenz auf dem Reporterplasmid zugänglicher ist, als die Zielsequenz im porzinen Genom. So kann es zu homologen Rekombinationsereignissen im C-Check-

Plasmid gekommen sein, ohne dass es in der genomische Zielsequenz im FANCA-Gen zur INDEL-Bildung kam. Dies würde die Rate an homologen Rekombinationsereignissen mit gleichzeitiger Abwesenheit von spezifischen INDELS im FANCA-Gen erklären.

Die Verwendung des Einplasmid-Systems hat bei durchflusszytometrischen Messungen eine Transfektionseffizienz von bis zu 81 % ergeben. Dies entspricht den Werten in der Literatur^[109]. Von den Einzelkolonie-Sequenzen wurden 6 von 7 identifizierten Mutationen im FANCA-Gen von einem Einplasmid-System generiert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Verwendung von einem Plasmid, das alle notwendigen Komponenten für das CRISPR/Cas9-System kodiert, zu einer höheren Rate an spezifischen Mutationen führt als die Verwendung mehrerer Plasmide, die die CRISPR/Cas9-Komponenten kodieren.

Bei dem Einplasmid-System kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen, die eine spezifische eGFP-Fluoreszenz aufweisen, erfolgreich transfiziert wurden. Da das Einplasmid-System alle Komponenten des CRISPR/Cas9-Systems enthält, wurden somit auch diese in die Zellen transfiziert. Bei einem Mehrplasmid-System kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie die unterschiedlichen Plasmide von den Zellen aufgenommen werden. Es besteht zum einen die Möglichkeit, dass die Aufnahme eines Plasmids die Aufnahme aller Plasmide induziert, und zum anderen kann die Aufnahme der Plasmide zufällig geschehen. Bei Anwesenheit aller CRISPR/Cas9-Komponenten ist die Aktivität des Plasmids ein limitierender Faktor. Eine zu hohe DNA-Konzentration kann apoptotisch auf die Zellen wirken. Standardmäßig wurde bei der Elektroporation eine DNA-Menge von 10 µg verwendet. In der Literatur werden DNA-Mengen von 1 µg bzw. Konzentrationen von 1 µg/µl beschrieben, die zu Mutationseffizienzen von bis zu 70 % führen^[121, 122]. Der Hersteller des verwendeten Elektroporationssystems empfiehlt eine DNA-Gesamtmenge von 5 – 30 µg zu verwenden^[123], da dies je nach Zelltyp zu optimalen Transfektionseffizienzen führt. Zudem wird die Verwendung von Plasmiden für die Erzeugung spezifischer INDELS oft als kritischer Faktor betrachtet. Anstelle von Plasmiden wird die Transfektion mit Cas9-mRNA oder Ribonukleoprotein (RNP) beschrieben^[124-126], da mRNA oder RNPs in den Zellen früher aktiv sind als Plasmide. Es wurde durch die Transfektion von fetalen Fibroblasten mit Cas9-mRNA erfolgreich ein Alzheimer-

Schweinemodell^[127] und Yucatan-Minischweine mit Atherosklerose^[128] generiert. Bei der Verwendung von Cas9-mRNA wurden Mutationseffizienzen von 20 - 80 % erreicht. Die Verwendung von RNPs führt zu Mutationseffizienzen von 24 - 94 %^[126]. Diese waren jedoch stark abhängig von den Zellen, in denen die Mutationen eingeführt wurden. Zudem kommen die beschriebenen Mutationseffizienzen denen nahe, die in dieser Arbeit ermittelt wurden. Es ist somit nicht eindeutig, ob eine Transfektion mit mRNA oder RNPs zu einer höheren Mutationseffizienz führt, als bei der Verwendung von Plasmiden. Es ist allerdings bestätigt, dass die Verwendung von Cas9-mRNA für die Erstellung von Großtiermodellen geeignet ist^[120, 128-131].

Die hier erzeugten Ergebnisse sind ein Schritt hin zur Erstellung eines FANCA-Modells im Schwein. Mit den hier entwickelten CRISRP/Cas-Konstrukten könnten somatische Zellen *in vitro* spezifisch im FANCA-Gen mutiert werden. Die veränderten Zellen würden anschließend in enukleierte porzine Eizellen übertragen. Durch einen elektrischen Impuls wird die Eizelle rekonstruiert und aktiviert. Diese Methode ist die gängigste, die in der Generierung von genetisch-modifizierten Schweinen angewendet wird^[128, 132-134]. Mit dieser Technik wurden erfolgreich Modelle für Mukoviszidose, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Alzheimer erzeugt^[127-129]. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten wurden in dieser Arbeit jedoch keine Fibroblasten, sondern immortalisierte STE-Zellen und iPS-Zellen verwendet^[128, 132, 134, 135]. Jedoch zeigten die transfizierten iPS-Zellen nur in Exon10 eine Mutation. In den immortalisierten Zellen hingegen ist eine Mutationsrate von bis zu 45 % möglich. Die Zielsequenzen scheinen in den iPS-Zellen von der sgRNA schlechter erkannt zu werden.

Zur Überprüfung, ob die spezifischen INDELS auch zu einem Knockout der FANCA-Proteinexpression führen, sollte ein Western Blot etabliert werden. Die verwendeten anti-FANCA-Antikörper sind gegen das humane FANCA gerichtet und die Crossreaktivität mit dem porzinen FANCA war unklar. Aus diesem Grund wurde mit murinen F9-Zellen, humanen HEK-Zellen und porzinen Wildtyp-Zellen überprüft, ob der Antikörper für eine Detektion des FANCA-Proteins verwendbar ist. In den verwendeten Zellen sollte das FANCA-Protein exprimiert werden. Die Western Blot-Ergebnisse haben ergeben, dass mit dem Antikörper keines der porzinen FANCA-Proteine nachgewiesen werden kann. Die besondere

Schwierigkeit bei der Auswahl eines Antikörpers liegt darin, dass die kommerziell erhältlichen Antikörper für die Detektion des humanen FANCA-Proteins konzipiert wurden. Da das porcine FANCA-Protein nur zu 66 % identisch ist mit dem humanen FANCA-Protein^[136], kann es dazu kommen, dass ein Antikörper nicht mehr spezifisch bindet. Die Nachweismethode der Proteinexpression muss hierfür verbessert oder angepasst werden. Anstelle des FANCA-Proteins besteht die Möglichkeit, das ubiquitinierte FANCD2-Protein nachzuweisen^[22, 137]. Im Fanconi-Reparaturmechanismus wird FANCD2 durch den Fanconi-Kernkomplex ubiquitiniert. Bei der Expression von FANCA, das im Fanconi-Kernkomplex aktiv ist, wird somit auch die Ubiquitinierung des FANCD2 reduziert^[22, 137]. Alternativ kann anstelle der Proteinexpression auch die mRNA-Expression mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) bestimmt werden. Diese hat ein höheres Detektionslimit als ein Western Blot, sodass auch bei sehr geringen Mengen an mRNA nachgewiesen werden kann, ob ein Protein exprimiert wird.

6.2 Optimierung der Mikroinjektion

Bei der Verwendung von parthenogenetischen porcinen Embryonen werden die gewonnenen Eizellen *in vitro* gereift. Die gereiften Eizellen befinden sich in der MII-Phase. Durch eine elektrische oder chemische Aktivierung werden die Eizellen rekonstruiert. Die Aktivierung ist also essentiell für die Entwicklung von parthenogenetischen Embryonen. Eine Mikroinjektion kann somit vor der Aktivierung (vAkt) und nach der Aktivierung (nAkt) erfolgen. Es hat sich gezeigt, dass die mechanische Einwirkung der Mikroinjektion einen Einfluss auf die Entwicklung der parthenogenetischen Embryonen hat. Einen Unterschied in der Transfektions- und Entwicklungseffizienz ist zwischen den beiden Versuchsgruppen nicht erkennbar gewesen.

Der Injektionszeitpunkt im Versuch vAkt war direkt vor der Aktivierung und beim Versuch nAkt 3 Stunden nach der Aktivierung. Während der Kultivierung wurde die Entwicklung der Versuchsgruppen im Vergleich zur Kulturkontrolle beobachtet. Die injizierten Eizellen haben sich schlechter entwickelt als die Kulturkontrolle. Die mechanische Einwirkung, die die Mikroinjektion auf die Eizelle ausübt, schränkt die Entwicklungsfähigkeit der Eizellen ein. Zur Optimierung der Mikroinjektion wurde eine Plasmidlösung, bestehend aus pT2Venus, pCMV/SB100 und TMR-Dextran, injiziert. Das Plasmid pCMV/SB100 kodiert die *Sleeping Beauty*

Transposase, die den auf pT2Venus kodierten Venus-Reporter als Transposon in das porcine Genom einfügen konnte. Dadurch konnte beobachtet werden, ab welchem Entwicklungsstadium die Plasmide als aktiv erkennbar sind. Der chemische Farbstoff TMR-Dextran dient der Überprüfung der Transfektion. In der Arbeit von Liu et al., in der beschrieben wurde, dass bis zu einer injizierten Konzentration von 50 ng/ μ l kein Unterschied in der Entwicklung entsteht^[138]. Dieser Effekt wurde jedoch im Vergleich zu Injektionskontrollen beschrieben. Die Entwicklung von nicht injizierten Eizellen wurde nicht betrachtet. Luchetti et al. hingegen konnten ebenfalls beobachten, dass es im Vergleich zu einer Kulturkontrolle zu einer Differenz von 50 % in der Entwicklung kommt^[139], was bestätigt, dass die Mikroinjektion eine geringe Entwicklungskompetenz bedingt.

Anhand der injizierten Reporter konnte beobachtet werden, dass beim Versuch vAkt die Plasmide ab dem 8-Zell-Stadium als aktiv erkennbar sind. Beim Versuch nAkt ist dies schon ab dem 4-Zell-Stadium erkennbar. Jedoch haben sich in der Gruppe vAkt 18 % der Oozyten zu Blastozysten entwickelt, wovon 14 % eine Venus-Fluoreszenz aufwiesen. In der Gruppe nAkt entwickelten sich 5 % der Oozyten zu Blastozysten, wovon 36 % eine Venus-Fluoreszenz aufwiesen. Es lässt sich sagen, dass die Entwicklungsrate der vAkt-Eizellen besser ist, die Transfektionsrate jedoch bei den nAkt-Eizellen. Diese Unterschiede liegen jedoch innerhalb einer biologischen Varianz, weswegen geschlossen werden kann, dass die hier untersuchten Injektionszeitpunkte keinen Einfluss auf Entwicklungs- und Transfektionsrate haben. Tao et al. und Sato et al. beschreiben die Mikroinjektion in parthenogenetische Embryos 6 Stunden nach einer elektrischen Aktivierung^[140] oder 8 Stunden nach einer chemischen Aktivierung^[141]. Dabei haben sich 48 %^[140] bzw. 43 %^[141] der Eizellen zu Blastozysten entwickelt. In den Studien von Tao und Sato wurden die injizierten Eizellen auf INDEL-Bildung untersucht. Es konnten 70 %^[140] bzw. 93 %^[141] an spezifischen INDELS nachgewiesen werden. Es liegt somit die Vermutung nahe, dass eine Aktivierung 6 – 8 Stunden nach der Aktivierung zu einer höheren Entwicklungsrate führt. Zudem besteht die Möglichkeit, dass der Anteil an Blastozysten, die eine Venus-Fluoreszenz aufweisen, durch eine Injektion nach 6 – 8 Stunden höher sein könnte, als ermittelt. Dem entgegen steht jedoch die Beschreibung, dass eine Injektion zu verschiedenen Zeitpunkten zu keinem Unterschied in der Expression eines eGFP-Reporters in parthenogenetischen porcinen Embryonen führt^[138].

Dabei wurden auch die Zeitpunkte untersucht, die von Tao und Sato als optimal beschrieben wurden.

6.3 Spezifische FANCA-INDEL-Bildung in parthenogenetischen porzinen Embryonen

Nachdem bei der Optimierung der Mikroinjektion festgestellt wurde, dass zwischen den untersuchten Injektionszeitpunkten kein Unterschied in Entwicklungs- und Transfektionsrate vorliegt, wurde eine spezifische INDEL-Bildung in parthenogenetischen porzinen Embryonen untersucht. Hierbei wurde, wie bei den porzinen STE- und iPS-Zellen, das Mehrplasmid- und ein Einplasmid-System (pX458) verwendet. Die injizierten Eizellen wurden bis Tag 6, dem Blastozysten-Stadium, kultiviert. Die Blastozysten wurden in Pools von 3 – 5 Blastozysten lysiert. Mit dem pGEM-T Easy-Vektor-System wurden Einzelkolonien der Blastozystenpools erstellt. In den Einzelkolonien haben sich bei den Mutationseffizienzen hohe Varianzen aufgrund der relativ geringen Anzahl an Blastozysten gezeigt.

In den Versuchen, FANCA-INDELS zu generieren, wurde festgestellt, dass die Mikroinjektion einen Einfluss auf die Entwicklungsrate der injizierten Eizellen hat, wie es bereits beschrieben wurde^[139]. Die Eizellen der Versuchsgruppen und der Injektionskontrolle zeigen eine um 50 % reduzierte Entwicklung im Vergleich zur Kulturkontrolle. Die Versuchsgruppen zeigen zudem die Tendenz, dass deren Entwicklungsrate schlechter ist als bei der Injektionskontrolle. Die Ursache könnte in der Injektionslösung liegen. In den Versuchsgruppen wurde Plasmidlösungen als Fremd-DNA in die Eizellen injiziert. Dieser Einfluss auf die Eizellen ist jedoch bis zu einer Konzentration von 50 ng/µl an Fremd-DNA als normal zu betrachten^[138, 139]. Auch die verringerte Entwicklungskompetenz ist bei der Mikroinjektion in parthenogenetische porzine Embryonen nicht unüblich^[138, 139].

Als Injektionslösungen wurde das Mehrplasmid-System, bestehend aus pX330, pJoker und C-Check, sowie ein Einplasmid-System (pX458) verwendet. Das Mehrplasmid-System hat den Vorteil, dass, wie bei den STE-Zellen, durch homologe Rekombination eine spezifische eGFP-Fluoreszenz erkennbar ist. Dies zeigt in den Embryonen eine Aktivität der CRISPR/Cas9-Konstrukte an. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass die Cas9-Nuklease im FANCA-Gen spezifische INDELS induzieren kann. Das Einplasmid-System zeigt über die eGFP-Reporter-

Fluoreszenz an, dass die Eizellen erfolgreich transfiziert wurden. Die Aktivität des eGFP-Reporters lässt darauf schließen, dass die Cas9 ebenfalls aktiv ist. Bei den Injektionen mit dem Mehrplasmid-System wurde festgestellt, dass sich von den injizierten Oozyten 13 % (Exon7), 13 % (Exon9) und 17 % (Exon10) zu Blastozysten entwickeln. Davon ist in 23 % (Exon7), 13 % (Exon9) und in 13 % (Exon10) die asRed-Fluoreszenz und in 23 % (Exon7), 13 % (Exon9) und in 10 % (Exon10) die eGFP-Fluoreszenz nachweisbar gewesen. In den Versuchsgruppen des Einplasmid-Systems wurde eine Entwicklungsrate von 43 % (Exon7), 35 % (Exon9) und 44 % (Exon10) ermittelt. Davon wurde in 28 % (Exon7), 13 % (Exon9) und 11 % (Exon10) die eGFP-Fluoreszenz nachgewiesen. Die Entwicklungsrate der Embryonen, unter Verwendung der verschiedenen Plasmid-Systeme, unterscheidet sich nicht voneinander. Es hat sich jedoch gezeigt, dass Entwicklungsraten von bis zu 50 % erreicht werden können^[119, 138, 139, 142]. Die Beschreibungen unterscheiden sich dabei nicht nur in der Art der Mikroinjektion, wobei in Eizellen von Großtieren bevorzugt zytoplasmatisch injiziert wird, sondern auch in der Art des verwendeten CRISPR/Cas9-Systems. Es wird bevorzugt Cas9-mRNA verwendet^[118-120, 138-142]. So wurde ein Schweinmodell für die Muskeldystrophie Duchenne generiert^[118], sowie weitere genetisch veränderte Schweine, aber auch Affen^[119] und Schafe^[120]. Bei der Verwendung von Plasmiden zeigt sich eine Entwicklungsrate, die der in dieser Arbeit entspricht^[139].

Die Transfektionseffizienz, die im Mehrplasmid-System durch die asRed-Fluoreszenz und im Einplasmid-System durch die eGFP-Fluoreszenz erkennbar ist, unterscheidet sich nicht zwischen den beiden injizierten Plasmid-Systemen. Durch die im Mehrplasmid-System vorhandene eGFP-Fluoreszenz lässt sich jedoch schließen, dass es in 23 % (Exon7), 13 % (Exon9) und 10 % (Exon10) der Blastozysten zu homologen Rekombinationsereignissen gekommen ist. Die eGFP-fluoreszierenden Blastozysten aus den Versuchen mit dem Mehrplasmid-System enthalten somit sehr wahrscheinlich INDELS in den Zielsequenzen. Die Anwendung der hier angewendeten Mehrplasmid- und Einplasmid-Systeme in parthenogenetischen porzinen Zellen wird in dieser Arbeit erstmalig beschrieben.

Über eine Einzelkolonie-Sequenzierung konnten in den verschiedenen Versuchsgruppen unterschiedliche INDELS identifiziert werden. Bei den Versuchen mit dem Mehrplasmid-System konnten vier (Exon7), zwei (Exon9) und

drei (Exon10) unterschiedliche INDELS ermittelt werden. Dies entspricht einer Mutationseffizienz von 19 % (Exon7), 15 % (Exon9) und 33 %. Bei den Versuchen mit dem Einplasmid-System pX458 wurden drei (Exon7), zwei (Exon9) und vier (Exon10) unterschiedliche Mutationen identifiziert. Dies entspricht einer Mutationseffizienz von 8 % (Exon7), 100 % (Exon9) und 40 %. Durch die Schwankungen der Mutationseffizienzen ist eine Aussage darüber, ob die Verwendung eines Mehrplasmid- oder eines Einplasmid-Systems zur Erzeugung von spezifischen Mutationen bevorzugt werden sollte, nur eingeschränkt möglich. Es zeichnet sich jedoch die Tendenz ab, dass die Verwendung eines Mehrplasmid- oder eines Einplasmid-System keinen Einfluss auf die Mutationseffizienz nimmt. Stattdessen kann die Verwendung von Plasmiden durch die Verwendung von Cas9-mRNA oder RNPs ausgetauscht werden. Durch die Injektion von Cas9-mRNA konnten Mutationseffizienzen von 50 % - 80 % erreicht werden^[118, 120]. Die Mutationseffizienz ist jedoch mit den in dieser Arbeit erreichten Mutationseffizienzen vergleichbar. Auch bei der Erstellung eines Schweine-Modells zur Muskeldystrophie Duchenne wurde Cas9-mRNA verwendet^[118]. Die Cas9-mRNA und sgRNA wurden zytoplasmatisch in parthenogenetische porcine Embryonen und Zygoten injiziert. Die Mutationseffizienz betrug in den parthenogenetischen Embryonen 70 % und in den *in vivo*-Versuchen 50 %. Die generierten Schweine replizieren hierbei vollständig den humanen Phänotyp der Muskeldystrophie^[118]. Zudem wurde in den Arbeiten von Sato^[140] und Tao^[141] Cas9-mRNA, anstelle eines Plasmids, verwendet. Dabei haben sich INDEL-Raten von 70 %^[140] bzw. 93 %^[141] gezeigt. Nur bei den Arbeiten von Liu et al. wurde gezeigt, dass die Injektion von Cas9-mRNA zu einer geringeren Mutationseffizienz führt als die Verwendung von Plasmiden^[138]. Diese Mutationseffizienzen sind ebenfalls vergleichbar mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen. Daher ist es zurzeit unklar, ob die Verwendung von Cas9-mRNA oder RNPs tatsächlich einen höheren Effekt auf die Mutationsrate hat als die verwendeten Plasmide. Die Verwendung von mRNA oder RNPs verringert hingegen das Auftreten von mosaiken Embryonen^[124, 125]. Dabei haben RNPs den bisher größten Effekt, Mosaizismus zu verringern^[126].

Bei einer Übertragung der Ergebnisse auf entwicklungsfähige Eizellen ist zu beachten, dass es verschiedene Möglichkeiten gibt, diese zu erhalten. Es können befruchtete Eizellen aus Spendertieren entnommen werden, die anschließend

injiziert und mittels Embryotransfer in Empfängertiere übertragen werden. Alternativ dazu können befruchtete Eizellen mittels *in vitro*-Fertilisation (IVF) generiert werden. Eizellen aus Schlachthof-Ovarien werden *in vitro* gereift (IVM) und dann über IVF befruchtet. Für die IVM gibt es etablierte Protokolle, die es für das IVF bisher nicht gibt. Beim IVF von porzinen Oozyten liegt bisher das Problem vor, dass es zur Polyspermie kommen kann^[143]. Erst kürzlich wurden verbesserte Protokolle beschrieben, in denen aus IVF-generierten Schweineembryonen lebende Tiere gewonnen wurden^[144-146].

6.4 Off-Target-Analyse

Von den transfizierten STE- und iPS-Zellen wurde eine Off-Target-Analyse angefertigt. Es wurden für jede der hier verwendeten sgRNAs mögliche Off-Target-Sequenzen ermittelt. Für Exon7 wurden 386, für Exon9 38 und für Exon10 42 Off-Target-Sequenzen gefunden, wobei bis zu 4 Fehlpaarungen berücksichtigt wurden. Von den identifizierten Sequenzen wurden je sgRNA die zehn untersucht, bei denen die größte Wahrscheinlichkeit vorlag, dass die sgRNA daran hybridisiert. Es wurden 250 Proben analysiert, wovon 201 Proben auswertbar waren.

Es wurden insgesamt sechs Off-Target-Ereignisse identifiziert. Jeweils eines ist bei der sgRNA Exon7 und Exon9 aufgetreten und vier bei der sgRNA Exon10. Es ist aufgefallen, dass bei einem der Off-Targets der sgRNA Exon10 in den transfizierten STE-Zellen kein Off-Target-Ereignis ermittelt werden konnte, jedoch bei den transfizierten iPS-Zellen. Die Off-Targets scheinen in den iPS-Zellen von der sgRNA eher erkannt zu werden. Weiterhin sind in einigen Off-Target-Sequenzen vermehrt Punktmutationen zu finden. Die Ursache dafür kann sowohl ein Off-Target-Ereignis als auch eine spontan eingeführte Mutation durch die Taq-Polymerase oder der Cas9-Nuklease sein. Für die Standard-Taq-Polymerasen ist eine Mutationsrate von $6.8 \cdot 10^{-5}$ Fehlern/bp^[147] beschrieben. Spontane Mutationen durch die Taq-Polymerase lassen sich dadurch weitgehend ausschließen. Die analysierten Off-Target-Sequenzen können jedoch auch repetitive Sequenzen sein, wodurch eine Sequenzanalyse nicht möglich ist, da es zu Überlagerungen dieser Sequenzen kommt. Die Off-Target-Ereignisse weisen darauf hin, dass die sgRNAs weitgehend spezifisch für die Zielsequenzen sind, da keine „echten Off-

Target-Mutationen vorliegen^[119, 142], jedoch Punktmutationen mit unklarem Ursprung.

Alternativ kann statt einer Off-Target-Analyse eine Gesamtgenom-Sequenzierung vorgenommen werden. Diese basiert jedoch, wie auch die Off-Target-Analyse, auf einer PCR. Somit besteht auch hier die Möglichkeit, dass spontan Punktmutationen eingeführt werden können und so zu schwer interpretierbaren Ergebnissen führen. Da die Off-Target-Analyse in der Handhabung einfacher ist, fand die Off-Target-Analyse in dieser Arbeit Anwendung.

6.5 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es möglich ist, in porzinen immortalisierten STE- und primären iPS-Zellen, sowie in parthenogenetischen porzinen Embryonen spezifische Mutationen im FANCA-Gen des Schweinegenoms einzuführen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Effizienz, INDELs zu generieren, unabhängig davon ist, ob ein Mehrplasmid- oder ein Einplasmid-System verwendet wird, um die Komponenten des CRISPR/Cas9-Systems in die Zellen und Embryonen einzubringen. Es konnte auch gezeigt werden, dass der Injektionszeitpunkt bei den Versuchen mit den parthenogenetischen porzinen Embryonen keinen Einfluss auf die Entwicklung und die Transfektion nimmt. Eine Verschiebung des Injektionszeitpunktes auf 6 – 8 Std. nach der Aktivierung kann jedoch einen Effekt auf die INDEL-Bildung haben^[140, 141]. Es steht auch zur Debatte, inwiefern die Verwendung von Plasmiden für das CRISPR/Cas9-System durch Cas9-mRNA oder durch RNPs ersetzt werden könnte^[124-126]. Die mit Cas9-mRNA generierten Effizienzen in der INDEL-Bildung unterscheiden sich nicht von denen, die in dieser Arbeit gezeigt wurden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch die Verwendung von Cas9-mRNA erfolgreich Krankheitsmodelle im Schwein erstellt wurden^[118, 127-130, 148, 149]. In der Off-Target-Analyse ist zu sehen, dass die verwendeten sgRNA weitgehend spezifisch für die Zielsequenzen im FANCA-Gen sind. Die Verwendung spezifischerer sgRNAs oder ein Wechsel auf andere Zielsequenzen kann in Betracht gezogen werden. In dieser Arbeit konnte nicht gezeigt werden, ob die gebildeten INDELs einen Knockout des porzinen FANCA-Proteins zur Folge haben. Daher sollte dies in nachfolgenden Versuchen vorrangig überprüft werden. Anschließend sollte entschieden werden, mit welcher Technik ein Fanconi-

Anämie-Modell erstellt werden kann. Diese Arbeit beschreibt die Etablierung von CRISRP/Cas-Konstrukten, mit denen spezifisch das porcine FANCA-Gen mutagenisiert werden kann. Das ist die Grundlage für die INDEL-Bildung, aber auch für die Einführung spezifischer Mutationen über die homologe Rekombination. In weiter führenden Arbeiten kann das für die Erstellung eines Tiermodells für die Fanconi-Anämie genutzt werden.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der semikontinuierlichen DNA-Replikation ^[2]	1
Abb. 2: Schematische Darstellung eines Interstrand- und Intrastrand-Crosslinks ^[5]	3
Abb. 3: Darstellung des Fanconi-Reparaturmechanismus.....	5
Abb. 4: Mögliche Zell- und Gentherapiestrategien in der Fanconi-Anämie ^[37]	9
Abb. 5: Schematische Darstellung der homologen Rekombination ^[57]	11
Abb. 6: Schematische Darstellung des somatischen Zellkerntransfers ^[63]	13
Abb. 7: Schematische Darstellung einer ZFN ^[68]	14
Abb. 8: Schematische Darstellung der Reparaturmöglichkeiten nach einem Doppelstrangbruch mittels ZFNs ^[68]	15
Abb. 9: Schematische Darstellung einer TALEN ^[68]	16
Abb. 10: Schematische Struktur der sgRNA von <i>Streptococcus pyogenes</i>	17
Abb. 11: Schematische Darstellung der CRISPR/Cas9 ^[68]	17
Abb. 12: Verwendeter 100 bp DNA-Größenstandard.	28
Abb. 13: Verwendeter vorgefärbter Protein-Größenstandard.	28
Abb. 14: Verwendeter Western Blot Protein-Größenstandard.	29
Abb. 15: Schematische Darstellung eines Semi-Dry-Transfers.	40
Abb. 16: Mikroskop für die Mikroinjektion in parthenogenetische porcine Embryonen.....	41
Abb. 17: FemtoJet für die Mikroinjektion in parthenogenetische porcine Embryonen.	42
Abb. 18: Aufbau und Ausrichtung der Halte- und Injektionsnadel für die Mikroinjektion.	42
Abb. 19: Mikroinjektion in das Zytoplasma einer parthenogenetischen porcinen Oozyte.....	43
Abb. 20: Punktion eines Follikels mit Hilfe einer 18G Kanüle.	44
Abb. 21: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers ^[92]	48
Abb. 22: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.....	57
Abb. 23: Sequenz des FANCA-Gens im Schwein ^[100]	58
Abb. 24: Integrierte Zielsequenz für die sgRNA für Exon 7 im Plasmid C-Check_Exon7 ^[103]	58
Abb. 25: Integrierte sgRNA im Plasmid pX458Faex10 ^[103]	59
Abb. 26: Plasmidkarte von p119 C-Check.	63
Abb. 27: Plasmidkarte von pX330.	63
Abb. 28: Plasmidkarte vom Klonierungsvektor pJoker.....	64
Abb. 29: Spezifische eGFP (A)- und asRed-Fluoreszenz (B) der mit C-Check_Exon7, pX330 und pJoker (Exon7) transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung.....	65
Abb. 30: Plasmidkarte von pX458.	66
Abb. 31: Spezifische eGFP (A)- und asRed-Fluoreszenz (B) der mit pX458Faex7 transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung.	67
Abb. 32: Plasmidkarte von pX459.	68
Abb. 33: Agarosegel zur PCR von STE- und iPS-Zellen.	69
Abb. 34: Agarosegel zum T7-Assay von STE- und iPS-Zellen.	70
Abb. 35: Elektropherogramm der Sequenzierung transfizierter STE- und iPS-Zell-Pools in Exon9.	71

Abb. 36: Elektropherogramm der Sequenzierung transfizierter STE- und iPS-Zell-Pools in Exon10.	72
Abb. 37: Plasmidkarte von pT2Venus (A) und pCMV/SB100 (B).	75
Abb. 38: Kulturkontrolle der parthenogenetischen porzinen Embryonen bei der Optimierung der Mikroinjektion.....	76
Abb. 39: Injektion vor der Aktivierung von parthenogenetischen porzinen Embryonen.....	76
Abb. 40: Injektion nach der Aktivierung von parthenogenetischen porzinen Embryonen.....	77
Abb. 41: Entwicklungsunterschiede zwischen verschiedenen Versuchsgruppen bei der Optimierung der Mikroinjektion in parthenogenetischen porzinen Embryonen.	78
Abb. 42: Fluoreszenznachweis zwischen verschiedenen Versuchsgruppen bei der Optimierung der Mikroinjektion in parthenogenetischen porzinen Embryonen.....	79
Abb. 43: Kulturkontrolle von parthenogenetischen porzinen Embryonen mit der Injektion von C- Check.....	81
Abb. 44: Injektionskontrolle von parthenogenetischen porzinen Embryonen mit der Injektion von C- Check.....	81
Abb. 45: Injektion von C-Check von parthenogenetischen porzinen Embryonen.....	82
Abb. 46: Entwicklungsunterschiede zwischen der Kulturkontrolle, der Injektionskontrolle und der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit der Cas9-Nuklease, C-Check_Exon7 und der sgRNA_Exon7, n = 4.	84
Abb. 47: Fluoreszenznachweis in der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit der Cas9- Nuklease, C-Check_Exon7 und der sgRNA_Exon7, n = 4.	85
Abb. 48: Entwicklungsunterschiede zwischen der Kulturkontrolle, der Injektionskontrolle und der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit der Cas9-Nuklease, C-Check_Exon9 und der sgRNA_Exon9, n = 6.	86
Abb. 49: Fluoreszenznachweis in der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit der Cas9- Nuklease, C-Check_Exon9 und der sgRNA_Exon9, n = 6.	87
Abb. 50: Entwicklungsunterschiede zwischen der Kulturkontrolle, der Injektionskontrolle und der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit der Cas9-Nuklease, C-Check_Exon10 und der sgRNA_Exon10, n = 5.	89
Abb. 51: Fluoreszenznachweis in der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit der Cas9- Nuklease, C-Check_Exon10 und der sgRNA_Exon10, n = 5.	90
Abb. 52: Injektion von pX458 in parthenogenetische porzine Embryonen.....	92
Abb. 53: Entwicklungsunterschiede zwischen der Kulturkontrolle, der Injektionskontrolle und der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit pX458Faex7, n = 6.....	93
Abb. 54: eGFP-Expression in der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit pX458Faex7, n = 6.	94
Abb. 55: Entwicklungsunterschiede zwischen der Kulturkontrolle, der Injektionskontrolle und der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit pX458Faex9, n = 8.....	96
Abb. 56: eGFP-Expression in der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit pX458Faex9, n = 8.	97

Abb. 57 Entwicklungsunterschiede zwischen der Kulturkontrolle, der Injektionskontrolle und der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit pX458Faex10, n = 4.....	99
Abb. 58: eGFP-Expression in der Versuchsgruppe nach der Mikroinjektion mit pX458Faex10, n = 4.....	99
Abb. 59: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 2 der sgRNA für Exon7.....	101
Abb. 60: Western Blot humaner und porziner Zellen mit dem polyklonalen FANCA-Antikörper (A) und mit einem Tubulin-Antikörper (B).....	103
Abb. 61: Western Blot muriner und humaner Zellen mit dem monoklonalen FANCA-Antikörper (A) und mit einem Tubulin-Antikörper (B).....	104
Abb. 62: Spezifische eGFP- und asRed-Fluoreszenz der negativen Kontrolle der STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung (rote Graphen).....	148
Abb. 63: Spezifische eGFP- und asRed-Fluoreszenz der mit C-Check_Exon7 transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung.....	149
Abb. 64: Spezifische eGFP- und asRed-Fluoreszenz der mit C-Check_Exon9 transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung.....	150
Abb. 65 Spezifische eGFP- und asRed-Fluoreszenz der mit C-Check_Exon10 transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung.....	151
Abb. 66: Spezifische eGFP- und asRed-Fluoreszenz der mit pX458Faex7 transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung.....	152
Abb. 67: Spezifische eGFP- und asRed-Fluoreszenz der mit pX458Faex9 transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung.....	153
Abb. 68: Spezifische eGFP- und asRed-Fluoreszenz der mit pX458Faex10 transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung.....	154
Abb. 69: Agarosegel zur PCR von STE- und iPS-Zellen (ungeschnitten).....	155
Abb. 70: Agarosegel zum T7-Assay von STE- und iPS-Zellen (ungeschnitten).....	156
Abb. 71: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 3 der sgRNA für Exon7.....	157
Abb. 72: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 5 der sgRNA für Exon7.....	157
Abb. 73: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 6 der sgRNA für Exon7.....	158
Abb. 74: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 7 der sgRNA für Exon7.....	158
Abb. 75: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 9 der sgRNA für Exon7.....	159
Abb. 76: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 10 der sgRNA für Exon7.....	159
Abb. 77: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 1 der sgRNA für Exon9.....	160
Abb. 78: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 2 der sgRNA für Exon9.....	161
Abb. 79: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 3 der sgRNA für Exon9.....	162
Abb. 80: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 5 der sgRNA für Exon9.....	163
Abb. 81: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 6 der sgRNA für Exon9.....	164
Abb. 82: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 7 der sgRNA für Exon9.....	165
Abb. 83: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 8 der sgRNA für Exon9.....	166
Abb. 84: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 9 der sgRNA für Exon9.....	167
Abb. 85: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 1 der sgRNA für Exon10.....	168
Abb. 86: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 2 der sgRNA für Exon10.....	168

Abb. 87: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 4 der sgRNA für Exon10. 169

Abb. 88: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 6 der sgRNA für Exon10. 169

Abb. 89: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 7 der sgRNA für Exon10. 170

Abb. 90: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 8 der sgRNA für Exon10. 170

Abb. 91: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 9 der sgRNA für Exon10. 171

Abb. 92: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 10 der sgRNA für Exon10. 171

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auflistung von FANCA-Mutationen in israelischen Patienten ^[26]	7
Tab. 2: Phänotyp des FancA-Mausmodells im Vergleich zu Fanconi-Anämie-Patienten ^[41]	10
Tab. 3: Verwendete Puffer für die PCR.	19
Tab. 4: Verwendete Puffer für die Antikörperinkubation.	19
Tab. 5: Verwendete Puffer für die Fraktionierung von Proteinen.	19
Tab. 6: Zusammensetzung der DMEM-Stocklösung für die Herstellung der Zellkulturmedien.	20
Tab. 7: Verwendete Medien für die Zellkultur.	20
Tab. 8: Verwendeter Lysispuffer für die Lyse von STE-Zellen.	20
Tab. 9: Verwendetes ES-Zellmedium für die Kultivierung von iPS-Zellen ^[88]	21
Tab. 10: Verwendeter Puffer bei der Oozytengewinnung.	21
Tab. 11: Zusammensetzung der DMEM/F12-Stocklösung.	22
Tab. 12: Verwendetes DMEM-Medium für die Reifung der Oozyten.	22
Tab. 13: Zusammensetzung der TL-Hepes-Stocklösung.	23
Tab. 14: Verwendete Puffer für die Kumulusentfernung.	23
Tab. 15: Verwendeter Puffer für die Mikroinjektion.....	24
Tab. 16: Verwendeter Puffer für die Aktivierung.....	25
Tab. 17: Verwendeter Puffer für die Kultivierung.	25
Tab. 18: Verwendete Substanzen für die Erstellung eines Trenngels.....	26
Tab. 19: Verwendete Substanzen für die Erstellung eines Sammelgels.....	26
Tab. 20: Verwendeter Auftragspuffer für die SDS-Gelelektrophorese.	27
Tab. 21: Verwendete Puffer für den Semi-Dry Blot.	27
Tab. 22: Verwendete Laborgeräte.	32
Tab. 23: Verwendete Substanzen und Zusammensetzung für die PCR von Blastozysten-Pools. .	36
Tab. 24: Verwendetes Temperaturprogramm für die PCR von Blastozysten-Pools.	36
Tab. 25: Verwendete Primer.	36
Tab. 26: Hybridisierungsprogramm beim T7-Assay.	37
Tab. 27: Zusammensetzung des Trenngels der SDS-PAGE bei 7% und 10%.	39
Tab. 28: Zusammensetzung des Sammelgels der SDS-PAGE.	39
Tab. 29: Auflistung der Off-Target-Primer nach der optimalen Annealingtemperatur.	49
Tab. 30: Ligationsprogramm von C-Check.	51
Tab. 31: PCR-Produkt-Größe der zu untersuchenden Zielloci.	52
Tab. 32: Verwendete Substanzen und Zusammensetzung für die Ligation mit dem pGEM T-Easy-Vektor-System.	53
Tab. 33: Verwendete Substanzen und Zusammensetzung für die Kolonie-PCR.....	54
Tab. 34: Verwendetes Temperaturprogramm für die Kolonie-PCR.....	54
Tab. 35: Verwendete Plasmide zur spezifischen INDEL-Bildung im porzinen FANCA-Gen.....	60
Tab. 36: Mutationen in den Einzelklonsequenzen von Exon7 des FANCA-Gens.	73
Tab. 37: Mutationen in den Einzelklonsequenzen von Exon9 des FANCA-Gens.	73
Tab. 38: Mutationen in den Einzelklonsequenzen von Exon10 des FANCA-Gens.	73

Tab. 39: Verwendete Plasmidlösungen für die Mikroinjektion mit C-Check.	83
Tab. 40: Einzelkolonie-Sequenzen nach der Mikroinjektion mit C-Check_Exon7.....	85
Tab. 41: Einzelkolonie-Sequenzen nach der Mikroinjektion mit C-Check_Exon9.....	88
Tab. 42: Einzelkolonie-Sequenzen nach der Mikroinjektion mit C-Check_Exon10.....	90
Tab. 43: Verwendete Plasmidlösungen für die Mikroinjektion von pX458.	92
Tab. 44: Einzelkolonie-Sequenzen nach der Mikroinjektion mit pX458Faex7.	94
Tab. 45: Vergleich der Mutationseffizienz unterschiedlicher CRISPR/Cas9-Plasmide in Exon7. ...	95
Tab. 46: Identifizierte Mutationen nach der Mikroinjektion mit pX458Faex9.	97
Tab. 47: Vergleich der Mutationseffizienz unterschiedlicher CRISPR/Cas9-Plasmide in Exon9. ...	98
Tab. 48: Identifizierte Mutationen nach der Mikroinjektion mit pX458Faex10.	100
Tab. 49: Vergleich der Mutationseffizienz unterschiedlicher CRISPR/Cas9-Plasmide in Exon10.	100
Tab. 50: Analysierte Off-Target-Sequenzen der sgRNA_Exon7, 9 und 10.	102
Tab. 51: Genloci, Primernamen und –sequenzen für die Off-Targets der sgRNA für Exon7.....	142
Tab. 52: Genloci, Primernamen und –sequenzen für die Off-Targets der sgRNA für Exon9.....	144
Tab. 53: Genloci, Primernamen und –sequenzen für die Off-Targets der sgRNA für Exon10.	146

7 Literaturverzeichnis

1. Donald J. Voet JGV, Charlotte W. Pratt. DNA-Replikation, DNA-Reparatur und Rekombination. Lehrbuch der Biochemie. 2. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2010. p. 961-1006.
2. Genome Y. What is dna replication? 2017 [cited 2018 24.01.]. Available from: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-dna-replication>.
3. Dong H, Nebert DW, Bruford EA, Thompson DC, Joenje H, Vasiliou V. Update of the human and mouse Fanconi anemia genes. *Hum Genomics*. 2015;9:32. doi: 10.1186/s40246-015-0054-y. PubMed PMID: 26596371; PubMed Central PMCID: PMC4657327.
4. Schneider M, Chandler K, Tischkowitz M, Meyer S. Fanconi anaemia: genetics, molecular biology, and cancer – implications for clinical management in children and adults. *Clinical Genetics*. 2015;88(1):13-24. doi: 10.1111/cge.12517.
5. McHugh PJ, Spanswick VJ, Hartley JA. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *The Lancet Oncology*. 2001;2(8):483-90. Epub 2002/03/22. doi: 10.1016/s1470-2045(01)00454-5. PubMed PMID: 11905724.
6. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chemical Reviews*. 1999;99(9):2467-98. doi: 10.1021/cr980421n.
7. Colis LC, Raychaudhury P, Basu AK. Mutational Specificity of γ -Radiation-Induced Guanine–Thymine and Thymine–Guanine Intrastrand Cross-Links in Mammalian Cells and Translesion Synthesis Past the Guanine–Thymine Lesion by Human DNA Polymerase η . *Biochemistry*. 2008;47(31):8070-9. doi: 10.1021/bi800529f.
8. Box HC, Budzinski EE, Dawidzik JD, Wallace JC, Evans MS, Gobey JS. Radiation-Induced Formation of a Crosslink between Base Moieties of Deoxyguanosine and Thymidine in Deoxygenated Solutions of d(CpGpTpA). *Radiation Research*. 1996;145(5):641-3. doi: 10.2307/3579285.
9. Deans AJ, West SC. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11:467. doi: 10.1038/nrc3088.
10. Shukla P, Solanki A, Ghosh K, Vundinti BR. DNA interstrand cross-link repair: understanding role of Fanconi anemia pathway and therapeutic

implications. *European Journal of Haematology*. 2013;91(5):381-93. doi: 10.1111/ejh.12169.

11. Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nature reviews Genetics*. 2007;8(10):735-48. Epub 2007/09/05. doi: 10.1038/nrg2159. PubMed PMID: 17768402.

12. Kottemann MC, Smogorzewska A. Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. *Nature*. 2013;493(7432):356-63. Epub 2013/01/18. doi: 10.1038/nature11863. PubMed PMID: 23325218; PubMed Central PMCID: PMC3700363.

13. Lopez-Martinez D, Liang CC, Cohn MA. Cellular response to DNA interstrand crosslinks: the Fanconi anemia pathway. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(16):3097-114. doi: 10.1007/s00018-016-2218-x. PubMed PMID: 27094386; PubMed Central PMCID: PMC4951507.

14. Castilla-Cortazar I, de Ita JR, Aguirre GA, Castorena-Torres F, Ortiz-Urbina J, Garcia-Magarino M, et al. Fanconi Anemia and Laron Syndrome. *Am J Med Sci*. 2017;353(5):425-32. doi: 10.1016/j.amjms.2017.02.001. PubMed PMID: 28502327.

15. G. F. Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). 1927.

16. Duxin JP, Walter JC. What is the DNA repair defect underlying Fanconi anemia? *Curr Opin Cell Biol*. 2015;37:49-60. doi: 10.1016/j.ceb.2015.09.002. PubMed PMID: 26512453; PubMed Central PMCID: PMC4688103.

17. Auerbach AD, Wolman SR. Susceptibility of Fanconi's anaemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. *Nature*. 1976;261(5560):494-6. Epub 1976/06/10. PubMed PMID: 934283.

18. Auerbach AD. A test for Fanconi's anemia. *Blood*. 1988;72(1):366-7. Epub 1988/07/01. PubMed PMID: 3291985.

19. Sasaki MS, Tonomura A. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer research*. 1973;33(8):1829-36. Epub 1973/08/01. PubMed PMID: 4352739.

20. Sasaki MS. Is Fanconi's anaemia defective in a process essential to the repair of DNA cross links? *Nature*. 1975;257(5526):501-3. Epub 1975/10/09. PubMed PMID: 1178054.

21. Castella M, Pujol R, Callen E, Ramirez MJ, Casado JA, Talavera M, et al. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *J Med Genet.* 2011;48(4):242-50. doi: 10.1136/jmg.2010.084210. PubMed PMID: 21217111.
22. Xie J, Kim H, Moreau LA, Puhalla S, Garber J, Al Abo M, et al. RNF4-mediated polyubiquitination regulates the Fanconi anemia/BRCA pathway. *J Clin Invest.* 2015;125(4):1523-32. doi: 10.1172/JCI79325. PubMed PMID: 25751062; PubMed Central PMCID: PMC4396491.
23. Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res.* 2009;668(1-2):4-10. Epub 2009/07/23. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.01.013. PubMed PMID: 19622403; PubMed Central PMCID: PMC2742943.
24. Antonio Casado J, Callen E, Jacome A, Rio P, Castella M, Lobitz S, et al. A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network. *J Med Genet.* 2007;44(4):241-9. Epub 2006/11/16. doi: 10.1136/jmg.2006.044719. PubMed PMID: 17105750; PubMed Central PMCID: PMC2598052.
25. Levran O, Erlich T, Magdalena N, Gregory JJ, Batish SD, Verlander PC, et al. Sequence variation in the Fanconi anemia gene FAA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(24):13051-6. Epub 1997/12/16. PubMed PMID: 9371798; PubMed Central PMCID: PMC24261.
26. Savino M, Ianzano L, Strippoli P, Ramenghi U, Arslanian A, Bagnara GP, et al. Mutations of the Fanconi anemia group A gene (FAA) in Italian patients. *American journal of human genetics.* 1997;61(6):1246-53. Epub 1997/12/18. doi: 10.1086/301632. PubMed PMID: 9399890; PubMed Central PMCID: PMC1716093.
27. Levran O, Doggett NA, Auerbach AD. Identification of Alu-mediated deletions in the Fanconi anemia gene FAA. *Human mutation.* 1998;12(3):145-52. Epub 1998/08/26. doi: 10.1002/(sici)1098-1004(1998)12:3<145::aid-humu2>3.0.co;2-g. PubMed PMID: 9711872.
28. Morgan NV, Tipping AJ, Joenje H, Mathew CG. High frequency of large intragenic deletions in the Fanconi anemia group A gene. *American journal of human genetics.* 1999;65(5):1330-41. Epub 1999/10/16. doi: 10.1086/302627. PubMed PMID: 10521298; PubMed Central PMCID: PMC1288285.

29. Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, et al. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in fanconi anemia. European Fanconi Anemia Research Group. *Blood*. 2000;96(13):4064-70. Epub 2000/12/09. PubMed PMID: 11110674.
30. Callen E, Casado JA, Tischkowitz MD, Bueren JA, Creus A, Marcos R, et al. A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood*. 2005;105(5):1946-9. Epub 2004/11/04. doi: 10.1182/blood-2004-07-2588. PubMed PMID: 15522956.
31. Whitney MA, Saito H, Jakobs PM, Gibson RA, Moses RE, Grompe M. A common mutation in the FACC gene causes Fanconi anaemia in Ashkenazi Jews. *Nature genetics*. 1993;4(2):202-5. Epub 1993/06/01. doi: 10.1038/ng0693-202. PubMed PMID: 8348157.
32. Tipping AJ, Pearson T, Morgan NV, Gibson RA, Kuyt LP, Havenga C, et al. Molecular and genealogical evidence for a founder effect in Fanconi anemia families of the Afrikaner population of South Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(10):5734-9. Epub 2001/05/10. doi: 10.1073/pnas.091402398. PubMed PMID: 11344308; PubMed Central PMCID: PMC33282.
33. Tamary H, Bar-Yam R, Zemach M, Dgany O, Shalmon L, Yaniv I. The molecular biology of Fanconi anemia. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2002;4(10):819-23. Epub 2002/10/23. PubMed PMID: 12389351.
34. Castella M, Pujol R, Callen E, Trujillo JP, Casado JA, Gille H, et al. Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. *Blood*. 2011;117(14):3759-69. doi: 10.1182/blood-2010-08-299917. PubMed PMID: 21273304; PubMed Central PMCID: PMC3083295.
35. Tolar J, Becker PS, Clapp DW, Hanenberg H, de Heredia CD, Kiem HP, et al. Gene therapy for Fanconi anemia: one step closer to the clinic. *Hum Gene Ther*. 2012;23(2):141-4. doi: 10.1089/hum.2011.237. PubMed PMID: 22248350; PubMed Central PMCID: PMC3277737.
36. Socie G, Devergie A, Girinski T, Piel G, Ribaud P, Esperou H, et al. Transplantation for Fanconi's anaemia: long-term follow-up of fifty patients transplanted from a sibling donor after low-dose cyclophosphamide and thoraco-abdominal irradiation for conditioning. *British journal of haematology*. 1998;103(1):249-55. Epub 1998/10/29. PubMed PMID: 9792317.

37. Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C, Kuliev A. Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. *Jama*. 2001;285(24):3130-3. Epub 2001/06/28. PubMed PMID: 11427142.
38. MacMillan ML, Hughes MR, Agarwal S, Daley GQ. Cellular therapy for fanconi anemia: the past, present, and future. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2011;17(1 Suppl):S109-14. Epub 2011/01/14. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.11.027. PubMed PMID: 21195298.
39. Kahraman S, Beyazyurek C, Yesilipek MA, Ozturk G, Ertem M, Anak S, et al. Successful haematopoietic stem cell transplantation in 44 children from healthy siblings conceived after preimplantation HLA matching. *Reproductive biomedicine online*. 2014;29(3):340-51. Epub 2014/07/30. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.05.010. PubMed PMID: 25066893.
40. Trujillo JP, Surralles J. Savior siblings and Fanconi anemia: analysis of success rates from the family's perspective. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2015;17(11):935-8. Epub 2015/02/13. doi: 10.1038/gim.2014.206. PubMed PMID: 25674777.
41. Liu GH, Suzuki K, Li M, Qu J, Montserrat N, Tarantino C, et al. Modelling Fanconi anemia pathogenesis and therapeutics using integration-free patient-derived iPSCs. *Nat Commun*. 2014;5:4330. doi: 10.1038/ncomms5330. PubMed PMID: 24999918; PubMed Central PMCID: PMC4291073.
42. Rio P, Banos R, Lombardo A, Quintana-Bustamante O, Alvarez L, Garate Z, et al. Targeted gene therapy and cell reprogramming in Fanconi anemia. *EMBO Mol Med*. 2014;6(6):835-48. doi: 10.15252/emmm.201303374. PubMed PMID: 24859981; PubMed Central PMCID: PMC4203359.
43. Osborn MJ, Gabriel R, Webber BR, DeFeo AP, McElroy AN, Jarjour J, et al. Fanconi anemia gene editing by the CRISPR/Cas9 system. *Hum Gene Ther*. 2015;26(2):114-26. doi: 10.1089/hum.2014.111. PubMed PMID: 25545896; PubMed Central PMCID: PMC4326027.
44. Bogliolo M, Surralles J. Fanconi anemia: a model disease for studies on human genetics and advanced therapeutics. *Curr Opin Genet Dev*. 2015;33:32-40. doi: 10.1016/j.gde.2015.07.002. PubMed PMID: 26254775.
45. Cheng NC, van de Vrugt HJ, van der Valk MA, Oostra AB, Krimpenfort P, de Vries Y, et al. Mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia homolog

- Fanca. *Hum Mol Genet.* 2000;9(12):1805-11. Epub 2000/08/01. PubMed PMID: 10915769.
46. Casado JA, Núñez MI, Segovia JC, Ruiz de Almodóvar JM, Bueren JA. Non-homologous End-Joining Defect in Fanconi Anemia Hematopoietic Cells Exposed to Ionizing Radiation. *Radiation Research.* 2005;164(5):635-41. doi: 10.1667/rr3395.1.
47. Carreau M, Gan OI, Liu L, Doedens M, McKerlie C, Dick JE, et al. Bone marrow failure in the Fanconi anemia group C mouse model after DNA damage. *Blood.* 1998;91(8):2737-44. Epub 1998/05/16. PubMed PMID: 9531583.
48. Koomen M, Cheng NC, van de Vrugt HJ, Godthelp BC, van der Valk MA, Oostra AB, et al. Reduced fertility and hypersensitivity to mitomycin C characterize *Fancg/Xrcc9* null mice. *Hum Mol Genet.* 2002;11(3):273-81. Epub 2002/02/02. PubMed PMID: 11823446.
49. van de Vrugt HJ, Koomen M, Bakker S, Berns MA, Cheng NC, van der Valk MA, et al. Evidence for complete epistasis of null mutations in murine Fanconi anemia genes *Fanca* and *Fancg*. *DNA repair.* 2011;10(12):1252-61. Epub 2011/11/01. doi: 10.1016/j.dnarep.2011.09.015. PubMed PMID: 22036606.
50. Houghtaling S, Timmers C, Noll M, Finegold MJ, Jones SN, Meyn MS, et al. Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (*Fancd2*) knockout mice. *Genes & development.* 2003;17(16):2021-35. Epub 2003/08/02. doi: 10.1101/gad.1103403. PubMed PMID: 12893777; PubMed Central PMCID: PMC196256.
51. Bakker ST, de Winter JP, te Riele H. Learning from a paradox: recent insights into Fanconi anaemia through studying mouse models. *Dis Model Mech.* 2013;6(1):40-7. doi: 10.1242/dmm.009795. PubMed PMID: 23268537; PubMed Central PMCID: PMC3529337.
52. Parmar K, D'Andrea A, Niedernhofer LJ. Mouse models of Fanconi anemia. *Mutat Res.* 2009;668(1-2):133-40. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.03.015. PubMed PMID: 19427003; PubMed Central PMCID: PMC2778466.
53. Noll M, Battaile KP, Bateman R, Lax TP, Rathbun K, Reifsteck C, et al. Fanconi anemia group A and C double-mutant mice: functional evidence for a multi-protein Fanconi anemia complex. *Experimental hematology.* 2002;30(7):679-88. Epub 2002/07/24. PubMed PMID: 12135664.

54. Pulliam-Leath AC, Ciccone SL, Nalepa G, Li X, Si Y, Miravalle L, et al. Genetic disruption of both *Fancc* and *Fanccg* in mice recapitulates the hematopoietic manifestations of Fanconi anemia. *Blood*. 2010;116(16):2915-20. Epub 2010/07/08. doi: 10.1182/blood-2009-08-240747. PubMed PMID: 20606166; PubMed Central PMCID: PMCPmc2974601.
55. Yan Z, Stewart ZA, Sinn PL, Olsen JC, Hu J, McCray PB, Jr., et al. Ferret and pig models of cystic fibrosis: prospects and promise for gene therapy. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2015;26(1):38-49. doi: 10.1089/humc.2014.154. PubMed PMID: 25675143; PubMed Central PMCID: PMCPMC4367511.
56. Rogers CS, Hao Y, Rokhlina T, Samuel M, Stoltz DA, Li Y, et al. Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. *J Clin Invest*. 2008;118(4):1571-7. doi: 10.1172/JCI34773. PubMed PMID: 18324337; PubMed Central PMCID: PMCPMC2265103.
57. Keiser NW, Engelhardt JF. New animal models of cystic fibrosis: what are they teaching us? *Current opinion in pulmonary medicine*. 2011;17(6):478-83. Epub 2011/08/23. doi: 10.1097/MCP.0b013e32834b14c9. PubMed PMID: 21857224; PubMed Central PMCID: PMCPmc3596000.
58. Fisher JT, Zhang Y, Engelhardt JF. Comparative biology of cystic fibrosis animal models. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2011;742:311-34. Epub 2011/05/07. doi: 10.1007/978-1-61779-120-8_19. PubMed PMID: 21547741; PubMed Central PMCID: PMCPmc3617920.
59. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature reviews Genetics*. 2010;11(9):636-46. Epub 2010/08/19. doi: 10.1038/nrg2842. PubMed PMID: 20717154.
60. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14(1):49-55. Epub 2012/11/22. doi: 10.1038/nrm3486. PubMed PMID: 23169466; PubMed Central PMCID: PMCPmc3547402.
61. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. 2013;31(9):827-32. Epub 2013/07/23. doi: 10.1038/nbt.2647. PubMed PMID: 23873081; PubMed Central PMCID: PMCPmc3969858.

62. Kues WA, Niemann H. Advances in farm animal transgenesis. *Preventive veterinary medicine*. 2011;102(2):146-56. Epub 2011/05/24. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.04.009. PubMed PMID: 21601297.
63. Orr-Weaver TL, Szostak JW. Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(14):4417-21. Epub 1983/07/01. PubMed PMID: 6308623; PubMed Central PMCID: PMC384049.
64. Capecchi MR. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*. 1980;22(2 Pt 2):479-88. Epub 1980/11/01. PubMed PMID: 6256082.
65. Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*. 1985;317(6034):230-4. PubMed PMID: 2995814.
66. Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*. 1986;44(3):419-28. PubMed PMID: 3002636.
67. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 1989;244(4910):1288-92. PubMed PMID: 2660260.
68. Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature reviews Genetics*. 2005;6(6):507-12. doi: 10.1038/nrg1619. PubMed PMID: 15931173.
69. Soto DA, Ross PJ. Pluripotent stem cells and livestock genetic engineering. *Transgenic Research*. 2016;25(3):289-306. doi: 10.1007/s11248-016-9929-5.
70. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997;385(6619):810-3. Epub 1997/02/27. doi: 10.1038/385810a0. PubMed PMID: 9039911.
71. Holker M, Petersen B, Hassel P, Kues WA, Lemme E, Lucas-Hahn A, et al. Duration of in vitro maturation of recipient oocytes affects blastocyst development of cloned porcine embryos. *Cloning and stem cells*. 2005;7(1):35-44. Epub 2005/07/06. doi: 10.1089/clo.2005.7.35. PubMed PMID: 15996116.
72. Petersen B, Lucas-Hahn A, Oropeza M, Hornen N, Lemme E, Hassel P, et al. Development and validation of a highly efficient protocol of porcine somatic cloning using preovulatory embryo transfer in peripubertal gilts. *Cloning and stem*

- cells. 2008;10(3):355-62. Epub 2008/08/30. doi: 10.1089/clo.2008.0026. PubMed PMID: 18729768.
73. Pattinson SD, Kind V. Using a moot to develop students' understanding of human cloning and statutory interpretation. *Med Law Int.* 2017;17(3):111-33. doi: 10.1177/0968533217726350. PubMed PMID: 28943724; PubMed Central PMCID: PMC5598875.
74. Yang C-X, Ross JW. Genetic modification of domestic animals for agriculture and biomedical applications. *Biomedical Science, Engineering and Technology: InTech*; 2012.
75. Vajta G, Zhang Y, Machaty Z. Somatic cell nuclear transfer in pigs: recent achievements and future possibilities. *Reproduction, fertility, and development.* 2007;19(2):403-23. Epub 2007/01/30. PubMed PMID: 17257528.
76. Harrison S, Boquest A, Grupen C, Faast R, Guildolin A, Giannakis C, et al. An efficient method for producing alpha(1,3)-galactosyltransferase gene knockout pigs. *Cloning and stem cells.* 2004;6(4):327-31. Epub 2005/01/27. doi: 10.1089/clo.2004.6.327. PubMed PMID: 15671659.
77. Lagutina I, Lazzari G, Galli C. Birth of cloned pigs from zona-free nuclear transfer blastocysts developed in vitro before transfer. *Cloning and stem cells.* 2006;8(4):283-93. Epub 2007/01/02. doi: 10.1089/clo.2006.8.283. PubMed PMID: 17196093.
78. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology.* 2013;31(7):397-405. Epub 2013/05/15. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004. PubMed PMID: 23664777; PubMed Central PMCID: PMC3694601.
79. Petersen B, Niemann H. Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals. *Transgenic Res.* 2015;24(3):381-96. doi: 10.1007/s11248-015-9862-z. PubMed PMID: 25603988.
80. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-21. Epub 2012/06/30. doi: 10.1126/science.1225829. PubMed PMID: 22745249.
81. Miller J, McLachlan AD, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *The EMBO journal.*

1985;4(6):1609-14. Epub 1985/06/01. PubMed PMID: 4040853; PubMed Central PMCID: PMCPmc554390.

82. Pabo CO, Peisach E, Grant RA. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual review of biochemistry*. 2001;70:313-40. Epub 2001/06/08. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.313. PubMed PMID: 11395410.

83. Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*. 1991;252(5007):809-17. Epub 1991/05/10. PubMed PMID: 2028256.

84. Smith J, Bibikova M, Whitby FG, Reddy AR, Chandrasegaran S, Carroll D. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic acids research*. 2000;28(17):3361-9. Epub 2000/08/23. PubMed PMID: 10954606; PubMed Central PMCID: PMCPmc110700.

85. Hauschild-Quintern J, Petersen B, Cost GJ, Niemann H. Gene knockout and knockin by zinc-finger nucleases: current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(16):2969-83. Epub 2012/11/20. doi: 10.1007/s00018-012-1204-1. PubMed PMID: 23161061.

86. Doyon Y, Choi VM, Xia DF, Vo TD, Gregory PD, Holmes MC. Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption. *Nature methods*. 2010;7(6):459-60. Epub 2010/05/04. doi: 10.1038/nmeth.1456. PubMed PMID: 20436476.

87. Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2002;161(3):1169-75. Epub 2002/07/24. PubMed PMID: 12136019; PubMed Central PMCID: PMCPmc1462166.

88. Moehle EA, Rock JM, Lee YL, Jouvenot Y, DeKolver RC, Gregory PD, 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;104(9):3055-60. Epub 2007/03/16. doi: 10.1073/pnas.0611478104. PubMed PMID: 17360608; PubMed Central PMCID: PMCPmc1802009.

89. Orlando SJ, Santiago Y, DeKolver RC, Freyvert Y, Boydston EA, Moehle EA, et al. Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic acids*

- research. 2010;38(15):e152. Epub 2010/06/10. doi: 10.1093/nar/gkq512. PubMed PMID: 20530528; PubMed Central PMCID: PMCPmc2926620.
90. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*. 2009;326(5959):1509-12. Epub 2009/11/26. doi: 10.1126/science.1178811. PubMed PMID: 19933107.
91. Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*. 2009;326(5959):1501. Epub 2009/11/26. doi: 10.1126/science.1178817. PubMed PMID: 19933106.
92. Tesson L, Usal C, Menoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol*. 2011;29(8):695-6. Epub 2011/08/09. doi: 10.1038/nbt.1940. PubMed PMID: 21822240.
93. Carlson DF, Tan W, Lillico SG, Stverakova D, Proudfoot C, Christian M, et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(43):17382-7. Epub 2012/10/03. doi: 10.1073/pnas.1211446109. PubMed PMID: 23027955; PubMed Central PMCID: PMCPmc3491456.
94. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual review of genetics*. 2011;45:273-97. Epub 2011/11/09. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132430. PubMed PMID: 22060043.
95. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-23. Epub 2013/01/05. doi: 10.1126/science.1231143. PubMed PMID: 23287718; PubMed Central PMCID: PMCPmc3795411.
96. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339(6121):823-6. Epub 2013/01/05. doi: 10.1126/science.1232033. PubMed PMID: 23287722; PubMed Central PMCID: PMCPmc3712628.
97. Institutions B-X. Introduction to CRISPRi Metabolic Gear Box2013 [cited 2018 23.01.]. Available from: <http://2013.igem.org/Team:SJTU-BioX-Shanghai/Project/CRISPRi/Introduction>.
98. Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects.

Nature methods. 2014;11(4):399-402. Epub 2014/03/04. doi: 10.1038/nmeth.2857. PubMed PMID: 24584192.

99. Kues WA, Herrmann D, Barg-Kues B, Haridoss S, Nowak-Imialek M, Buchholz T, et al. Derivation and characterization of sleeping beauty transposon-mediated porcine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2013;22(1):124-35. doi: 10.1089/scd.2012.0382. PubMed PMID: 22989381.

100. ThermoFisher. Produktübersicht Dextran,Tetramethylrhodamin, 10000MW, Anionic, Fixable 2017 [cited 2017 21.12.]. Available from: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D1868>.

101. Garrels W, Mates L, Holler S, Dalda A, Taylor U, Petersen B, et al. Germline transgenic pigs by Sleeping Beauty transposition in porcine zygotes and targeted integration in the pig genome. *PLoS One.* 2011;6(8):e23573. doi: 10.1371/journal.pone.0023573. PubMed PMID: 21897845; PubMed Central PMCID: PMC3163581.

102. Scientific T. Cell types successfully transfected with the Neon® Transfection System. 2018.

103. Abcam. Introduction to flow cytometry 2018 [cited 2018 16.01.]. Available from: <http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>.

104. DocCheck. Durchflusszytometrie 2017 [cited 2018 16.01.]. Available from: <http://flexikon.doccheck.com/de/Durchflusszytometrie>.

105. Crispor 2017 [cited 2018 16.01.]. Available from: <http://crispor.tefor.net/>.

106. Sus Scrofa isolate TJ Tabasco breed Duroc Chromosome 1-10, 12-18, X. In: Genious, editor. 11.1 ed. NCBI2017.

107. NCBI. Primer-Blast 2018 [cited 2018 16.01.].

108. Zhou Y, Liu Y, Hussmann D, Brogger P, Al-Saaidi RA, Tan S, et al. Enhanced genome editing in mammalian cells with a modified dual-fluorescent surrogate system. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(13):2543-63. doi: 10.1007/s00018-015-2128-3. PubMed PMID: 26755436.

109. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-308. doi: 10.1038/nprot.2013.143. PubMed PMID: 24157548; PubMed Central PMCID: PMC3969860.

110. Genebuild. Ensembl release 91 2018 [cited 2018 30.01.].

111. Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode M R, Barrell D, Bhai J, et al. Ensembl 2018. *Nucleic acids research*. 2018;46(D1):D754-D61. doi: 10.1093/nar/gkx1098.
112. M. Haeussler J-PC. CRISPOR 2017 [cited 2018 05.02.]. Available from: <http://crispor.tefor.net/>.
113. NCBI. Primer-BLAST 2018 [cited 2018 05.02.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
114. Kearsse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28(12):1647-9. Epub 2012/05/01. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199. PubMed PMID: 22543367; PubMed Central PMCID: PMC3371832.
115. Ren C, Xu K, Liu Z, Shen J, Han F, Chen Z, et al. Dual-reporter surrogate systems for efficient enrichment of genetically modified cells. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(14):2763-72. Epub 2015/03/03. doi: 10.1007/s00018-015-1874-6. PubMed PMID: 25725802.
116. Ramakrishna S, Cho SW, Kim S, Song M, Gopalappa R, Kim JS, et al. Surrogate reporter-based enrichment of cells containing RNA-guided Cas9 nuclease-induced mutations. *Nat Commun*. 2014;5:3378. Epub 2014/02/27. doi: 10.1038/ncomms4378. PubMed PMID: 24569644.
117. Kim H, Um E, Cho SR, Jung C, Kim H, Kim JS. Surrogate reporters for enrichment of cells with nuclease-induced mutations. *Nature methods*. 2011;8(11):941-3. Epub 2011/10/11. doi: 10.1038/nmeth.1733. PubMed PMID: 21983922.
118. Yu HH, Zhao H, Qing YB, Pan WR, Jia BY, Zhao HY, et al. Porcine Zygote Injection with Cas9/sgRNA Results in DMD-Modified Pig with Muscle Dystrophy. *Int J Mol Sci*. 2016;17(10). Epub 2016/10/14. doi: 10.3390/ijms17101668. PubMed PMID: 27735844; PubMed Central PMCID: PMC5085701.
119. Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 2014;156(4):836-43. Epub 2014/02/04. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.027. PubMed PMID: 24486104.
120. Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, et al. Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9

- Technology and Microinjection into Zygotes. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136690. Epub 2015/08/26. doi: 10.1371/journal.pone.0136690. PubMed PMID: 26305800; PubMed Central PMCID: PMC4549068.
121. Zhou X, Xin J, Fan N, Zou Q, Huang J, Ouyang Z, et al. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015;72(6):1175-84. doi: 10.1007/s00018-014-1744-7.
122. Nakamura H, Katahira T, Sato T, Watanabe Y, Funahashi J. Gain- and loss-of-function in chick embryos by electroporation. *Mechanisms of development*. 2004;121(9):1137-43. Epub 2004/08/07. doi: 10.1016/j.mod.2004.05.013. PubMed PMID: 15296977.
123. Invitrogen. Neon^P Transfection System - User Guide. 2014.
124. Aida T, Chiyo K, Usami T, Ishikubo H, Imahashi R, Wada Y, et al. Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. *Genome Biol*. 2015;16:87. doi: 10.1186/s13059-015-0653-x. PubMed PMID: 25924609; PubMed Central PMCID: PMC4414275.
125. Kouranova E, Forbes K, Zhao G, Warren J, Bartels A, Wu Y, et al. CRISPRs for Optimal Targeting: Delivery of CRISPR Components as DNA, RNA, and Protein into Cultured Cells and Single-Cell Embryos. *Human Gene Therapy*. 2016;27(6):464-75. doi: 10.1089/hum.2016.009. PubMed PMID: PMC4931306.
126. Liang X, Potter J, Kumar S, Zou Y, Quintanilla R, Sridharan M, et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *Journal of biotechnology*. 2015;208:44-53. Epub 2015/05/25. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.04.024. PubMed PMID: 26003884.
127. Jakobsen JE, Johansen MG, Schmidt M, Liu Y, Li R, Callesen H, et al. Expression of the Alzheimer's Disease Mutations AbetaPP695sw and PSEN1M146I in Double-Transgenic Gottingen Minipigs. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2016;53(4):1617-30. Epub 2016/08/20. doi: 10.3233/jad-160408. PubMed PMID: 27540966.
128. Davis BT, Wang XJ, Rohret JA, Struzynski JT, Merricks EP, Bellinger DA, et al. Targeted disruption of LDLR causes hypercholesterolemia and atherosclerosis in Yucatan miniature pigs. *PLoS One*. 2014;9(4):e93457. Epub 2014/04/03. doi: 10.1371/journal.pone.0093457. PubMed PMID: 24691380; PubMed Central PMCID: PMC43972179.

129. Klymiuk N, Mundhenk L, Kraehe K, Wuensch A, Plog S, Emrich D, et al. Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(5):597-608. Epub 2011/12/16. doi: 10.1007/s00109-011-0839-y. PubMed PMID: 22170306.
130. Kwon DN, Lee K, Kang MJ, Choi YJ, Park C, Whyte JJ, et al. Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs. *Sci Rep*. 2013;3:1981. Epub 2013/06/14. doi: 10.1038/srep01981. PubMed PMID: 23760311; PubMed Central PMCID: PMCPmc4070623.
131. Saalfrank A, Janssen KP, Ravon M, Flisikowski K, Eser S, Steiger K, et al. A porcine model of osteosarcoma. *Oncogenesis*. 2016;5:e210. Epub 2016/03/15. doi: 10.1038/oncsis.2016.19. PubMed PMID: 26974205; PubMed Central PMCID: PMCPmc4815050.
132. Jakobsen JE, Johansen MG, Schmidt M, Dagnaes-Hansen F, Dam K, Gunnarsson A, et al. Generation of minipigs with targeted transgene insertion by recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) and somatic cell nuclear transfer (SCNT). *Transgenic Res*. 2013;22(4):709-23. Epub 2012/11/01. doi: 10.1007/s11248-012-9671-6. PubMed PMID: 23111619; PubMed Central PMCID: PMCPmc3712138.
133. Callesen H, Liu Y, Pedersen HS, Li R, Schmidt M. Increasing efficiency in production of cloned piglets. *Cellular reprogramming*. 2014;16(6):407-10. Epub 2014/10/22. doi: 10.1089/cell.2014.0053. PubMed PMID: 25333333.
134. Whyte JJ, Meyer AE, Spate LD, Benne JA, Cecil R, Samuel MS, et al. Inactivation of porcine interleukin-1 β results in failure of rapid conceptus elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(2):307-12. doi: 10.1073/pnas.1718004115.
135. Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science*. 2008;321(5897):1837-41. Epub 2008/09/27. doi: 10.1126/science.1163600. PubMed PMID: 18818360; PubMed Central PMCID: PMCPmc2570747.
136. NCBI. Protein-BLAST 2018 [cited 2018 06.02.]. Available from: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome.

137. Kim H, Yang K, Dejsuphong D, D'Andrea AD. Regulation of Rev1 by the Fanconi anemia core complex. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19(2):164-70. doi: 10.1038/nsmb.2222. PubMed PMID: 22266823; PubMed Central PMCID: PMC3280818.
138. Liu S, Liu X, Huang H, Liu Q, Su X, Zhu P, et al. Factors affecting efficiency of introducing foreign DNA and RNA into parthenogenetic or in vitro-fertilized porcine eggs by cytoplasmic microinjection. *In vitro cellular & developmental biology Animal.* 2016;52(7):713-22. Epub 2016/05/01. doi: 10.1007/s11626-016-0025-1. PubMed PMID: 27130683.
139. Luchetti CG, Bevacqua RJ, Lorenzo MS, Tello MF, Willis M, Buemo CP, et al. Vesicles Cytoplasmic Injection: An Efficient Technique to Produce Porcine Transgene-Expressing Embryos. *Reprod Domest Anim.* 2016;51(4):501-8. Epub 2016/06/05. doi: 10.1111/rda.12708. PubMed PMID: 27260090.
140. Sato M, Kosuke M, Koriyama M, Inada E, Saitoh I, Ohtsuka M, et al. Timing of CRISPR/Cas9-related mRNA microinjection after activation as an important factor affecting genome editing efficiency in porcine oocytes. *Theriogenology.* 2017;108:29-38. Epub 2017/12/02. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.030. PubMed PMID: 29195121.
141. Tao L, Yang M, Wang X, Zhang Z, Wu Z, Tian J, et al. Efficient biallelic mutation in porcine parthenotes using a CRISPR-Cas9 system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;476(4):225-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.100. PubMed PMID: 27221047.
142. Wang Y, Du Y, Shen B, Zhou X, Li J, Liu Y, et al. Efficient generation of gene-modified pigs via injection of zygote with Cas9/sgRNA. *Sci Rep.* 2015;5:8256. Epub 2015/02/06. doi: 10.1038/srep08256. PubMed PMID: 25653176; PubMed Central PMCID: PMC4317696.
143. Romar R, Funahashi H, Coy P. In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. *Theriogenology.* 2016;85(1):125-34. Epub 2015/08/15. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.017. PubMed PMID: 26271164.
144. Yoshioka K, Noguchi M, Suzuki C. Production of piglets from in vitro-produced embryos following non-surgical transfer. *Animal reproduction science.* 2012;131(1-2):23-9. Epub 2012/03/02. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.01.018. PubMed PMID: 22377163.

145. Mito T, Yoshioka K, Noguchi M, Yamashita S, Misumi K, Hoshi T, et al. Birth of piglets from in vitro-produced porcine blastocysts vitrified and warmed in a chemically defined medium. *Theriogenology*. 2015;84(8):1314-20. Epub 2015/08/10. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.06.024. PubMed PMID: 26255223.
146. Whitworth KM, Lee K, Benne JA, Beaton BP, Spate LD, Murphy SL, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biol Reprod*. 2014;91(3):78. Epub 2014/08/08. doi: 10.1095/biolreprod.114.121723. PubMed PMID: 25100712; PubMed Central PMCID: PMCPmc4435063.
147. Ling LL, Keohavong P, Dias C, Thilly WG. Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity: modified T7, Taq, and vent DNA polymerases. *PCR methods and applications*. 1991;1(1):63-9. Epub 1991/08/01. PubMed PMID: 1842924.
148. Luo Y, Li J, Liu Y, Lin L, Du Y, Li S, et al. High efficiency of BRCA1 knockout using rAAV-mediated gene targeting: developing a pig model for breast cancer. *Transgenic Res*. 2011;20(5):975-88. Epub 2010/12/25. doi: 10.1007/s11248-010-9472-8. PubMed PMID: 21181439.
149. Pinnapureddy AR, Stayner C, McEwan J, Baddeley O, Forman J, Eccles MR. Large animal models of rare genetic disorders: sheep as phenotypically relevant models of human genetic disease. *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10:107. doi: 10.1186/s13023-015-0327-5. PubMed PMID: 26329332; PubMed Central PMCID: PMCPMC4557632.

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst habe. Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen in Anspruch genommen:

Ich habe keinerlei entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation an folgenden Institutionen angefertigt:

Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Nutztiergenetik, Mariensee, Deutschland

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Datum, eigenhändige Unterschrift

9 Anhang

9.1 Sequenzen und Namen der Off-Targets

Tab. 51: Genloci, Primernamen und –sequenzen für die Off-Targets der sgRNA für Exon7.

Genlocus	Primer	Primersequenz (5'-3')
intergenic:XR_00234 4404.1/XM_0210933 89.1- XR_303997.2/NM_0 01243596.1	Ex7OTPrimer1 _fw2	ACCCTCTCATACAGCTGGC
	Ex7OTPrimer1 _bw2	AGGTACCTCCACACGGTTTTTC
intergenic:NM_21378 0.1- NM_001244315.1	Ex7OTPrimer2 _fw	AGGCACTCAGCAGTTCTTCTT
	Ex7OTPrimer2 _bw	TGGAAGGCATTACGAAGGGG
intron:XM_02109018 1.1/XM_021090161.1 /XM_005659303.3/X M_005659302.3/XM_ 005659300.3/XM_00 3480289.4	Ex7OTPrimer3 _fw	AGCTGGATCTTAAAGGATGGGAC
	Ex7OTPrimer3 _bw	TCTGGGTGAACATTCAGGGT
intergenic:XM_00566 1021.3- XM_005661026.2	Ex7OTPrimer4 _fw	CAAGCTCTCAAGGGCAGACA
	Ex7OTPrimer4 _bw	GCCCCAAATAGATGCCTGGT
intergenic:XM_00566 9936.3/XR_0013003 77.2/XM_005669935. 3-NM_001123185.1	Ex7OTPrimer5 _fw	TCCAGCTTTGTCCATTTTCAGC

	Ex7OTPrimer5	TGGCAAAAGTGCCAGACAAA
	_bw	
intron:XM_02108704	Ex7OTPrimer6	TCTGTCCTCGGGTCTCAGTT
5.1/XM_021087044.1	_fw	
/XM_021087043.1/X		
M_021087042.1		
	Ex7OTPrimer6	GAGCACCATGTGGGTGTGAT
	_bw	
intergenic:XM_02107	Ex7OTPrimer7	TGCTAAATGAGCCCAGACCA
4240.1-	_fw	
XM_001929360.6/X		
M_013983365.2		
	Ex7OTPrimer7	GACCTTTGTCAAGACTGTAGCC
	_bw	
intergenic:NM_00103	Ex7OTPrimer8	ACAGTCAACAAAATATACAACCTCG
8623.1-	_fw	
XM_005660172.3/X		
M_021065145.1/XM_		
013993629.2/XM_01		
3993628.2/XM_0056		
60171.3		
	Ex7OTPrimer8	TGTACAAAGTTAAGGTGCAGAACT
	_bw	
intergenic:XM_01398	Ex7OTPrimer9	ACAGCAGGAATTATGCATACAACA
3429.2-	_fw	
XM_013983450.2		
	Ex7OTPrimer9	CCCCACCCACCTACACAAAG
	_bw	
intron:XM_00565535	Ex7OTPrimer1	AACTGGGAAGCGGGGTTTTTA
6.3	0_fw	
	Ex7OTPrimer1	AGTCCTCAGCAAGCAGTTCT
	0_bw	

Tab. 52: Genloci, Primernamen und –sequenzen für die Off-Targets der sgRNA für Exon9.

Genlocus	Primer	Primersequenz (5'-3')
intergenic:XM_00312 4002.4/XR_0013072 48.2/XR_001307247. 2/XM_021084935.1/ XM_013995284.2/XR _002341949.1/XM_0 21084936.1/XM_021 084934.1/XM_02108 4933.1/XM_0210849 32.1	Ex9OTPrimer1_fw	TCCTCCTCTGGGGTCTTCAG
	Ex9OTPrimer1_bw	GCCCTTCCCTTGAGCTTCTT
intergenic:XM_01398 2417.2- XM_021068416.1/X M_021068415.1/XM_ 021068414.1/XM_02 1068418.1/XM_0210 68417.1/NM_001244 697.1	Ex9OTPrimer2_fw	CTTGGGGGCCATGGAAGATA
	Ex9OTPrimer2_bw	AGAGCTCACCTGCCAAAACA
exon:XR_002337493 .1/NM_001244147.1	Ex9OTPrimer3_fw	CCAGAGAGAGCTGGGGAGAG
	Ex9OTPrimer3_bw	GTGGAGCTGACGGGTCATTA
exon:XM_021064676 .1/XM_003482804.4/ XM_003130672.6	Ex9OTPrimer4_fw	AGAGGATCCTGAGCCCCATT
	Ex9OTPrimer4_bw	GTACAGCTATGCCAGGGAGG
intergenic:XM_02107 6358.1- XM_021076370.1/X M_021076369.1/XM_	Ex9OTPrimer5_fw	AAGCTCCCAGCTTTCTGGTG

021076368.1/XM_02
 1076367.1/XM_0210
 76366.1/XM_021076
 365.1/XM_02107636
 4.1/XM_021076363.1
 /XM_021076358.1/X
 M_021076357.1/XM_
 021076356.1/XM_02
 1076355.1/XM_0210
 76354.1/XM_021076
 353.1

	Ex9OTPrimer5_bw	ACAAGGCATAGCCAACTCCC
intergenic:XM_00313	Ex9OTPrimer6_fw	CTGAGCTGCTTTGGGACTGA
2294.4-		
XM_021069183.1/X		
M_013981845.2		
	Ex9OTPrimer6_bw	AGGTGGTAGGGGAACTCAGG
intergenic:XM_00566	Ex9OTPrimer7_fw	AGCAGGAATGTAGCAGTCGG
2353.3-		
XR_002342518.1		
	Ex9OTPrimer7_bw	AGCCTCGGTGGTAAACTGAA
intergenic:XM_02108	Ex9OTPrimer8_fw	TCCAGAGTGGAGAGTCGTCC
6294.1-		
NM_001244153.1		
	Ex9OTPrimer8_bw	GCCCCAAGGATAACACCTC
intergenic:XM_02108	Ex9OTPrimer9_fw	ATGTCTGTGCTCTTGTGGCT
0417.1/XM_0210804		
16.1/XM_021080415.		
1/XM_021080414.1/		
XM_021080413.1/X		
M_021080411.1/XM_		
021080410.1/XM_02		
1080409.1-		
XM_003360391.4/X		

M_013986303.2

Ex9OTPrimer9_bw ATTCCAGCTTTGACCTGGTAGT
 intron:XM_01399895 Ex9OTPrimer10_f AGGCTTCTTGTGTCCTTGGG
 5.2/XM_003127539.4 w
 Ex9OTPrimer10_b GCAGGATAATCCCAGCCCAG
 w

Tab. 53: Genloci, Primernamen und –sequenzen für die Off-Targets der sgRNA für Exon10.

Genlocus	Primer	Primersequenz (5'-3')
intron:XM_02107399 1.1	Ex10OTPrimer 1_fw	TATTCCTTGGGCGACGGAG
	Ex10OTPrimer 1_bw	AGTCTGCCCTTTTCCCTGTG
exon:XM_021077955 .1/XM_021077957.1/ XM_021077956.1/XR _002340027.1	Ex10OTPrimer 2_fw	CTCCACCTAATGCCCCACTG
	Ex10OTPrimer 2_bw	CCCAGCAGCTCAGAATCACA
intergenic:XM_02109 3695.1/XM_0210936 96.1/XM_021093697. 1- XM_021093480.1/X M_021093479.1/NM _001252427.2	Ex10OTPrimer 4_fw	TTTCTTGGCACCCATCACCA
	Ex10OTPrimer 4_bw	TAAGGGGCATTTACGGACC
intergenic:XM_02107 5826.1- XM_021075799.1/X M_021075806.1/XM_ 021075803.1/XM_02	Ex10OTPrimer 6_fw	ACAGAGCCTCGACAAGATGC

1075801.1/XM_0210		
75807.1/XM_021075		
800.1/XM_02107580		
2.1/XM_021075804.1		
	Ex10OTPrimer	CCTTCATCCTCCTGGGAAGC
	6_bw	
exon:XM_013980837	Ex10OTPrimer	CGAGGGACACTGTCTTGCAT
.2/XM_013980836.2/	7_fw	
XM_005668680.3/N		
M_213907.1		
	Ex10OTPrimer	TGGGGAGAGCAGAGGATGAA
	7_bw	
intron:XM_02109002	Ex10OTPrimer	GCTGATGGATGGCAGAGGAG
4.1/XM_001928519.7	8_fw	
	Ex10OTPrimer	CTGGGGTTCGTCCAGACTTC
	8_bw	
intergenic:XM_02106	Ex10OTPrimer	GGGCCAGCAGTGATGGATAA
4007.1-	9_fw	
XM_021064007.1/N		
M_001244388.1		
	Ex10OTPrimer	GGAGTCCTGGCTGGAAACTC
	9_bw	
intron:XM_00565386	Ex10OTPrimer	CCTGTCACTTGGCTCCTTGT
4.3	10_fw	
	Ex10OTPrimer	TAAAGGCCTTGATGCGGAGG
	10_bw	

9.2 Durchflusszytometrische Messungen von STE-Zellen transfiziert mit C-Check und pX458

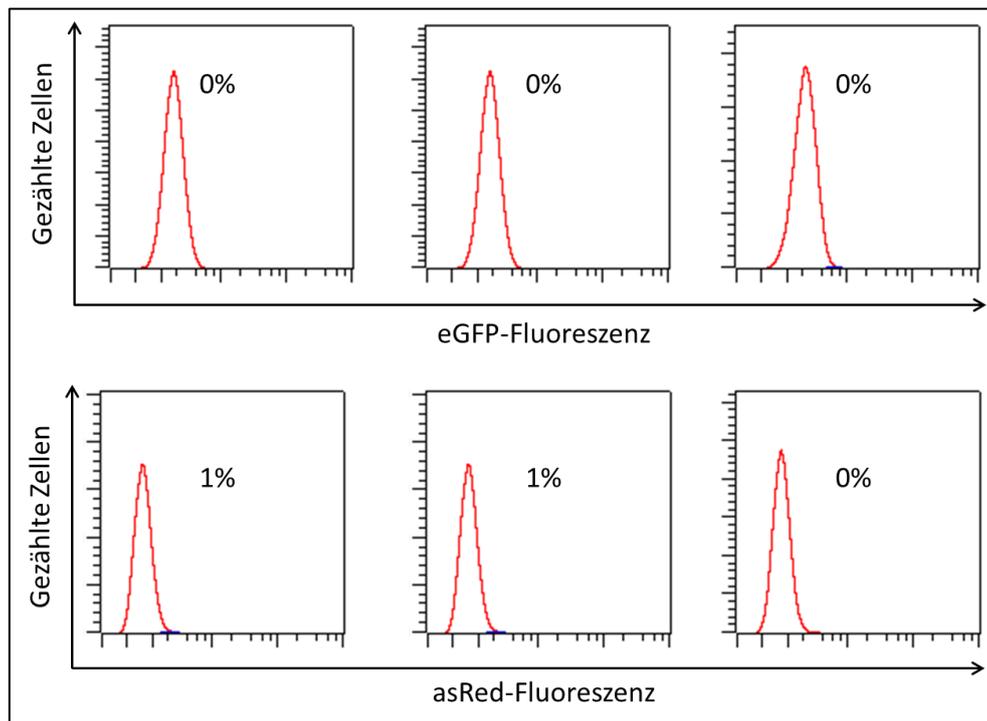


Abb. 62: Spezifische eGFP- und asRed-Fluoreszenz der negativen Kontrolle der STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung (rote Graphen). Der dargestellte Wert zeigt den prozentualen Anteil an fluoreszierenden Zellen an.

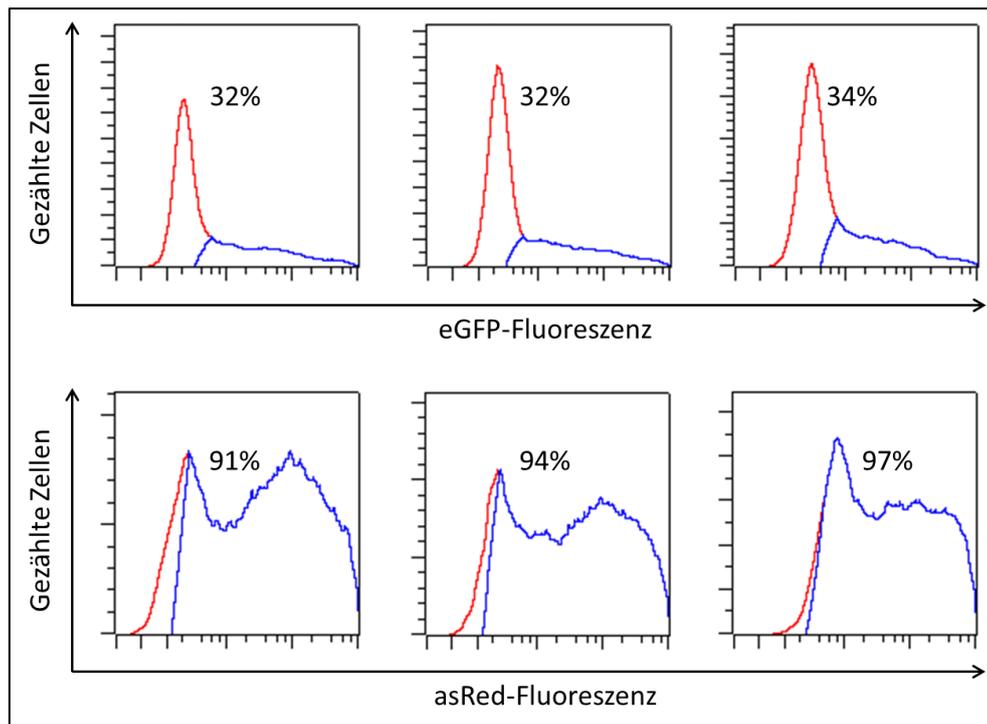


Abb. 63: Spezifische eGFP- und asRed-Fluoreszenz der mit C-Check_Exon7 transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung. In rot ist die negative Population, in blau die positive Population dargestellt. Der dargestellte Wert zeigt den prozentualen Anteil an fluoreszierenden Zellen an.

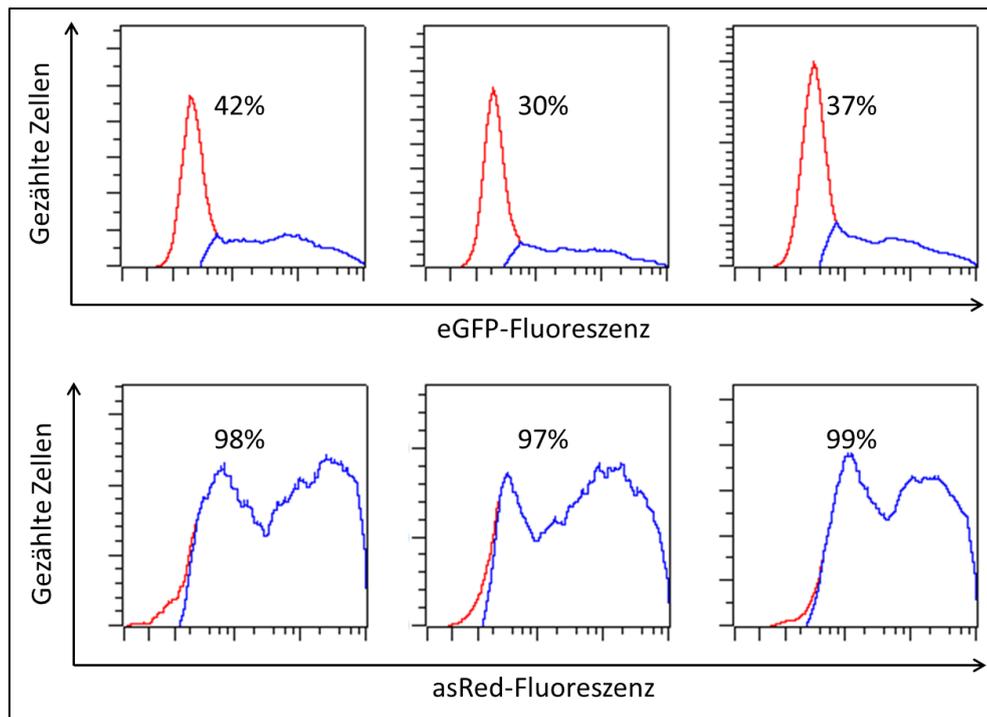


Abb. 64: Spezifische eGFP- und asRed-Fluoreszenz der mit C-Check_Exon9 transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung. In rot ist die negative Population, in blau die positive Population dargestellt. Der dargestellte Wert zeigt den prozentualen Anteil an fluoreszierenden Zellen an.

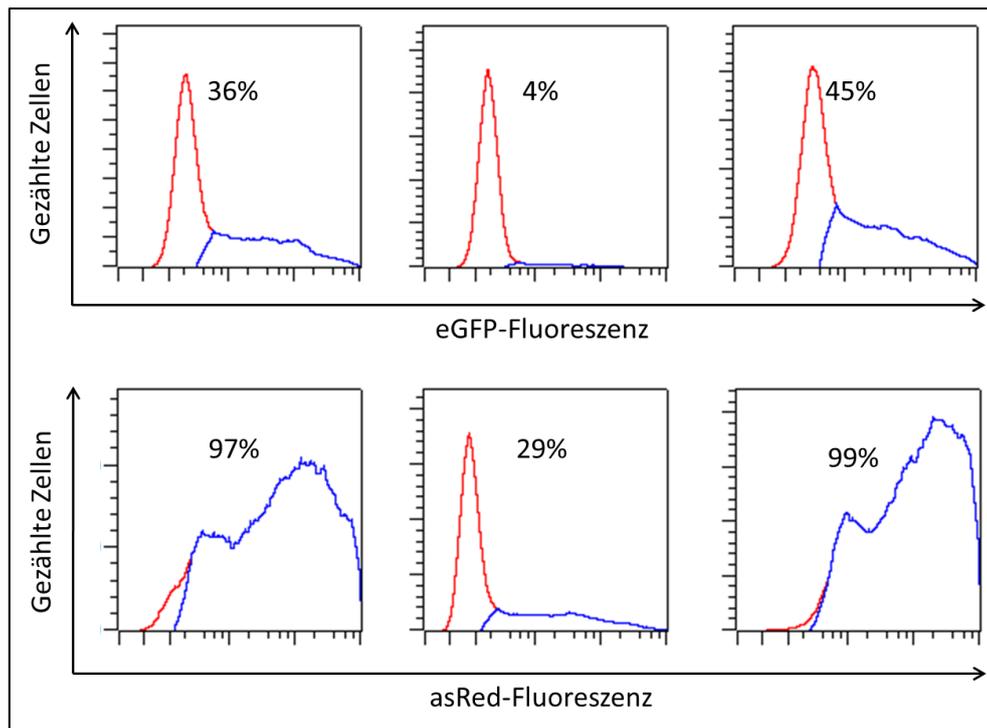


Abb. 65 Spezifische eGFP- und asRed-Fluoreszenz der mit C-Check_Exon10 transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung. In rot ist die negative Population, in blau die positive Population dargestellt. Der dargestellte Wert zeigt den prozentualen Anteil an fluoreszierenden Zellen an.

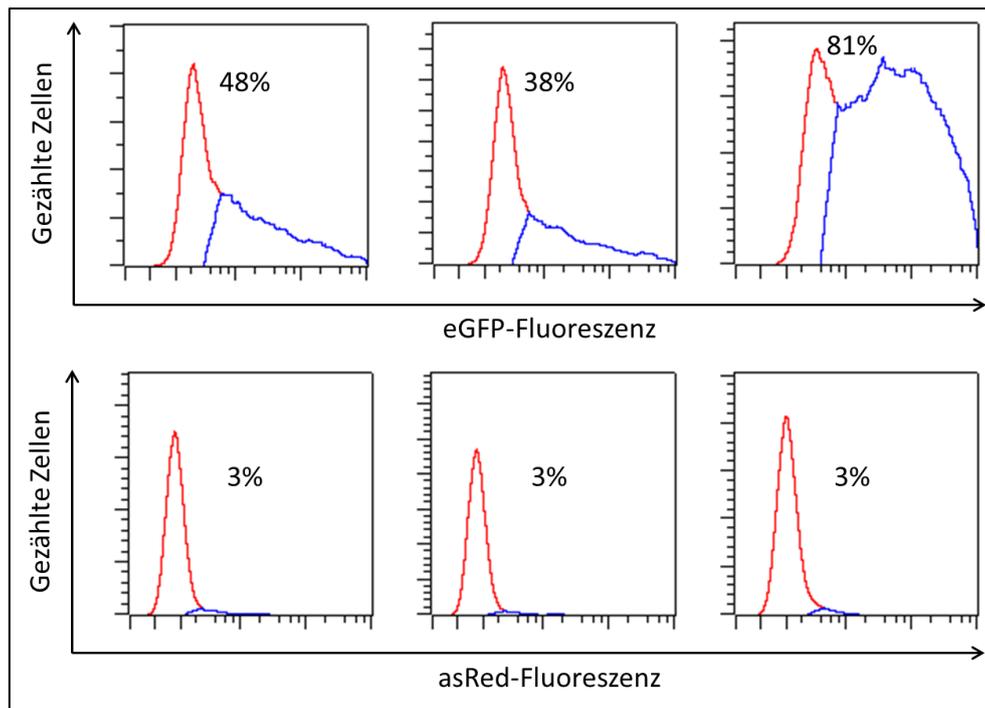


Abb. 66: Spezifische eGFP- und asRed-Fluoreszenz der mit pX458Faex7 transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung. In rot ist die negative Population, in blau die positive Population dargestellt. Der dargestellte Wert zeigt den prozentualen Anteil an fluoreszierenden Zellen an.

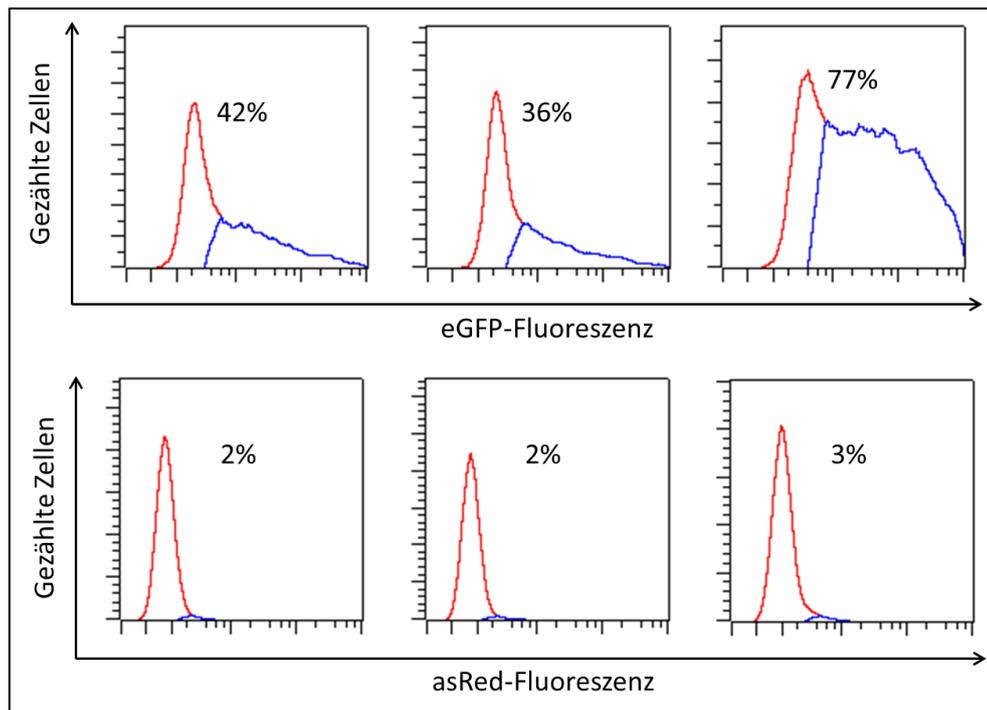


Abb. 67: Spezifische eGFP- und asRed-Fluoreszenz der mit pX458Faex9 transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung. In rot ist die negative Population, in blau die positive Population dargestellt. Der dargestellte Wert zeigt den prozentualen Anteil an fluoreszierenden Zellen an.

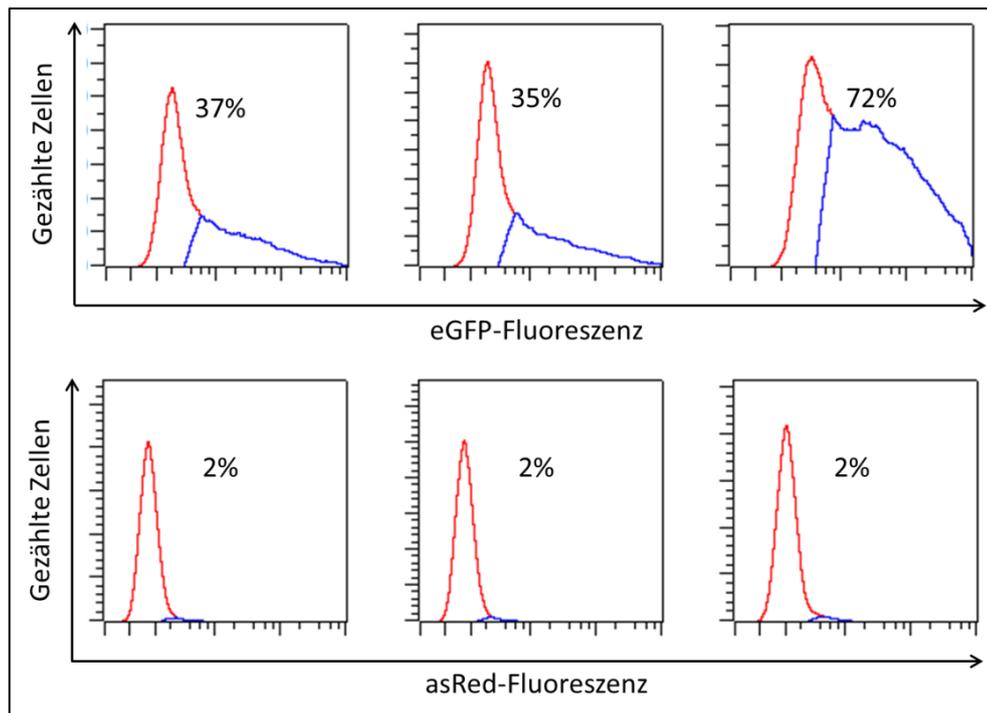


Abb. 68: Spezifische eGFP- und asRed-Fluoreszenz der mit pX458Faex10 transfizierten STE-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung. In rot ist die negative Population, in blau die positive Population dargestellt. Der dargestellte Wert zeigt den prozentualen Anteil an fluoreszierenden Zellen an.

9.3 Ungeschnittene Agarosegele der STE- und iPS-Zellen

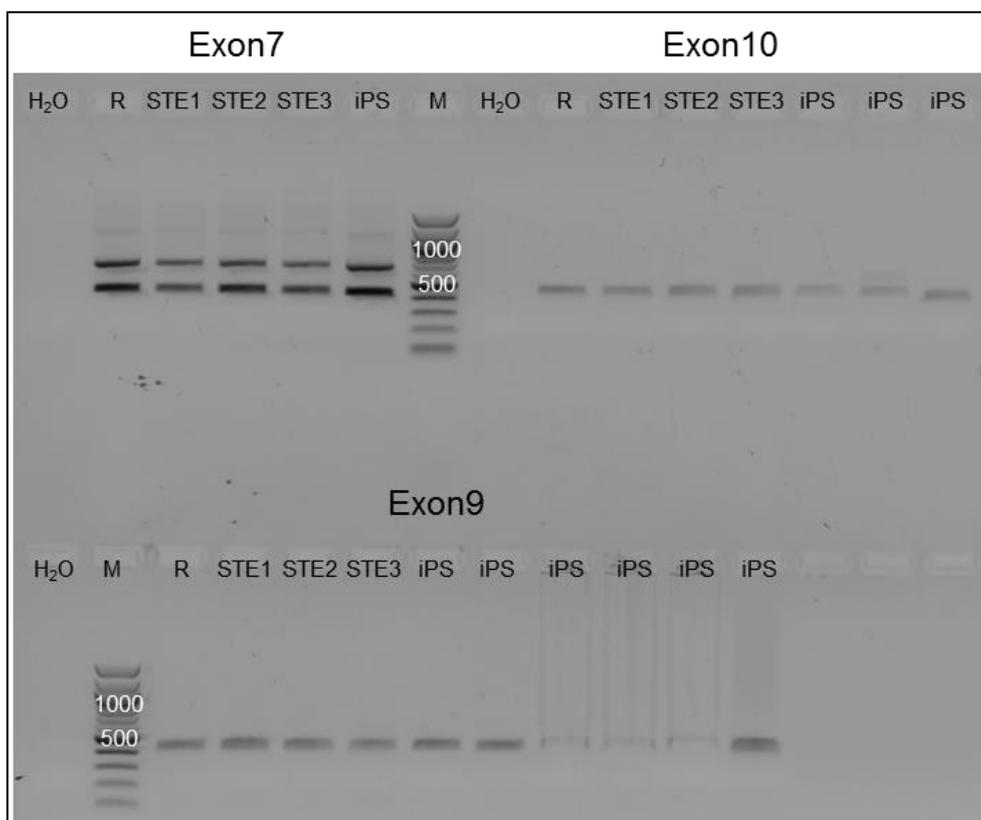


Abb. 69: Agarosegel zur PCR von STE- und iPS-Zellen (ungeschnitten). Dargestellt sind die Amplikons der lysierten Zellen, bei denen eine Transfektion durchgeführt wurde. Als negative Kontrolle wurde H_2O , als positiv Kontrolle eine unbehandelte Referenz-Probe verwendet. R: unbehandelte Referenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS: iPS-Zellen mit pX459 transfiziert, M: 100 bp Leiter.

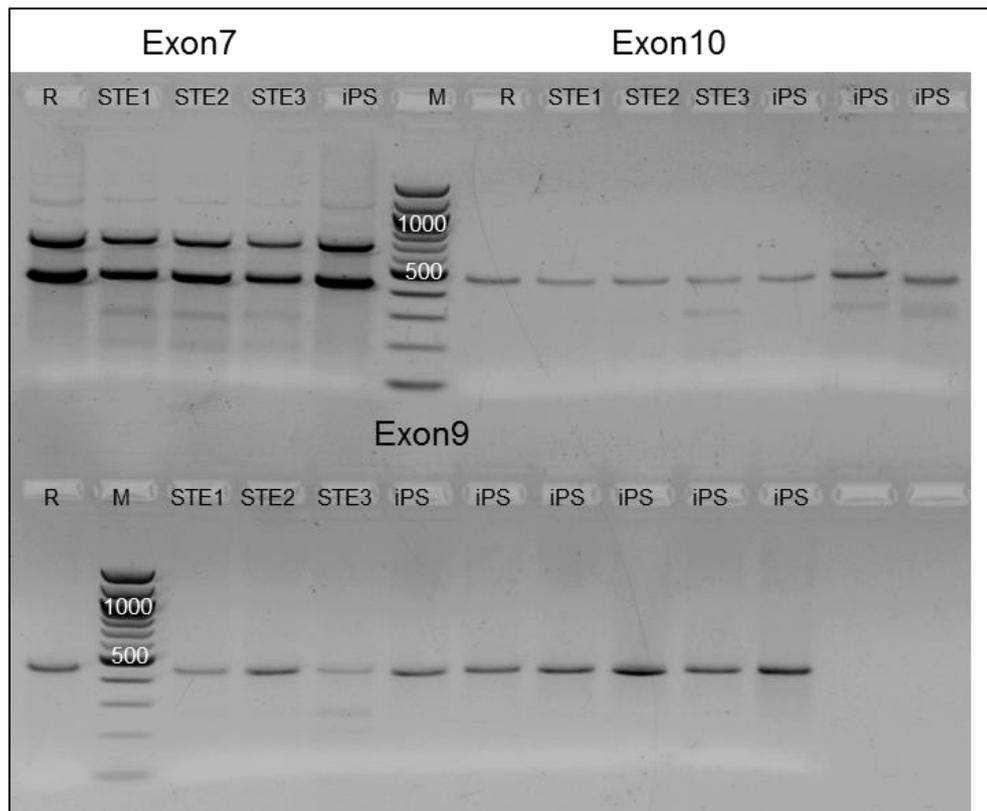


Abb. 70: Agarosegel zum T7-Assay von STE- und iPS-Zellen (ungeschnitten). Dargestellt sind die Amplikons der lysierten Zellen, bei denen eine Transfektion durchgeführt wurde. Als negative Kontrolle wurde eine unbehandelte Referenz-Probe verwendet. R: unbehandelte Referenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS: iPS-Zellen mit pX459 transfiziert, M: 100 bp Leiter.

9.4 Elektropherogramme der Off-Target-Analyse

9.4.1 Off-Targets der sgRNA für Exon7 des FANCA-Gens



Abb. 71: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 3 der sgRNA für Exon7. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon7 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS: iPS-Zellen mit pX459 transfiziert^[114].



Abb. 72: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 5 der sgRNA für Exon7. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon7 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS: iPS-Zellen mit pX459 transfiziert^[114].

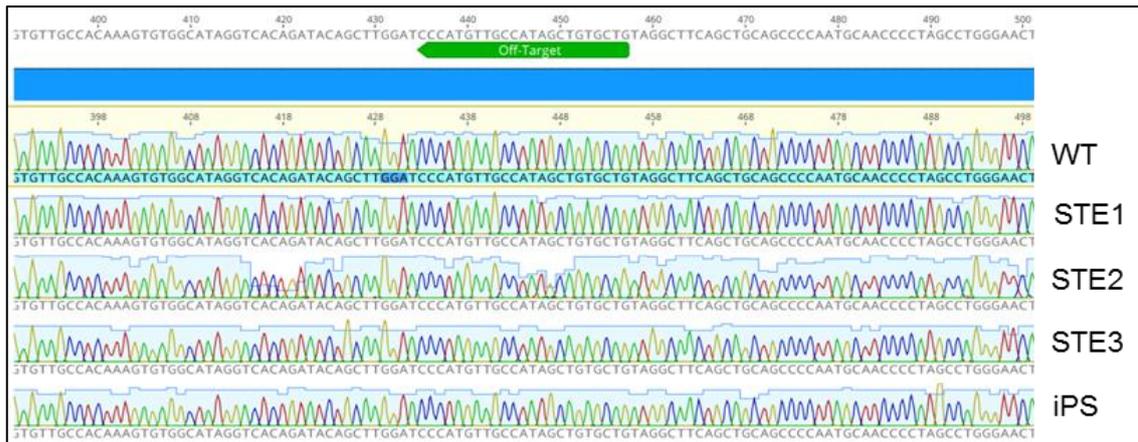


Abb. 73: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 6 der sgRNA für Exon7. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon7 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS: iPS-Zellen mit pX459 transfiziert^[114].

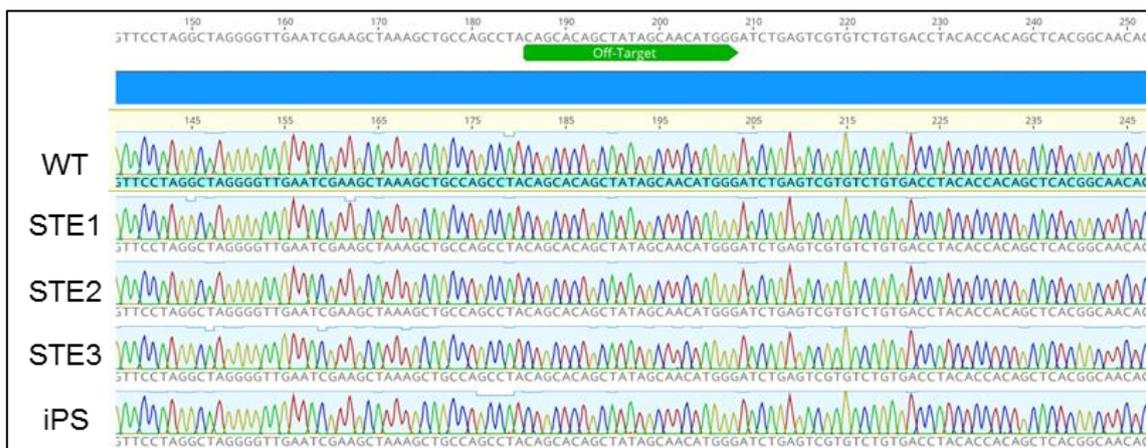


Abb. 74: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 7 der sgRNA für Exon7. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon7 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS: iPS-Zellen mit pX459 transfiziert^[114].



Abb. 75: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 9 der sgRNA für Exon7. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon7 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS: iPS-Zellen mit pX459 transfiziert^[114].

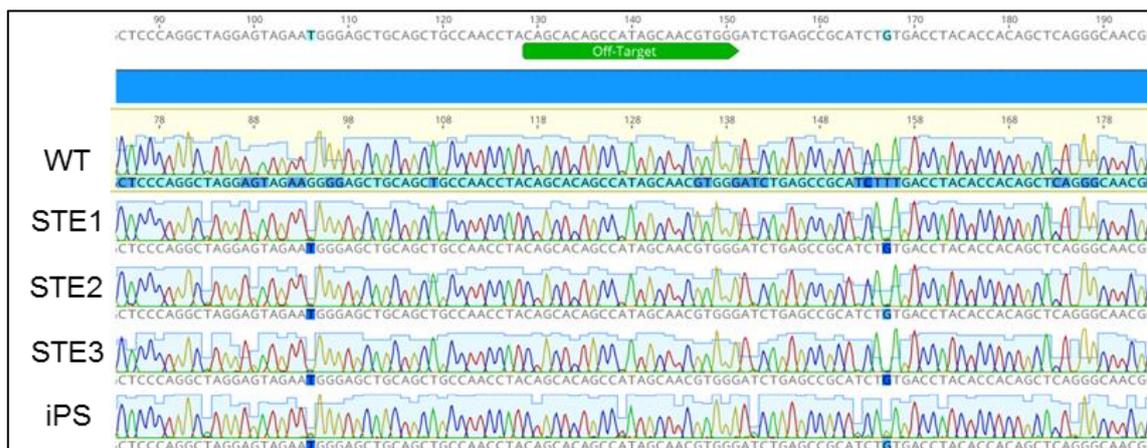


Abb. 76: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 10 der sgRNA für Exon7. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon7 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS: iPS-Zellen mit pX459 transfiziert^[114].

9.4.2 Off-Targets der sgRNA für Exon9 des FANCA-Gens



Abb. 77: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 1 der sgRNA für Exon9. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon9 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS 1-6: sechs unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].



Abb. 78: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 2 der sgRNA für Exon9. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon9 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS 1-6: sechs unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].



Abb. 79: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 3 der sgRNA für Exon9. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon9 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS: iPS 1-6: sechs unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].



Abb. 80: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 5 der sgRNA für Exon9. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon9 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS 1-6: sechs unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].



Abb. 81: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 6 der sgRNA für Exon9. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon9 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS 1-6: sechs unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].



Abb. 82: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 7 der sgRNA für Exon9. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon9 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS 1-6: sechs unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].

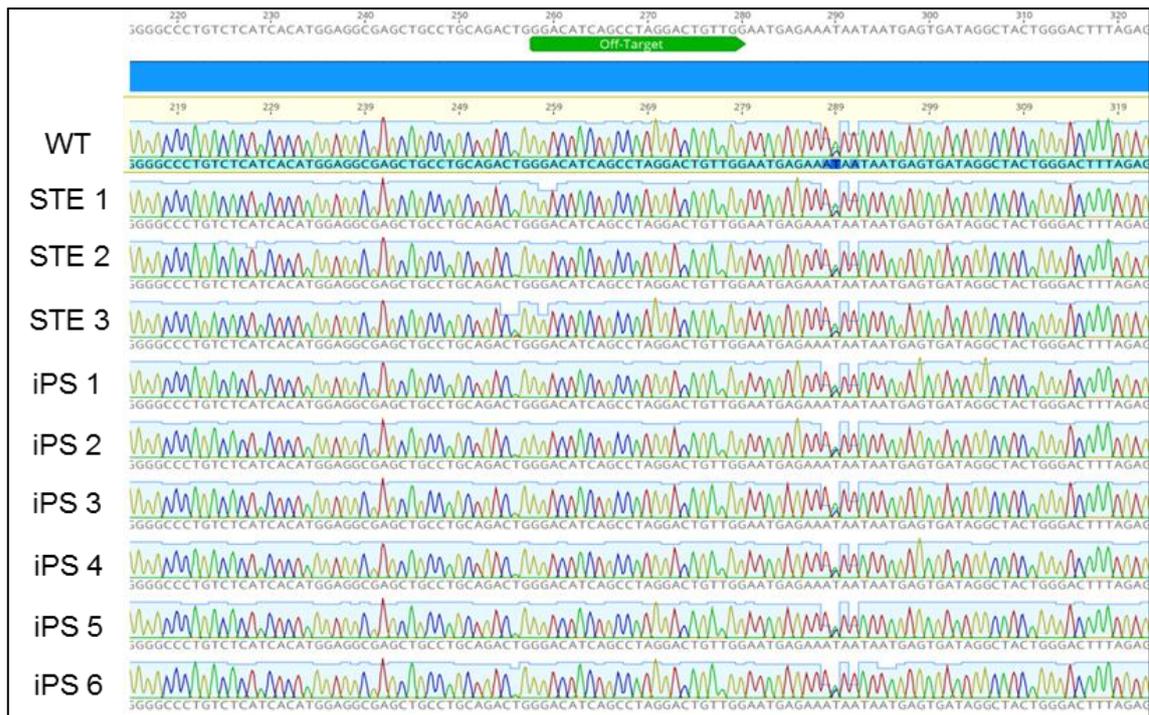


Abb. 83: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 8 der sgRNA für Exon9. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon9 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS 1-6: sechs unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].



Abb. 84: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 9 der sgRNA für Exon9. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon9 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS 1-6: sechs unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].

9.4.3 Off-Targets der sgRNA für Exon10 des FANCA-Gens



Abb. 85: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 1 der sgRNA für Exon10. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon10 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS 1-3: drei unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].



Abb. 86: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 2 der sgRNA für Exon10. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon10 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS 1-3: drei unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].



Abb. 87: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 4 der sgRNA für Exon10. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon10 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS 1-3: drei unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].



Abb. 88: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 6 der sgRNA für Exon10. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon10 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS 1-3: drei unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].



Abb. 89: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 7 der sgRNA für Exon10. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon10 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS 1-3: drei unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].



Abb. 90: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 8 der sgRNA für Exon10. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon10 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS 1-3: drei unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].

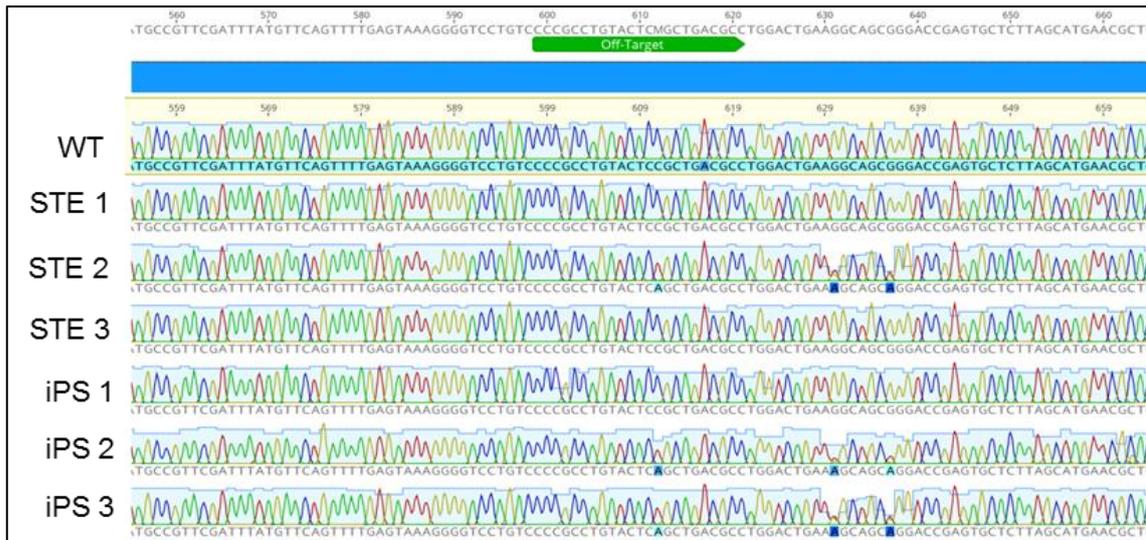


Abb. 91: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 9 der sgRNA für Exon10. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon10 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS 1-3: drei unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].



Abb. 92: Elektropherogramm der Off-Target-Sequenz 10 der sgRNA für Exon10. In grün ist die Off-Target Sequenz dargestellt, die von der sgRNA für Exon10 anvisiert werden kann. WT: Referenz-Sequenz, STE 1: mit C-Check transfizierte STE-Zellen, STE 2: mit pX458 transfizierte STE-Zellen, STE 3: mit pX459 transfizierte STE-Zellen, iPS 1-3: drei unterschiedliche iPS-Zellkulturen mit pX459 transfiziert^[114].

Danksagung

Ich danke,

- ... Prof. Dr. Wilfried Kues für die Betreuung meiner Thesis und den Hilfestellungen, wenn ich einmal nicht weiter wusste.
- ... Prof. Dr. Heiner Niemann für die Möglichkeit, meine Thesis am Friedrich-Loeffler-Institut in Mariensee durchführen zu können.
- ... Prof. Dr. Maren von Köckritz-Blickwede und Prof. Dr. Reinhard Schwinzer für die Co-Betreuung meiner Thesis.
- ... meinen Freunden, die mich in den Jahren der Doktorarbeit unterstützt, motiviert und abgelenkt haben. Besonders meinen liebsten Freunden Caro, Bene, Thoren und Anna möchte ich meinen größten Dank aussprechen für ihre unermüdliche Geduld mit mir.
- ... meinen Kollegen, Hendrik, Birgit, Maren und Steffi, die mein Klagen bei Tee und Kuchen ertragen haben, mir aber immer Zuversicht zusprachen.
- ... dem Arbeitskreis Biotechnologie, insbesondere dem Klon-Team, für ihre Unterstützung und Hilfe.
- ... Frau Engelmann, die mir in meiner schwersten Zeit beigestanden hat und mir zeigte, dass mein Leben mehr wert ist, als ich annahm.
- ... meiner Familie, die immer davon überzeugt war, dass ich nicht nur mein Studium, sondern auch meine Doktorarbeit meistern werde.
- ... all denen, die hier bisher nicht explizit erwähnt habe. Ich danke euch allen, dass ihr an mich geglaubt habt, wenn ich es nicht mehr tat.