

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. Steffen Emmert

Die Generierung sowie Charakterisierung eines
CRISPR/Cas9-vermittelten Knockouts von *SNAP29* in
humanen Fibroblasten

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der

Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Marie Christine Martens

geboren am 12.01.1992 in Lübeck

Rostock 2020

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002975

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Steffen Emmert

Einrichtung: Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie,
Universitätsmedizin Rostock

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Jorge Frank

Einrichtung: Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie,
Universitätsmedizin Göttingen

Drittgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Brigitte Pützer

Einrichtung: Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung,
Universitätsmedizin Rostock

Datum der Verteidigung: 27.10.2020

Datum der Verleihung des akademischen Grad Dr. med. : 25.01.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Liste der Tabellen	VI
Liste der Abbildungen	VII
Abkürzungen	IX
Zusammenfassung.....	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 Ichthyosen	1
1.2 CEDNIK-Syndrom	2
1.3 SNAP29 als SNARE-Protein	4
1.3.1 Funktionelle und strukturelle Domänen der SNAREs.....	4
1.3.2 Mechanismus der SNARE-abhängigen Vesikelfusion	5
1.4 SNAP29 und das CEDNIK-Syndrom	5
1.4.1 Auswirkungen des <i>SNAP29</i> -Knockout beim CEDNIK-Syndrom.....	6
1.4.2 CEDNIK-Syndrom im Modellorganismus Maus	6
1.5 Genomeditierung mit CRISPR/Cas9	7
1.5.1 CRISPR/Cas9-Methode	7
1.5.2 DNA-Reparatur nach DSB	8
1.5.3 Limitationen der CRISPR/Cas9-Methode	9
1.6 Lentivirale Vektoren	9
1.6.1 Aufbau der Lentiviren	9
1.6.2 Anwendung von lentiviralen Vektoren in der Forschung.....	10
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2 Material.....	14
2.1 Zelllinien und Bakterien.....	14
2.1.1 Zelllinien.....	14
2.1.2 Bakterien.....	14
2.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.3 Geräte.....	16

2.4	Chemikalien	17
2.5	Puffer, Lösungen und Zellkulturmedium	18
2.6	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	20
2.7	Oligonukleotide.....	20
2.8	Plasmide	22
2.9	Enzyme.....	22
2.10	Antikörper	22
2.11	Software und Online-Werkzeuge	23
3	Methoden	25
3.1	Molekularbiologie.....	25
3.1.1	Ethanol-fällung	25
3.1.2	Quantifizierung der DNA-Konzentrationen.....	25
3.1.3	DNA-Gewinnung	25
3.1.3.1	Isolation genomischer DNA	25
3.1.3.2	Amplifikation und Isolation von Plasmid-DNA.....	25
3.1.3.3	Agarose-Gelelektrophorese (AGE)	26
3.1.3.4	DNA-Extraktion aus einem Agarosegel.....	26
3.1.4	Enzymatische Manipulation von DNA	26
3.1.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
3.1.4.2	Plasmiddephosphorylierung und Oligonukleotidphosphorylierung.....	27
3.1.4.3	Restriktionsverdau von DNA und Generierung von CRISPR/Cas9-Konstrukten.....	28
3.1.4.4	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	28
3.1.4.5	T7EI-Assay	29
3.2	Mikrobiologie.....	30
3.2.1	Sterilisierung und Autoklavierung	30
3.2.2	Generierung von chemisch kompetenten <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) DH5 α	30
3.2.3	Transformation von <i>E.coli</i> DH5 α und Stb13.....	30
3.3	Zellbiologie.....	31
3.3.1	Zellkulturtechniken	31

3.3.1.1	Kultur immortalisierter Zelllinien.....	31
3.3.1.2	Zellen zählen	31
3.3.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	32
3.3.1.4	Transiente Transfektion mit CRISPR/Cas9 und pLJM1-EGFP	32
3.3.1.5	Transiente Transfektion der C5N-Keratinocyten: Weitere Protokolle	32
3.3.1.6	Produktion lentiviraler Vektoren	32
3.3.1.7	Lentivirale Transduktion	34
3.3.1.8	Einzelklonexpansion.....	34
3.3.2	Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie.....	34
3.3.3	Durchflusszytometrie.....	35
3.4	Biochemische Methoden	35
3.4.1	Präparation von Proteinlysaten.....	35
3.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	36
3.4.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
3.4.4	Western Blot	36
3.4.5	Membran-„Stripping“	37
3.5	Statistische Analyse	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Arbeitsablauf zur Generierung eines CRISPR/Cas9-vermittelten KO von <i>Snap29</i> in immortalisierten murinen Keratinocyten.....	38
4.1.1	Methodische Exploration verschiedener Transfektionsverfahren.....	38
4.1.2	Erstellung der sgRNA-Konstrukte und Wirksamkeit in vivo.....	43
4.2	Erstellung eines <i>Snap29</i> ^{+/-} -Klons in immortalisierten murinen Keratinocyten mittels Transfektion	45
4.2.1	Sequenzierung eines monoklonalen <i>Snap29</i> ^{+/-} -Klons	45
4.2.2	T7EI-Assay zur Bestätigung der DNA-Modifikation.....	47
4.2.3	Nachweis von SNAP29 zur Analyse der Auswirkung der DNA-Modifikation.....	48
4.3	Vergleich der Effizienz von Transfektion und lentiviraler Transduktion	49
4.3.1	Produktion von Lentiviren	49
4.3.2	Vergleich der lentiviralen Transduktion in Zelllinien verschiedener Spezies.....	52

4.3.3	Vergleich der lentiviralen Transduktionseffizienz und der Transfektionseffizienz zwischen humanen und murinen Zelllinien.....	53
4.4	Lentivirale Transduktion zur Generierung eines CRISPR/Cas9 vermittelten KO	56
4.4.1	CRISPR/Cas9 vermittelter KO durch lentiviral transduziertes sgRNA-Konstrukt A0 in C5N-Keratinocyten nicht erfolgreich.....	56
4.4.2	CRISPR/Cas9 vermittelter KO durch lentiviral transduziertes sgRNA-Konstrukt human_A0 in MRC5Vi-Fibroblasten.....	56
5	Diskussion.....	60
5.1	Generierung von humanen <i>SNAP29</i> -KO Fibroblasten mittels CRISPR/Cas9.....	60
5.2	Produktion von murinen <i>Snap29</i> ^{+/-} -Keratinocyten mittels CRISPR/Cas9.....	61
5.3	Bedeutung einer <i>SNAP29</i> -defizienten Zelllinie für die Forschung.....	62
5.4	Permanente Veränderungen durch lentivirale Transduktion.....	64
5.5	Lentivirale Transduktionseffizienz ist speziesabhängig.....	64
5.6	Lentivirale Transduktion ist effizienter als Transfektion.....	65
5.7	Reduktion der <i>off-target</i> Effekte der CRISPR/Cas9-Methode.....	66
5.8	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	66
6	Quellen.....	67
7	Anhang.....	74
7.1	Selbstständigkeitserklärung.....	74
7.2	Lebenslauf.....	75
7.3	Liste der Publikationen.....	76
7.4	Publizierte Vorträge und Poster (Abstracts).....	77
7.5	Sonstige Vorträge und Posterpräsentationen.....	77
7.6	Danksagungen.....	79
7.7	Thesen.....	80

Liste der Tabellen

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien	14
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	15
Tabelle 3: Geräte.....	16
Tabelle 4: Chemikalien	17
Tabelle 5: Puffer, Lösungen und Zellkulturmedium	18
Tabelle 6: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	20
Tabelle 7: PCR-Primer	20
Tabelle 8: sgRNA-Oligonukleotide	21
Tabelle 9: Plasmide	22
Tabelle 10: Enzyme	22
Tabelle 11: Primärantikörper.....	22
Tabelle 12: Sekundärantikörper	23
Tabelle 13: Software und Online-Werkzeuge.....	23
Tabelle 14: PCR-Mastermix (A) und PCR-Programm (B) für den Thermocycler	27
Tabelle 15: Sequenzierungsansatz (A) und Sequenzierungsprogramm (B).....	29
Tabelle 16: Weitere Transfektionsansätze zur lentiviralen Vektorproduktion	33
Tabelle 17: Virenverdünnungen zur Transduktion	33

Liste der Abbildungen

Abbildung 1: Klinisches Spektrum des CEDNIK-Syndroms (modifiziert nach Sprecher et al. 2005).	2
Abbildung 2: Struktur von SNAREs und ihre Komplexbildung (modifiziert nach Jahn and Scheller 2006 und Seebode 2015).	5
Abbildung 3: Durch das CRISPR/Cas9-System induzierte Doppelstrangbrüche (DSB) und ihre Reparatur durch „non-homologous end-joining“ (NHEJ) oder Homologie-geleitete Reparatur (HDR) (modifiziert nach Doudna and Charpentier 2014)	8
Abbildung 4: Genom der Lentiviren und Konstrukte der in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Vektoren.	12
Abbildung 5: Arbeitsablauf zur Generierung eines CRISPR/Cas9-vermittelten Snap29 KO in C5N-Keratinocyten.....	39
Abbildung 6: Vergleich verschiedener Transfektionsverfahren in C5N-Keratinocyten nach Transfektion mit einem EGFP-Plasmid.....	41
Abbildung 7: Vergleich verschiedener ViaFect™-Verhältnisse bei der Transfektion der C5N-Keratinocyten mit einem EGFP-Plasmid.....	42
Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung von SNAP29 in C5N-Keratinocyten nach Transfektion mit den generierten sgRNA-Konstrukten A0 bis A4 und Puromycinselektion. ..	44
Abbildung 9: Sequenzierung der polyklonalen Zellpopulation C5N A0 im Vergleich zu C5N WT.....	46
Abbildung 10: Sequenzierung des heterozygoten Klons C5N A0_10 im Vergleich zum C5N WT und Analyse der Allelsequenzen.	46
Abbildung 11: Nachweis des heterozygoten KO im C5N A0_10 Klon auf Proteinebene im Vergleich zum C5N WT	47
Abbildung 12: T7EI-Assay des Klons A0_10 im Vergleich zum WT.....	48
Abbildung 13: Western Blot und Immunfluoreszenz des Klons A0_10 im Vergleich zum WT bzw. primären Mausmodellfibroblasten (T-MEF).....	49
Abbildung 14: Konfluenzbestimmung von HEK293T-Zellen (A) ohne Virenproduktion und (B) mit Virenproduktion.	51
Abbildung 15: Virusproduktion nach Transfektion mit Attractene in verschiedenen Plasmidverhältnissen mit EGFP-Kontrollvektor.	52
Abbildung 16: Transduktionseffizienz verschiedener bekannter Zelllinien aus Mensch, Maus und Hamster nach Transduktion mit pLJM1-EGFP tragenden Lentiviren unter dem Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 96 Stunden.....	54
Abbildung 17: Bestimmung der Effizienz lentiviraler Transduktion mit verschieden stark verdünnten Virussuspensionen im Vergleich zur Effizienz zweier Transfektionsreagenzien (Attractene und ViaFect™) mittels Durchflusszytometrie.....	55

Abbildung 18: Vergleich der humanen und murinen DNA-Sequenzen des kodierenden Abschnitts des Exon 1 von SNAP29 (human) und Snap29 (murin).....	57
Abbildung 19: Sanger-Sequenzierung sowie Sequenzanalyse eines SNAP29-KO Klons (hS10_03) im Vergleich zum WT	58
Abbildung 20: Nachweis von SNAP29 mittels Western Blot in MRC5Vi WT und KO.....	59
Abbildung 21: Zelldichte der WT- und KO-Fibroblasten bei gleicher Anfangsdichte	59

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AUS	Australien
BCC	Basalzellkarzinom
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
Cas	CRISPR-assoziiert
CEDNIK	<i>Cerebral Dysgenesis, Neuropathy, Ichthyosis, Keratoderma</i>
CIP	Calf intestinal alkaline phosphatase
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COP I/II	<i>Coat protein I/II</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats</i>
crRNA	CRISPR-RNA
D	Deutschland
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	<i>Double stranded DNA</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHD1	<i>Eps15 homology domain-containing protein 1</i>
EMC	<i>Enzyme mismatch cleavage</i>
EGFP	<i>Enhanced Green-Fluorescent Protein</i>
engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kalbserum
FIN	Finnland
fwd	<i>Forward</i>
G	Guanin

GliR	Gli-Repressor
HDR	<i>Homology directed repair</i>
Hh	Hedgehog
hiFCS	Hitzeinaktiviertes FCS
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
JPN	Japan
KO	<i>Knockout</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LDLR	LDL-Rezeptor
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
LUX	Luxemburg
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mm ²	Quadratmillimeter
mM	Millimolar
ml	Milliliter
mol	Mol
MRT	Magnetresonanztomographie
NHEJ	<i>Non-homologous end-joining</i>
nm	Nanometer
N	Beliebiges Nukleotid
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PES	Polyethersulfon
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
Ptch1	Patched1
PuroR	Puromycinresistenzkassette
rev	<i>Reverse</i>
RPE	<i>Retinal Pigment Epithelium</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RSV	Rous-Sarkom-Virus
s	Sekunde/Sekunden

SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Shh	Sonic Hedgehog
SIN	Selbst-inaktivierend
Smo	Smoothened
SNAP	<i>Soluble NSF attachment proteins</i>
SNARE	SNAP-Rezeptor
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
ssRNA	<i>Single stranded RNA</i>
T	Thymidin
T7EI	T7 Endonuklease I
TAL	<i>Transcription activator-like</i>
TALEN	TAL Effektor-Nukleasen
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TFA	Trifluoressigsäure
tracrRNA	Transaktivierenden crRNA
TRC	<i>The RNAi Consortium</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
UK	Vereinigtes Königreich
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
VSV	Vesikulärer Stomatitis-Virus
WT	Wildtyp
ZFN	Zinkfinger-Nuklease

Zusammenfassung

Eine *loss-of-function* Mutation im *SNAP29* Gen führt im Menschen zu dem seltenen, neurokutanen, autosomal-rezessiv vererbten CEDNIK (engl.: *Cerebral Dysgenesis, Neuropathy, Ichthyosis, Keratoderma*)-Syndrom. SNAP29 ist ein SNARE (*Soluble NSF Attachment Protein [SNAP] Receptor*)-Protein, das in Membranfusion, epidermale Differenzierung, primäre Zilienbildung und Autophagie involviert ist. Obwohl die Arbeitsgruppe bereits die weltweit ersten zwei *Snap29-Knockout* (KO)-Mausmodelle generiert und charakterisiert hat, die den ichthyotischen Phänotyp des humanen CEDNIK-Syndroms widerspiegeln, gibt es bisher keine immortalisierte Zelllinie zur Tiermodell-unabhängigen Erforschung der Funktionen von SNAP29. Um eine immortalisierte SNAP29-defiziente Zelllinie zu generieren, wurde die CRISPR/Cas9-Methode verwendet.

Während dieser Arbeit wurde zunächst versucht, ein *Snap29-KO* in immortalisierten murinen Keratinozyten (C5N) zu erzeugen. Dafür wurden verschiedene sgRNAs erstellt und in ein CRISPR/Cas9-Plasmid, das für die Endonuklease Cas9, eine Ampicillinresistenz und eine Puromycinresistenz kodiert, integriert. Obwohl eine heterozygote *Snap29^{+/-}*-Zelllinie (Modifikation eines Allels: c.180delG) durch Transfektion mit einem CRISPR/Cas9-Plasmid, das Exon 1 von *Snap29* angreift, generiert werden konnte, wurde kein vollständiger KO in den murinen Keratinozyten erreicht.

Da ein Zusammenhang mit der Transfektionseffizienz von murinen Keratinozyten vermutet wurde, wurden zwei verschiedene Transfektionsreagenzien mit der neu etablierten Methode der lentiviralen Transduktion in ihrer Effizienz verglichen. Dafür wurden die Zellen mit *EGFP*-Plasmiden transfiziert oder mit lentiviralen Vektoren, die eine *EGFP*-Kassette beinhalteten, behandelt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die lentivirale Transduktion effizienter als die Plasmid-Transfektion angewendet werden konnte. Zudem wurden mit der lentiviralen Transduktion höhere Transduktionseffizienzen bei humanen Zelllinien als bei murinen Zelllinien erzielt. Insbesondere wurde die Transduktionseffizienz der immortalisierten humanen Fibroblastenzelllinie MRC5Vi gegenüber der C5N-Zelllinie untersucht. Hier zeigte sich ein signifikant höherer Prozentsatz an EGFP-positiven Zellen bei den MRC5Vi-Zellen.

Da ein *SNAP29-KO* in humanen Zellen im Vergleich zu murinen Zellen für funktionelle Untersuchungen zu bevorzugen ist, wurden im Folgenden humane MRC5Vi-Fibroblasten mit einem CRISPR/Cas9-Plasmid transduziert, welches Exon 1 von *SNAP29* angreift. Die Zielsequenz entsprach positionell dem 80 % übereinstimmenden murinen Genabschnitt. Mit Hilfe dieses Plasmids konnte eine homozygote *SNAP29-KO*-Zelllinie (c.169_196delinsTTCGT) erzeugt werden. Der KO wurde sowohl durch Sanger-Sequenzierung als auch durch Western Blot nachgewiesen.

Damit konnte erfolgreich eine humane *SNAP29*-KO-Zelllinie generiert werden, die nun zur weiteren Erforschung der Funktionen von SNAP29, insbesondere bezüglich dessen Einfluss auf die Ziliogenese, den Sonic hedgehog- und den Notch-Signalweg und die Autophagie, untersucht werden kann.

1 Einleitung

1.1 Ichthyosen

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie besteht aus der avaskulären verhornten Epidermis, der darunter liegenden bindegewebigen Dermis und der Subkutis. Embryologisch betrachtet entsteht die Epidermis aus dem Ektoderm, die Dermis und Subkutis hingegen sind mesodermalen Ursprungs (Kanitakis 2001; Welsch et al. 2014). Durch eine komplexe, terminale Differenzierung der Keratinozyten, den Hauptzellen der Epidermis, entstehen Korneozyten, die durch Desmosomen verbunden sind und von einer Hüllschicht aus Proteinen und Lipiden umgeben sind. Zusammen mit interzellulären Lipiden bilden sie als äußerste Schicht der Epidermis – dem *Stratum corneum* – eine wirksame Barriere gegen physikalische, mechanische und chemische Schäden und schützen vor transepidermale Wasserungsverlust (Kalinin et al. 2002; Kanitakis 2001; Proksch et al. 2008). Neben den Keratinozyten befinden sich auch Immunzellen wie Langerhanszellen und epidermale dendritische T-Zellen in der Epidermis. Zusammen mit Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems der Dermis und humoralen Faktoren des Immunsystems stellen sie eine effektive Immunabwehr dar (Proksch et al. 2008; Tay et al. 2014).

Epidermale Differenzierungsstörungen können zu Verhornungsstörungen führen. Eine stark heterogene Gruppe an Verhornungsstörungen stellen die Ichthyosen dar. Trotz ihrer unterschiedlichen Ätiologie und klinischen Erscheinungsformen gehen sie immer mit einer gestörten Differenzierung und Abschilferung der Epidermis einher, was zu einer gestörten Barrierefunktion der Haut führt (Akiyama 2011; Richard 2004). Epidermale Barriestörungen sind häufig mit einem gestörten Lipidmetabolismus oder Proteinddefekten der Epidermis assoziiert (Madison 2003). Somit ist es nicht verwunderlich, dass Gene, die bei Ichthyosen betroffen sind, in den epidermalen Lipidmetabolismus und die Bildung der verhornten Hüllschicht involviert sind (z.B. Transglutaminasen, Loricrin und Filaggrin). Weitere Störungen bei Ichthyosen betreffen den Proteinkatabolismus, die Peroxisomen und die Nukleotidexzisionsreparatur (Akiyama 2011; Richard 2004).

Klinisch zeigen sich Ichthyosen als eine Kombination aus trockener Haut, Schuppung, Hyperkeratosen und bei manchen Formen Erythrodermie und betreffen die gesamte oder einen Großteil der Haut. Durch die Erste Ichthyosis Konsensus Konferenz in Sorèze 2009 wurden die angeborenen Ichthyosen in syndromale und nicht-syndromale Formen unterteilt. Zu den nicht-syndromalen Formen zählt somit unter anderem die *Ichthyosis vulgaris* und die Harlequin-Ichthyose. Syndromale Formen umfassen das Sjögren-Larsson-Syndrom (Symptomkomplex aus unter anderem generalisierte Schuppung mit stärkster Ausprägung am Rumpf und Nacken, Pruritus, Paraplegie und mentaler Retardierung), das MEDNIK-

Syndrom (englisches Akronym der zugehörigen Symptome: mentale Retardierung [*Mental retardation*], Enteropathie [*Enteropathy*], Taubheit [*Deafness*], Neuropathie [*Neuropathy*], Ichthyose [*Ichthyosis*], Keratose [*Keratoderma*]) und das CEDNIK-Syndrom (Oji et al. 2010; Takeichi & Akiyama 2016).

1.2 CEDNIK-Syndrom

Das CEDNIK-Syndrom (OMIM: 609528) ist eine autosomal-rezessive neurokutane Erkrankung, die 2005 von Eli Sprecher und Mitarbeiter zum ersten Mal beschrieben wurde. Das englische Akronym CEDNIK beschreibt einen für diese Erkrankung typischen Symptomkomplex aus zerebraler Dysgenese (*CE*rebral *D*ysgenesis), Neuropathie (*N*europathy), Ichthyose (*I*chthyosis) und Palmoplantarkeratose (*K*eratoderma) (Sprecher et al. 2005). Palmoplantarkeratose bezeichnet eine Verdickung der Haut an den Handflächen und Fußsohlen (Itin & Fistarol 2005).

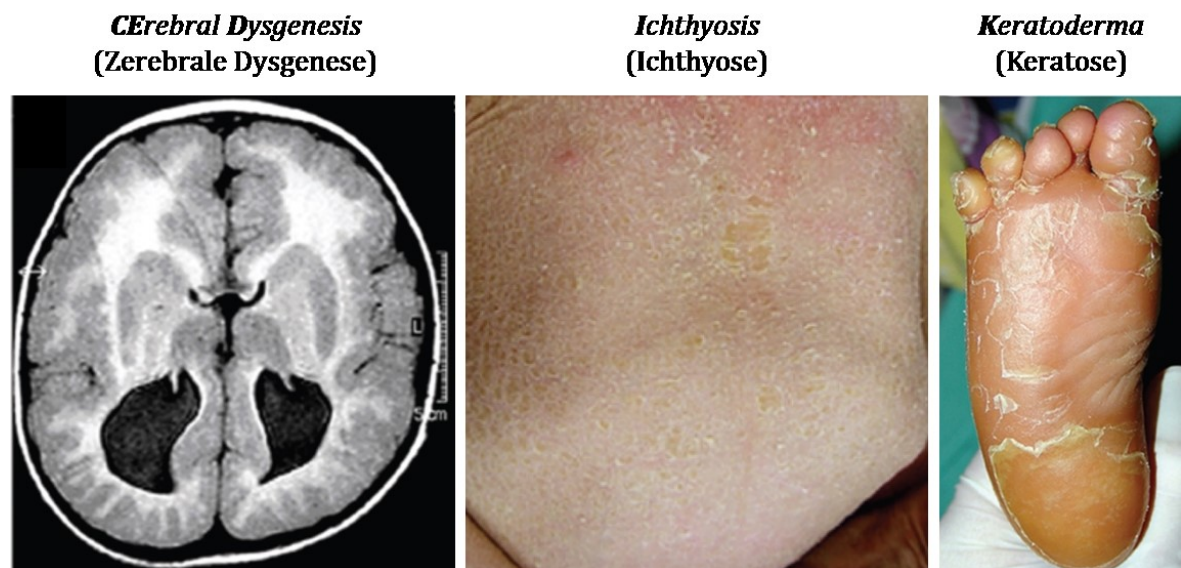


Abbildung 1: Klinisches Spektrum des CEDNIK-Syndroms (modifiziert nach Sprecher et al. 2005) Zu den klinischen Zeichen des CEDNIK-Syndroms gehören kortikale Dysplasie sowie ein abnormales *Corpus callosum*, hier sind Pachygyrie mit Mikrogyrie und Fehlen des *Corpus callosum* (Magnetresonanztomographie-Aufnahmen) zu sehen, eine Verdickung der plantaren Haut (Keratose) und Ichthyose, hier lamellare Ichthyose der Bauchhaut.

Durch Studie zweier blutsverwandter israelischer Familien, in denen insgesamt sieben betroffene Individuen auftraten, konnte das Symptombild und der Verlauf der Erkrankung beschrieben und der genetische Hintergrund ermittelt werden (Sprecher et al. 2005).

Die Patienten wurden nach unauffälliger Schwangerschaft reif mit einem normalen APGAR-Wert und normalem Gewicht geboren, entwickelten in den ersten vier Lebensmonaten jedoch erste Symptome. Unter anderem fielen eine langsame, konjugierte, laterale Augenbewegung („*roving eye movement*“) und Gedeihstörungen auf (Sprecher et al. 2005). „*Roving eye movements*“ treten unter anderem bei Komapatienten auf und weisen darauf hin, dass der

Nervus oculomotorius (III. Hirnnerv) intakt und das Koma toxischer, metabolischer oder bilateral hemisphärischer Genese ist (Bateman 2001). Des Weiteren wurde bei allen Patienten eine progrediente Mikrozephalie und ein fazialer Dysmorphismus festgestellt. Der faziale Dysmorphismus prägte sich in einer antimongoloiden Lidachse (Abfall der Lidspalte nach temporal unten), leichtem okulären Hypertelorismus (vergrößerter Augenabstand) und einer flachen Nasenwurzel aus. Ab dem 5.-11. Lebensmonat traten eine Palmoplantarkeratose und eine Ichthyose auf, die sich während des zweiten Lebensjahres progressiv verschlechterte (*Abbildung 1*). In der weiteren Entwicklung wurde eine psychomotorische Retardierung festgestellt. Muskeleigenreflexe konnten nicht hervorgerufen werden. Muskelbiopsien wiesen eine neurogene Atrophie mit normaler Funktion der mitochondrialen Atmungskette auf. Weitere Untersuchungen ergaben eine hypoplastische Sehnervenscheibe und deuteten auf eine makuläre Atrophie hin. Bei einigen Patienten konnte eine leichte sensorineurale Taubheit nachgewiesen werden. Magnetresonanztomographie(MRT)-Aufnahmen des Gehirns einiger Patienten zeigten ein abnormales *Corpus callosum* und kortikale Dysplasie, die sich in Pachygyrie (reduzierte Gyrierung mit verdickten/vergrößerten Hirnwindungen) und Polymikrogyrie (Gyrierungsstörung mit abnorm vielen und zu kleinen Windungen) ausdrückten, auf (*Abbildung 1*). Drei männliche Patienten starben im Alter von 5 bis 12 Jahren an Aspirationspneumonien. Vier weitere Patienten, zum damaligen Zeitpunkt zwischen 5 und 13 Jahren alt, lebten mit schweren psychomotorischen Retardierungen, Ichthyose und Palmoplantarkeratose (Sprecher et al. 2005).

Der autosomal-rezessive Gendefekt befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 22 (22q11.2) als Deletion einer Base in *SNAP29*. Die Deletion eines Guanins wurde an Position 220 - ausgehend vom ATG-Startcodon - der cDNA ermittelt (Sprecher et al. 2005). Seit der Erstbeschreibung wurden weitere Mutationen für das CEDNIK-Syndrom beschrieben: c.486insA (Fuchs-Telem et al. 2011) und c.85C>T (Hsu et al. 2017). Insgesamt liegt die Fallzahl nun bei 12 Patienten (Hsu et al. 2017).

Durch Untersuchung von Patienten mit dem 22q11.2 Deletionssyndrom konnten vier weitere Mutationen in *SNAP29* gefunden werden, die das klinische Bild des Deletionssyndroms um das klinische Bild eines CEDNIK-Syndroms ergänzen: c.388_389insGA, c.28_32delCCGTT, c.265G>A und c.268C>T. Da durch das Deletionssyndrom eine Hemizygotie erzeugt wird, können so autosomal-rezessive Mutationen aufgedeckt werden (McDonald-McGinn et al. 2013).

1.3 SNAP29 als SNARE-Protein

Zum intrazellulären Transport von Vesikeln existiert eine komplexe Maschinerie. Vesikel bilden sich durch Ausknospen der Membran (engl.: *vesicle budding*), werden an einen bestimmten Ort in der Zelle adressiert (engl.: *vesicle targeting*), dorthin transportiert und fusionieren schließlich mit ihrer Zielmembran (engl.: *vesicle fusion*) (Bonifacino & Glick 2004). Durch Anlagerung von Hüllproteinen, die aus dem Zytosol rekrutiert werden, an die Membran wird diese verformt und erlaubt so die Ausknospung zum Transportvesikel. Nach der Ausknospung fällt der Mantel aus Hüllproteinen vom Vesikel ab (Faini et al. 2013). Die Fusion mit der Zielmembran wird durch SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein [NSF] attachment proteins [SNAP] receptors*) vermittelt (Söllner et al. 1993).

1.3.1 Funktionelle und strukturelle Domänen der SNAREs

Jedes SNARE-Protein besitzt eine evolutionär konservierte SNARE-Domäne aus 60-80 Aminosäuren, die mindestens ein heptadisches Wiederholungsmotiv aufweist. Diese Domäne ist typisch für Proteine, die α -helikale superspiralisierte (engl.: *coiled-coil*) Strukturen bilden. Tatsächlich bildet sich ein SNARE-Komplex aus vier α -Helices, die sich zu einer viersträngigen, parallelen *coiled-coil* Struktur zusammenlagern (Antonin et al. 2002; Poirier et al. 1998; Weimbs et al. 1997). SNARE-Proteine unterscheiden sich durch ihre N- und C-terminalen Domänen. Beide Domänen sind jeweils durch ein Zwischenstück, den sogenannten *linker*, mit der SNARE-Domäne verbunden (Jahn & Scheller 2006). Da sich eine funktionelle Einteilung der SNARE-Proteine in v-SNAREs und t-SNAREs, entsprechend ihrer Lokalisation auf der Vesikelmembran oder Zielmembran (engl.: *target membrane*), im Falle einer Fusion funktionell und strukturell identischer Vesikel als inopportun erwies, wurde eine Reklassifizierung der SNAREs anhand ihrer strukturellen Domänen vorgenommen. Die Benennung der dabei entstehenden vier Subtypen - Qa-, Qb-, Qc- und R-SNAREs - erfolgt dabei auf Basis von hochkonservierten Glutamin(Q)- oder Arginin(R)-Resten. Fusogene SNARE-Komplexe bestehen in der Regel aus je einem Mitglied dieser vier Subtypen (Bock et al. 2001; Fasshauer et al. 1998; Malsam et al. 2008; Rothman 1994). Die Struktur der SNAREs ist in *Abbildung 2A* dargestellt.

Eine Untergruppe der t-SNAREs stellen die Qbc-SNAREs dar. Sie bestehen aus zwei SNARE-Domänen, die miteinander verbunden sind und die SNARE-Domäne der Qb- und Qc-SNAREs eines SNARE-Komplexes darstellen. Qbc-SNAREs verbinden sich mit einem Qa-SNARE und einem R-SNARE zu einem SNARE-Komplex (*Abbildung 2B*).

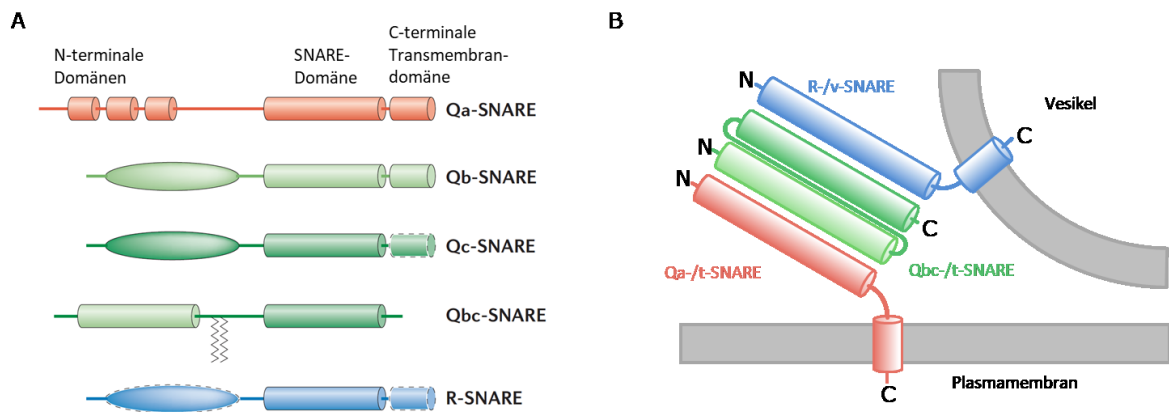


Abbildung 2: Struktur von SNAREs und ihre Komplexbildung (modifiziert nach Jahn and Scheller 2006 und Seebode 2015) (A) Qa-SNAREs besitzen N-terminal drei antiparallele Helices (rot). Qb- (hellgrün), Qc- (dunkelgrün) und R-SNAREs (blau) können verschiedene N-terminale Domänen besitzen (ovale Form). Qbc-SNAREs stellen die kleine Unterfamilie der SNAP25-Familienmitglieder dar. Sie bestehen aus je einer Qb- und einer Qc-SNARE Domäne. Diese Domänen sind durch ein kurzes Zwischenstück (engl.: *linker*) verbunden. Dieser ist häufig palmitoyliert (Zick-zack-Linien). Qbc-SNAREs besitzen im Gegensatz zu den anderen SNAREs keine Transmembrandomäne. (B) Der zytosolische Qbc-SNARE (z.B. SNAP29) interagiert mit zwei membrangebundenen SNAREs, einem Qa-SNARE und einem R-SNARE. Der Qa-SNARE und der R-SNARE liefern je einen Helix, der Qbc-SNARE zwei.

1.3.2 Mechanismus der SNARE-abhängigen Vesikelfusion

Damit Membranen fusionieren können, müssen sich diese bis auf eine geringe Distanz annähern und die Wassermoleküle zwischen den Lipidschichten verdrängen. Für diese Annäherung wird die freiwerdende Energie der SNARE-Komplexbildung genutzt. Separat auf Membranen vorkommende SNARE-Proteine verbinden sich bei der Annäherung zweier Membranen spontan zu stabilen Bündeln bestehend aus vier Helices (Oelkers et al. 2016). Der entstehende Komplex wird als „trans-SNARE Komplex“ oder auch „SNAREpin“ bezeichnet (Südhof & Rothman 2009).

Nach erfolgreicher Fusion wird der trans-SNARE Komplex zu einem cis-SNARE Komplex im Zielkompartiment. Dort erfolgt die Auflösung des cis-SNARE Komplexes, die durch α -SNAPs und NSF katalysiert wird. NSF ist eine AAA+ ATPase und liefert durch Hydrolyse die Energie zur Auflösung des Komplexes (Hong 2005; Jahn & Scheller 2006).

1.4 SNAP29 und das CEDNIK-Syndrom

Die Qbc-SNAREs werden als SNAP25-Familie bezeichnet, zu denen auch SNAP23, SNAP29 und SNAP47 gerechnet werden (Holt et al. 2006; Steegmaier et al. 1998). Auffällig ist, dass diese Proteinfamilie keine Transmembrandomänen aufweist. Lediglich SNAP23 und SNAP25 besitzen einen Membrananker, der aus palmytoylierten Cysteinresten des Zwischenstücks besteht (Hess et al. 1992; Ravichandran et al. 1996). Weder SNAP29 noch SNAP47 besitzen einen Membrananker (Holt et al. 2006). Das somit zyttoplasmatische SNAP29 kann nur durch Interaktionen mit anderen Proteinen membrangebunden vorliegen (Steegmaier et al. 1998).

Insgesamt konnte eine Beteiligung von SNAP29 an der Endozytose (Rotem-Yehudar et al. 2001) und somit auch an der Zellmotilität (Rapaport et al. 2010), der Reifung und Sekretion lamellärer Granula (Fuchs-Telem et al. 2011; Sprecher et al. 2005), Bildung primärer Zilien (Lu et al. 2015), Kinetochorbildung (Morelli et al. 2016) und Autophagie (Diao et al. 2015) nachgewiesen werden.

1.4.1 Auswirkungen des SNAP29-Knockout beim CEDNIK-Syndrom

Die Expression von SNAP29 ist bei CEDNIK-Patienten in der Haut reduziert, während normale Haut eine Expression in Epidermis und Dermis aufweist. Im *Stratum spinosum* und im *Stratum granulosum* der Epidermis treten viele leere Vesikel auf, weitere abnormale Vesikel mit verschiedenen Inhalten befinden sich in den unteren Schichten des signifikant verdickten *Stratum corneum*. Zudem konnten auch normal aussehende lamellare Granula mit Lipidmolekülen nachgewiesen werden, die zwischen die obere Schicht des *Stratum granulosum* und die verhornten Schichten der Epidermis in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. Da epidermale Differenzierung auf die korrekte Verteilung von Lipiden und proteolytischen Enzymen angewiesen ist und dabei eine wichtige Rolle bei der Bildung der Barrierefunktion der Haut spielt, sowie die Desquamation beeinflusst, können Sekretionsstörungen der lamellaren Granula, wie sie bei CEDNIK-Patienten auftreten, diesen Prozess negativ beeinflussen. Die häufigsten intracornealen Lipide sind die Ceramide. Sie entstehen aus einer Vorstufe, dem Glucosylceramid, das normalerweise in den oben erwähnten extrazellulären Raum sezerniert wird. Dieses Glucosylceramid wird bei CEDNIK-Patienten in den Zellen des unteren *Stratum corneum* zurückgehalten (Sprecher et al. 2005).

1.4.2 CEDNIK-Syndrom im Modellorganismus Maus

Um das humane CEDNIK-Syndrom und seine molekularen Abläufe besser zu verstehen, hat unsere Arbeitsgruppe kürzlich die weltweit ersten beiden Mausmodelle erstellt, ein totaler *Snap29-Knockout* (KO) und ein epidermaler *Snap29-KO*. Auch hier zeigte sich ein autosomal rezessiver Erbgang, so dass heterozygote *Snap29*-Mäuse phänotypisch nicht vom Wildtyp (WT) zu unterscheiden waren. Die beiden KO-Mausmodelle verhielten sich weitgehend identisch (Schiller et al. 2016a).

Im Gegensatz zum Menschen verstarben die *Snap29* KO-Mäuse bereits wenige Stunden nach der Geburt. Sie hatten zudem eine reduzierte Körpergröße. Der Hautphänotyp ähnelte dem der CEDNIK-Patienten. Sie wiesen bereits bei der Geburt einen ichthyosiformen Phänotyp mit schuppiger und gestraffter Haut auf, der deutlich stärker ausgeprägt war als der menschliche Phänotyp. Durch die Hautveränderungen kam es zu Bewegungseinschränkungen. Die Mausmodelle wiesen zusätzlich zur Hyperkeratose auch eine in CEDNIK-Patienten nicht nachgewiesene Akanthose auf. Zudem konnte eine schwere Barrierestörung der Haut

nachgewiesen werden. Die epidermale Differenzierung sowie die Distribution von Lipiden in der Epidermis waren gestört. Letzteres ist auf eine Beeinträchtigung der lamellaren Granula zurückzuführen. Des Weiteren waren die Autophagie und die Funktion des endoplasmatischen Retikulums verändert (Schiller et al. 2016a).

1.5 Genomeditierung mit CRISPR/Cas9

CRISPR steht für „*clustered regularly interspaced palindromic repeats*“. Das CRISPR/CRISPR-assoziierte (Cas)-System wurde in der mikrobiellen adaptiven Immunantwort auf Plasmide und Viren entdeckt (Wiedenheft et al. 2012). Neben der CRISPR/Cas-Methode stehen zur Genomeditierung (engl.: *genome editing*) hauptsächlich Meganukleasen, Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) und „*transcription activator-like*“ (TAL) Effektor-Nukleasen (TALEN) zur Verfügung. Diese letztgenannten Methoden basieren alle auf der DNA-Erkennung durch Proteine (Epinat 2003; Wood et al. 2011). Anders als ZFN und TALEN benutzt CRISPR/Cas kein Protein um die Zielsequenz zu erkennen, sondern nutzt eine RNA-basierte Methode, um eine Endonuklease zur Zielsequenz zu leiten und dort einen Doppelstrangbruch (DSB) zu induzieren. Da durch Veränderungen in der sogenannten „*guide RNA*“ eine neue Zielsequenz ausgewählt werden kann, ist diese Methode einfacher an die jeweiligen Forschungsgebiete anzupassen als Protein-basierte Methoden (Doudna & Charpentier 2014).

1.5.1 CRISPR/Cas9-Methode

Es wurden drei Typen von CRISPR-Systemen in der mikrobiellen adaptiven Immunantwort identifiziert, die alle aus Cas-Genen, nichtkodierender RNA und spezifischen repetitiven Sequenzen bestehen. Kurze variable Sequenzen aus exogenen Quellen – sogenannte Protospacer – mit einer Länge von 20 Basenpaaren (bp) werden durch repetitive DNA-Sequenzen umschlossen, die ein Motiv enthalten, das spezifisch für ein bestimmtes CRISPR-System ist. Diese Motive werden, da sie benachbart zu den Protospacern auftreten, *protospacer adjacent motives* (PAM) genannt. Diese zwingend notwendige PAM-Sequenz ist abwärts der DNA-Zielsequenz gelegen. Für die Genomeditierung wird das *Streptococcus pyogenes* Typ II System genutzt (Ran et al. 2013b).

Das Typ II CRISPR-System besteht aus der Nuclease Cas9, einer Ansammlung von CRISPR-RNAs (crRNA) und einer transaktivierenden crRNA (tracrRNA). Die crRNA beinhaltet den Protospacer und führt die Endonuklease Cas9 zur DNA-Zielsequenz, wenn eine tracrRNA vorliegt. Durch Watson-Crick-Basenpaarung bildet sich ein tracrRNA:crRNA-Duplex aus, der die sogenannte *guide RNA* darstellt. Der Protospacer ist bei der Genomeditierung eine selbstgewählte Sequenz, die die gewünschten Zielsequenz bestimmt. Diese Zielsequenz muss nach 20 bp ein PAM beinhalten. In *S. pyogenes* ist die PAM-Sequenz ein 5'-NGG (Jinek et al. 2012; Ran et al. 2013b). Zur einfacheren Anwendung in der Forschung können die beiden

RNAs zu einer einzigen Führungs-RNA (engl.: *single guide RNA* = sgRNA) kombiniert werden. Die Cas9-Endonuklease induziert etwa 3 Basenpaare aufwärts der PAM-Sequenz einen DSB (*Abbildung 3A*) (Jinek et al. 2012).

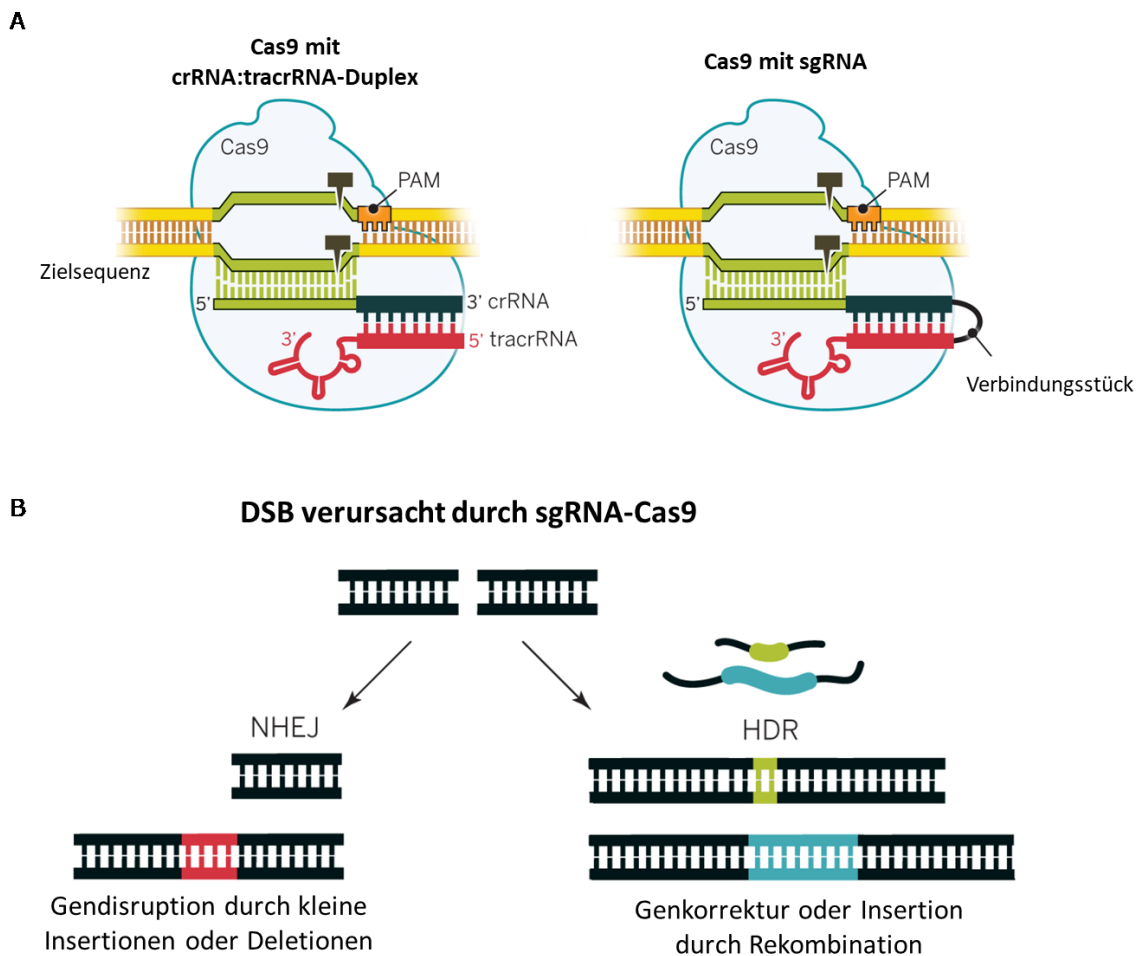


Abbildung 3: Durch das CRISPR/Cas9-System induzierte Doppelstrangbrüche (DSB) und ihre Reparatur durch „non-homologous end-joining“ (NHEJ) oder Homologie-geleitete Reparatur (HDR) (modifiziert nach Doudna and Charpentier 2014) (A) Die Endonuklease Cas9 wird durch einen Duplex aus crRNA (CRISPR RNA) und tracrRNA (transaktivierende crRNA) zur Zielsequenz geleitet. Zur einfacheren Anwendung in der Forschung können die crRNA und die tracrRNA durch ein Verbindungsstück zu einer sgRNA (*single guide RNA*) verbunden werden. Cas9 induziert etwa drei Basenpaare aufwärts der PAM (*protospacer adjacent motif*)-Sequenz einen DSB. (B) DSB können durch zwei Reparaturmechanismen repariert werden. Das fehleranfällige NHEJ führt zu kleinen Insertionen oder Deletionen, die letztlich zu Leserasterverschiebungen und so verfrühten Stopcodons führen können. Die genaue HDR führt zu einer Genkorrektur oder zur Insertion eines gewünschten DNA-Abschnitts durch Rekombination.

1.5.2 DNA-Reparatur nach DSB

Es gibt zwei Wege, um einen DSB zu reparieren: einerseits das fehleranfällige Verbinden der Enden durch *non-homologous end-joining* (NHEJ) oder andererseits durch die genaue Homologie-geleitete Reparatur (engl.: *homology-directed repair* = HDR). Um eine Gendisruption in einem experimentellen Ansatz zu erzeugen, ist das NHEJ der gewünschte Reparaturmechanismus, da dies zu Insertionen und Deletionen führen kann und somit zu Leserasterverschiebungen (Ran et al. 2013b). Für die HDR benötigt man ein

Reparaturtemplate, was zu einer gezielten Mutation des Genoms oder zur gezielten Insertion einer Sequenz genutzt werden kann (*Abbildung 3B*)(Sander & Joung 2014).

1.5.3 Limitationen der CRISPR/Cas9-Methode

Obwohl die sgRNA für eine spezifische Sequenz ausgewählt wird, kann ein Binden an einer anderen Stelle im Genom nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Mit verschiedenen Online-Programmen kann die Wahrscheinlichkeit berechnet werden, mit der die Nuklease Cas9 an falschen Stellen im Genom aktiv wird (engl.: *off-target activity*) (Hsu et al. 2013; Ran et al. 2013b; Stemmer et al. 2015). Durch Genomanalysen konnte gezeigt werden, dass *off-target* Mutationen durch die CRISPR/Cas9-Methode selten sind (Smith et al. 2014; Veres et al. 2014). Eine genaue Vorhersage der *off-target* Aktivität ist jedoch auf Grund von Fehlpaarungen und epigenetischen Effekten bisher nicht möglich (Yee 2016).

1.6 Lentivirale Vektoren

Lentivirale Vektoren sind replikationsdefiziente, hybride virale Partikel und eine Subfamilie der Retroviren, deren prominentester Vertreter das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist, welches das erworbene Immunschwächesyndrom (engl.: *Acquired Immune Deficiency Syndrome – AIDS*) auslöst (Barré-Sinoussi et al. 1983; Gallo et al. 1984; Haase 1986; Naldini 1998). Lentiviren verursachen langsame (lateinisch: *lentus, a, um* – langsam, träge) Infektionen, die chronische oder progressive Erkrankungen hervorrufen und vorwiegend mit Infektion von Makrophagen und Lymphozyten in Verbindung gebracht werden (Naldini 1998; Vigna & Naldini 2000).

Retrovirale Vektoren stellen eine effiziente Methode zur stabilen Integration von DNA-Konstrukten dar. Ihr Nachteil besteht darin, dass sie nur Zellen infizieren können, die sich aktiv teilen. Lentivirale Vektoren bieten den Vorteil, dass sie alle Zellen transduzieren – unabhängig von ihrem Zellzyklusstadium (Shearer & Saunders 2015).

1.6.1 Aufbau der Lentiviren

Retroviren sind behüllte (+)-Einzelstrang-RNA (ssRNA) Viren, die nach Eintritt in die Wirtszelle ihr Genom durch die virale reverse Transkriptase in ein Doppelstrang-DNA-Stück (dsDNA) überführen. Retroviren enthalten zwei identische (+)-ssRNA Moleküle, die sich mittels Basenpaarung über zwei Transfer-RNA (tRNA) aus der vorherigen Wirtszelle zusammenlagern. Die tRNA wird aber auch als Primer für die reverse Transkription verwendet. Das Eindringen in die Wirtszelle geschieht durch Rezeptor-vermittelte Endozytose oder Verschmelzen des Virus mit der Zellmembran der Wirtszelle, wodurch das Nukleokapsid ins Zytoplasma freigesetzt wird. Nach Disassemblierung des Nukleokapsids startet die reverse Transkription. Dafür wird zuerst die ssRNA zur Produktion eines

komplementären DNA-Strangs durch die reverse Transkriptase genutzt. Der RNA-Strang wird danach degradiert und ein komplementärer DNA-Strang auf Vorlage des bereits produzierten DNA-Strangs gebildet. Diese Doppelstrang-DNA gelangt in den Zellkern der Wirtszelle. Im Falle der Lentiviren erfolgt der Transport aktiv, weshalb eine Transduktion unabhängig vom Zellzyklusstadium erfolgen kann. Andere Retroviren können nur nach Zerfall der Kernmembran in das Wirtszellgenom integrieren. An beiden Enden der viralen dsDNA befinden sich sogenannte *long terminal repeats* (LTRs), welche Sequenzwiederholungen darstellen, als Promotor für *gag*, *pol* und *env* agieren und für die Integration der viralen DNA notwendig sind. Der Einbau ins Genom erfolgt mehr oder weniger zufällig. Jedes Retrovirus hat seine eigenen Präferenzen für die Integration. HIV integriert bevorzugt in transkriptionelle Einheiten. Das Genom der Retroviren besteht aus drei wichtigen Genen: *gag*, *pol* und *env*. Diese Gene kodieren für Polyproteine, die in mehrere kleine Proteine gespalten werden. Das Gen *gag* kodiert Strukturproteine, *pol* kodiert Enzyme, die für die reverse Transkription und Integration in das Wirtszellgenom verantwortlich sind, und *env* kodiert die viralen Hüllglykoproteine (engl.: *viral envelope glycoproteins*). Die kleineren Gene *rev* und *tat* kodieren für Proteine, die regulatorische Funktionen haben und auf RNA-Level zusammengespleißt werden müssen, um exprimiert zu werden. Zusätzlich enthält das Genom Gene für akzessorische Proteine - *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu* (Clark 2006; Milone & O'Doherty 2018; Vannucci et al. 2013). In *Abbildung 4A* ist das lentivirale Genom schematisch dargestellt.

1.6.2 Anwendung von lentiviralen Vektoren in der Forschung

Lentivirale Vektoren wurden seit dem Beginn ihres Einsatzes in der Forschung stark modifiziert, so dass man inzwischen von drei Generationen sprechen kann. Die Weiterentwicklung wurde unter anderem zur Verbesserung der Sicherheit vorangetrieben (Vannucci et al. 2013). Lentivirale Vektoren der dritten Generation werden aus drei Konstrukten produziert: zwei Konstrukte enthalten die für die Verpackung der Viren nötigen Strukturproteine, Enzyme und Hüllproteine und werden Verpackungskonstrukte genannt (engl.: *packaging constructs*), das dritte Konstrukt ist das Transfervektorkonstrukt (engl.: *transfer vector construct*) und enthält das zu integrierende DNA-Konstrukt. Beide Konstrukttypen werden in dieselbe Zelllinie zur Vektorpartikelproduktion eingebracht. Da die Partikel nur den Transfervektor verpacken und somit die Fähigkeit zur Verpackung neuer Partikel nach Infektion verlieren, sind diese viralen Vektoren auf eine einzige Transduktionsrunde limitiert (Vigna & Naldini 2000). Die Trennung dieser viralen Gene erfolgte, um die Anwendung der lentiviralen Vektoren sicherer zu gestalten. Durch Rekombination der verschiedenen Konstrukte wäre es möglich, dass replikationskompetente Lentiviren entstehen und somit eine Bedrohung für den Anwender darstellen. Eine Separation der minimal notwendigen genetischen Elemente von HIV-1, auf dem lentivirale

Vektoren häufig basieren, auf drei Konstrukte senkt das Risiko eines so komplexen Rekombinationsereignisses (Milone & O'Doherty 2018; Naldini 1998; Shearer & Saunders 2015).

In *Abbildung 4B* sind die Konstrukte zur Produktion der lentiviralen Vektoren der dritten Generation schematisch dargestellt. Hier werden beispielhaft die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte beschrieben. *Abbildung 4B (1)* zeigt die Transfervektorkonstrukte, die als Plasmide vorliegen, hier aber zur Veranschaulichung im Schema des viralen Genoms dargestellt sind. Während das Plasmid lentiCRISPR v2 die Sequenzen zur Produktion der sgRNA und des Cas9-Proteins, dieses unter einem EF-1 α -Promotor, enthält, beinhaltet das Plasmid pLJM1-EGFP eine EGFP-Kassette unter dem Einfluss eines CMV(Cytomegalievirus)-Promotors. Die zu transferierenden Gene sind von den beiden LTRs umgeben. Diese sind jedoch so modifiziert, dass ein selbst-inaktivierender (SIN) Vektor vorliegt. Dafür wurde in der 3'LTR-Region eine große Sequenz eliminiert und somit auch die Promotor- und Enhanceraktivität der LTR. Diese Deletion wird stromaufwärts während der Transduktion dupliziert und inaktiviert somit beide LTRs. Die 5'LTR-Region wurde so modifiziert, dass ein Promotor (CMV- bzw. RSV[Rous-Sarkom-Virus]-Promotor) eingefügt wurde, der die Promotorfunktion der LTR übernimmt. Beide Transfervektorkonstrukte beinhalten die HIV-1 ψ -Sequenz, die als Verpackungssignal dient (Vigna & Naldini 2000). Die Puromycinresistenzkassette (PuroR) dient zur späteren Selektion der positiv transduzierten Zellen, die Ampicillinresistenzkassette wird zur Selektion der transformierten Bakterien in der Plasmidproduktion benutzt.

Abbildung 4B (2) zeigt die Verpackungskonstrukte. Pseudotypisierung bezeichnet den Austausch des viralen Hüllproteins durch ein anderes virales Hüllprotein. Somit kann das Zielspektrum des lentiviralen Vektors verändert werden (Cronin et al. 2005). Der lentivirale Vektor wurde mit dem Protein G des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G) als Hüllprotein pseudotypisiert. Dieses Gen steht unter dem Einfluss eines CMV-Promotors und befindet sich auf dem Plasmid pCMV-VSV-G. VSV-G-pseudotypisierte lentivirale Vektoren zeigen ein breites Wirtsspektrum, was dadurch begründet ist, dass das Virus den LDL (*low density lipoprotein*)-Rezeptor und LDLR-Familienmitglieder als Haupteintrittspforte in die Zellen verwendet (Finkelshtein et al. 2013). Die viralen Gene *gag* und *pol* befinden sich auf einem separaten Plasmid. Der CMV-Enhancer dient hier als Promotor.

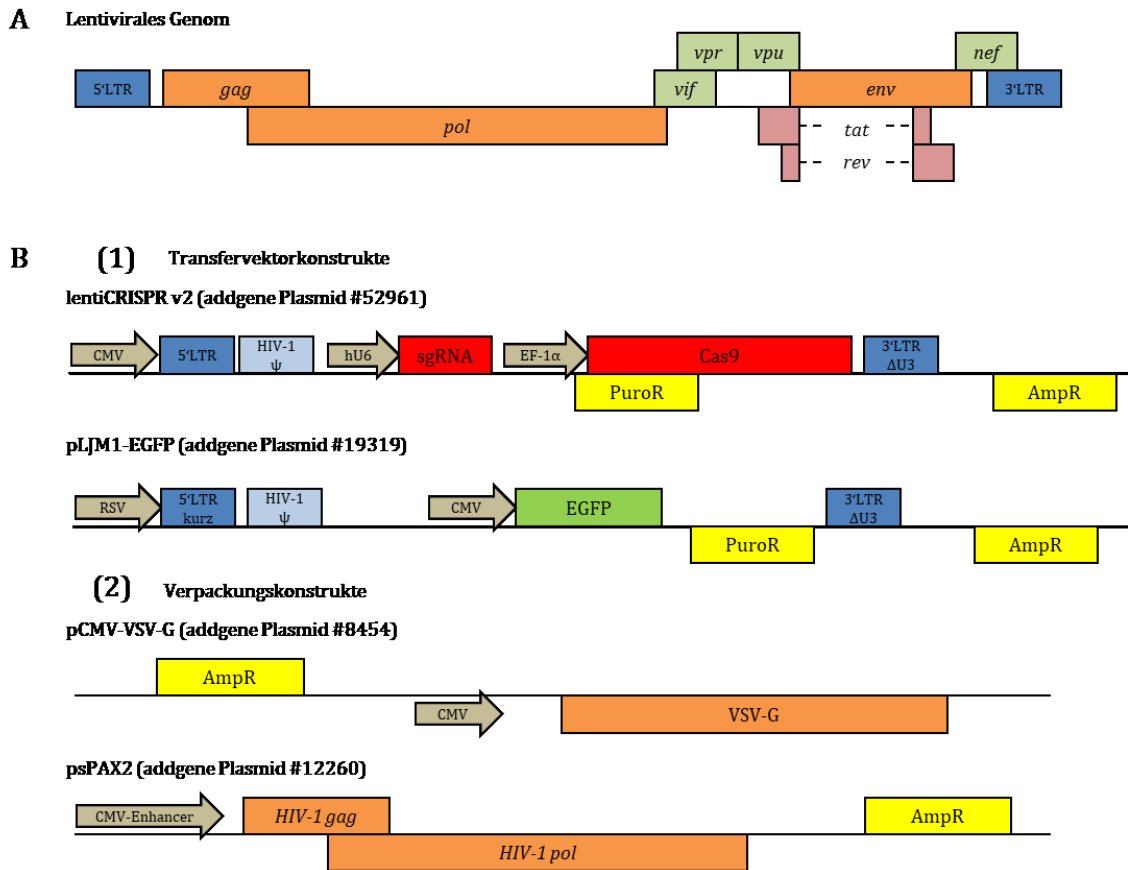


Abbildung 4: Genom der Lentiviren und Konstrukte der in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Vektoren (A) Das lentivirale Genom wird an beiden Enden von LTRs flankiert und besteht aus drei wichtigen Genen: *gag*, *pol* und *env*. Die Gene *gag*, *pol* und *env* kodieren für Polyproteine, die in mehrere kleine Proteine gespalten werden. Das Gen *gag* kodiert Strukturproteine, *pol* kodiert Enzyme, die für die reverse Transkription und Integration in das Wirtszellgenom verantwortlich sind, und *env* kodiert die viralen Hüllglykoproteine (engl.: *viral envelope glycoproteins*). Die kleineren Gene *rev* und *tat* kodieren für Proteine, die regulatorische Funktionen haben und auf RNA-Level zusammengespleißt werden müssen um exprimiert zu werden. Zusätzlich enthält das Genom Gene für akzessorische Proteine - *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu*. (B) Lentivirale Vektoren werden durch Transfektion dreier Konstrukte in eine Verpackungszelllinie produziert. Diese drei Konstrukte sind einerseits der Transfervektor (B(1)) und andererseits zwei Verpackungsplasmide (B(2)). Der Transfervektor enthält den in die Zelle zu integrierenden DNA-Abschnitt. Während das Plasmid lentiCRISPR v2 die Sequenzen zur Produktion der sgRNA und des Cas9-Proteins, dieses unter einem EF-1 α -Promotor, enthält, beinhaltet das Plasmid pLJM1-EGFP eine EGFP-Kassette unter dem Einfluss eines CMV(Cytomegalievirus)-Promotors. Die zu transferierenden Gene sind von den beiden LTRs umgeben. Diese sind jedoch so modifiziert, dass ein selbst-inaktivierender (SIN) Vektor vorliegt. Dafür wurde in der 3'LTR-Region eine große Sequenz eliminiert und somit auch die Promotor- und Enhanceraktivität der LTR. Die 5'LTR-Region wurde so modifiziert, dass ein Promotor (CMV- bzw. RSV[Rous-Sarkom-Virus]-Promotor) eingefügt wurde, der die Promotorfunktion des LTR übernimmt. Beide Transfervektorkonstrukte beinhalten die HIV-1 ψ -Sequenz, die als Verpackungssignal dient. Die Puromycinresistenzkassette (PuroR) dient zur späteren Selektion der positiv transduzierten Zellen, die Ampicillinresistenzkassette wird zur Selektion der transformierten Bakterien in der Plasmidproduktion benutzt. Die Verpackungsvektoren bestehen aus einem Plasmid, das für ein Hüllprotein kodiert. Hier wurde das Protein G des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G) als Hüllprotein zur Pseudotypisierung verwendet. Dieses Gen steht unter dem Einfluss eines CMV-Promotors und befindet sich auf dem Plasmid pCMV-VSV-G. Die viralen Gene *gag* und *pol* befinden sich auf einem separaten Plasmid (psPAX2). Der CMV-Enhancer dient hier als Promotor. Beide Verpackungsplasmide enthalten eine Ampicillinresistenzkassette, durch die positiv transformierte Bakterien zur Plasmidproduktion selektiert werden. Die Abbildung ist an Clark (2006) und die Addgene-Plasmidkarten der verwendeten Plasmide angelehnt.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Eine *loss-of-function* Mutation im *SNAP29* Gen führt im Menschen zu dem seltenen, neurokutanen, autosomal-rezessiv vererbten CEDNIK-Syndrom. SNAP29 ist ein SNARE-Protein, das in Membranfusion, epidermale Differenzierung, primäre Zilienbildung und Autophagie involviert ist. Obwohl bereits zwei *Snap29*-Knockout (KO)-Mausmodelle generiert und charakterisiert wurden, die den ichthyotischen Phänotyp des humanen CEDNIK-Syndroms widerspiegeln, wurde bisher keine immortalisierte Zelllinie zur Tiermodell-unabhängigen Erforschung der Funktion von SNAP29 beschrieben.

Die CRISPR/Cas9-Methode ist eine elegante Technik der Genomeditierung. Da die Zielsequenz der Endonuklease Cas9 durch eine kurze, 20 bp umfassende RNA-Sequenz bestimmt wird, ist sie einfach an das jeweilige Projekt des Anwenders anpassbar. Die Cas9 wird durch ein Zusammenspiel aus Zielsequenz-RNA, der crRNA, und einer transaktivierenden RNA, der tracrRNA, aktiviert um einen DSB in der Zielsequenz zu induzieren. Zur einfacheren Anwendung wurden die beiden RNAs zu einer sgRNA kombiniert. Durch Einbringen eines Plasmides mit der sgRNA-Sequenz und der Cas9-kodierenden Sequenz in eine Zielzelle kann eine Genommodifikation erzielt werden. Zur Auswahl der Zielsequenz können verschiedene Online-Programme verwendet werden, die gleichzeitig eine *off-target* Aktivität berechnen können.

Das Ziel meiner Dissertation war es, eine SNAP29-defiziente Zelllinie zu generieren. Dafür wurde die CRISPR/Cas9-Methode zur Genomeditierung genutzt. Die entstandene KO-Zelllinie sollte charakterisiert werden, um sie als Modellzelllinie für die weitere Erforschung der Funktionen von SNAP29 etablieren zu können.

2 Material

2.1 Zelllinien und Bakterien

2.1.1 Zelllinien

Die für diese Arbeit verwendeten Zelllinien sind in *Tabelle 1* aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Spezies	Quelle oder Erstbeschreiber
C5N	Immortalisierte Keratinozyten	Maus	Epstein Jr, EH, <i>Department of Dermatology, University of California, San Francisco, USA</i>
MRC5Vi	Immortalisierte fetale Lungenfibroblasten	Mensch	Geschenk von Sarah Sertic (Sertic et al, 2011)
HEK293T	Embryonale Nierenzellen	Mensch	ATCC Manassas Virginia, USA CRL-3216
HEK293A	Embryonale Nierenzellen	Mensch	Invitrogen CA, USA R705-07
HeLa	Zervixkarzinomepithelzellen	Mensch	ATCC Manassas Virginia, USA CCL-2
HaCaT	Spontan transformierte aneuploide immortale Keratinozyten	Mensch	Boukamp et al. 1988
3T3	Immortalisierte Fibroblasten	Maus	Todaro & Green 1963
HCT116	Kolorektale Karzinomzellen	Mensch	Rajput et al. 2008
GM00637	Immortalisierte adulte Fibroblasten	Mensch	<i>Coriell Institute, Camden, NJ, USA</i>
CHO	Immortalisierte Ovarienzellen	Hamster	Puck, Cieciora, & Robinson, 1958

2.1.2 Bakterien

Escherichia coli (*E. coli*) DH5 α [F⁻, endA1, glnV44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR, nupG, Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ -] (Hanahan 1983) sowie *E. coli* StbI3 [F⁻mcrB mrrhsdS20(r_B⁻, m_B⁻) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str^R) xyl-5 λ -leumtl-1] (Invitrogen, Karlsruhe, D) wurden zur Transformation und Amplifikation der Plasmid-DNA verwendet.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Blotting-Papier extra dick	Bio-Rad Laboratories, München, D
CELLSTAR®CELLreactor™, Polypropylene Filter Top Tube	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Deckgläser, rund	Roth, Karlsruhe, D
Dispenser multipette® plus	Eppendorf, Hamburg, D
Dispenser Spitzen (2,5 ml, 5 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Erlenmeyerkolben (200 ml, 500 ml)	VWR, Darmstadt, D
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Brand, Wertheim, D
Kimtech Tücher	Kimberly-Clarke Professional, Roswell, USA
Kryoboxen	Nunc, Wiesbaden, D
Kryoröhrchen 2ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels 4-15 %	Bio-Rad Laboratories, München, D
Mikrotiterplatten (6-Well, 24-Well, 96-Well) für die Zellkultur	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim, D
Nitrozellulose, 0,45 µM Protran BA85	Amersham Bioscience, Piscataway, USA
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, D
Parafilm®	Brand, Wertheim, D
Pasteurpipetten (230 nm)	Brand, Wertheim, D
PCR Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, D
PES 0,45 µm Filter	Sarstedt, Nümbrecht, D
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Polystyrene Rundbodenreaktionsgefäße	BD Falcon, Heidelberg, D
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, 5,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Skalpell, Einmalbenutzung	Feather, Osaka, JPN
Spritzen (Plastik, Einmalnutzung, 5ml)	BD Discardit, Franklin Lakes, NJ, USA
Zahnstocher	Fackelmann, Hersbruck, D
Zellkulturschale (10 cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zellkulturflaschen (25 cm ³ , 75 cm ³ , 175 cm ³)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

2.3 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Hersteller
-150 °C Gefriertruhe, ULT7150-9-M23	Thermo Scientific, Asheville NC, USA
-80 °C Gefriertruhe	Dometic, Hosingen, LUX
AF80 Flockeneisbereiter	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills IL, USA
Arktik Thermal Cycler	Thermo Scientific, Vantaa, FIN
Autoklav LVSA 40/60	Zirbus, Bad Grund, D
Bakterienschüttler	GFL, Burgwedel, D
ChemoCam Imager 6.0	Intas, Göttingen, D
CO ₂ -Inkubator	Panasonic, Gunma, JPN
DU 640 [®] Spektrophotometer	Beckmann, München, D
FACSCalibur mit Macintosh Computer (Quadra 650)	BD Biosciences, Heidelberg, D
Feinwaage AY220	Shimadzu, Kyoto, JPN
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen, D
Gel iX 20 Imager	Intas, Göttingen, D
Glomax [®] Discover System	Promega, Mannheim, D
Hera safe Sterilbank	Thermo Fisher, Waltham MA, USA
Horizontal Electrophoresis System	Bio-Rad, Hercules CA, USA
Inkubator Modell 200	Memmert, Büchenbach, D
Kühlschrank +4 °C	Liebherr, Ochsenhausen, D
Microcentrifuge	STARLAB, Hamburg, D
Microplate Mixer	STARLAB, Hamburg, D
Mikroskop Axio Vert.A1	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg, D
Mini-PROTEAN [®] Tetra System	Bio-Rad, Hercules CA, USA
NanoVuePlus [®]	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
pH Meter	WTW, Weilheim, D
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald, D
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Power Pack Model 250	Biometra, Göttingen, D
Power Supply Ease 500	Invitrogen, Karlsruhe, D
Rocking Shaker	STARLAB, Hamburg, D
Sonorex RK31	Bandelin, Berlin, D
Sterilisator	Heraeus Instruments, Hanau,, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Trans Blot Turbo	Bio-Rad, Hercules CA, USA

Vortex Mixer	STARLAB, Hamburg, D
Wasserbad	Memmert, Büchenbach, D
Zentrifuge 5430	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Universal 30RF	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge Z 300K	Hermle LaborTechnik, Wehingen, D

2.4 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
β -Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	Merck, Darmstadt, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Munich, D
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen, D
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf, D
Borsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bradford Mix Roti [®] -Quant	Roth, Karlsruhe, D
Bromphenol blau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Complete ULTRA Tablets Mini EDTA	Roche, Mannheim, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, D
Ethanol absolut, 99,8 %	Merck, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Fluorescence mounting medium	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Gene Ruler (100 bp #SM0241, 1kb SM0311) DNA ladder	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, D
Glyzerin (C ₃ H ₈ O ₃)	Merck, Darmstadt, D
Glyzin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
HD Green	Intas, Goettingen, D
Hoechst33342	Life Technologies, Eggenstein, D
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Merck, Darmstadt, D
Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 %	Braun, Melsungen, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, D
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, D
LB Agar	Life technologies, Darmstadt, D
LB Broth Base	Life technologies, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, D
Marker VI, protein ladder	Appllichem, Chicago IL, USA
Methanol (CH ₃ OH)	Mallinckrodt Baker, Griesheim, D

Natriumacetat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Merck, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, D
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Polybrene (Hexadimethrine Bromide)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Puromycin	Invivogen, San Diego, CA, USA
Roti®-Free Stripping Buffer	Roth, Karlsruhe, D
Roti®-Quant 5x Konzentrat	Roth, Karlsruhe, D
Superfibronectin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck, Darmstadt, D
Tris-Base	Merck, Darmstadt, D
Triton X-100	Merck, Darmstadt, D

2.5 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedium

Puffer, Lösungen und Medium wurden wie unten aufgelistet angesetzt.

Tabelle 5: Puffer, Lösungen und Zellkulturmedium

Name	Rezeptur/Hersteller
Zellkultur	
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose	PAA, Coelbe, D
FibroLife® fibroblast medium Complete Kit	Lifeline Cell Technology, Frederick MD, USA
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium, no phenol red	Life Technologies, Eggenstein, D
EBSS - Earle's Balanced Salt Solution	Gibco®, Life Technologies, Eggenstein, D
Zellkulturmedium, Standard	500 ml DMEM 10 % FCS (v/v) 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) (final: 100 units/ml und 100 µg Streptomycin/ml)
Zellkulturmedium, HEK293T	500 ml DMEM 10 % FCS, hitzeinaktiviert (v/v) 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) (final: 100 units/ml und 100 µg Streptomycin/ml)
Erntemedium, Harvest Medium	500 ml DMEM 40 % FCS, hitzeinaktiviert (v/v)

	1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) (final: 100 units/ml und 100 µg Streptomycin/ml)
Einfriermedium, Standard	40 % DMEM 40 % FCS (v/v) 20 % DMSO (v/v)
Einfriermedium, HEK293T	40 % DMEM 40 % FCS, hitzeinaktiviert (v/v) 20 % DMSO (v/v)
Fetales Kalbsserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, D
Penicillin-Streptomycin (100x)	PAA, Coelbe, D
Polybrene-Stocklösung (10x)	1 g Polybrene 10 ml Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 %
Trypanblau Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Trypsin/EDTA	Biochrom AG, Berlin, D
Gelelektrophorese	
TBE	89 mM Tris-Base 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
Proteinbiochemie	
Zellysepuffer	10 ml PBS 1 Tablette Complete Ultra 1 mM PMSF
Immunoblot Transferpuffer, pH 8.3	0.192 M Glyzin 0.025 M Tris-Base 20 % MeOH (v/v) 0.01 % SDS
Ponceau S Lösung	0.2 % Ponceau S (v/v) 3 % TFA (v/v)
4 % Paraformaldehyd (PFA)	3.6 g PFA 8 ml PBS 8 Tropfen 1 M NaOH → unter Rühren auflösen bei 60°C → auf 50 ml mit PBS auffüllen
SDS Laufpuffer, pH 8.3	0.192 M Glyzin 0.025 M Tris-Base 0.1 % SDS
SDS Spaltpuffer, pH 4,7	30 mM Tris-Base 3 % SDS 15 % Glycerin 0,04 % Bromphenol blau

	Vor Gebrauch 10 % β -Mercaptoethanol (v/v) zufügen
Zusätzliche häufig verwendete Puffer	
10x PBS, pH 7.2	1.5 M NaCl 30 mM KCl 80 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 10 mM KH ₂ PO ₄
6x DNA Ladepuffer	0.5 M EDTA 50 % Glycerin (v/v) 0.01 % Bromphenol blau

2.6 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Tabelle 6: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Hersteller
Attractene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden, D
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, D
Gel extraction and PCR Clean Up	Macherey-Nagel, Düren, D
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, D
MATra	iba Lifesciences, Göttingen, D
NucleoBond® Xtra MiDi/Maxi	Macherey-Nagel, Düren, D
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren, D
TransIT®-LT1 Transfection Reagent	Mirus Bio LLC, Madison WI, USA
ViaFect™ Transfection Reagent	Promega, Mannheim, D
WesternBreeze Chemiluminescent Immunodetection Systems anti mouse/rabbit	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.7 Oligonukleotide

Tabelle 7: PCR-Primer

Primernamen	Sequenz
SNAP29_e1_fwd	5'-CAACCCCTCCTGCTTCCTA-3'
SNAP29_e1_rev	5'-GGCAGCGAGGGAGAAATTA-3'
SNAP29_e2_fwd	5'-GGCCTCCCTCAAAGTCACTATAT-3'
SNAP29_e2_rev	5'-CCACAAGGTTCCAGGATACCTTA-3'
SNAP29_e3_fwd	5'-CAGGGTGTCTCCTCCAGTTTT-3'
SNAP29_e3_rev	5'-CCCTGGTCCTGGGATTATAGTT-3'

SNAP29_e4_fwd	5'-CTCAGAGCCTTTCACCTCCTTT-3'
SNAP29_e4_rev	5'-CGCCTAGGTCTGGTCTGGATT-3'
SNAP29_e5_fwd	5'-GCACTGTGACAGCCTGTCATT-3'
SNAP29_e5_rev	5'-GGCCTCGGAGTGAGAAACAT-3'
pX330 fwd	5'-AGGGCCTATTTCCCATGATTC-3'
hU6-fwd	5'-ACTATCATATGCTTACCGTAAC-3'
human_SNAP29_e1_fwd	5'-ATGGACAGTAGGCTGCGGTT-3'
human_SNAP29_e1_rev	5'-TTTCTCGTCTCCGTTTGACAG-3'
human_SNAP29_e2_fwd	5'-CTGCTCCATGTGGTCCCTTGA-3'
human_SNAP29_e2_rev	5'-TGGATCCCTTCATGGCACT-3'
human_SNAP29_e3_fwd	5'-GCACACAGGCATTATGTGAAAAG-3'
human_SNAP29_e3_rev	5'-CCTTGTTCTCCTCTCCATGGAG-3'
human_SNAP29_e4_fwd	5'-TGTCAAATTAACCGCTCTCTG-3'
human_SNAP29_e4_rev	5'-GGTCCCTGGTGTGTTTCAT-3'
human_SNAP29_e5_fwd	5'-AGATCCCTGTCTCTCCCACTTAC-3'
human_SNAP29_e5_rev	5'-CTGACTCATGGTAAGGCTTAGGA-3'

Tabelle 8: sgRNA-Oligonukleotide

Ziel-plasmid	Konstrukt-name	Oligonukleotid-name	Sequenz (Überhänge kursiv und unterstrichen)	
pX459	A0	<i>Snap29 Cas9 fwd_0</i>	5'- <u>CACCT</u> AATCCTTTTCGACGATGACGTGG-3'	
		<i>Snap29 Cas9 rev_0</i>	5'- <u>AAACC</u> CCACGTCATCGTCGAAAGGATTA-3'	
	A1	<i>Snap29 Cas9 fwd_1</i>	5'- <u>CACCG</u> CCTGTCAATGGGCGCGTCGGGG-3'	
		<i>Snap29 Cas9 rev_1</i>	5'- <u>AAACC</u> CCCCGACGCGCCATTGACAGGC-3'	
	A2	<i>Snap29 Cas9 fwd_2</i>	5'- <u>CACCAT</u> GTATGAATCGGAGAAGATCGG-3'	
		<i>Snap29 Cas9 rev_2</i>	5'- <u>AAACC</u> CGATCTTCTCCGATTCATACAT-3'	
	A3	<i>Snap29 Cas9 fwd_3</i>	5'- <u>CACCG</u> TCTTAGGACTCCTCGCTGCCGG-3'	
		<i>Snap29 Cas9 rev_3</i>	5'- <u>AAACC</u> CGGCAGCGAGGAGTCCTAGAAC-3'	
	A4	<i>Snap29 Cas9 fwd_4</i>	5'- <u>CACCG</u> ATGGTAGACAAGATGGATCAGG-3'	
		<i>Snap29 Cas9 rev_4</i>	5'- <u>AAACC</u> CTGATCCATCTTGTCTACCATC-3'	
	lentiCRISPR v2	Lenti A0	<i>Snap29 Cas9 fwd_0</i> lentiCRISPR v2	5'- <u>CACCG</u> TAATCCTTTTCGACGATGACGTGG-3'
			<i>Snap29 Cas9 rev_0</i> lentiCRISPR v2	5'- <u>AAACC</u> CCACGTCATCGTCGAAAGGATT <u>A</u> C-3'
human_A0		lenti_SNAP29 A0 human fwd	5'- <u>CACCG</u> CAATCCGTTTCGACGACGACG-3'	
		lenti_SNAP29 A0 human rev	5'- <u>AAACC</u> CGTCGTCGTCGAACGGATT <u>G</u> C-3'	

2.8 Plasmide

Tabelle 9: Plasmide

Plasmid	Bakterien zur Transformation	Addgene #	Hersteller
pCMV-VSV-G	DH5 α	#8454	Addgene, Cambridge MA, USA
pLJM1-EGFP	StbI3	#19319	Addgene, Cambridge MA, USA
psPAX2	DH5 α	#12260	Addgene, Cambridge MA, USA
pX459	DH5 α	#48139	Addgene, Cambridge MA, USA
lentiCRISPR v2	StbI3	#52961	Addgene, Cambridge MA, USA
pcDNA3.1-EGFP	DH5 α	---	Zur Verfügung gestellt durch Janin Lehmann, Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Rostock, D

2.9 Enzyme

Tabelle 10: Enzyme

Enzym	Hersteller
BbsI	Thermo Fisher, Waltham MA, USA
BsmBI	New England Biolabs, Ipswich MA, USA
CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase) 1u/ μ l	New England Biolabs, Ipswich MA, USA
ExoSAP	Affymetrix, Santa Clara CA, USA
T4 DNA Ligase 1u/ μ l	Thermo Fisher, Waltham MA, USA
T4 Polynukleotid Kinase	New England Biolabs, Ipswich MA, USA
T7 Endonuclease I	New England Biolabs, Ipswich MA, USA
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Thermo Scientific, Waltham MA, USA

2.10 Antikörper

Tabelle 11: Primärantikörper

Antigen	Antikörper	Wirt	Hersteller	Verdünnung
β -Aktin	Anti-human β -actin clone AC-74	Maus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	1:2500
Cas9	Anti-Cas9 from <i>Streptococcus pyogenes</i> clone 7A9-3A3	Maus	active motif, La Hulpe, BEL	0.5 μ g/ml
SNAP29	Anti-SNAP29 clone 111 303	Kaninchen	Synaptic Systems, Göttingen, D	1:300

Tabelle 12: Sekundärantikörper

Antikörper	Wirt	Hersteller	Verdünnung
Alexa-Fluor® 488 goat anti-rabbit	Ziege	Dianova, Hamburg, D	1:800
Alexa-Fluor® 594 goat anti-mouse	Ziege	Dianova, Hamburg, D	1:800

2.11 Software und Online-Werkzeuge

Tabelle 13: Software und Online-Werkzeuge

Name	Anbieter/Internetadresse	Anwendung
CCTop	https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/ , (Stemmer et al. 2015)	sgRNA-Design, <i>off-target</i> Analyse
Chromas Lite 2.1	Technelysium, South Brisbane, AUS	Sequenzanalyse
CRISPR Design	http://crispr.mit.edu/	sgRNA-Design, <i>off-target</i> Analyse
e!Ensembl	http://www.ensembl.org	Genomdatenbank
FlowJo® v10	FLOWJO,LLC, Ashland OR, USA	Durchflusszytometrie
Glomax® Software	Promega, Mannheim, D	Bestimmung der Proteinkonzentration
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, USA	Western Blot-Quantifikation durch Densitometrie
LabImage 1D	Intas, Goettingen, D	Imaging System, Western Blot
ZEN Mikroskopie- und Imaging-Software	Carl Zeiss, Oberkochen, D	Mikroskopie-aufnahmen
Mendeley	https://www.mendeley.com/download-desktop/	Referenzmanager
Microsoft Office	Microsoft, Unterschleissheim, D	Word, PowerPoint, Excel
MultAlin	http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin (Corpet 1988)	Alignment
NextProt	https://www.nextprot.org/	Proteindomänen
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	Literaturrecherche
Reverse Complement	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html	<i>in silico</i> Sequenzübersetzung
GraphPad	GraphPad Software, Inc., La Jolla CA, USA	Statistik
T _m calculator	http://www6.appliedbiosystems.com/support/	Primerdesign

	teertools/calc/	
Translation tool	http://web.expasy.org/translate	DNA-zu-Protein Sequenzübersetzung
UniProt	https://www.uniprot.org	Proteindomänen

3 Methoden

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Ethanolfällung

Der aufzureinigenden DNA-Probe (x µl) wurden 3M Natriumacetat (0,1 x µl) und 96 % Ethanol (2,5 x µl) zugesetzt. Dieser Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl 70 % Ethanol gewaschen. Danach wurde der Ansatz erneut bei Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert (14.000 rpm). Der Überstand wurde erneut verworfen. Das DNA-Pellet wurde in Wasser resuspendiert.

3.1.2 Quantifizierung der DNA-Konzentrationen

Die DNA-Konzentrationen sowie die Reinheit der DNA wurden photometrisch bestimmt. Gegen einen Referenzwert (Lösungsmittel der Probe) wurde die Absorption der Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 280 nm mit dem NanoVuePlus® nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ermittelt. Somit konnte die DNA-Konzentration bestimmt werden, da das Absorptionsspektrum von Nukleinsäuren einem spezifischen Muster entspricht. Zur Bestimmung der Reinheit der DNA wurden zwei Absorptionswerte der Wellenlängen 260 nm und 280 nm ($A_{260/280}$) ins Verhältnis gesetzt. Ein Wert von etwa 1,8 entspricht reiner DNA. Liegt der Wert darunter, so weist dies auf eine Kontamination der Probe durch Proteine oder Phenol hin, während ein Quotient > 2 für eine Verunreinigung durch RNA spricht. Für $A_{260/230}$ werden Werte von etwa 2,0-2,2 erwartet. Niedrigere Werte weisen auf eine Kontamination mit Substanzen hin, die bei 230 nm absorbieren.

3.1.3 DNA-Gewinnung

3.1.3.1 Isolierung genomischer DNA

Das Qiagen *QIAamp Blood and Tissue Kit* wurde verwendet, um genomische DNA aus den Zellen zu gewinnen.

3.1.3.2 Amplifikation und Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde eine einzelne Bakterienkolonie in 4 ml LB Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) zur Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien bei 37 °C über Nacht unter ständigem Schütteln inkubiert. Aus den Bakterien wurde Plasmid-DNA unter Verwendung des NucleoSpin® Plasmid Kit von Macherey-Nagel isoliert. Das NucleoBond® Xtra MiDi/Maxi Kit von Macherey-Nagel wurde zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA verwendet. Dafür wurden 100 ml LB Medium mit Ampicillin

(100 µg/ml) mit Bakterien inokuliert und über Nacht unter ständigem Schütteln bei 37 °C inkubiert.

3.1.3.3 Agarose-Gelelektrophorese (AGE)

Eine Agarose-Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um PCR-Produkte, Plasmide oder durch Restriktionsverdau gewonnene DNA-Fragmente zu analysieren oder zur weiteren Verarbeitung aufzutrennen. Die negativ geladene DNA bewegt sich dabei in einem elektrischen Feld zur Anode ((+)-Pol). Da sich kleinere DNA-Fragmente in der Agarose-Gelmatrix schneller bewegen als größere Fragmente, können die Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt und durch Fluoreszenzfärbung (z.B. HD Green® Safe DNA Dye) und UV-Licht (254 nm) visualisiert werden, da die Fluoreszenzfarbstoffe mit der DNA-Doppelhelix interkalieren. Zur Herstellung von Agarose-Gelen wurde Agarosepulver in 1x TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle aufgelöst. Durch Anpassen der eingesetzten Agarosemenge kann die Viskosität und somit die Porengröße des Gels angepasst werden. Als Nukleinsäurefluoreszenzfarbstoff wurde HD Green® Safe DNA Dye zugefügt (5 µl pro 100 ml Agaroselösung). Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer eingesetzt. Es wurde eine Spannung von 60-80 V verwendet. Die Proben wurden mit 6x *Loading Dye* angesetzt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden 5 µl eines definierten Standards (*Gene Ruler DNA ladder*) auf demselben Gel mit aufgetrennt. Anhand des Standards konnte die Größe der DNA-Fragmente abgeschätzt werden. Die Fragmente wurden mit Hilfe des Geldokumentationssystem Gel iX 20 Imager von Intas dargestellt.

3.1.3.4 DNA-Extraktion aus einem Agarosegel

Spezifische DNA-Fragmente wurden aus dem Agarose-Gel mit Hilfe des *NucleoSpin® Gel extraction and PCR clean up Kit* von Macherey-Nagel extrahiert. Dafür wurde eine AGE (siehe *Kapitel 3.1.3.3*) durchgeführt, um die DNA-Fragmente aufzutrennen und anschließend die gewünschten Fragmente mit einem Skalpell ausschneiden zu können.

3.1.4 Enzymatische Manipulation von DNA

3.1.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wird zur Amplifikation spezifischer DNA-Regionen mit Hilfe eines Vorlage-DNA-Strangs genutzt und wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt. Durch Denaturierung wird die Doppelstrang-DNA, die als Vorlage der Amplifikation dient, in Einzelstrang-DNA aufgespalten. Sogenannte Primer – Oligonukleotide mit komplementärer Sequenz zur Einzelstrang-DNA, die jeweils in 5'-3'-Richtung die Grenzen des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts vorgeben – werden danach an die Einzelstrang-DNA angelagert (engl.: *annealed*). Dadurch entstehen freie 3' Hydroxylenden zur Synthese des komplementären DNA-Strangs durch die DNA-Polymerase (Elongation). Durch 30-40 Wiederholungen dieser drei Schritte

(Denaturierung, Anlagerung der Primer, Elongation) kann eine bestimmte DNA-Region exponentiell amplifiziert werden. Für diese Arbeit wurde die *Taq* Polymerase verwendet. Für die PCR wurden Primer mit einem GC-Gehalt von 40-60 % und einer Schmelztemperatur von etwa 50-60 °C generiert (Tabelle 7).

In Tabelle 14A ist der Mastermix für 4 Reaktionen mit je 25 µl angegeben. Jedem Reaktionsansatz wurden 200 ng DNA zugesetzt, ein Ansatz wird als Wasserkontrolle mitgeführt, um Verunreinigungen des Mastermix ausschließen zu können. Für das T7EI-Assay werden 800 ng DNA verwendet. In Tabelle 14B ist das PCR-Programm für den Thermocycler dargestellt. Zur Kontrolle der erfolgreichen PCR wurden je 5 µl der Proben mit 6xLoading Dye versetzt und auf ein 1 %-Agarose-Gel mit HD Green® Safe DNA Dye aufgetragen. Eine 100 bp-Leiter (*Gene Ruler DNA ladder*) wurde zur Kontrolle aufgetragen. Zur Darstellung der Fragmente wurde das Geldokumentationssystem Gel iX 20 Imager von Intas verwendet.

Tabelle 14: PCR-Mastermix (A) und PCR-Programm (B) für den Thermocycler

A)		B)	
10 µl	Taq-Puffer ohne MgCl ₂	95 °C	5 Minuten
10 µl	MgCl ₂ (25 mM)	95 °C	30 Sekunden
3 µl	DMSO	60 °C	20 Sekunden
2 µl	dNTPs (je Nukleotid 10 mM)	72 °C	1 Minute/kb
4 µl	Forward Primer	72 °C	2 Minuten
4 µl	Reverse Primer	4 °C	∞
0,6 µl	Taq-Polymerase		
64,4 µl	H ₂ O		

} x35

3.1.4.2 Plasmiddephosphorylierung und Oligonukleotidphosphorylierung

Nach dem Restriktionsverdau wurden die Plasmidvektoren zum Schutz vor Religation dephosphoryliert. Der Dephosphorylierungsansatz, bestehend aus 20 µg Plasmid, 1µl CIP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) und 5µl Puffer, die mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt wurden, wurde bei 37 °C für eine Stunde inkubiert und das Enzym danach bei 65 °C für 15 min inaktiviert. Zur Aufkonzentrierung der DNA wurde eine Ethanol-fällung (siehe Kapitel 3.1.1) durchgeführt.

Die Führungssequenzen für die sgRNA wurden als Oligonukleotide mit Restriktionsstellenüberhängen für BbsI (pX459) oder für BsmBI (lentiCRISPR v2) bei Sigma-Aldrich bestellt (siehe Tabelle 8). Die Oligonukleotide, die als Führungssequenzen für Exon 1 und Exon 2 von *Snap29* (*Mus musculus*) bzw. Exon 1 von *SNAP29* (*Homo sapiens*) ausgewählt wurden, wurden aneinandergelagert (95 °C, 5 min, über Nacht abkühlen lassen) und

phosphoryliert. Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase (PNK) von NEB nach dem Herstellerprotokoll phosphoryliert.

3.1.4.3 Restriktionsverdau von DNA und Generierung von CRISPR/Cas9-Konstrukten

Die Plasmide pX459 und lentiCRISPR v2 beinhalten die cDNA, die für die *Streptococcus pyogenes* Cas9 (hSpCas9) kodiert, die sgRNA mit Restriktionsschnittstellen zur individuellen Modifikation und eine Puromycinresistenzkassette (Ran et al. 2013b; Sanjana et al. 2014). Das Plasmid pX459 wurde mit BbsI (Thermo Fisher), lentiCRISPR v2 mit BsmBI (New England Biolabs) nach dem Herstellerprotokoll geschnitten. Da durch BsmBI zwei Fragmente aus lentiCRISPR v2 entstanden, wurden die geschnittenen Plasmidfragmente zur Aufreinigung auf ein Agarosegel aufgetragen und anschließend das größere Fragment (~12.000 bp) aus dem Gel ausgeschnitten. Das gewünschte Plasmidfragment wurde mit Hilfe des *Gel extraction and PCR Clean Up*-Systems von Macherey-Nagel nach Herstelleranweisungen extrahiert. Die Oligonukleotide für pX459 wurden durch die T4 PNK phosphoryliert (siehe *Kapitel 3.1.4.2*), die Oligonukleotide für lentiCRISPR v2 bereits phosphoryliert bestellt. Mit Hilfe der T4 Ligase, einer DNA-Ligase, die kovalente Phosphodiesterbindungen zwischen freien 3' Hydroxyl- und 5' Phosphatenden von DNA-Fragmenten katalysiert, wurden die aneinandergelagerten, phosphorylierten Oligonukleotide in den Vektor ligiert. Hierfür wurde der Ligationansatz, bestehend aus 25 ng dephosphoryliertem Vektor und 1 µl DNA Ligase ad 20 µl aneinandergelagerte, phosphorylierte Oligonukleotide, für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konstrukte wurden in den *Escherichia coli* Stamm DH5α (pX459) oder Stb13 (lentiCRISPR v2) transformiert und transformierte Zellen mit Ampicillin selektiert (siehe *Kapitel 3.2.3* Transformation von *E. coli* DH5α). Zur Kontrolle der stattgehabten Ligation wurde die Sequenz des entstandenen Plasmids mit Hilfe des BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit mit einem pX330 fwd-Primer (pX459) oder hU6-fwd-Primer (lentiCRISPR v2) sequenziert und mit der erwarteten Sequenz verglichen (*Tabelle 7*). Die Führungssequenzen wurden mit Hilfe von *in silico on-* und *off-target* Vorhersagen ausgewählt (<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>, <http://crispr.mit.edu/>).

3.1.4.4 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

DNA wurde durch eine Sanger-Sequenzierung mittels Kettenabbruch-Synthese (Sanger et al. 1977) sequenziert. Dafür wird eine modifizierte PCR mit Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) und Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs) zum Kettenabbruch durchgeführt, bei der jedoch nur ein Primer und kein Primerpaar hinzugegeben wird. Hier wurden das *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* von Applied Biosystems nach Herstellerangaben verwendet, bei dem basenspezifisch fluoreszenzmarkierte ddNTPs zur Detektion eingesetzt werden. Daher kann die Sequenzierung in einer einzigen Reaktion durchgeführt werden. Die

Fluoreszenzfarbstoffe können während einer Elektrophorese mit einem Laser angeregt und das Fluoreszenzmuster in einem Sequenziergerät ausgewertet werden. Dieser Schritt wurde durch die Firma Eurofins Genomics durchgeführt. Das Ergebnis dieser Auswertung wird in einem Chromatogramm dargestellt und in dieser Form von der Firma bereitgestellt. Vom Herstellerprotokoll abweichende Angaben sind *Tabelle 15* zu entnehmen.

Tabelle 15: Sequenzierungsansatz (A) und Sequenzierungsprogramm (B)

A) Sequenzierungsansatz	B) Sequenzierungsprogramm
300-500 ng Plasmid-DNA oder PCR-Produkt 7 µl +ExoSAP-Verdau	96 °C 30 s
0,5 µl Primer	55 °C 15 s
1 µl BigDye Enzym	60 °C 4 min
2 µl BigDye Puffer	} x26
Ad 10 µl H ₂ O	

Vor der Sequenzierung genomischer DNA aus PCR-Produkten wurde ein ExoSAP-Verdau durchgeführt. Dazu wurden 5 µl PCR-Produkt für einen ExoSAP-Verdau nach Herstellerprotokoll (Affymetrix) angesetzt. Bei jedem Sequenzierungsansatz wurde zum Vergleich eine WT-Kontrolle mitgeführt. Die Sequenzen wurden mit dem Programm Chromas Lite und <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> (Corpet 1988) analysiert. Die Sequenzen der Plasmidligation wurden mit der gewünschten Sequenz verglichen und passende Plasmide für weitere Versuche ausgewählt. Die jeweiligen Exon-Sequenzen der Zellpopulationen die mit CRISPR/Cas9-Konstrukten transfiziert oder transduziert worden waren, wurden mit den jeweiligen WT-Sequenzen verglichen und Veränderungen in der DNA-Sequenz durch CRISPR/Cas9 dokumentiert.

3.1.4.5 T7EI-Assay

Das T7 Endonuklease I (T7EI)-Assay von New England Biolabs ist eine sogenannte „*enzyme mismatch cleavage*“ (EMC) Methode. Dabei erkennt die eingesetzte Nuklease Fehlpaarungen und extrahelikalen Windungen und schneidet die Heteroduplex-DNA an diesen Stellen. Es können ein oder mehrere Nukleotide als Fehlpaarungen detektiert werden. Die T7EI stammt aus Bakteriophagen und kann Insertionen und Deletionen, die durch NHEJ entstanden sind, in den amplifizierten genomischen DNA-Abschnitten erkennen. Für dieses Assay wird genomische DNA des durch CRISPR/Cas9 veränderten Exons mittels PCR (siehe *Kapitel 3.1.4.1*) amplifiziert. Durch Denaturieren und erneute Anlagerung entstehen so Heteroduplex-DNA-Fragmente. Durch Analyse mittels AGE (siehe *Kapitel 3.1.3.3*) können so

Fragmentlängenunterschiede zwischen T7EI-behandelter DNA und unbehandelter DNA nachgewiesen werden, die einen Rückschluss auf die vorliegenden Allele zulassen.

3.2 Mikrobiologie

3.2.1 Sterilisierung und Autoklavierung

Flüssigkeiten (z.B. *aqua bidest* oder Pufferlösungen) und flüssige sowie feste S1-/S2-Abfälle wurden im Autoklaven sterilisiert (120 °C, 3 bar, 20 min). Plastikpipettenspitzen wurden autoklaviert (120 °C, 3 bar, 20 min) und anschließend getrocknet (70 °C, 4 Stunden). Glaspipetten, die für die Zellkultur verwendet wurden, wurden im Geschirrspüler bei 40 °C gewaschen. Danach wurden sie mit Baumwolle abgedichtet und sterilisiert (180 °C, mindestens 4 Stunden).

3.2.2 Generierung von chemisch kompetenten *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α

Rekombinante Plasmid-DNA kann mit Hilfe kompetenter Bakterien amplifiziert werden. Dafür muss die Plasmid-DNA in die Bakterienzelle aufgenommen werden, was ohne Behandlung der Bakterien nur in sehr geringem Umfang erfolgt. Durch physikalische oder chemische Methoden können Bakterienzellmembranen so verändert werden, dass fremde DNA besser aufgenommen werden kann. Hohe Salzkonzentrationen können eine Öffnung von Poren herbeiführen. Durch Anwendung der oben genannten Methoden werden sogenannte kompetente Zellen produziert.

Eine einzelne Kolonie am Vortag auf LB-Agar ohne Antibiotikum ausplattierter kompetenter Bakterien wurde mit einem sterilen Holzstäbchen abgenommen, um damit 10 ml LB-Medium zu inokulieren. Diese Kultur wurde über Nacht (37 °C, 1800 rpm) inkubiert und am nächsten Tag mit 190 ml frischem LB-Medium aufgefüllt. Die Inkubation wurde bis zum Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{600}=0,5$ fortgeführt und danach der Beginn der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien durch Inkubation auf Eis aufrechterhalten. Bakterienpellets wurden durch Zentrifugation (4 °C, 4000 rpm, 10 min) erstellt und danach in 25 ml eiskaltem 100 mM $MgCl_2$ resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert, bevor die Bakterien erneut zentrifugiert wurden. Die Bakterien wurden in 5 ml eiskaltem 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert, auf Eis für 20 min inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml (85 % $CaCl_2$, 15 % Glycerin) resuspendiert. Es wurden Aliquote à 50 μ l erstellt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Transformation von *E. coli* DH5 α und StbI3

Die Aufnahme von exogener DNA in eine Bakterienzelle wird als Transformation bezeichnet. Ein Beispiel dafür ist die Aufnahme rekombinanter Plasmid-DNA durch kompetente *E. coli* (DH5 α Bakterien, siehe *Kapitel 3.2.2*). Zur Transformation wurde kompetenten DH5 α -

Bakterien 5 µl der Plasmid-DNA (Ligationsansatz) zugegeben und vorsichtig durch Umrühren gemischt. Danach wurden die Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden 45 s lang einem 42 °C Hitzeschock ausgesetzt und anschließend erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Nachdem 450 µl LB-Medium zur Regeneration zugefügt wurde, wurden die Bakterien 60 min bei 37 °C auf niedrigster Stufe im Heizblock geschüttelt. StbI3 Bakterien wurden nach Herstellerangaben transformiert. Danach wurde die Bakteriensuspension zur Selektion der transformierten Bakterien auf Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert, da die hier verwendeten Plasmide immer eine Ampicillinresistenzkassette enthalten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.3 Zellbiologie

3.3.1 Zellkulturtechniken

3.3.1.1 Kultur immortalisierter Zelllinien

Die Zelllinien (*Tabelle 1*) wurden in DMEM high glucose + 10 % FCS + 1 % P/S (im Weiteren „Medium“ genannt) im Brutschrank kultiviert (befeuchtete Atmosphäre, 5 % CO₂, 37 °C). Nur das Medium für die HEK293T-Zellen, die zur Virusproduktion verwendet wurden, wurde mit hitzeinaktiviertem FCS angesetzt (im Weiteren „hiFCS-Medium“ genannt). Zur Hitzeinaktivierung wurde das FCS bei 56 °C für 30 min erhitzt. Zur Virenernte wurde eine Variante des hiFCS-Mediums verwendet, die mit 40 % hiFCS angesetzt wurde (fortan „Harvest Medium“ genannt). Wenn die Zellen konfluent gewachsen waren, wurden sie passagiert (1:4 - 1:10). Dafür wurden tote Zellen und verbleibendes FCS-enthaltendes Medium mit PBS von den adhären Zellen gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche oder der Kulturschale gelöst. Dazu wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert, bis alle Zellen sich von der Oberfläche gelöst hatten, was unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Zur Hemmung der Trypsinaktivität wurde mindestens die doppelte Menge an Medium dazugegeben und die Zellen bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Medium resuspendiert und auf eine angemessene Anzahl an Zellkulturflaschen oder Zellkulturplatten aufgeteilt oder der Kryokonservierung zugeführt (siehe *Kapitel 3.3.1.3*).

3.3.1.2 Zellen zählen

Die Anzahl der Zellen/ml wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Dafür wurde eine Zellsuspension, wie in *Kapitel 3.3.1.1* beschrieben, erstellt. Es wurden 10 µl einer 1:10 mit Trypanblau vermischten Zellsuspension (10 µl Zellsuspension, 90 µl Trypanblau) auf die Neubauer Zählkammer aufgetragen. Vier große Quadrate (je 1 mm²) der Neubauer Zählkammer wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Anzahl der Zellen/ml entspricht der Summe der gezählten Zellen aller vier Quadrate addiert x 2500 x Verdünnungsfaktor 10.

3.3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden 500 µl Zellsuspension mit 500 µl Einfriermedium (40 % DMEM mit 40 % FCS, bei HEK293T-Zellen hiFCS und 20 % DMSO) versetzt und in Kryoröhrchen transferiert. Zur kontrollierten Abkühlung von -1 °C/min auf -80 °C im Gefrierschrank wurde ein Einfriercontainer verwendet. Für die Langzeitkonservierung wurden die Kryoröhrchen ab dem folgenden Tag bei -150 °C gelagert. Kryokonservierte Zellen wurden vor erneuter Kultivierung im Kryoröhrchen unter fließendem Wasser aufgetaut und die Zellsuspension in 10 ml Medium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1000 rpm, 5 min). Das Zellpellet wurde vom Überstand befreit und zur erneuten Aussaat in einer Zellkulturflasche in Medium resuspendiert. Zur Entfernung des restlichen DMSO und toter Zellen, wurde das Medium am Folgetag erneuert.

3.3.1.4 Transiente Transfektion mit CRISPR/Cas9 und pLJM1-EGFP

Für die transiente Transfektion mit dem pX459-Vektor, in den die sgRNA-Konstrukte einkloniert wurden, bzw. pLJM1-EGFP wurden in 24-Well-Zellkulturplatten 1,5 x 10⁴ Zellen (C5N-Keratinocyten bzw. MRC5Vi-Fibroblasten) in 500 µl ausgesät. Am Folgetag folgte die Transfektion mit 0,5 µg Plasmid-DNA, 1,5 µl ViaFect™ Transfection Reagent ad 50 µl OptiMEM. Der Transfektionsansatz wurde gut durchgemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach den Zellen zugetropft. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch Medium mit Antibiotikum (Puromycin: C5N mit 1,5 µg/ml und MRC5Vi mit 0,25 µg/ml) zur Selektion ersetzt. Sobald die Zellen der untransfizierten Selektionskontrolle vollständig gestorben waren, wurde die Selektion mit Puromycin beendet und wieder Medium ohne Antibiotikum zur Kultivierung verwendet. ViaFect™ Transfection Reagent soll in der Lage sein, viele verschiedene Zelllinien mit relativ hoher Effizienz transfizieren zu können (Promega 2014).

3.3.1.5 Transiente Transfektion der C5N-Keratinocyten: Weitere Protokolle

Zur Ermittlung des optimalen Protokolls zur Transfektion von C5N-Keratinocyten wurden weitere Transfektionsreagenzien getestet. Neben Attractene wurden auch MATra Short und Lipofectamine nach Herstellerprotokoll in 24-Well-Platten eingesetzt. Dafür wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Um den Transfektionserfolg mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisieren zu können, wurden die Zellen mit dem Plasmid pcDNA3.1-EGFP transfiziert.

3.3.1.6 Produktion lentiviraler Vektoren

Für die Produktion von lentiviralen Vektoren wurden 4 x 10⁶ HEK293T Zellen in 10 cm Zellkulturschalen in 10 ml hiFCS-Medium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das hiFCS-

Medium gewechselt und die Zellen mit einem Transfektionsansatz transfiziert. Das Medium wurde 6 Stunden nach Transfektion gewechselt. Der Transfektionsansatz bestand aus 2 µg pLJM1-EGFP (Kontrolle) oder 2 µg lentiCRISPR v2 mit dem inklonierten sgRNA-Konstrukt, 2 µg psPAX2 und 0,2 µg pCMV-VSV-G ad 300 µl DMEM ohne Zusätze mit 15 µl Attractene, der gut durchgemischt wurde und nach 15 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur den Zellen zugetropft wurde. Attractene ist ein nicht-liposomales Lipid, das die Transfektion auch von nicht-adhären Zellen ermöglicht. Es kann mit der DNA Komplexe bilden, so dass Mizellen entstehen, die von der Zelle durch Endozytose aufgenommen werden können (Gharaati-Far et al. 2018). Das hiFCS-Medium wurde 24 Stunden nach Transfektion durch Harvest Medium ersetzt. Die lentiviralen Vektoren wurden 48 Stunden nach diesem Mediumwechsel geerntet, indem das mit den Zellen inkubierte Harvest Medium vorsichtig aufgenommen und mit Hilfe eines 0,45 µm PES-Filters von Zelltrümmern und groben Verunreinigungen befreit wurde. Die geernteten lentiviralen Vektoren wurden bei -20 °C kurzfristig gelagert.

Zur Ermittlung des besten Transfektionsreagenzes und des besten Plasmidverhältnisses wurden weitere Transfektionsansätze auf gleiche Weise getestet. Diese sind in *Tabelle 16* dargestellt. Die Reagenzien wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 16: Weitere Transfektionsansätze zur lentiviralen Vektorproduktion

	TransIT®-LT1 Transfection Reagent	ViaFect™ Transfection Reagent	Attractene Transfection Reagent
Hersteller	Mirus Bio LLC	Promega	Qiagen
pLJM1-EGFP	8 ng	4 ng	2 ng
psPAX2	6 ng	3 ng	1,5 ng
pCMV-VSV-G	4 ng	2 ng	1 ng

Tabelle 17: Virenverdünnungen zur Transduktion

Verdünnung	Vektor in Harvest Medium [µl]	Medium [µl]	Polybrene (10 mg/ml) [µl]
Unverdünnt	498,5	0	1,5
1:5	300	198,5	1,5
1:10	150	348,5	1,5
1:25	60	438,5	1,5
1:50	30	468,5	1,5
1:100	15	483,5	1,5

3.3.1.7 Lentivirale Transduktion

Die Zielzellen der Transduktion wurden in 6-Well-Zellkulturplatten mit einer Zellzahl von 10^5 Zellen in 1,5 ml Medium ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen transduziert. Dafür wurde den Zellen Viren in verschiedenen Verdünnungen (*Tabelle 17*) zusätzlich zu 1ml Medium zugesetzt. Die Virenverdünnungen wurde vor der Puromycinselektion 48 Stunden (MRC5Vi-Fibroblasten) bzw. 72 Stunden (C5N-Keratinozyten) auf den Zielzellen belassen. Für die Bestimmung der EGFP-Expression wurden Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der Zellen zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Transduktion erstellt.

3.3.1.8 Einzelklonexpansion

Für die Herstellung monoklonaler Zelllinien wurden 100 μ l einer Zellsuspension mit einer Konzentration von 50 Zellen/10 ml pro Vertiefung in einer 96-Well-Platte ausgesät. Eine Vertiefung wurde zur Positivkontrolle für Zellwachstum mit einer geringeren Verdünnung bestückt. Die Vertiefungen wurden 48 Stunden nach Aussaat unter dem Mikroskop auf einzelne Zellen überprüft und diese Vertiefungen weiter beobachtet. Bei Bedarf wurde das Medium erneuert. Sobald die Kolonie eine angemessene Größe erreicht hatte, wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA gelöst (siehe *Kapitel 3.3.1.1*) und in einer 6-Well-Platte erneut ausgesät. Die Zellen wurden solange weiterkultiviert, bis eine genügende Zellzahl zur Sequenzierung und zur Weiterkultivierung vorhanden war. Zur Vereinzelnung der MRC5Vi-Fibroblasten wurden die 96-Well-Platten vorher mit Superfibronektin beschichtet (50 μ l/Well, 5 μ g/ml Superfibronektin in PBS, 2 Stunden bei 37 °C) und danach zweimal mit PBS gewaschen. Als Medium wurde hier *FibroLife® S2 Fibroblast Medium Complete Kit* verwendet.

3.3.2 Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie

Um die Expression von SNAP29 analysieren zu können, wurden $1,5 \times 10^4$ Zellen (C5N-Keratinozyten und heterozygoter Klon A0_10) auf runden Deckgläsern in 24-Well-Platten ausgesät. Die Zellen in der Zellkulturplatte wurden am Folgetag dreimal mit PBS gewaschen, bevor sie anschließend mit 4 % PFA für 15 min fixiert wurden. Danach wurden sie erneut dreimal mit PBS gewaschen und die Zellmembranen mit 0,1 % Triton X-100 für 15 min permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Deckgläser 30 min mit TSA geblockt. Der Primärantikörper gegen SNAP29 (*Tabelle 11*) wurde 1:250 in TSA verdünnt und für 90 min auf den Deckgläser inkubiert. Hierfür wurden 100 μ l Tropfen der Antikörperverdünnung vorgelegt und die Deckgläser umgekehrt darauf platziert. Danach wurden die Deckgläser zweimal mit PBS/0,05 % Tween und dreimal mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper (anti-rabbit, *Tabelle 12*) wurde 1:800 in TSA verdünnt und für 20 min auf den Deckgläsern inkubiert. Nach erneutem Waschen wie nach dem Primärantikörper wurden die Zellen mit Hoechst33342 (fortan Hoechst genannt) als Kernfärbung gegengefärbt

und nach erneutem Waschen mit PBS mit DAKO Fluoromount eingedeckelt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zur Ermittlung des besten Transfektionsprotokolls für C5N-Keratinocyten wurden die Deckgläser mit den Zellen aus *Kapitel 3.3.1.5* mit 4 % PFA fixiert und anschließend mit Hoechst gegengefärbt wie oben beschrieben.

Mikroskopische Aufnahmen der Zellen wurden mit Hilfe des Microscope Axio Vert.A1 und der ZEN Software angefertigt.

3.3.3 Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zelllinien C5N und MRC5Vi in 6-Well-Platten mit unterschiedlichen Verdünnungen (unverdünnt, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50 und 1:100) unterschiedlicher Stocklösungen lentiviraler Vektoren mit *EGFP*-Gen transduziert. Zur jeweiligen Zeit der Selektion (MRC5Vi-Zellen: 48 Stunden, C5N-Zellen: 72 Stunden) wurden die Zellen geerntet. Zusätzlich wurden die C5N-Keratinocyten und MRC5Vi-Fibroblasten mit Hilfe von ViaFect™ (siehe *Kapitel 3.3.1.4*) oder Attractene (5×10^5 Zellen in 10 cm Schale, Methode siehe *Kapitel 3.3.1.6*) mit dem Plasmid pLJM1-EGFP transfiziert. Zur Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, zweimal mit PBS gewaschen und in 400-500 μ l PBS aufgenommen. Kurz vor dem Einlesen der Proben wurden die Zellen erneut gründlich resuspendiert. In der Durchflusszytometrie werden einzelne Zellen nach ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz analysiert. Die Darstellung erfolgt in einem zweidimensionalen Diagramm. Da die erfolgreich transduzierten oder transfizierten Zellen EGFP exprimieren, wird eine hohe Intensität des Fluoreszenzsignals auf der dafür vorgesehenen Achse erwartet. Der Beginn der EGFP-Positivität wurde anhand von untransduzierten oder untransfizierten Kontrollen festgelegt. Die Auswertung der Daten des FACSCalibur erfolgte mit der Software FlowJo. Die Analyse der Zellen am FACSCalibur erfolgte im Zentrum für Medizinische Forschung im Arbeitsbereich Zellbiologie mit freundlicher Unterstützung von Dr. Susanne Stähle.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Präparation von Proteinlysaten

Die Zellen wurden, wie in *Kapitel 3.3.1.1* beschrieben, geerntet und das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen, um ein Ganzzelllysat zu erstellen. Die Zellen wurden in einer angemessenen Menge Lysepuffer (PBS mit PMSF und Proteinaseinhibitormix) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch wiederholtes (dreimal) Einfrieren in flüssigem Stickstoff und erneutes Auftauen auf Eis aufgebrochen. Die Lysate wurden anschließend für 30 min in einem Ultraschallbad weiter behandelt. Die Zellen wurden bei 4 °C für 30 min mit 14.000 rpm

zentrifugiert, um einen Überstand frei von Zelltrümmern zu gewinnen, der in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Mit Hilfe von 3 % SDS-Spaltpuffer, der β -Mercaptoethanol enthält, wurde die benötigte Konzentration des Proteinlysats hergestellt (in der Regel 50 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) und anschließend kurz aufgekocht (95 °C, 10 min). Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte anhand des Bradford Assays (Bradford 1976). Dafür wurde die Bradford-Lösung Roti®-Quant 1:5 in *aqua bidest* angesetzt. Die Proben wurden jeweils mit Puffer in zwei Konzentrationsstufen verdünnt (1:20 und 1:40) und zusätzlich mit 150 μl Bradford-Lösung versetzt. Die entstandenen Ansätze wurden bei Raumtemperatur für 5 min unter Schütteln inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde durch Messung der optischen Dichte (OD_{595}) mittels eines Photometers (GloMax® Discover System) bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer BSA-Kalibrierungskurve (serielle Verdünnung, 0-1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) errechnet.

3.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Laemmli (Laemmli 1970) wurde zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe durch Anlegen eines elektrischen Feldes verwendet. Die Auftrennung nach der Größe wird einerseits durch Auflösung der Disulfidbrückenbindungen durch das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol und andererseits durch Denaturierung und damit Störung der Tertiärstruktur durch das stark negativ geladenen Detergenz SDS sowie dessen Anlagerung über seinen aliphatischen Anteil an das ungefaltete Polypeptid ermöglicht. Durch ein konstantes Verhältnis von SDS zur Menge des Polypeptids kann die intrinsische Ladung des Polypeptids vernachlässigt werden und ermöglicht so eine Separierung der Proteine nach Größe. Proteinlysate wurden daher wie in *Kapitel 3.4.1* angesetzt. Zur PAGE wurden 4–15 % *Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels* verwendet. Die Gele wurden, wenn nicht anders angegeben, mit 50 μg Proteinlysate und Proteinmarker beladen.

3.4.4 Western Blot

Mit Hilfe spezifischer Antikörper können im Western Blot spezifische Proteine nach Auftrennung durch eine SDS-PAGE und Übertragung auf eine Membran, für diese Arbeit eine Nitrozellulosemembran, nachgewiesen werden. Der Transfer vom Polyacrylamid-Gel auf die Membran wurde im *semi-dry* Western Blot-Verfahren durchgeführt (Bio-Rad Transblot Turbo System, 0,6 A, maximal 12 V, 45 min). Vor Verwendung wurden das Blot-Papier und die Membran für mindestens 5 min in Transferpuffer gelegt. Durch eine Färbung der Membran mit Ponceau S-Lösung kann die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel

nachgewiesen werden. Die Membran wurde anschließend mit *aqua bidest* entfärbt und für 30 min mit Blocking-Puffer inkubiert, um freie Bindungsstellen der Membran zu blockieren und somit eine Fehlbindung des Primärantikörpers an der Membran zu verhindern. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit der Primärantikörperlösung inkubiert (Tabelle 11). Die Membranen wurden am Folgetag dreimal mit Waschlösung gewaschen und anschließend mit dem passenden Sekundärantikörper inkubiert (45 min, Raumtemperatur). Danach wurden die Membranen dreimal mit Waschlösung und zweimal mit *aqua bidest* gewaschen. Das *WesternBreeze Chemiluminescent Immunodetection System* von Applied Biosystems wurde zur Detektion der Antikörperbindung nach Herstelleranweisungen eingesetzt. Mit dem Chemo Cam Imager 3.2 wurde die Chemolumineszenz aufgenommen und die Signalstärke mit ImageJ quantifiziert. Der Wert für die Signalstärke des konstitutiv exprimierten β -Aktin (ein sogenanntes „Housekeeping Gen“) wurde auf den Wert 100 festgelegt und jede Proteinbandenintensität entsprechend umgerechnet.

3.4.5 Membran-„Stripping“

Um die Membranen mit den darauf gebundenen Proben erneut verwenden zu können, wurden die Membranen in Roti®-Free Stripping Buffer bei 56 °C für 30 min von den vorher gebundenen Antikörpern und der Chemolumineszenz-Färbung befreit. Danach wurden die Membranen mit PBS gewaschen und 30 min bei Raumtemperatur in Blocking Puffer blockiert. Die folgenden Schritte entsprechen dem Protokoll aus Kapitel 3.4.4 ab Zugabe des Primärantikörpers.

3.5 Statistische Analyse

Statistische Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism durchgeführt. Die Anzahl der unabhängigen Proben (n) ist beim jeweiligen Experiment angegeben. Die Daten geben den Mittelwert (engl.: *mean*) \pm SD (Standardabweichung) an. Der zweiseitige, ungepaarte Student's t-Test wurde angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden auf * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ und *** $P < 0.001$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Arbeitsablauf zur Generierung eines CRISPR/Cas9-vermittelten KO von *Snap29* in immortalisierten murinen Keratinozyten

In *Abbildung 5* ist der Arbeitsablauf zur Generierung eines *Snap29*-KO Klon dargestellt. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Ansätze zur Erzeugung eines *Snap29*-KO Klon eingesetzt: die transiente Transfektion (*Abbildung 5A-C*) und die lentivirale Transduktion (*Abbildung 5D-F*) eines Konstrukts, das für die Endonuklease Cas9 und die sgRNA kodiert. Zur transienten Transfektion wurde das Plasmid pX459, das für die *Streptococcus pyogenes* Cas9 Endonuklease (hellrot), eine Ampicillinresistenzkassette (gelb) und eine Puromycinresistenzkassette (grün) kodiert, verwendet. Es enthält eine BbsI Restriktionsstelle, um die sgRNA mit selbsterstellten Zielsequenzen integrieren zu können (*Abbildung 5A*). Zur lentiviralen Transduktion wurde das Plasmid lentiCRISPR v2 verwendet (*Abbildung 5D*). Die sgRNA-Zielsequenz wurde nach Restriktionsverdau des Plasmids mit BsmBI in das Plasmid ligiert (*Abbildung 5E*) und lentivirale Vektoren wurden mit Hilfe der Plasmide psPAX2 und pCMV-VSV-G in HEK293T Zellen produziert. Alternativ wurde statt des lentiCRISPR v2-Konstrukts das Plasmid pLJM1-EGFP verwendet, um die Transduktionseffizienz ermitteln zu können. Polyklonale Zellpopulationen wurden mit Sanger-Sequenzierung auf CRISPR/Cas9-bedingte DNA-Modifikationen im Vergleich zum WT analysiert. Wenn Anhalt für eine Genmodifikation mit CRISPR/Cas9 bestand (*Abbildung 5G*), wurden monoklonale Zellpopulationen generiert. Diese monoklonalen Zellpopulationen wurden mittels Sequenzierung und T7EI-Assay auf DNA-Modifikationen untersucht. Durch diese CRISPR/Cas9-vermittelte Genomedition können so ein oder beide Allele von *Snap29* modifiziert werden, wobei letzteres im besten Fall einen vollständigen *Snap29*-KO bewirken würde.

4.1.1 Methodische Exploration verschiedener Transfektionsverfahren

Zur Generierung einer murinen KO-Zelllinie aus immortalisierten C5N-Keratinozyten muss das CRISPR-Plasmid mit dem sgRNA-Konstrukt und der Endonuklease Cas9 in die Zielzellen gelangen. Da Keratinozyten zu den am schwersten zu transfizierenden Zellen gehören (Deyrieux & Wilson 2007), wurden verschiedene Transfektionsverfahren exploriert, um eine möglichst effiziente transiente Expression zu erreichen. Es wurden vier verschiedene Methoden bzw. Reagenzien (Attractene, Lipofectamine, MATra und ViaFect™) gemäß den Herstellerprotokollen getestet.

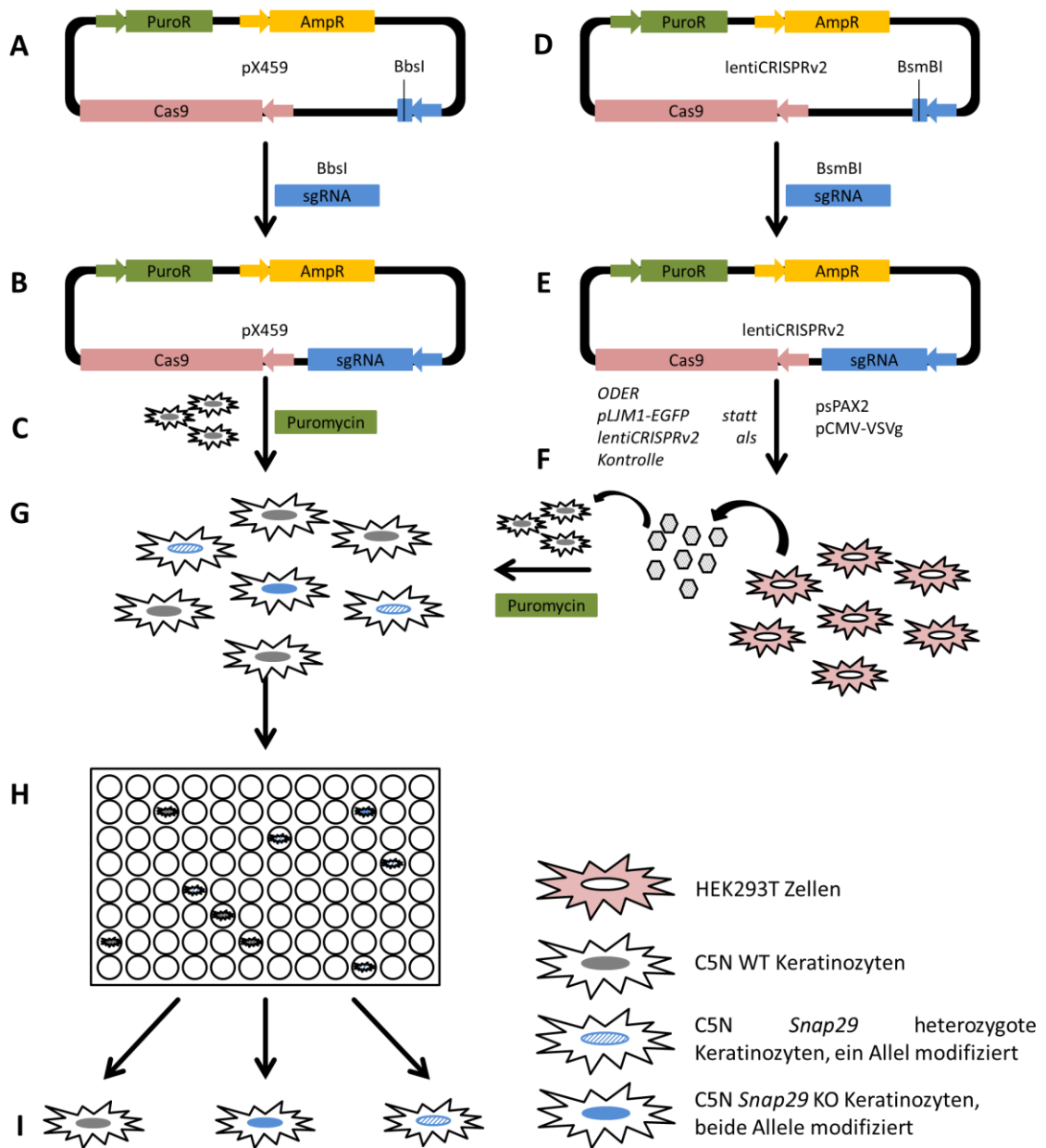


Abbildung 5: Arbeitsablauf zur Generierung eines CRISPR/Cas9-vermittelten Snap29 KO in C5N-Keratinozyten (A) Das Plasmid pX459, das für die *Streptococcus pyogenes* Cas9 Endonuklease (hellrot), eine Ampicillinresistenzkassette (gelb) und eine Puromycinresistenzkassette (grün) kodiert, enthält eine BbsI Restriktionsstelle um die sgRNA mit selbsterstellten Zielsequenzen modifizieren zu können. (B) Die sgRNA-Zielsequenz (blau) wurde in das Plasmid ligiert. (C) C5N-Keratinozyten wurden mit diesem Plasmid transfiziert und anschließend in Medium, das Puromycin enthielt, selektiert. (D) Eine andere Möglichkeit besteht in der lentiviralen Transduktion des sgRNA-Konstrukts und der Endonuklease Cas9 in die Zielzellen. Dafür wurde das Plasmid lentiCRISPR v2 verwendet. (E) Die sgRNA-Zielsequenz wurde nach Restriktionsverdau des Plasmids mit BsmBI in das Plasmid ligiert. (F) Lentivirale Vektoren wurden mit Hilfe der Plasmide psPAX2 und pCMV-VSV-G produziert. HEK293T Zellen wurden mit diesen drei Plasmiden kotransfiziert. Alternativ wurde statt des lentiCRISPR v2-Konstrukts das Plasmid pLJM1-EGFP verwendet um die Transduktionseffizienz ermitteln zu können. C5N-Keratinozyten wurden mit diesen lentiviralen Vektoren transduziert und anschließend in Medium, das Puromycin enthielt, selektiert. (G) Polyklonale Zellpopulationen wurden mit Sanger-Sequenzierung analysiert. Wenn die Möglichkeit gegeben war, dass die Genmodifikation mit CRISPR/Cas9 erfolgreich war, (H) wurden monoklonale Zellpopulationen generiert. Dafür wurden durch serielle Verdünnung 50 Zellen in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die 96-Well-Platte wurde nach 48 Stunden auf Einzelzellklone untersucht. (I) Diese monoklonalen Zellpopulationen wurden kultiviert bis genügend Material zur DNA-Analyse (Sequenzierung, T7EI) und weiteren Kultivierung zur Verfügung stand. Die Legende unten rechts zeigt einerseits die verwendeten Zellen, andererseits die verschiedenen Möglichkeiten der Gen disruption, die durch CRISPR/Cas9-Modifikation entstehen können.

C5N-Keratinocyten wurden dafür in gleicher Dichte ausgesät und am Folgetag mit einem EGFP-Plasmid transfiziert (siehe *Kapitel 3.3.1.5*). Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert, mit Hoechst gegengefärbt und die erfolgreich transfizierten Zellen anhand des Fluoreszenzsignals von EGFP (in *Abbildung 6* grün) ermittelt. Im Vergleich zur Gesamtzahl der Zellen (Hoechst-positive Zellen) waren nach Transfektion mittels ViaFect™ deutlich mehr GFP-positive Zellen zu beobachten als nach Transfektion mittels Attractene, Lipofectamine oder MATra. Zudem fiel auf, dass die Zellen nach der Transfektion mit Lipofectamine weniger vital (kleine, abgerundete Zellen und mehr tote, schwimmende Zellen im Medium) erschienen als vorher. Daher wurde im Folgenden ViaFect™ zur Transfektion von C5N-Keratinocyten verwendet.

ViaFect™ kann für die Transfektion in unterschiedlichen Verhältnissen (μl Transfektionsreagenz : μg DNA) eingesetzt werden. Um das optimale Verhältnis zu ermitteln, wurden drei Verhältnisse (2:1, 3:1, 4:1) nach Herstellerangaben verglichen. Erneut wurden C5N-Zellen ausgesät und 24 Stunden nach Transfektion mit einem EGFP-Plasmid unter dem Fluoreszenzmikroskop verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Verwendung der Verhältnisse 3:1 und 4:1 zu höheren Raten an EGFP-positiven Zellen führte (*Abbildung 7*). Da Transfektionsreagenzien potenziell toxisch für die Zellen sind, wurde für weitere Transfektionen die Verwendung von ViaFect™ in einem Verhältnis von 3:1 ausgewählt.

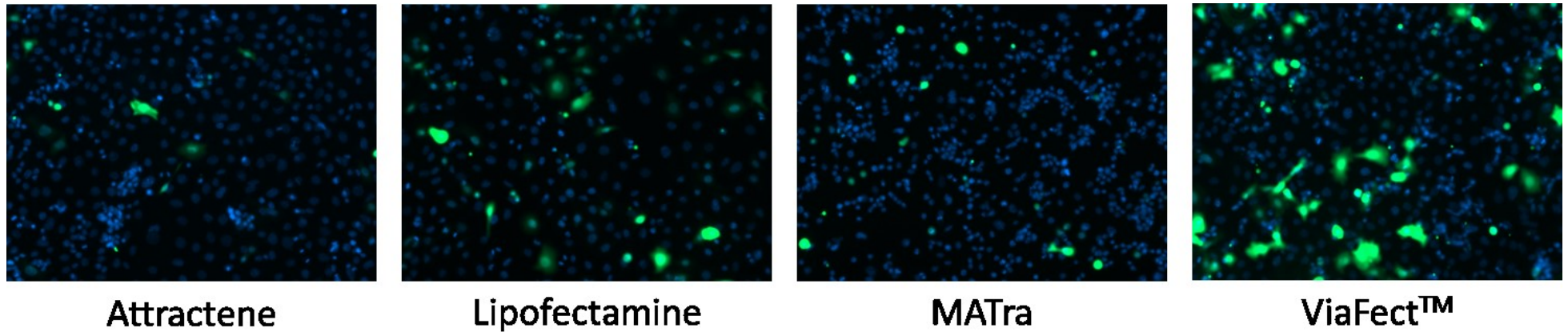
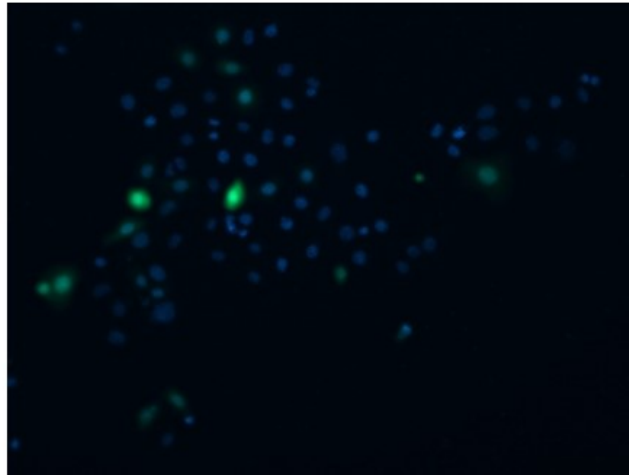


Abbildung 6: Vergleich verschiedener Transfektionsverfahren in C5N-Keratinocyten nach Transfektion mit einem EGFP-Plasmid C5N-Zellen wurden dem Herstellerprotokoll des betreffenden Transfektionsreagens (Attractene, Lipofectamine, MATra und ViaFect™) entsprechend mit einem EGFP-Plasmid (grün) transfiziert und nach 24 Stunden mit 4 % PFA fixiert. Die Zellen wurden mit Hoechst (blau) gegengefärbt und die Deckgläschen auf einen Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (20x, Hoechst 28 ms, EGFP 160 ms).

ViaFect™ 2:1



ViaFect™ 3:1



ViaFect™ 4:1

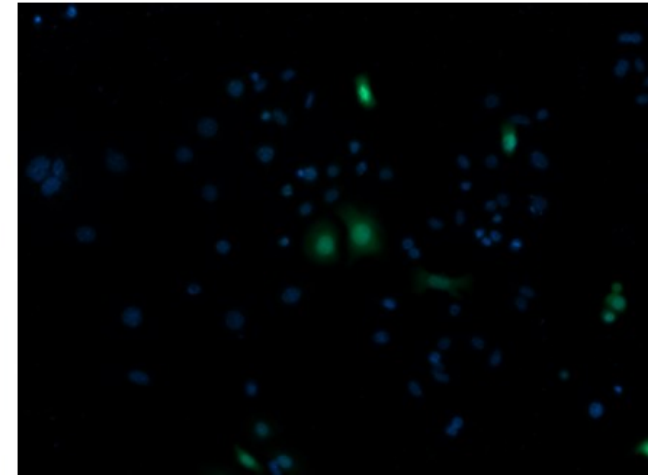


Abbildung 7: Vergleich verschiedener ViaFect™-Verhältnisse bei der Transfektion der C5N-Keratinozyten mit einem EGFP-Plasmid C5N-Zellen wurden dem Herstellerprotokoll von ViaFect™ entsprechend mit einem EGFP-Plasmid (grün) transfiziert und nach 24 Stunden mit 4 % PFA fixiert. Die Zellen wurden mit Hoechst (blau) gegengefärbt und die Deckgläschen auf einen Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (20x, Hoechst 250 ms, EGFP 80 ms).

4.1.2 Erstellung der sgRNA-Konstrukte und Wirksamkeit *in vivo*

Die Zielsequenzen für den CRISPR/Cas9-vermittelten *Snap29*-KO wurden mit Hilfe zweier Online-Tools (siehe *Kapitel 3.1.4.3*) zur Generierung von sgRNAs erstellt. Die fünf Zielsequenzen wurden jeweils in das CRISPR-Plasmid pX459 ligiert, das auch für die Endonuklease Cas9 und die sgRNA kodiert. Die so entstandenen fünf sgRNA-Konstrukte wurden entsprechend A0-A4 benannt. Die Zielsequenzen A0-A2 befinden sich in Exon 1, die Zielsequenzen A3 und A4 in Exon 2 von *Snap29*. Um die korrekte Insertion der Zielsequenz in das sgRNA-Konstrukt zu ermitteln, wurde die Insertionsregion sequenziert und mit der erwarteten Sequenz - Sequenz von pX459 mit BbsI restriktionsverdaut und ligierten Zielsequenzen - verglichen.

Da ein unterschiedliches Ansprechen der C5N-Keratinocyten auf die sgRNA-Plasmide in Bezug auf die SNAP29-Expression zu erwarten war, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung nach Transfektion der Zellen mit den sgRNA-Konstrukten durchgeführt.

Da durch die Transfektion von C5N mit den sgRNA-Konstrukten ein KO von *Snap29* erzielt werden sollte, wurde als Folge der Transfektion eine reduzierte Expression von SNAP29 erwartet. Um zu testen mit welchem Konstrukt die stärkste Reduktion der SNAP29-Expression erzielt wird, wurden C5N mit diesen Konstrukten transfiziert und anschließend die SNAP29-Expression mittels Immunfluoreszenz ermittelt. Dadurch konnte frühzeitig ermittelt werden, welche Konstrukte die höchsten Erfolgchancen auf einen KO-Klon aufwiesen. Dazu wurden die C5N-Keratinocyten auf Deckgläschen ausgesät, mit ViaFect™ transfiziert und anschließend mit Puromycin selektiert. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit einem SNAP29-Antikörper und passendem sekundären Antikörper (siehe *Tabelle 12*). Die Zellkerne wurden mit Hoechst gegengefärbt. Die Färbung zeigt die SNAP29-Expression im EGFP-Kanal (grün). Die Kontrolle (ohne Primärantikörper) weist keinerlei positives EGFP-Signal auf. Die WT-Zellen sind durchweg EGFP-positiv. C5N-Keratinocyten, die mit den sgRNA-Konstrukten A0, A1 und A4 transfiziert wurden, zeigen eine deutlich reduzierte EGFP-Intensität. C5N-Keratinocyten, die mit den sgRNA-Konstrukten A2 und A3 transfiziert wurden, zeigte vergleichbare Signalintensitäten wie WT-Zellen. Dies lässt die Vermutung zu, dass die erfolgreiche Transfektion der sgRNA-Konstrukte A0, A1 und A4 eine Reduktion der SNAP29-Expression in Folge einer DNA-Veränderung herbeiführt (*Abbildung 8*).

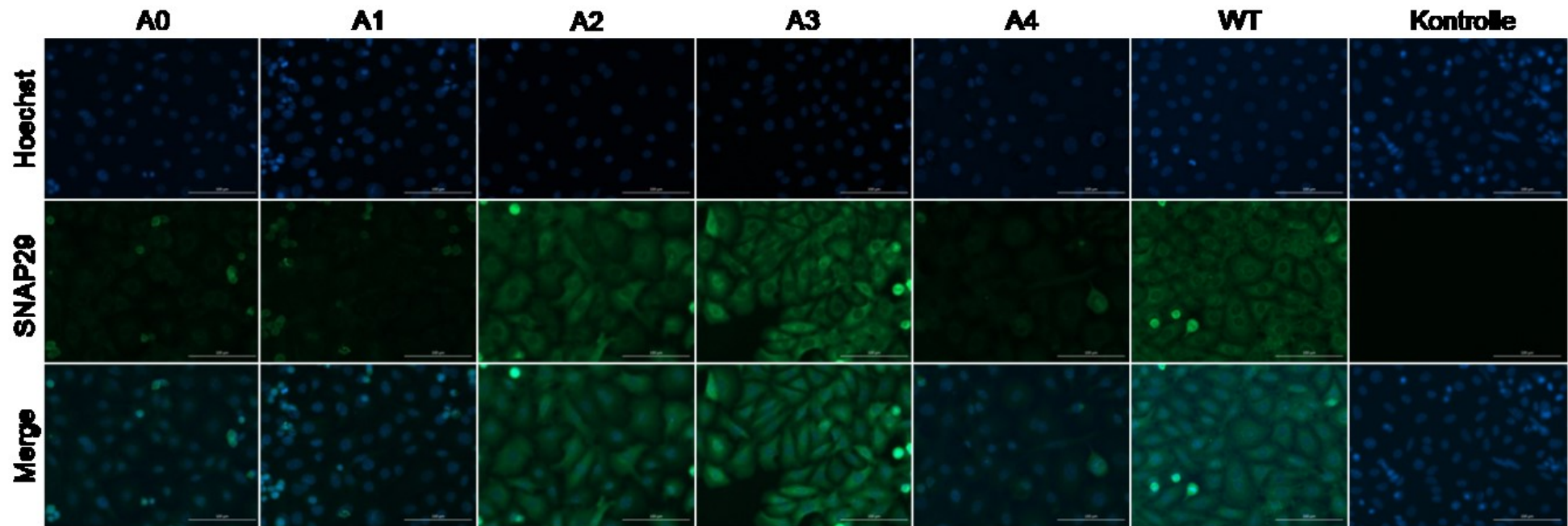


Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung von SNAP29 in C5N-Keratinocyten nach Transfektion mit den generierten sgRNA-Konstrukten A0 bis A4 und Puromycinselektion Die C5N-Keratinocyten wurden auf Deckgläschen in einer 24-Well-Platte kultiviert und danach mit den sgRNA-Konstrukten A0-A4 transfiziert. Nach Puromycinselektion wurden die Zellen mit 4 % PFA (Paraformaldehyd) auf den Deckgläschen fixiert und anschließend mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert um SNAP29 mittels Immunfluoreszenz visualisieren zu können. Die Deckgläschen wurden mit TSA geblockt und mit dem Primärantikörper gegen SNAP29 inkubiert. Der Sekundärantikörper (markiert mit Alexa Fluor 488) und die Gegenfärbung mit Hoechst erfolgten anschließend. Um Autofluoreszenz und unspezifische Bindungen auszuschließen wurde bei der Kontrolle der Primärantikörper weggelassen. (40x, Hoechst 80ms, Alexa Fluor 488 1000 ms).

4.2 Erstellung eines *Snap29*^{+/-}-Klons in immortalisierten murinen Keratinozyten mittels Transfektion

Um eine monoklonale Zellpopulation erzeugen zu können, die SNAP29-defizient ist, wurden zunächst die C5N-Keratinozyten mit den sgRNA-Konstrukten A0-A4 (*Tabelle 8*) transfiziert und anschließend mit Puromycin selektiert. Nach erfolgreicher Selektion wurde von den entstandenen polyklonalen Populationen DNA isoliert und Exon 1 (A0-A2) und Exon 2 (A3, A4) von *Snap29* sequenziert und mit der WT-Sequenz verglichen. Dabei konnte eine Veränderung der Sequenz der polyklonalen C5N A0-Zellpopulation, die mit dem sgRNA-Konstrukt A0 transfiziert worden war, festgestellt werden. Im Vergleich mit der WT-Sequenz wurden in der C5N A0-Zellpopulation kleine Peaks detektiert, die unterhalb der WT-Sequenz lagen, jedoch in der WT-Sequenz nicht auftraten (*Abbildung 9*). Da eine heterogene, polyklonale Zellpopulation durch die CRISPR/Cas9-Genomeditierung mittels des sgRNA-Konstrukts A0 und anschließender Puromycinselektion erzeugt worden war, konnte davon ausgegangen werden, dass ein Teil dieser Zellpopulation genetische Veränderungen durchlaufen hatte. Somit wurde eine weitere Analyse dieser C5N A0-Zellpopulation durch Vereinzelung durchgeführt, um einen genetisch veränderten Zellklon zu isolieren.

4.2.1 Sequenzierung eines monoklonalen *Snap29*^{+/-}-Klons

Die polyklonalen A0-transfizierten Keratinozyten wurden in einer 96-Well-Platte, wie in *Kapitel 4.1* beschrieben, vereinzelt. Da das sgRNA-Konstrukt A0 in Exon 1 von *Snap29* angreift, wurde eine Sequenzierung dieses Exons mit DNA aus den monoklonalen Zellpopulationen durchgeführt. Die Sequenz zeigt deutliche Doppelpeaks, die auf eine Veränderung im Genom hinweisen. Diese Veränderungen ereigneten sich in der durch die sgRNA markierten Region. Daher ist davon auszugehen, dass die Veränderung spezifisch für dieses sgRNA-Konstrukt ist. Die unterliegende Sequenz wurde ausgelesen und zeigt eine Deletion einer Base sowie eine spätere Substitution einer Base (*Abbildung 10*).

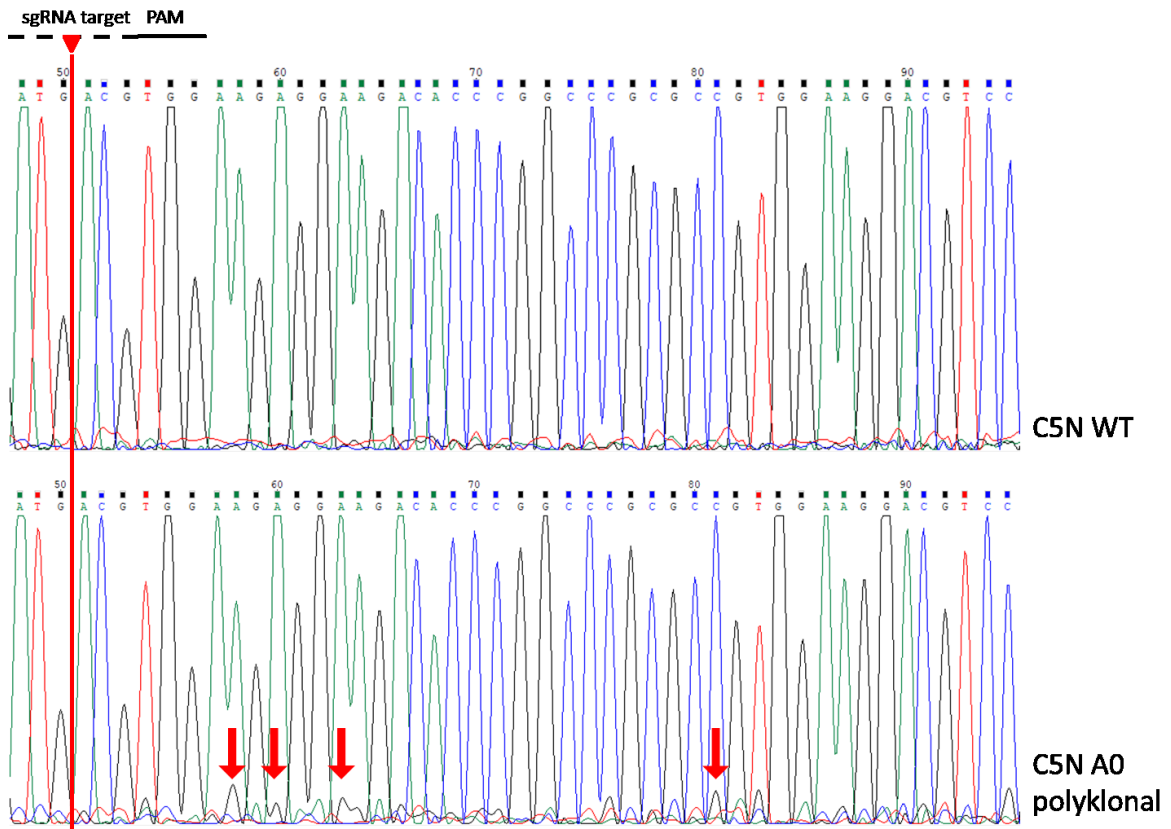


Abbildung 9: Sequenzierung der polyklonalen Zellpopulation C5N A0 im Vergleich zu C5N WT Durch Transfektion von C5N-Keratinocyten mit dem sgRNA-Konstrukt A0 und anschließende Puromycinselektion wurde eine polyklonale Zellpopulation C5N A0 erzeugt. Exon 1 von *Snap29* der polyklonalen Zellpopulation C5N A0 und der C5N WT Population wurde sequenziert, um Veränderungen im Gen durch CRISPR/Cas9 feststellen zu können. Die sgRNA, die PAM und die publizierte Schnittstelle der Cas9 (rote, senkrechte Linie mit rotem Dreieck) sind markiert. In der Sequenz der Sanger-Sequenzierung von C5N A0 konnten Peaks detektiert werden, die unterhalb der WT-Sequenz liegen, jedoch in der WT-Sequenz nicht auftreten (Beispielpeaks durch rote Pfeile markiert).

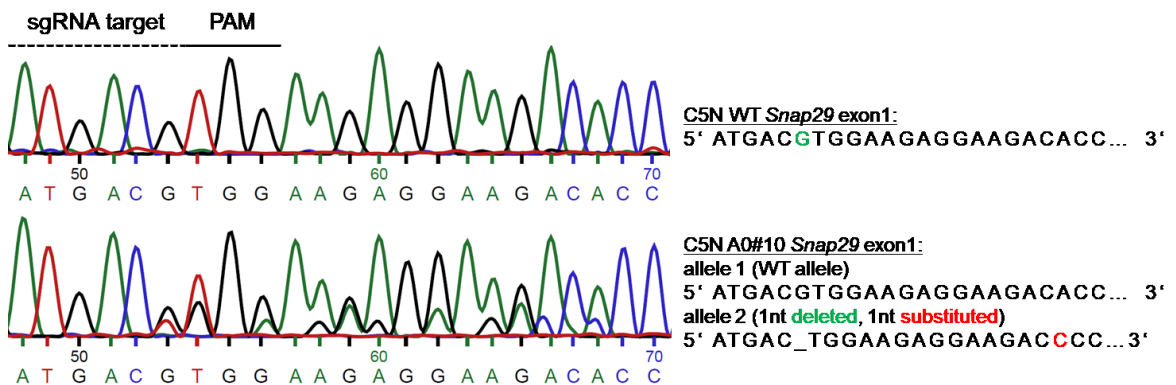


Abbildung 10: Sequenzierung des heterozygoten Klons C5N A0_10 im Vergleich zum C5N WT und Analyse der Allelsequenzen Der Klon C5N A0_10 wurde nach Sanger sequenziert und mit dem C5N WT verglichen. Über der Sequenz sind die sgRNA-Zielsequenz der Sequenz A0 und die PAM markiert. Auf der rechten Seite sind die Sequenzen der Allele notiert. Dabei zeigte sich eine Deletion (c.43delG) sowie eine Substitution (c.58A>C) in Exon 1.

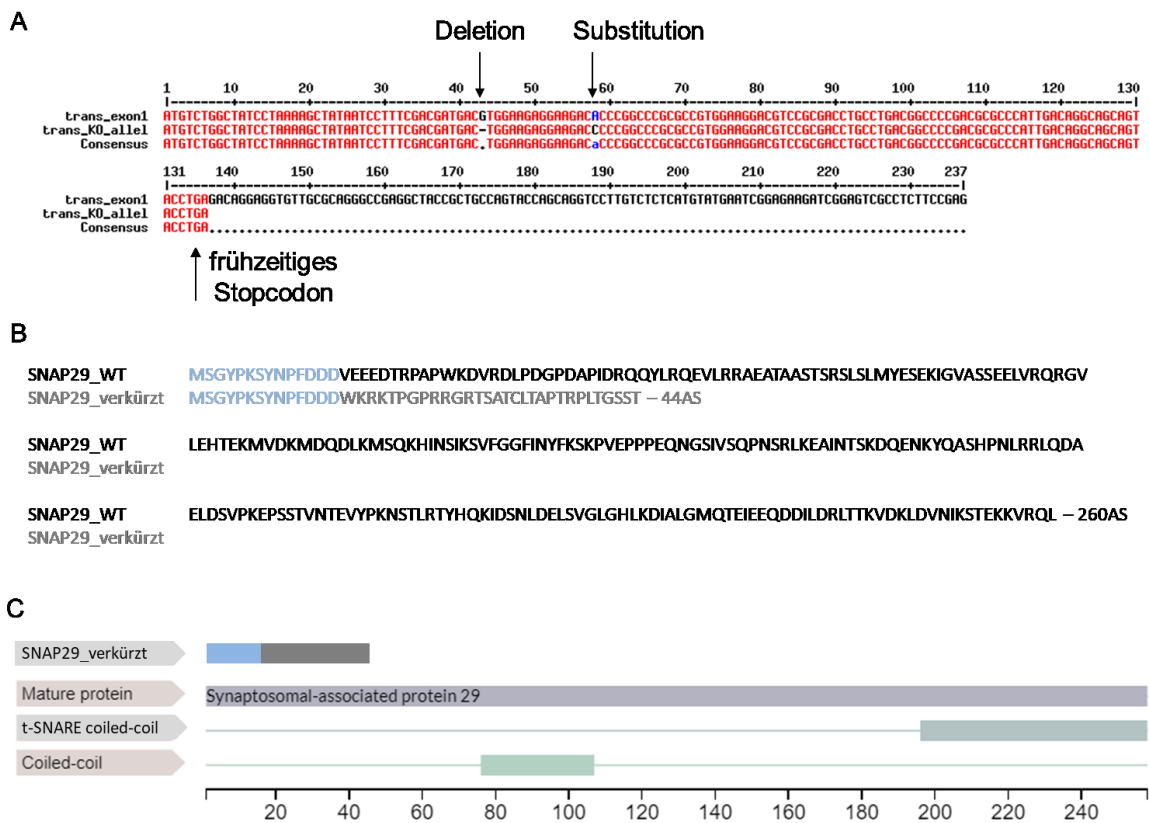


Abbildung 11: Nachweis des heterozygoten KO im C5N A0_10 Klon auf Proteinebene im Vergleich zum C5N WT (A) Vergleich der DNA-Sequenzen beginnend mit dem Startcodon. (B) Vergleich der resultierenden Proteinsequenzen. In hellblau sind die identischen Anteile der Sequenz dargestellt. In hellgrau ist die modifizierte und trunkeierte Proteinsequenz des Klons A0_10 angegeben. (C) Funktionelle Domänen von SNAP29 und Darstellung der verkürzten Sequenz in den in (B) angegebenen Farben.

Obleich eine DNA-Modifikation detektiert wurde, ist dies noch nicht beweisend für einen Funktionsverlust des Allels. Daher wurde eine weitere Auswertung der DNA-Sequenz und des Polypeptids, der durch die DNA kodiert wird, durchgeführt. Der Vergleich der Sequenzen zeigt ein verfrühtes Stopcodon nach 135 Basen. Die Deletion ereignete sich an Position 43 des WT-Allels (c.43delG), die Substitution von A zu C an Position 58 (c.58A>C) (Abbildung 11A).

Nach Translation führt dies zu einem verkürzten SNAP29. SNAP29 umfasst normalerweise 260 Aminosäuren (AS). Das verkürzte SNAP29 aus dem Klon A0_10 besitzt nur noch 44 AS und stimmt nur noch in den ersten 14 AS mit der WT-Sequenz überein (Abbildung 11B). SNAP29 hat SNARE-Domänen, die die Funktionalität des Proteins ausmachen. Diese SNARE-Domänen sind in dem verkürzten Protein nicht mehr enthalten (Abbildung 11C). Das Fehlen der Domänen ist ein deutlicher Hinweis auf den Funktionsverlust dieses Allels.

4.2.2 T7EI-Assay zur Bestätigung der DNA-Modifikation

Zur Bestätigung der Modifikation wurde ein T7EI-Assay durchgeführt. Bei diesem Assay wird der modifizierte DNA-Abschnitt – hier Exon 1 von SNAP29 – mittels PCR vervielfacht. Eine anschließende Denaturierung und erneute Anlagerung führt dazu, dass sich auch DNA-Stränge verschiedener Allele zusammenlagern. Dadurch entstehen Fehlpaarungen, die durch

das Enzym T7 Endonuklease I erkannt werden. Dieses Enzym schneidet die DNA-Doppelstränge an diesen Stellen und zwei kürzere Fragmente entstehen. In einer Gelelektrophorese zeigen sich somit anstatt einer Bande, die die WT-Kontrolle aufweist, drei Banden. Wenn ein Fragment sehr kurz ist, können gegebenenfalls auch nur zwei Banden sichtbar werden (Kim et al. 2014; Vouillot et al. 2015).

In *Abbildung 12* ist das Ergebnis des T7EI-Assays für den Klon A0_10 zu sehen. Das amplifizierte Exon 1-Fragment hat eine erwartete Länge von 494 bp. Da die Modifikation relativ weit vorne im Exon 1 stattfindet, sind nur zwei Banden nach Behandlung mit T7EI sichtbar. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass eine Modifikation der DNA durch CRISPR/Cas9 mit der sgRNA A0 erfolgte.

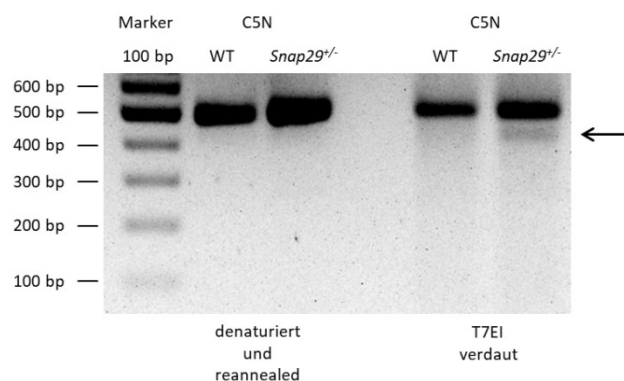


Abbildung 12: T7EI-Assay des Klons A0_10 im Vergleich zum WT Exon 1 von *Snap29* aus WT und A0_10 (*Snap29^{-/-}*) wurde amplifiziert. Die entstehenden DNA-Doppelstränge wurden denaturiert und wieder aneinandergelagert, um bei Alleldifferenzen eine Fehlpaarung hervorzurufen. Anschließend wurden sie mit der T7 Endonuklease I (T7EI) inkubiert, die die DNA-Doppelstränge dort schneidet, wo Fehlpaarungen vorliegen. Beide Ansätze, vor T7EI und nach T7EI, wurden auf ein Agarosegel zur Elektrophorese aufgetragen, um etwaige Fehlpaarungen durch Mehrfachbanden nachweisen zu können. Die erwartete Exon 1-Fragmentlänge beträgt 494 bp. Das durch Fehlpaarung hervorgerufene T7EI-verdaute Fragment ist mit einem Pfeil markiert.

4.2.3 Nachweis von SNAP29 zur Analyse der Auswirkung der DNA-Modifikation

Das humane CEDNIK-Syndrom ist eine autosomal-rezessive Erkrankung (Sprecher et al. 2005). Dementsprechend führt erst ein vollständiger KO von *Snap29* zum Krankheitsbild. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass keine Reduktion der Expression von SNAP29 in Zellen heterozygoter Mäuse auftritt. Dies konnte sowohl im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenz für den Klon A0_10 im Vergleich zum WT bestätigt werden (*Abbildung 13*).

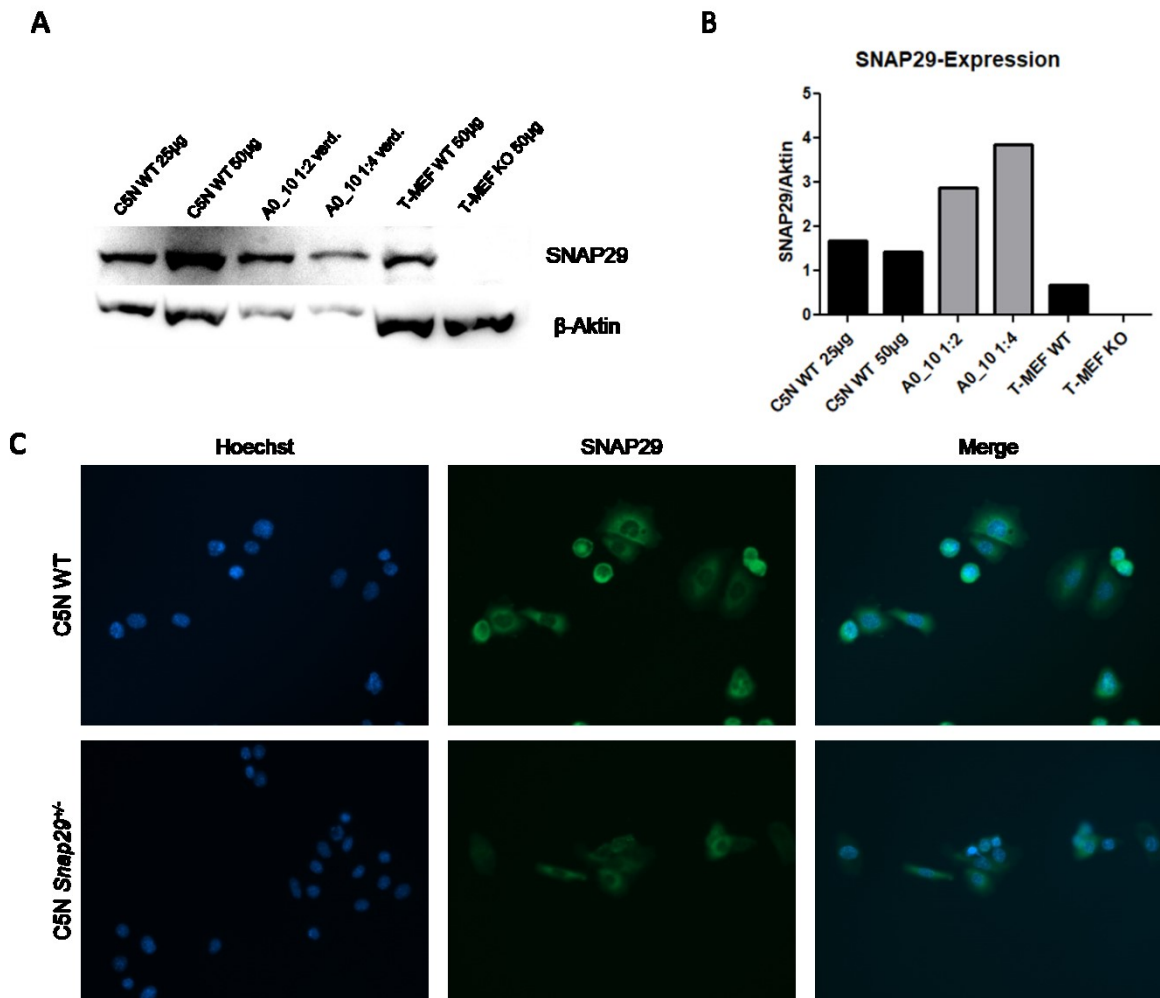


Abbildung 13: Western Blot und Immunfluoreszenz des Klon A0_10 im Vergleich zum WT bzw. primären Mausmodellfibroblasten (T-MEF) (A) Der Western Blot wurde mit Ganzzelllysaten von C5N WT Keratinozyten und *Snap29*^{-/-} Keratinozyten sowie primären WT und KO Mausmodellfibroblasten (T-MEF) mit Antikörpern gegen β -Aktin und SNAP29 durchgeführt. Zur Gelelektrophorese wurde ein 4-15 % Tris-Glyzin Gel verwendet. (B) Eine quantitative Auswertung mit ImageJ ergab keine reduzierte Expression von SNAP29 in den heterozygoten C5N-Keratinozyten. Die Aktin-Expression wurde auf 100 normiert und das Verhältnis vom normierten SNAP29 zum normierten Aktin bestimmt. (C) Die Keratinozyten wurden auf Deckgläschen kultiviert und anschließend zur Färbung fixiert. SNAP29 wurde mit einem Antikörper fluoreszenzmarkiert (grün). Die Gegenfärbung erfolgte mit Hoechst (blau) (40x, Hoechst 400 ms, EGFP 2200 ms).

4.3 Vergleich der Effizienz von Transfektion und lentiviraler Transduktion

4.3.1 Produktion von Lentiviren

Da die Transfektion zur Modifikation von murinen Keratinozyten mittels CRISPR/Cas9 zu ineffektiv schien, wurde die Möglichkeit einer lentiviralen Transduktion erwogen.

Ein lentivirales CRISPR-Plasmid – lentiCRISPR v2 - wurde durch die Arbeitsgruppe von Dr. Feng Zhang zur Verfügung gestellt und durch Sanjana und Mitarbeitern beschrieben (Sanjana et al. 2014; Shalem et al. 2014). Um die gewünschte sgRNA in das lentiCRISPR v2-Plasmid

klonieren zu können, liefert die Arbeitsgruppe von Dr. Feng Zhang ein ausführliches Protokoll. In diesem Protokoll werden die Verpackungsplasmide psPAX2 und pVSV-G und als Positivkontrolle der Lentivirusproduktion das Plasmid pLJM1-EGFP von AddGene empfohlen (Shalem et al. 2014).

Zur Produktion der Lentiviren wurde zuerst ein Protokoll im Labor etabliert (siehe *Kapitel 3.3.1.6* und *3.3.1.7*). Das Protokoll orientiert sich an den Protokollen des *RNAi Consortiums* des *Broad Institutes* zur lentiviralen Produktion (The RNAi Consortium (TRC) 2015), der AddGene-Website (AddGene 2016) und der Arbeitsgruppe um Tiscornia (Tiscornia et al. 2006) sowie am Herstellerprotokoll für TransIT®-LT1 (Mirus) und am Methodenteil einer Publikation von Chen und Mitarbeitern (Chen et al. 2015b).

Die zu verwendenden Transfektionsreagenzien erforderten eine Konfluenz $\geq 80\%$ (TransIT®-LT1) bzw. 40-80 % (Attractene). Da nur eine HEK293T-Zellzahl von $3,8 \times 10^6$ in 10 cm Zellkulturschalen zur Lentivirusproduktion aus den verschiedenen Protokollen (AddGene 2016; The RNAi Consortium (TRC) 2015) hervorging, wurden zunächst verschiedene Anzahlen von Zellen in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert und eine Konfluenzbestimmung durchgeführt. Im Vergleich zur empfohlenen Zellzahl im traditionellen Protokoll zur Transfektion mittels Attractene ($0,5-2,5 \times 10^6$), ist diese Zellzahl sehr hoch.

Zur Ermittlung der optimalen Zellzahl, die ausgesät werden muss, damit einerseits eine Konfluenz von 40-80 % bei Transfektion besteht und andererseits 96 Stunden später zum Zeitpunkt der Virusernte annähernd eine Konfluenz von 100 % erreicht wird, wurden verschiedene Zellkonzentrationen (*Abbildung 14*) ausgesät und die Konfluenz alle 24 Stunden unter dem Mikroskop dokumentiert. Da die Virusernte 96 Stunden nach Aussaat erfolgt, wurde dieser Zeitraum zur Beobachtung festgelegt. Es wurde beobachtet, dass bereits 1×10^6 HEK293T-Zellen ausreichen, um eine 100 %ige Konfluenz nach 96 Stunden zu erreichen (*Abbildung 14A*). Diese Bestimmung fand jedoch nicht unter der Bedingung der Transfektion statt. Da die Virusproduktion parallel zur Proliferation abläuft, bestand die Hypothese, dass die Virusproduktion die Proliferation der HEK293T verlangsamt. Daher wurden erneut Zellen, diesmal mit höherer Anfangsdichte, ausgesät und nach 24 Stunden für die EGFP-Virenproduktion mittels Attractene mit pLJM1-EGFP, pCMV-VSV-G und psPAX2 transfiziert. Erneut wurde in 24-Stunden-Intervallen eine Dokumentation der Konfluenz unter dem Mikroskop durchgeführt (*Abbildung 14B*). Die Testung ergab, dass nun erst bei 2×10^6 HEK293T-Zellen eine Konfluenz von 100 % nach 96 Stunden erreicht werden konnte.

Da eine Konfluenz von $\geq 80\%$ bzw. 40-80 % zum Transfektionszeitpunkt erwünscht war, wurden die Konfluenzen 24 Stunden nach Aussaat verglichen. Unter Berücksichtigung der Zelldichte nach 96 Stunden wurde 4×10^6 HEK293T-Zellen als die optimale Zellzahl

festgelegt. Diese Zellzahl deckt sich auch mit der in der Literatur erwähnten Zellzahl von $3,8 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm Zellkulturschale.

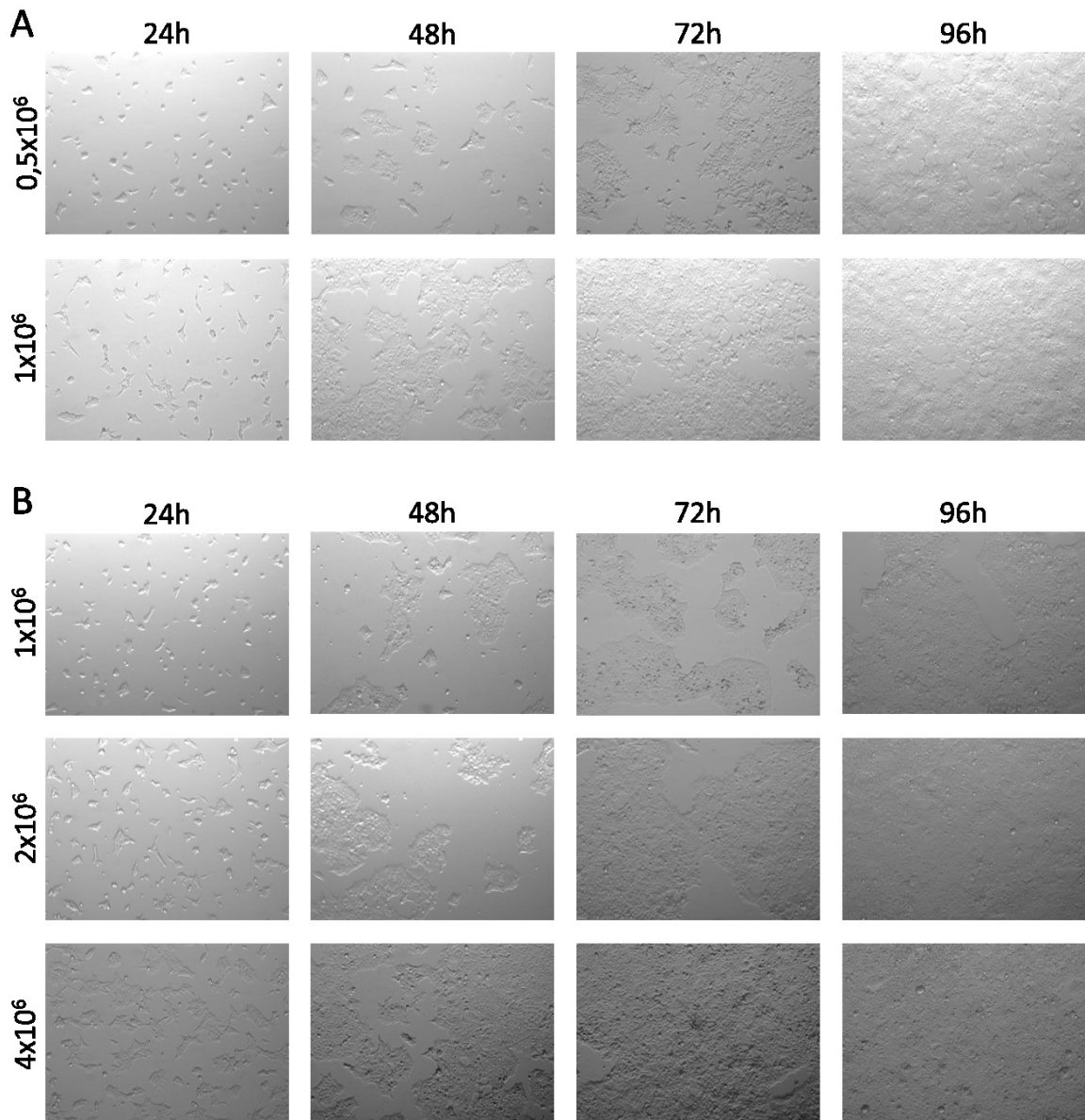


Abbildung 14: Konfluenzbestimmung von HEK293T-Zellen (A) ohne Virenproduktion und (B) mit Virenproduktion (A) Die links angegebene Zellzahl wurde in 10 cm Schalen kultiviert und die Konfluenz im 24-Stunden-Takt unter dem Mikroskop dokumentiert. (B) Wieder wurde die links angegebene Zellzahl in 10cm Schalen kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die HEK293T-Zellen mittels Attractene mit pLJM1-EGFP, pCMV-VSV-G und psPAX2 transfiziert. Die Konfluenz wurde im 24-Stunden-Takt unter dem Mikroskop bestimmt (10x).

Nach der Festlegung auf 4×10^6 Verpackungszellen für eine 10cm Zellkulturschale musste ein Plasmidverhältnis zur Virenproduktion determiniert werden. In der Literatur wurden verschiedene Verhältnisse der Plasmide zueinander bei der Transfektion beschrieben. So wurden die Verhältnisse der Plasmide mit 4:3:2 (Chen et al. 2015b) und 1:1:0,1 (The RNAi Consortium (TRC) 2015) (lentiCRISPR v2:psPAX2:pCMV-VSV-G) angegeben. *Abbildung 15* zeigt die Virus-produzierenden HEK293T Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit Attractene. Dazu wurden die beiden erwähnten Plasmidverhältnisse getestet und zur

Kontrolle ein EGFP-Vektor verwendet, um die Virus-produzierenden Zellen zu markieren. Im späteren Verlauf erscheinen auch die Zellen positiv, die durch die produzierten Viren infiziert wurden und somit ebenfalls EGFP exprimieren können. Die Intensität der Fluoreszenz war bei Zellen, die mit einem Verhältnis von 1:1:0,1 transfiziert wurden stärker als bei Zellen, die mit einem Verhältnis von 4:3:2 transfiziert wurden. Außerdem erschienen die Zellen unter dem Mikroskop auch geringfügig vitaler, so dass das Plasmidverhältnis 1:1:0,1 für die weitere Virenproduktion verwendet wurde.

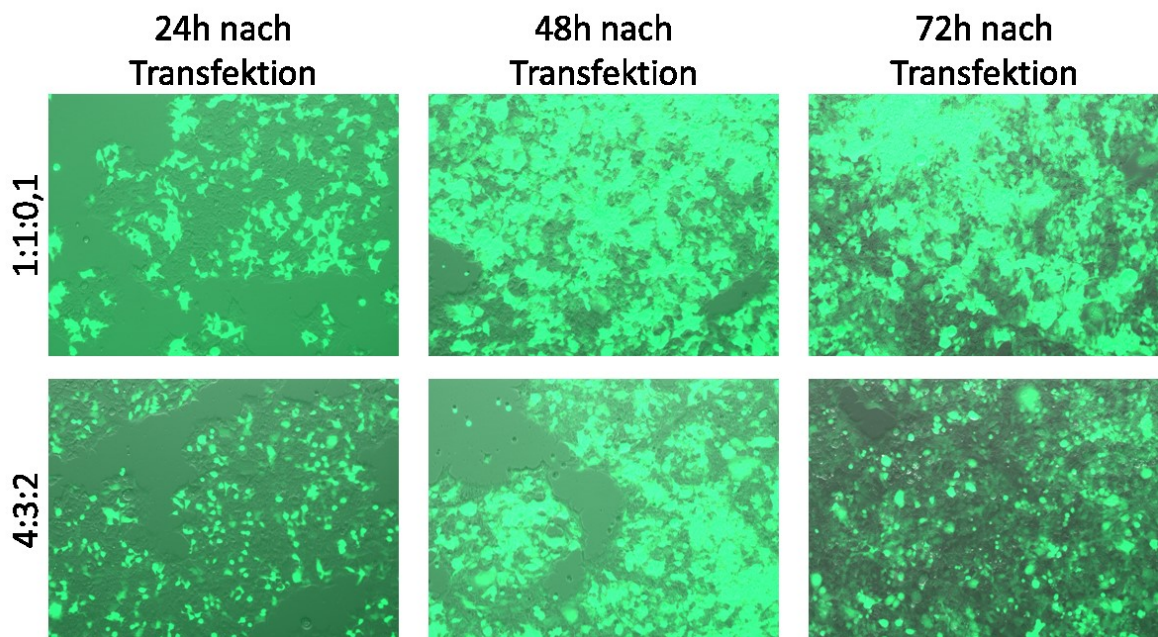


Abbildung 15: Virusproduktion nach Transfektion mit Attractene in verschiedenen Plasmidverhältnissen mit EGFP-Kontrollvektor 4×10^6 HEK293T-Zellen wurden in 10cm Schalen kultiviert und mit verschiedenen Plasmidverhältnissen mittels Attractene transfiziert. Die Verhältnisse lentiCRISPR v2:psPAX2:pCMV-VSV-G sind links angegeben. Nach Transfektion wurden im 24-Stunden-Takt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Kontrolle der EGFP-Positivität der Zellen erstellt (20x, EGFP 1800 ms).

Die Virusernte erfolgte in den genannten Protokollen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Es wurden Ernten nach 48 Stunden (Chen et al. 2015b) oder nach 48, 72 und 96 Stunden (AddGene 2016) empfohlen. Für die folgenden Experimente wurde die Virusernte nach 48 Stunden verwendet. Um eventuell bei der Ernte abgeschwemmte HEK293T-Zellen von der Virensuspension zu trennen, wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand durch einen $0,45 \mu\text{m}$ PES-Filter filtriert.

Die so entstandene Virussuspension wurde bis zur Verwendung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

4.3.2 Vergleich der lentiviralen Transduktion in Zelllinien verschiedener Spezies

Lentiviren können in der Zellbiologie zum Einschleusen von DNA in Zielzellen verwendet werden. Doch Lentiviren besitzen einen Tropismus, was dazu führt, dass die

Transduktionseffizienz zwischen unterschiedlich differenzierten Zellen einer Spezies und zwischen den Spezies variiert (Ikeda et al. 2002).

In *Abbildung 16* sind bekannte Zelllinien aus drei Spezies – Mensch, Maus und Hamster – gezeigt. Eine geringere Fluoreszenz durch das EGFP lässt auf eine geringere Transduktionseffizienz schließen. Insbesondere bei Mauszellen wurde eine geringe EGFP-Intensität und damit Transduktionseffizienz beobachtet. Zudem zeigte sich eine deutlich höhere EGFP-Intensität in humanen Zellen im Vergleich zu Hamster- und Mauszelllinien. Auch der Vergleich verschiedener Differenzierungen innerhalb einer Spezies wies einen Unterschied auf. Vor allem bei Keratinozyten (humane HaCaT, murine C5N) wurde eine geringe Transduktionseffizienz im Vergleich zu Fibroblasten der gleichen Spezies beobachtet (humane MRC5Vi und GM637, murine 3T3).

4.3.3 Vergleich der lentiviralen Transduktionseffizienz und der Transfektionseffizienz zwischen humanen und murinen Zelllinien

Lentivirale Transduktion ist ein stochastischer Vorgang, den man mit der Viruskonzentration beeinflussen kann. Da die Transfektion nur zu einem heterozygoten Klon in mehreren Durchgängen geführt hatte, bestand die Überlegung, dass die lentivirale Transduktion eine günstigere und effizientere Methode darstellen würde als die Transfektion. Da in unserem Labor parallel Versuche zum CRISPR/Cas9 vermittelten KO in humanen MRC5Vi-Zellen durchgeführt wurden (Lehmann et al. 2017), erschien ein Vergleich der Effizienz von C5N-Zellen und MRC5Vi-Zellen am sinnvollsten. In den MRC5Vi-Zellen konnte von Frau Dr. Lehmann ein XPF KO mittels Transfektion mit dem Transfektionsreagenz Attractene erzeugt werden.

Die Effizienzen der Transfektion und lentiviraler Transduktion wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt (*Abbildung 17*). Zur Transfektion wurden zwei verschiedene Transfektionsreagenzien (Attractene und ViaFect™) verwendet. Die lentiviralen Vektoren wurden in unterschiedlich starken Verdünnungen eingesetzt (unverdünnt, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50 und 1:100 in Medium). Die Auswertung der Effizienzen erfolgte jeweils zu dem Zeitpunkt, an dem die Selektion der CRISPR/Cas9-positiven Zellen mit Hilfe von Puromycin gestartet wurde. Bei der Transfektion war dies 24 Stunden nach Transfektion, bei der Transduktion von C5N-Zellen 72 Stunden nach Transduktion und bei der Transduktion von MRC5Vi-Zellen 48 Stunden nach Transduktion. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie und anschließendem *Gating* der Zellen anhand der negativen Kontrollzellen mit der Software FlowJo. Dabei wurden signifikant mehr EGFP-positive Zellen der humanen Zellen gegenüber den murinen Zellen detektiert. Ebenfalls signifikant mehr

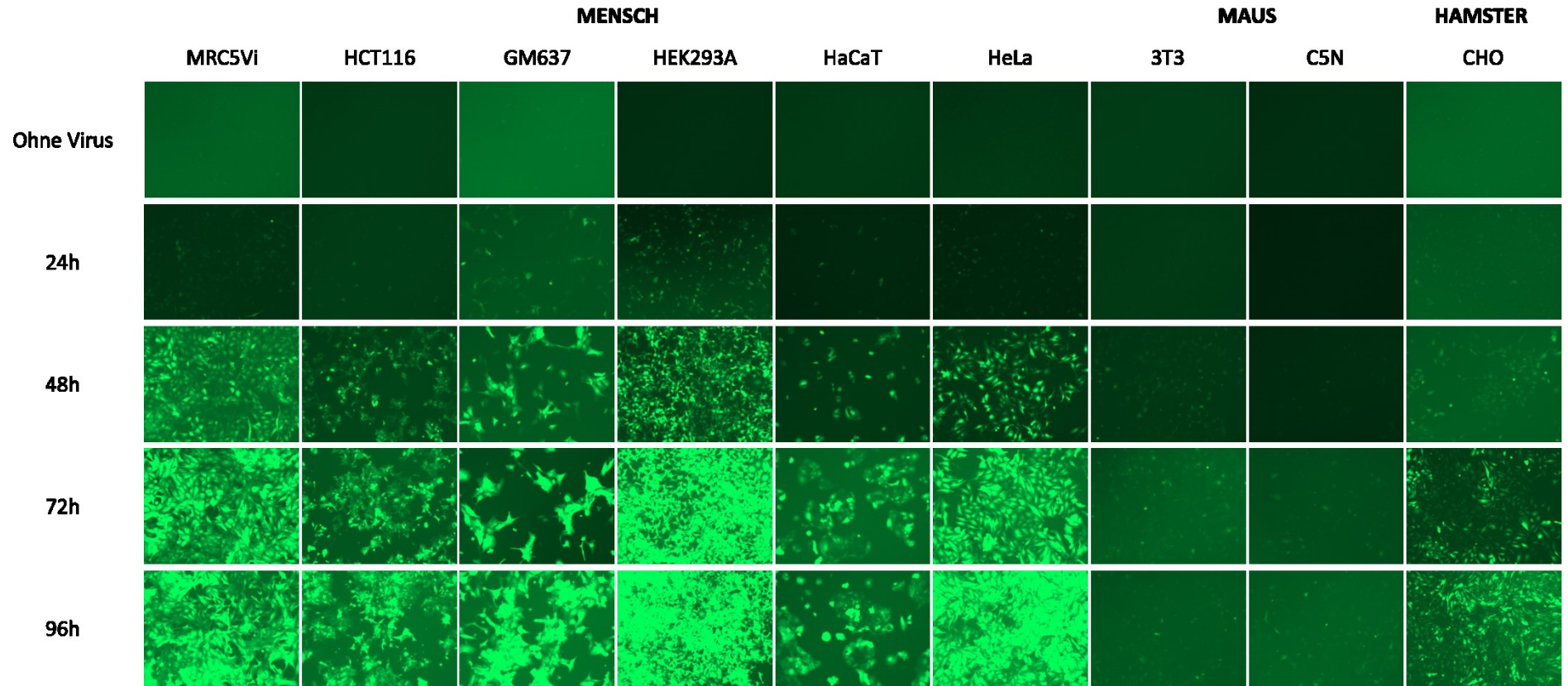
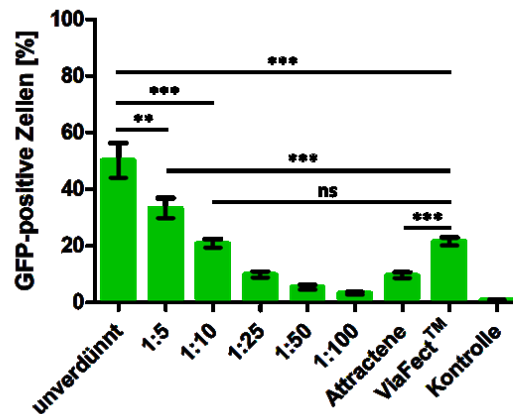
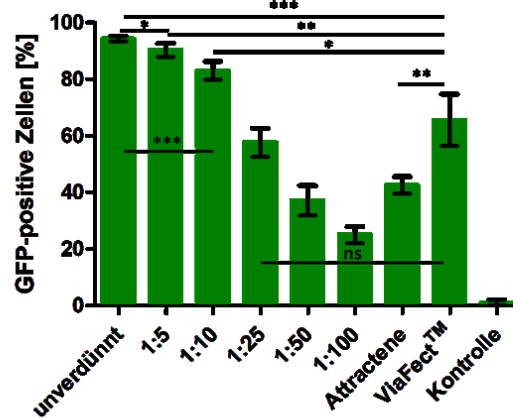


Abbildung 16: Transduktionseffizienz verschiedener bekannter Zelllinien aus Mensch, Maus und Hamster nach Transduktion mit pLJM1-EGFP tragenden Lentiviren unter dem Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 96 Stunden Die Lentiviren wurden in HEK293T-Zellen durch Attractene-Transfektion mit den Plasmiden psPAX2, pLJM1-EGFP und pCMV-VSV-G produziert. Der Virusüberstand wurde unverdünnt mit 1,5 ng Polybrene den Zelllinien (100.000 Zellen pro *Well* einer 6-*Well*-Platte, etwa gleiche Anfangskonfluenz) zugesetzt. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten alle 24 Stunden. (10x, EGFP 1800 ms).

A EGFP-Positivität nach Transduktion und Transfektion von C5N Zellen



B EGFP-Positivität nach Transduktion und Transfektion von MRC5Vi Zellen



C EGFP-Positivität nach Transduktion und Transfektion

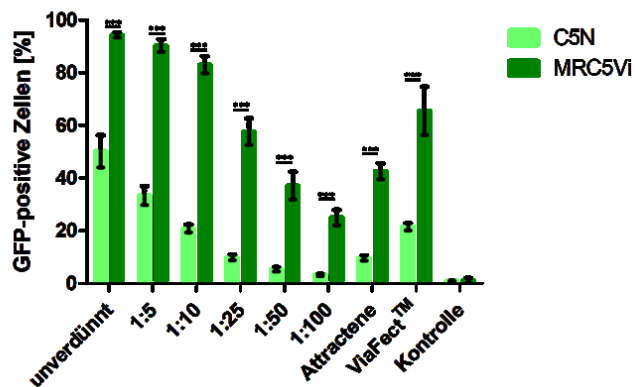


Abbildung 17: Bestimmung der Effizienz lentiviraler Transduktion mit verschieden stark verdünnten Virussuspensionen im Vergleich zur Effizienz zweier Transfektionsreagenzien (Attractene und ViaFect™) mittels Durchflusszytometrie (A) Die Transduktions- und Transfektionseffizienz von C5N-Zellen und (B) von MRC5Vi-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Zur Transfektion wurden zwei verschiedene Transfektionsreagenzien (Attractene und ViaFect™) benutzt. Die lentiviralen Vektoren wurden in unterschiedlich starken Verdünnungen eingesetzt (unverdünnt, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50 und 1:100 in Medium). Die Auswertung der Effizienzen erfolgte jeweils zu dem Zeitpunkt, an dem die Selektion der CRISPR/Cas9-positiven Zellen mit Hilfe von Puromycin gestartet wurde. Bei der Transfektion war dies 24 Stunden nach Transfektion, bei der Transduktion von C5N-Zellen 72 Stunden nach Transduktion und bei der Transduktion von MRC5Vi-Zellen 48 Stunden nach Transduktion. (C) Die Transduktions- und Transfektionseffizienz der C5N-Zellen aus (A) verglichen mit der Transduktions- und Transfektionseffizienz der MRC5Vi-Zellen aus (B). (transfizierte und transduzierte Zellen jeweils n=4, Kontrolle n=7, *p<0,1, **p<0,01, ***p<0,001).

EGFP-positive Zellen wurden nach Transduktion (bis zu einer Verdünnung von 1:10) im Vergleich zur Transfektion detektiert.

4.4 Lentivirale Transduktion zur Generierung eines CRISPR/Cas9 vermittelten KO

4.4.1 CRISPR/Cas9 vermittelter KO durch lentiviral transduziertes sgRNA-Konstrukt A0 in C5N-Keratinocyten nicht erfolgreich

Da der Nachweis erbracht wurde, dass eine lentivirale Transduktion deutlich effizienter ist als eine Transfektion, wurden die C5N-Keratinocyten mit lentiviralen Vektoren transduziert, die das sgRNA-Konstrukt A0 enthielten. Dies erfolgte mit unverdünnten und 1:10 verdünnten lentiviralen Vektoren. Trotz Anwendung an WT-C5N-Keratinocyten und heterozygoten *Snap29*^{+/-}-C5N-Keratinocyten konnte durch Sequenzierung keine monoklonale KO-Zelllinie nachgewiesen werden.

4.4.2 CRISPR/Cas9 vermittelter KO durch lentiviral transduziertes sgRNA-Konstrukt human_A0 in MRC5Vi-Fibroblasten

Humane Fibroblasten zeigten, wie in *Kapitel 4.3.3* beschrieben, eine deutlich höhere Transfektions- sowie Transduktionseffizienz als murine Keratinocyten. Das humane *SNAP29* und sein murines Ortholog *Snap29* stimmen in der kodierenden Sequenz von Exon 1 zu 81,4 % überein. Die sgRNA-Zielsequenz A0 unterscheidet sich in drei Basen (*Abbildung 18*). Nach Analyse mit Hilfe der sgRNA-Design-Tools stellte sich die zur murinen A0-Sequenz parallel liegende humane Sequenz als potenzielle Zielsequenz dar. Da in den murinen Keratinocyten durch Transfektion mit dem sgRNA-Konstrukt A0 zumindest ein Allel von *Snap29* verändert werden konnte (*Abbildung 10*), wurde nur diese Sequenz, nun als humanes A0-sgRNA-Konstrukt, an *SNAP29* humaner Fibroblasten getestet. Dies geschah durch lentivirale Transduktion.

Wie in *Abbildung 5* gezeigt, wurden monoklonale Zellpopulationen erzeugt und sequenziert. Der Klon hS10_03 zeigte einen homozygoten KO im Vergleich mit der WT Sequenz: 28 Basen wurden deletiert und 5 Basen inseriert (c.41_68delinsTTCGT). Die Indel-Mutation (Indel: Akronym für Insertion und Deletion) führt zu einer Leserasterverschiebung und resultiert in einem verfrühten Stopcodon. Das resultierende Protein besteht aus 45 Aminosäuren, von denen nur die ersten 13 Aminosäuren mit dem WT-Protein übereinstimmen. Die funktionellen *coiled-coil* Domänen von *SNAP29* sind im KO-Protein nicht enthalten. Zudem wurde ein bereits beschriebener Polymorphismus im proteinkodierenden Abschnitt von Exon 1 (c.18A>G, Ensembl: rs1061064, keine Publikationen) festgestellt. Das Basentriplett wird jedoch in beiden Fällen in die Aminosäure Lysin translatiert (*Abbildung 19*).

```

human 1 ATGTCAGCTTACCCTAAAAGCTACAATCCGTTTCGACGACGACGGGGAGGACGAAGGCGCC
murin 1 ATGCTGGCTATCCTAAAAGCTATAATCCITTCGACGATGACGTTGGAAGAGGAAGACACC

human 61 CGGCCGGCCCTTGGAGGGACGCCGAGACCTCCCGACGGGCCCGACGCGCCCGCGGAC
murin 61 CGGCCGCGCCGTGGAAGGACGTCGCGACCTGCCTGACGGCCCCGACGCGCCCATGAC

human 121 AGGCAGCAGTACTTGCGGCAGGAGGTCCTCCGCAGGGCTGAGGCCACGGCCGCCAGCACC
murin 121 AGGCAGCAGTACCTGAGACAGGAGGTGTTGCGCAGGGCCGAGGCTACCGCTGCCAGTACC

human 181 AGCAGGTCCCTGGCCCTCATGTACGAGTCCGAGAAGGTTGGGGTCGCCTCTTCCGAG
murin 181 AGCAGGTCCCTGTCTCTCATGTATGAATCGGAGAAGATCGGAGTCGCCTCTTCCGAG

```

Abbildung 18: Vergleich der humanen und murinen DNA-Sequenzen des kodierenden Abschnitts des Exon 1 von *SNAP29* (human) und *Snap29* (murin) Die DNA-Sequenzen von Exon 1 von *SNAP29/Snap29* wurden ab dem Startcodon verglichen und auf Homologie geprüft (Sequenzen von ensembl.org, human: ENST00000215730.11 und murin: ENSMUST00000023449.10). Grau hinterlegte Basen kennzeichnen veränderte Basen im Vergleich zum Ortholog. 193 von 237 Basen stimmen überein (=81,4 %). Die sgRNA-Sequenzen (im schwarzen Kasten) stimmen in 17 von 20 Basen (=85 %) überein.

Zur Bestätigung des KO auf Proteinebene wurde ein Western Blot durchgeführt. Im Western Blot konnte unter Verwendung eines Antikörpers gegen SNAP29 kein Signal im Ganzzelllysat der KO-Zellen (Klon hs10_03) detektiert werden, während im Ganzzelllysat von WT-Zellen eine Bande detektiert wurde. Nach Verwendung eines Antikörpers gegen β -Aktin wurde in beiden Proben ein ähnlich starkes Signal detektiert. Zudem konnte die stabile Expression von Cas9 in den lentiviral transduzierten KO-Fibroblasten nachgewiesen werden (*Abbildung 20*). Die Beobachtungen bestätigen den Verlust von SNAP29 in den lentiviral transduzierten KO-Fibroblasten.

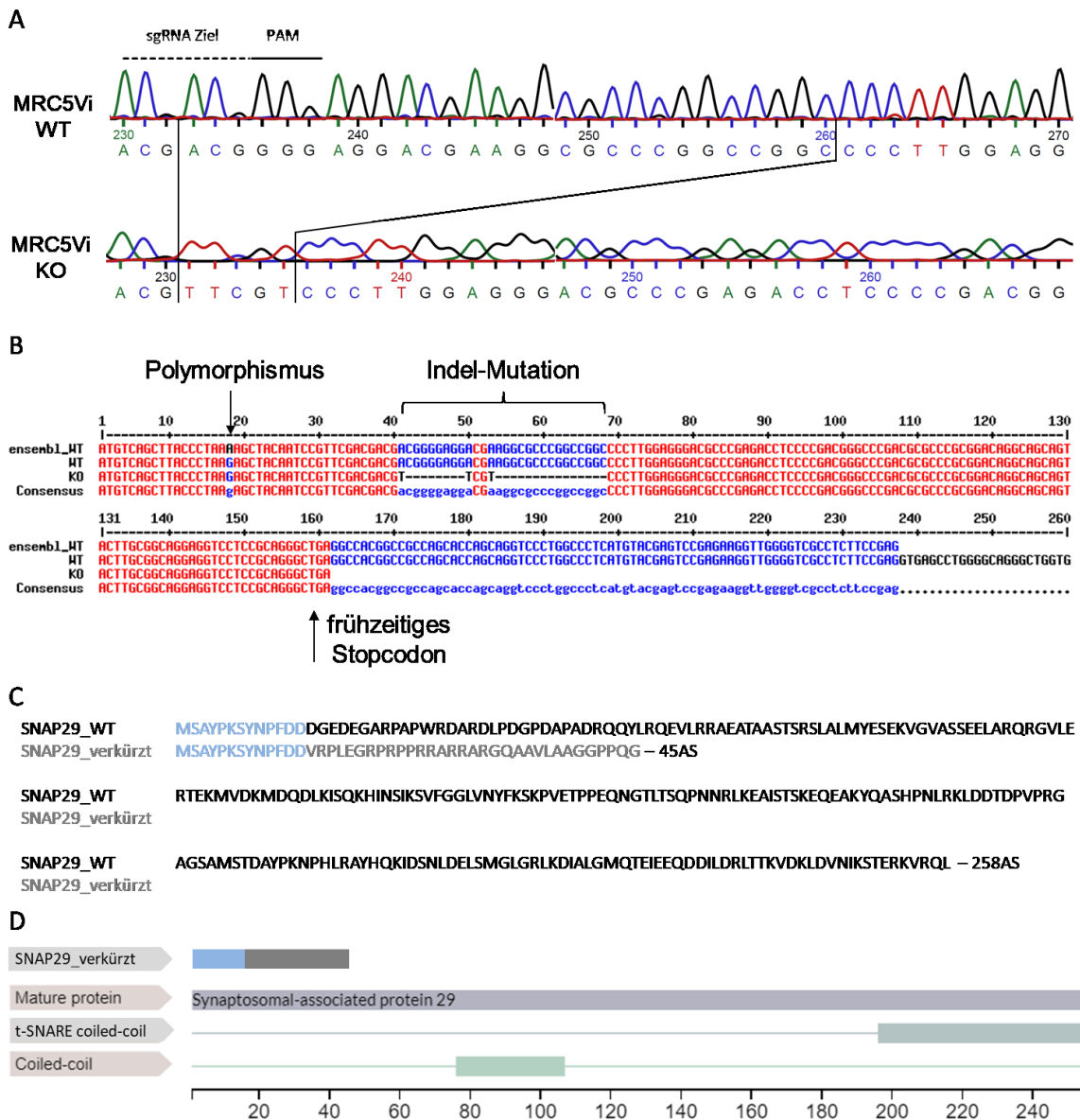


Abbildung 19: Sanger-Sequenzierung sowie Sequenzanalyse eines SNAP29-KO Klon (hS10_03) im Vergleich zum WT (A) Der Klon MRC5Vi hS10_03 (KO) wurde nach Sanger sequenziert und mit dem MRC5Vi WT verglichen. Über der Sequenz sind die sgRNA-Zielsequenz der Sequenz A0 und die PAM markiert. Dabei zeigte sich eine Deletion und anschließende Insertion (Indel: Akronym für Insertion und Deletion) in Exon 1 (c.41_68delinsTTCCGT). (B) Vergleich der DNA-Sequenzen beginnend mit dem Startcodon. Die verwendeten MRC5Vi-Fibroblasten zeigen einen bekannten Polymorphismus an Position 18 auf. (C) Vergleich der resultierenden Proteinsequenzen: In hellblau sind die identischen Anteile der Sequenz dargestellt. In hellgrau ist die modifizierte und trunkeierte Proteinsequenz des Klons hS10_03 angegeben. (D) Funktionelle Domänen von SNAP29 und Darstellung der verkürzten Sequenz in den in (C) angegebenen Farben.

Bei der Kultivierung der Zellen wurde ein verlangsamtetes Wachstum der KO-Zellen gegenüber den WT-Zellen beobachtet. Um diesen Phänotyp zu dokumentieren wurden KO- und WT-Zellen mit gleicher Anfangszellzahl ausgesät und im Abstand von 24 Stunden die Zelldichte mit dem Mikroskop dokumentiert. Dabei zeigte sich ein deutlich verlangsamtetes Wachstum der KO-Zellen. Die KO-Zellen erreichten die 48 Stunden-Zelldichte der WT-Zellen erst nach 96 Stunden (Abbildung 21).

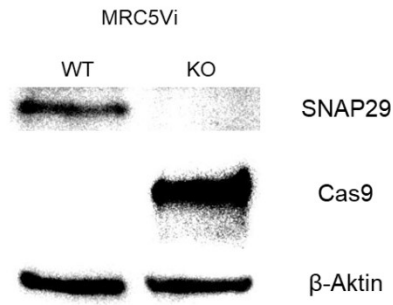


Abbildung 20: Nachweis von SNAP29 mittels Western Blot in MRC5Vi WT und KO Es wurden je 25µg Ganzzelllysat auf ein 4-15 % Tris-Glyzin Gel aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine Membran wurden die Proteine Cas9, β-Aktin und SNAP29 mit Antikörpern markiert.

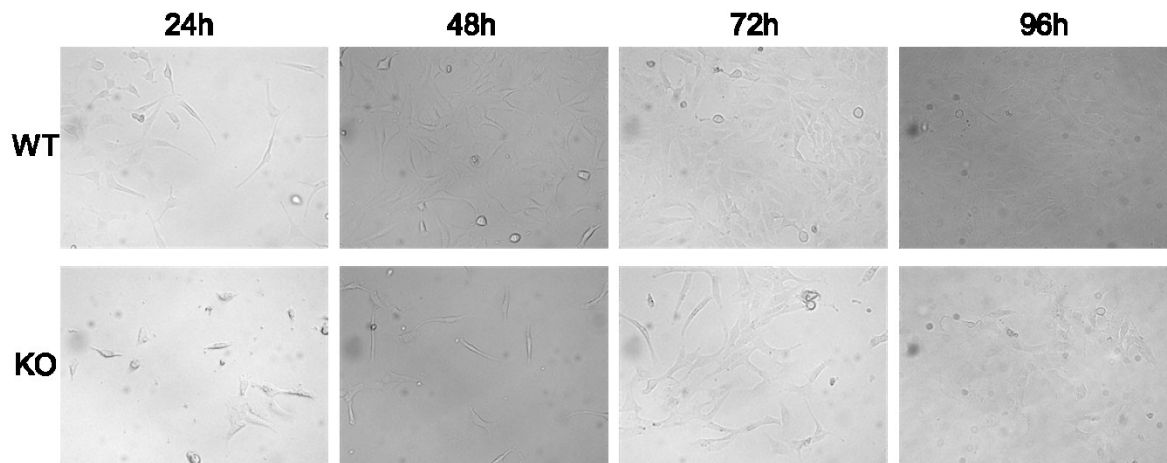


Abbildung 21: Zelldichte der WT- und KO-Fibroblasten bei gleicher Anfangsdichte WT- und KO-Fibroblasten wurden in einer 6-Well-Platte mit einer Anfangszellzahl von 100.000 Zellen kultiviert und das Zellwachstum im Abstand von jeweils 24 Stunden mit dem Mikroskop dokumentiert (20x).

5 Diskussion

SNARE-Proteine sind zuständig für die Vesikelfusion zwischen Vesikel- und Zielmembran (Jahn & Scheller 2006). SNAP29, ein SNARE-Protein, ist an vielen verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt, die eine Fusion zweier Membranen erfordert. Dazu zählen unter anderem Endozytose (Rotem-Yehudar et al. 2001), Zellmotilität (Rapaport et al. 2010), Reifung und Sekretion lamellärer Granula (Fuchs-Telem et al. 2011; Sprecher et al. 2005), Bildung primärer Zilien (Lu et al. 2015), Kinetochorbildung (Morelli et al. 2016) und Autophagie (Diao et al. 2015). Die Bedeutung dieses Proteins wird an der homozygoten *loss-of-function* Mutation von *SNAP29* beim neurokutanen CEDNIK-Syndrom deutlich (Sprecher et al. 2005). In zwei Mausmodellen konnte das humane CEDNIK-Syndrom nachgestellt und die Funktion von SNAP29 weiter untersucht werden (Schiller et al. 2016b; Schiller et al. 2016a).

Um den Effekt einer SNAP29-Defizienz besser untersuchen zu können, ist eine immortalisierte Zelllinie von Vorteil, da primäre Zellen nur begrenzt passagiert werden können. Daher war das Hauptziel dieser Arbeit, eine KO-Zelllinie zu etablieren. Zusätzlich wurden methodische Varianten der CRISPR/Cas9-Technik exploriert und miteinander verglichen.

5.1 Generierung von humanen *SNAP29*-KO Fibroblasten mittels CRISPR/Cas9

Die CRISPR/Cas9-Methode stellt eine effiziente und einfach anpassbare Technik zur sequenzspezifischen Modifikation des Genoms dar. Im Gegensatz zu ZFNs und TALENs arbeitet die CRISPR/Cas9-Methode mit einer RNA, die die Zielsequenz der Endonuklease vorgibt. Diese RNA kann durch den Anwender an die jeweilige Sequenz angepasst werden. Mit Hilfe von Online-Werkzeugen können Zielsequenzen schnell bestimmt und *off-target* Aktivitäten berechnet werden (Ran et al. 2013b).

Im Zuge dieser Arbeit konnte eine humane CRISPR/Cas9-vermittelte *SNAP29*-KO-Zelllinie generiert werden. Die Zielsequenz befand sich in Exon 1 von *SNAP29*. Die Zellen tragen einen homozygoten KO, der durch ein verfrühtes Stopcodon in Exon 1 von *SNAP29* bedingt wird, was zu einem stark verkürzten SNAP29-Protein ohne die funktionellen t-SNARE und *coiled-coil* Domänen führt. Zusätzlich konnte ein Polymorphismus der verwendeten MRC5Vi-Fibroblasten in Exon 1 von *SNAP29* festgestellt werden, der jedoch bereits bekannt ist, jedoch bisher in keiner Publikation erwähnt wurde (*Abbildung 19*). Die homozygote Modifikation in *SNAP29* kann dadurch erklärt werden, dass sich der KO durch ein zweizeitiges Geschehen ereignet hat. Da die CRISPR/Cas9-Methode einen Doppelstrangbruch induziert, kann eine Reparatur des Strangbruchs durch NHEJ oder HDR erfolgen. Vorausgesetzt es liegen noch

zwei Allele von *SNAP29* im Genom vor, wäre in einem ersten Schritt im ersten Allel durch CRISPR/Cas9 ein DSB induziert worden, der durch NHEJ repariert wurde. Zu einem späteren Zeitpunkt wäre im zweiten Allel ein DSB erfolgt, der dann jedoch nicht durch NHEJ, sondern durch HDR dem ersten Allel entsprechend repariert wurde. Die fehlende SNAP29-Proteinexpression wurde durch Western Blot nachgewiesen (*Abbildung 20*).

5.2 Produktion von murinen *Snap29*^{+/-}-Keratinocyten mittels CRISPR/Cas9

Neben einer Fibroblasten-Zelllinien mit einem homozygoten *SNAP29*-KO konnte im Rahmen dieser Arbeit auch ein *Snap29*-Allel der immortalisierte murinen Keratinocyten-Zelllinie C5N in Exon 1 modifiziert werden, was eine Verschiebung des Leserasters sowie ein verfrühtes Stopcodon in Exon 1 zur Folge hatte (*Abbildung 11*). Eine Verminderung der SNAP29-Proteinexpression in den *Snap*^{+/-}-Keratinocyten konnte nicht festgestellt werden (*Abbildung 11*). Im Mausmodell konnte - dem rezessiven Vererbungsmuster des CEDNIK-Syndroms entsprechend - phänotypisch kein Unterschied zwischen WT-Mäusen und heterozygoten *Snap29*^{+/-}-Mäusen festgestellt werden (Schiller et al. 2016a). Die Proteinexpression war jedoch im Vergleich zum WT in Fibroblasten der *Snap29*^{+/-}-Mäuse um 63 % reduziert. Ebenso konnte eine Reduktion der mRNA-Expression um annähernd 50 % nachgewiesen werden (Seebode 2015). Die Diskrepanz zwischen diesen beiden Ergebnissen ließe sich durch eine Analyse der mRNA-Expression in den *SNAP29*^{+/-}-Keratinocyten näher untersuchen.

Trotz weiterer Bemühungen konnte kein vollständiger KO erzeugt werden. Dies kann damit begründet werden, dass die sgRNA eine zu geringe *on-target* Aktivität besitzt. Trotz Berechnung der *on-target* Aktivität der empfohlenen sgRNAs mittels der verwendeten Online-Software besteht die Möglichkeit, dass diese *in silico* Ergebnisse sich nicht *in vivo* bestätigen lassen. Um eine realistischere Einschätzung der Funktionalität der sgRNAs zu erhalten, bietet zum Beispiel die Firma Takara Bio USA, Inc. ein System zur *in vitro*-Kontrolle der sgRNA-Aktivität an, um zeitaufwändige Versuche in der Zellkultur zu reduzieren. Dafür wird die DNA-Zielsequenz mit Hilfe der PCR amplifiziert und anschließend mit der zu untersuchenden sgRNA und der Endonuklease Cas9 inkubiert. Falls das Auftragen auf ein Agarose-Gel mehr als eine Bande ergibt, wäre dies eine Bestätigung der *on-target* Aktivität *in vitro* (Takara Bio USA, Inc., 2018). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass ein *Snap29*-KO in murinen Keratinocyten letal sein könnte. Ein Argument für diese Hypothese wäre, dass selbst die effizientere lentivirale Transduktion (siehe *Kapitel 4.3.3*) keine KO-Keratinocyten hervorbringen konnte. Außerdem ist es möglich, dass ein KO für die Keratinocyten eine so starke Belastung darstellt, dass dadurch auch die Letalität unter der vorher am WT festgelegten Puromycinkonzentration steigt.

5.3 Bedeutung einer SNAP29-defizienten Zelllinie für die Forschung

Durch die Beteiligung von SNAP29 an einer Vielzahl verschiedener zellulärer Funktionen sind KO-Zelllinien zur weiteren Erforschung der Proteinfunktion unabdingbar. Im Folgenden möchte ich näher auf einige Funktionen eingehen und mögliche Forschungsansätze hierzu erläutern.

Primäre Zilien spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation und in einigen Signalwegen der Entwicklung und Gewebshomöostase. Zu diesen Signalwegen zählen unter anderem der Hedgehog (Hh)- und der Notch-Signalweg. Primäre Zilien bilden sich auf Mutterzentriolen. Ihr 9+0 Grundgerüst aus zirkulär angeordneten Mikrotubulus-Doubletten wird von einer Membran eingehüllt, die in die Zellmembran übergeht, sich aber von ihr auf molekularer Ebene unterscheidet. Die Ursache findet sich in der frühen Entwicklung der Zilien. Ein großer ziliärer Vesikel bildet sich über der Zentriole und bildet eine Hülle um das sich formende Axonem. Das so entstehende Zilium zeigt in das Vesikellumen. Der Vesikel wird schließlich mittels Exozytose ausgeschleust und das primäre Zilium gelangt auf die Zelloberfläche (Chen et al. 2015a; Lu et al. 2015; Satir et al. 2010; Seeley & Nachury 2010). SNAP29 interagiert mit EHD1, einem Protein der EHD-Proteinfamilie. Die EHD-Proteinfamilie besteht aus 4 Mitgliedern. Während alle Familienmitglieder an der Regulation des endozytotischen Transports beteiligt sind, ist speziell EHD1 in der Bildung des ziliären Vesikels involviert. SNAP29 wird voraussichtlich durch EHD1 zur Bildung des ziliären Vesikels durch Membranfusion rekrutiert (Lu et al. 2015; Rotem-Yehudar et al. 2001; Zhang et al. 2012). Lu und Mitarbeiter konnten zeigen, dass RPE-Zellen (RPE = *retinal pigment epithelium*), die mit siRNA gegen *SNAP29* behandelt wurden, signifikant seltener ein primäres Zilium besitzen als mit Kontroll-siRNA behandelte Zellen (Lu et al. 2015).

Das Fehlen primärer Zilien während der Embryogenese beeinträchtigt die epidermale Differenzierung und die Hautbarrierefunktion (Ezratty et al. 2011). Eine im *Snap29*-KO-Mausmodell beobachtete Hyperproliferation der Epidermis mit unterdrückter Differenzierung der Keratinozyten wurde mit dem Fehlen oder einer Fehlfunktion der primären Zilien assoziiert (Schiller et al. 2016b).

Primäre Zilien sind essentiell für den Hh-Signalweg in Vertebraten, der sowohl in Entwicklungsprozesse wie die Organogenese als auch in die Tumorgenese involviert ist. Hh bindet an das Transmembranprotein Patched1 (Ptch1), das in primären Zilien lokalisiert ist. Ptch1 bewegt sich nachfolgend aus dem Zilium heraus, was es dem Transmembranprotein Smoothed (Smo) ermöglicht, in das primäre Zilium zu translozieren, und zur Aktivierung von Gli-Transkriptionsfaktoren führt. In Abwesenheit von Hh-Liganden wie Sonic Hh (Shh) werden die Gli-Transkriptionsfaktoren proteolytisch zu Repressorformen (GliRs) prozessiert

(Goetz & Anderson 2010). Der Hh-Signalweg ist in das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Zellen in der Embryonalentwicklung involviert. *Shh*-KO-Mäuse sind aufgrund von Problemen bei der Strukturierung des embryonalen Gewebes embryonal letal (Park et al. 2018). Zilien von dermalen Papillenzellen beeinflussen die Haarfollikelentwicklung über den Shh-Signalweg (Chen et al. 2015a; Ezratty et al. 2011). Übereinstimmend damit konnte im *Snap29*-KO-Mausmodell eine deutliche Reduktion der Haarfollikel gezeigt werden (Schiller et al. 2016b). Basalzellkarzinome (BCCs) können auf Basis einer *Ptch1*-Mutation entstehen. Dadurch kommt es zu einer dauerhaften Aktivierung des Shh-Signalwegs (Epstein 2008). Wie sich eine SNAP29-Defizienz oder SNAP29-Inhibition auf BCCs auswirkt, wurde bisher nicht untersucht.

Der Notch-Signalweg ist während der Embryogenese mit primären Zilien assoziiert (Ezratty et al. 2011). Notch ist ein heterodimerer Rezeptor, dessen zytoplasmatische Domäne durch Ligandenbindung proteolytisch abgespalten und somit transkriptionell mit Bindungspartnern aktiv wird. In der Epidermis induziert die Notch-Signalübertragung voraussichtlich die Differenzierung der Keratinozyten. Bei konstitutiver Expression von *Notch1* konnte in Maushaut eine Akanthose gezeigt werden, während bei Deletion von *Notch1* eine Abnahme der Zelldifferenzierung und gleichzeitig eine Zunahme der proliferierenden Zellschichten der Epidermis auftrat (Blanpain et al. 2006; Okuyama et al. 2008; Rangarajan 2001). Ob eine Assoziation mit primären Zilien postnatal vorliegt und zur Homöostase der Haut beiträgt, scheint bisher nicht exploriert worden zu sein.

Interessanterweise konnte eine Beteiligung primärer Zilien (Han & Alvarez-Buylla 2010), des Shh-Signalwegs (Yabut & Pleasure 2018) und des Notch-Signalwegs (Zhang et al. 2018) bei der Entwicklung des Gehirns nachgewiesen werden. Dies könnte die zerebrale Dysgenese beim CEDNIK-Syndrom erklären bzw. zu ihr beitragen.

Die generierte *Snap29*-KO-Zelllinie sollte daher auf die Ausbildung primärer Zilien und ihren Einfluss auf die erwähnten Signalwege untersucht werden.

Endoplasmatisches Retikulum (ER)-Stress wird durch einen Verlust der Homöostase im ER ausgelöst, was zu einer Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im ER-Lumen führt. (Li et al. 2014). Dadurch wird ein Mechanismus – die *unfolded protein response* (UPR) – ausgelöst, um einen Zellschaden zu vermeiden. Durch ER-Stress konnte eine beschleunigte Autophagosomenbildung nachgewiesen werden. Eine Beeinträchtigung der Autophagie erhöhte die Vulnerabilität der Zellen nach ER-Stress, was eine wichtige Rolle für die Autophagie im Zellüberleben nach ER-Stress impliziert (Ogata et al. 2006). Autophagie ist ein hochkonservierter katabolischer Prozess, der zur Degradierung und Wiederverwendung von Makromolekülen zellulärer Proteine und Organellen dient. Autophagosomen fusionieren für

diesen Prozess mit Lysosomen (Levy et al. 2017). In diesen Fusionsprozess ist SNAP29 involviert (Diao et al. 2015). Der Zusammenhang zwischen ER-Stress, Autophagie und SNAP29-Defizienz wurde im *Snap29*-KO-Mausmodell untersucht. Die Ergebnisse deuten auf eine Induktion der Autophagie durch ER-Stress hin (Schiller et al. 2016a). Eine weiterführende Untersuchung des Zusammenhanges von Autophagie und ER-Stress, sowie einer genauere Untersuchung, welche Prozesse durch eine SNAP29-Defizienz in der Autophagie beeinflusst werden, sollte an der hier beschriebenen *SNAP29*-KO-Zelllinie durchgeführt werden.

5.4 Permanente Veränderungen durch lentivirale Transduktion

Lentiviren sind eine Untergruppe der Retroviren, deren prominentester Vertreter das HI-Virus ist. Die in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Vektoren sind replikationsdefiziente, hybride virale Partikel. Eine Integration ihres viralen Genoms kann an allen Stellen des Genoms, auch mitten in Genen, erfolgen und somit Zellfunktionen beeinflussen (Milone & O'Doherty 2018; Naldini 1998). Daher können neben der gezielten Alteration auch andere Gene des Wirtszellgenoms betroffen sein - unabhängig davon, ob das zu alterierende Gen modifiziert werden konnte (Bokhoven et al. 2009). Außerdem erfolgt eine ständige Expression der sgRNA und der Endonuklease Cas9, was die Zelle ebenso in ihren Zellfunktionen beeinflussen kann. Solange die sgRNA und die Endonuklease Cas9 in der Zelle abgelesen werden können, kann es zu Alterationen im Genom kommen. Dies macht *off-target* Effekte auf Grund der andauernden Exposition wahrscheinlicher. Ebenso werden aber auch die *on-target* Effekte wahrscheinlicher, so dass alle transduzierten Zellen potenzielle KO-Zellen sind, je länger sie die transduzierte DNA in sich tragen.

Um *off-target* Effekte zu minimieren und von der Effizienz der lentiviralen Transduktion zu profitieren, sollten induzierbare lentivirale Vektoren (Aubrey et al. 2015) erwogen werden. Dies würde zumindest das Problem der ständigen Expression aufheben. Dennoch würde weiterhin das Problem der integrierten viralen DNA bestehen. Andere nicht-integrierende virale Vektoren wie adenovirale Vektoren (Ehrke-Schulz et al. 2017) sollten deshalb in Betracht gezogen werden.

5.5 Lentivirale Transduktionseffizienz ist speziesabhängig

Die lentivirale Transduktion basiert auf der Rezeptor-vermittelten Endozytose oder der Verschmelzung der viralen Membranhülle mit der Zellmembran und damit der Freisetzung des Nukleokapsids mit der viralen RNA in die Zielzelle (Milone & O'Doherty 2018). Durch eine Pseudotypisierung der lentiviralen Vektoren mit VSV-G kann ein breites Wirtsspektrum erreicht werden, da das VSV den LDL-Rezeptor und LDLR-Familienmitglieder als

Haupteintrittspforte in die Zellen verwendet (Finkelshtein et al. 2013). Dennoch kommt es zu unterschiedlich effizienter Transduktion bei Zelllinien verschiedener Spezies. So konnten Ikeda und Mitarbeiter zeigen, dass einige nicht-humane Zelllinien, unter anderem von Maus und Ratte, deutlich schlechter transduziert werden konnten als humane Zelllinien (Ikeda et al. 2002).

Auch in dieser Arbeit konnte ein Unterschied in der lentiviralen Transduktionseffizienz aufgezeigt werden. Dabei zeigte sich eine deutlich höhere Transduktionseffizienz von humanen Zelllinien gegenüber Mauszelllinien, die sich in einer früheren und stärkeren EGFP-Expression während der Inkubation mit pLJM1-EGFP tragenden lentiviralen Vektoren äußerte (*Abbildung 16*). Wie auch bei Ikeda und Mitarbeiter steht *EGFP* unter dem Einfluss eines CMV-Promotors (*Abbildung 4*). Die vermeintlich geringe Transduktionseffizienz in Nagerzelllinien wurde auf eine geringe Expression des CMV-Promotors zurückgeführt. Dies wurde damit begründet, dass ein Austausch mit dem EF1 α -Promotor zu einer ähnlich hohen Transduktionseffizienz wie bei humanen Zelllinien führte (Ikeda et al. 2002). Auch in einer anderen Studie erreichte der humane CMV-Promotor in murinen Zellen geringere Expressionslevel als in humanen Zellen (Addison et al. 1997). In einer anderen Studie wiederum wird die Internalisierung als limitierender Faktor bei der Transduktion mit VSV-G-pseudotypisierten lentiviralen Vektoren angesehen (Acevedo et al. 2018). Eine Wiederholung des Versuchs mit EGFP unter anderen Promotoren wie zum Beispiel dem EF1 α -Promotor würde hier Klarheit schaffen, in wie weit die Pseudotypisierung mit VSV-G oder der CMV-Promotor für die unterschiedliche EGFP-Expression verantwortlich sind.

5.6 Lentivirale Transduktion ist effizienter als Transfektion

Transfektion ist die Methode der Einschleusung eines exogenen DNA-Abschnitts mit Hilfe eines Stimulus in die Zielzelle. Dafür werden physikalische und chemische Methoden verwendet (Jin et al. 2014). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Transfektionsreagenzien (Attractene und ViaFect™) sich nicht nur in der Effizienz von der lentiviralen Transduktion stark unterscheiden, sondern auch, dass eine Effizienzdifferenz zwischen verschiedenen Transfektionsreagenzien besteht. ViaFect™ zeigte in beiden Zelllinien eine höhere Transfektionseffizienz. Zudem war die Transfektionseffizienz bei beiden Reagenzien in den humanen MRC5Vi-Fibroblasten signifikant höher als in den murinen C5N-Keratinocyten (*Abbildung 17*). Ein Effizienzunterschied zwischen Transfektionsreagenzien konnte auch mit anderen Reagenzien gezeigt werden (Shi et al. 2018). Eine andere Arbeitsgruppe konnte zusätzlich zeigen, dass Transfektionsreagenzien in verschiedene Zelllinien unterschiedliche Effizienzen aufweisen (Yamano et al. 2010), so dass meine Ergebnisse dieses Bild ergänzen. Grundsätzlich sollten deshalb bei jeder Transfektion einer Zelllinie, deren optimales Transfektionsreagenz noch nicht ermittelt wurde,

verschiedene zur Verfügung stehende Reagenzien an dieser Zelllinie auf ihre Effizienz getestet werden.

5.7 Reduktion der *off-target* Effekte der CRISPR/Cas9-Methode

Die CRISPR/Cas9-Methode birgt das Risiko von *off-target* Aktivität. Das heißt, dass der *on-target* Sequenz ähnliche DNA-Abschnitte ebenso von der Endonuklease Cas9 durch die sgRNA erkannt und durch Reparaturmechanismen modifiziert werden können (Yee 2016). Um diese *off-target* Effekte zu minimieren wird empfohlen, dass die Zielsequenz des *off-targets* nicht von einer PAM bestehend aus 5'-NGG oder 5'-NAG gefolgt wird. Zudem sollten *off-targets* mit weniger als drei Fehlpaarungen vermieden werden und mindestens zwei Fehlpaarungen sollten in der Nähe der PAM liegen. Außerdem sollte die Mehrzahl der Fehlpaarungen aneinandergereiht oder weniger als vier Basenpaare auseinander liegen (Hsu et al. 2013).

Darüber hinaus wäre die Verwendung einer sogenannten Nickase, Cas9n, empfehlenswert. Diese induziert keinen DSB, sondern erzeugt nur einen Einzelstrangbruch. So benötigt man zwei gegenläufig aktive Nickasen um einen DSB zu erzeugen. Dieser DSB kann dann auf den bekannten Wegen repariert werden und kann zu einer zielgerichteteren Modifikation des Genoms führen (Ran et al. 2013a).

Um eine KO-Zelllinie zu erhalten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit nur *on-target* modifiziert wurde, sollte neben der *in silico*-Analyse der *off-targets* auch die Erwägung der Verwendung von Nickasen in die Versuchsplanung aufgenommen werden.

5.8 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Insgesamt bilden die in dieser Arbeit generierten KO-Zelllinien einen wichtigen Grundstein für die weitere Erforschung der Funktionen von SNAP29. Da primäre Zellen nur eine begrenzte Zeit in der Zellkultur passagiert werden können, besteht durch die hier beschriebene Fibroblasten-KO-Zelllinie die Möglichkeit, reproduzierbare Ergebnisse zu erlangen. Insbesondere der Einfluss von SNAP29 auf die Ziliogenese, den Shh- und den Notch-Signalweg, den ER-Stress und die Autophagie kann somit weiter untersucht werden. Zudem können mit Hilfe der lentiviralen Vektoren weitere SNAP29-defiziente immortalisierte Zelllinien generiert werden, die zum Beispiel im Doppel-KO weitere Informationen über molekulare Interaktionen von SNAP29 geben können. Dies wird Inhalt eines Antrags bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) sein.

6 Quellen

Acevedo ML, García-de Gracia F, Miranda-Cárdenas C, Soto-Rifo R, Aguayo F, León O. Differences in the internalization of self-inactivating VSVG-pseudotyped murine leukemia virus-based vectors in human and murine cells. *J. Virol. Methods.* Elsevier; 2018;255(February):14–22

AddGene. Lentivirus Production [Internet]. Protocols. 2016 [cited 2017 Nov 29]. p. 10–1 Available from: <https://www.addgene.org/protocols/lentivirus-production/>

Addison CL, Hitt M, Kunsken D, Graham FL. Comparison of the human versus murine cytomegalovirus immediate early gene promoters for transgene expression by adenoviral vectors. *J. Gen. Virol.* 1997;78(7):1653–61

Akiyama M. Updated molecular genetics and pathogenesis of ichthyoses. *Nagoya J. Med. Sci.* 2011;73(3–4):79–90

Antonin W, Fasshauer D, Becker S, Jahn R, Schneider TR. Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat. Struct. Biol.* 2002;9(2):107–11

Aubrey BJ, Kelly GL, Kueh AJ, Brennan MS, O'Connor L, Milla L, et al. An Inducible Lentiviral Guide RNA Platform Enables the Identification of Tumor-Essential Genes and Tumor-Promoting Mutations In Vivo. *Cell Rep.* 2015;10(8):1422–32

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983. *Rev. Invest. Clin.* 1983;56(2):126–9

Bateman DE. Neurological assessment of coma. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2001;71:13–7

Blanpain C, Lowry WE, Pasolli HA, Fuchs E. Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev.* 2006;20(21):3022–35

Bock JB, Matern HT, Peden AA, Scheller RH. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature.* 2001;409(6822):839–41

Bokhoven M, Stephen SL, Knight S, Gevers EF, Robinson IC, Takeuchi Y, et al. Insertional Gene Activation by Lentiviral and Gammaretroviral Vectors. *J. Virol.* 2009;83(1):283–94

Bonifacino JS, Glick BS. The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell.* Cell Press; 2004;116(2):153–66

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 1988;106(3):761–71

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* Academic Press; 1976;72(1–2):248–54

Chen J, Laclef C, Moncayo A, Snedecor ER, Yang N, Li L, et al. The Ciliopathy Gene Rpgrip11 Is Essential for Hair Follicle Development. *J. Invest. Dermatol.* 2015a;135(3):701–9

Chen S, Sanjana NE, Zhang F, Sharp PA, Chen S, Sanjana NE, et al. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell.* Elsevier Inc.; 2015b;160(6):1246–60

- Clark DP. Chapter 17 - Viruses. *Mol. Biol. Underst. Genet. Revolut. Das Orig. mit Übersetzungshilfen*. 1. Auflage. Elsevier; 2006. p. 453–83
- Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(22):10881–90
- Cronin J, Zhang X-Y, Reiser J. Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping. *Curr. Gene Ther.* 2005;5(4):387–98
- Deyrieux AF, Wilson VG. In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology.* 2007;54(2):77–83
- Diao J, Liu R, Rong Y, Zhao M, Zhang J, Lai Y, et al. ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature.* 2015;520(7548):563–6
- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014;346(6213):1258096
- Ehrke-Schulz E, Schiwon M, Leitner T, Dávid S, Bergmann T, Liu J, et al. CRISPR/Cas9 delivery with one single adenoviral vector devoid of all viral genes. *Sci. Rep.* 2017;7(1):17113
- Epinat J-C. A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(11):2952–62
- Epstein EH. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat. Rev. Cancer.* 2008;8(10):743–54
- Ezratty EJ, Stokes N, Chai S, Shah AS, Williams SE, Fuchs E. A Role for the Primary Cilium in Notch Signaling and Epidermal Differentiation during Skin Development. *Cell.* Elsevier Inc.; 2011;145(7):1129–41
- Faini M, Beck R, Wieland FT, Briggs JAG. Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly. *Trends Cell Biol.* Elsevier Current Trends; 2013;23(6):279–88
- Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences;* 1998;95(26):15781–6
- Finkelshtein D, Werman A, Novick D, Barak S, Rubinstein M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013;110(18):7306–11
- Fuchs-Telem D, Stewart H, Rapaport D, Nousbeck J, Gat A, Gini M, et al. CEDNIK syndrome results from loss-of-function mutations in SNAP29. *Br. J. Dermatol.* 2011;164(3):610–6
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* 1984;224(4648):500–3
- Gharaati-Far N, Tohidkia MR, Dehnad A, Omid Y. Efficiency and cytotoxicity analysis of cationic lipids-mediated gene transfection into AGS gastric cancer cells. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group; 2018;46(5):1001–8
- Goetz SC, Anderson K V. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat. Rev. Genet.* Nature Publishing Group; 2010;11(5):331–44
- Haase AT. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature.* 1986;322(6075):130–6
- Han Y-G, Alvarez-Buylla A. Role of primary cilia in brain development and cancer. *Curr. Opin.*

Neurobiol. 2010;20(1):58–67

Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol. Academic Press*; 1983;166(4):557–80

Hess DT, Slater TM, Wilson MC, Skene JH. The 25 kDa synaptosomal-associated protein SNAP-25 is the major methionine-rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation in adult CNS. *J. Neurosci.* 1992;12(12):4634–41

Holt M, Varoqueaux F, Wiederhold K, Takamori S, Urlaub H, Fasshauer D, et al. Identification of SNAP-47, a Novel Qbc-SNARE with Ubiquitous Expression. *J. Biol. Chem.* 2006;281(25):17076–83

Hong W. SNAREs and traffic. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. Elsevier*; 2005;1744(2):120–44

Hsu T, Coughlin CC, Monaghan KG, Fiala E, McKinstry RC, Paciorkowski AR, et al. CEDNIK: Phenotypic and Molecular Characterization of an Additional Patient and Review of the Literature. *Child Neurol. Open.* 2017;4:2329048X17733214

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

Ikeda Y, Collins M, Radcliffe P, Mitrophanous K, Takeuchi Y. Gene transduction efficiency in cells of different species by HIV and EIAV vectors. *Gene Ther.* 2002;9(14):932–8

Itin PH, Fistarol SK. Palmoplantar Keratodermas. *Clin. Dermatol. Elsevier*; 2005;23(1):15–22

Jahn R, Scheller RH. SNAREs — engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006;7(9):631–43

Jin L, Zeng X, Liu M, Deng Y, He N. Current Progress in Gene Delivery Technology Based on Chemical Methods and Nano-carriers. *Theranostics.* 2014;4(3):240–55

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

Kalinin AE, Kajava A V., Steinert PM. Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *BioEssays.* 2002;24(9):789–800

Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol.* 2001;12(4):390–9; quiz 400–1

Kim J-SJM, Kim D, Kim S, Kim J-SJM. Genotyping with CRISPR-Cas-derived RNA-guided endonucleases. *Nat. Commun. Nature Publishing Group*; 2014;5(2014):3157

Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–5

Lehmann J, Seebode C, Smolorz S, Schubert S, Emmert S. XPF knockout via CRISPR/Cas9 reveals that ERCC1 is retained in the cytoplasm without its heterodimer partner XPF. *Cell. Mol. Life Sci. Springer International Publishing*; 2017;74(11):2081–94

Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer. Nature Publishing Group*; 2017;17(9):528–42

Li Y, Guo Y, Tang J, Jiang J, Chen Z. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 2014;46(8):629–40

- Lu Q, Insinna C, Ott C, Stauffer J, Pintado PA, Rahajeng J, et al. Early steps in primary cilium assembly require EHD1/EHD3-dependent ciliary vesicle formation. *Nat. Cell Biol.* 2015;17(3):228–40
- Madison KC. Barrier function of the skin: “La Raison d’Être” of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* Elsevier Masson SAS; 2003;121(2):231–41
- Malsam J, Kreye S, Söllner TH. Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008;65(18):2814–32
- McDonald-McGinn DM, Fahiminiya S, Revil T, Nowakowska BA, Suhl J, Bailey A, et al. Hemizygous mutations in SNAP29 unmask autosomal recessive conditions and contribute to atypical findings in patients with 22q11.2DS. *J. Med. Genet.* 2013;50(2):80–90
- Milone MC, O’Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia.* Springer US; 2018;1–13
- Mirus. Trans IT ® -LT1 Transfection Reagent Protocol [Internet]. [cited 2017 Nov 29]. Available from: <https://www.mirusbio.com/products/transfection/transit-lt1-transfection-reagent>
- Morelli E, Mastrodonato V, Beznoussenko G V, Mironov AA, Tognon E, Vaccari T. An essential step of kinetochore formation controlled by the SNARE protein Snap29. *EMBO J.* 2016;35(20):2223–37
- Naldini L. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1998;9(5):457–63
- Oelkers M, Witt H, Halder P, Jahn R, Janshoff A. SNARE-mediated membrane fusion trajectories derived from force-clamp experiments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences;* 2016;113(46):13051–6
- Ogata M, Hino S -i., Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, et al. Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26(24):9220–31
- Oji V, Tadini G, Akiyama M, Blanchet Bardon C, Bodemer C, Bourrat E, et al. Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: Results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorze 2009. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2010;
- Okuyama R, Tagami H, Aiba S. Notch signaling: Its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases. *J. Dermatol. Sci.* 2008;49(3):187–94
- Park S, Kim H, Kim K, Roh S. Sonic hedgehog signalling regulates the self-renewal and proliferation of skin-derived precursor cells in mice. *Cell Prolif.* 2018;51(6):e12500
- Poirier MA, Xiao W, Macosko JC, Chan C, Shin Y-K, Bennett MK. The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. *Nat. Struct. Biol.* 1998;5(9):765–9
- Proksch E, Brandner JM, Jensen J-M. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 2008;17(12):1063–72
- Promega. What transfection reagent should I choose ? 2014;1–4
- Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* 1958;108(6):945–56
- Rajput A, Martin IDS, Rose R, Beko A, LeVeae C, Sharratt E, et al. Characterization of HCT116 Human Colon Cancer Cells in an Orthotopic Model. *J. Surg. Res.* 2008;147(2):276–81
- Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell.* Elsevier;

2013a;154(6):1380–9

Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 2013b;8(11):2281–308

Rangarajan A. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J.* 2001;20(13):3427–36

Rapaport D, Lugassy Y, Sprecher E, Horowitz M. Loss of SNAP29 Impairs Endocytic Recycling and Cell Motility. Hotchin NA, editor. *PLoS One.* 2010;5(3):e9759

Ravichandran V, Chawla A, Roche PA. Identification of a Novel Syntaxin- and Synaptobrevin/VAMP-binding Protein, SNAP-23, Expressed in Non-neuronal Tissues. *J. Biol. Chem.* 1996;271(23):13300–3

Richard G. Molecular genetics of the ichthyoses. *Am. J. Med. Genet.* 2004;131C(1):32–44

Rotem-Yehudar R, Galperin E, Horowitz M. Association of Insulin-like Growth Factor 1 Receptor with EHD1 and SNAP29. *J. Biol. Chem.* 2001;276(35):33054–60

Rothman JE. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature.* 1994;372(6501):55–63

Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* Nature Publishing Group; 2014;32(4):347–55

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977;74(12):5463–7

Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods.* 2014;11(8):783–4

Satir P, Pedersen LB, Christensen ST. The primary cilium at a glance. *J. Cell Sci.* 2010;123(4):499–503

Schiller SA, Seebode C, Wieser GL, Goebbels S, Möbius W, Horowitz M, et al. Establishment of Two Mouse Models for CEDNIK Syndrome Reveals the Pivotal Role of SNAP29 in Epidermal Differentiation. *J. Invest. Dermatol.* Elsevier; 2016a;136(3):672–9

Schiller SA, Seebode C, Wieser GL, Goebbels S, Ruhwedel T, Horowitz M, et al. Non-keratinocyte SNAP29 influences epidermal differentiation and hair follicle formation in mice. *Exp. Dermatol.* 2016b;25(8):647–9

Seebode C. The role of SNAP29 during epidermal differentiation. Georg-August Universität Göttingen; 2015.

Seeley ES, Nachury M V. The perennial organelle: assembly and disassembly of the primary cilium. *J. Cell Sci.* 2010;123(4):511–8

Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, et al. Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. *Science* (80-.). 2014;343(6166):84–7

Shearer RF, Saunders DN. Experimental design for stable genetic manipulation in mammalian cell lines: lentivirus and alternatives. *Genes to Cells.* 2015;20(1):1–10

Shi B, Xue M, Wang Y, Wang Y, Li D, Zhao X, et al. An improved method for increasing the efficiency of gene transfection and transduction. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 2018;10(2):95–104

Smith C, Gore A, Yan W, Abalde-Atristain L, Li Z, He C, et al. Whole-Genome Sequencing Analysis Reveals High Specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-Based Genome Editing in

- Human iPSCs. *Cell Stem Cell*. Cell Press; 2014;15(1):12–3
- Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. 1993;362(6418):318–24
- Sprecher E, Ishida-Yamamoto A, Mizrahi-Koren M, Rapaport D, Goldsher D, Indelman M, et al. A Mutation in SNAP29, Coding for a SNARE Protein Involved in Intracellular Trafficking, Causes a Novel Neurocutaneous Syndrome Characterized by Cerebral Dysgenesis, Neuropathy, Ichthyosis, and Palmoplantar Keratoderma. *Am. J. Hum. Genet.* 2005;77(2):242–51
- Steggmaier M, Yang B, Yoo J, Huang B, Shen M, Yu S, et al. Three Novel Proteins of the Syntaxin/SNAP-25 Family. *J. Biol. Chem.* 1998;273(51):34171–9
- Stemmer M, Thumberger T, del Sol Keyer M, Wittbrodt J, Mateo JL. CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. Maas S, editor. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124633
- Südhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*. 2009;323(5913):474–7
- Takara Bio USA Inc. In Vitro Cleavage Efficiency of sgRNAs Correlates with Functional Genome Editing in Target Cells. 2018;1–5
- Takeichi T, Akiyama M. Inherited ichthyosis: Non-syndromic forms. *J. Dermatol.* 2016;43(3):242–51
- Tay SS, Roediger B, Tong PL, Tikoo S, Weninger W. The Skin-Resident Immune Network. *Curr. Dermatol. Rep.* 2014;3(1):13–22
- The RNAi Consortium (TRC). Lentivirus production of shRNA, CRISPR, or ORF-pLX clones in 10 cm dishes or 6-well plates. 2015.
- Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat. Protoc.* 2006;1(1):241–5
- TODARO GJ, GREEN H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* 1963;17(2):299–313
- Vannucci L, Lai M, Chiappesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.* 2013;36(1):1–22
- Veres A, Gosis BS, Ding Q, Collins R, Ragavendran A, Brand H, et al. Low Incidence of Off-Target Mutations in Individual CRISPR-Cas9 and TALEN Targeted Human Stem Cell Clones Detected by Whole-Genome Sequencing. *Cell Stem Cell*. Cell Press; 2014;15(1):27–30
- Vigna E, Naldini L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J. Gene Med.* 2000;2(5):308–16
- Vouillot L, Thélie A, Pollet N. Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3 (Bethesda)*. 2015;5(3):407–15
- Weimbs T, Low SH, Chapin SJ, Mostov KE, Bucher P, Hofmann K. A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: A new superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. National Academy of Sciences*; 1997;94(7):3046–51
- Welsch U, Deller T, Kummer W. Kapitel 16 Haut. *Lehrb. Histol.* 4. Auflage. Elsevier; 2014. p. 539–57
- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria

and archaea. *Nature*. 2012;482(7385):331–8

Wood AJ, Lo T-W, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*. 2011;333(6040):307

Yabut OR, Pleasure SJ. Sonic Hedgehog Signaling Rises to the Surface: Emerging Roles in Neocortical Development. Luikart BW, editor. *Brain Plast*. 2018;3(2):119–28

Yamano S, Dai J, Moursi AM. Comparison of Transfection Efficiency of Nonviral Gene Transfer Reagents. *Mol. Biotechnol*. 2010;46(3):287–300

Yee J-K. Off-target effects of engineered nucleases. *FEBS J*. 2016;283(17):3239–48

Zhang R, Engler A, Taylor V. Notch: an interactive player in neurogenesis and disease. *Cell Tissue Res. Cell and Tissue Research*; 2018;371(1):73–89

Zhang J, Naslavsky N, Caplan S. Rabs and EHDs: alternate modes for traffic control. *Biosci. Rep*. 2012;32(1):17–23

7. Anhang

7.1 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Die Generierung sowie Charakterisierung eines CRISPR/Cas9-vermittelten Knockouts von *SNAP29* in humanen Fibroblasten“

selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Die verwendeten Quellen habe ich vollständig angegeben.

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Marie Christine Martens
Geburtsdatum 12. Januar 1992, Lübeck, Deutschland
Adresse Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
Universitätsmedizin Rostock
Stempelstraße 13
18057 Rostock

Ausbildung

12/2020 Approbation als Ärztin
11/2020 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2019 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2017 Stipendium der Deutschen Stiftung Dermatologie
05/2016-12/2016 Studentische Hilfskraft im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie im Rahmen des FORUN (Forschungsförderung der Medizinischen Fakultät der Rostocker Universität)-Programms
04/2016 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2014 - 12/2020 Studium der Humanmedizin, Universitätsmedizin Rostock, Deutschland
02/2014 - 07/2014 Bachelorarbeit am LIMES-Institut in Bonn in der Forschungsgruppe „Immunologie und Umwelt“ mit dem Titel „The role of the AhR and the AhRR during acute UVB irradiation“
12/2011 – 10/2012 Teilnahme an iGEM 2012 („International Genetically Engineered Machine Competition“), Bronze Award
10/2011 - 07/2014 Bachelorstudiengang „Molekulare Biomedizin“ an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Deutschland
06/2011 Allgemeine Hochschulreife, Thomas-Mann-Schule Lübeck, Deutschland

Berufserfahrung

Seit 01/2021 Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsmedizin Rostock

7.3 Liste der Publikationen

- 1) Martens MC, Seebode C, Lehmann J, Emmert S; Photocarcinogenesis and Skin Cancer Prevention Strategies: An Update. *Anticancer Res.* 2018; 38(2):1153-1158.
- 2) Lehmann J, Seebode C, Martens MC, Emmert S; Xeroderma pigmentosum – Facts and Perspectives. *Anticancer Res.* 2018; 38(2):1159-1164.
- 3) Martens MC, Seebode C, Lehmann J, Emmert S; Molekulare Mechanismen der kutanen Photokarzinogenese: an update. *Aktuelle Dermatologie*, 2018; 44(05):226 - 231.
- 4) Seebode C, Lehmann J, Martens MC, Emmert S; Xeroderma pigmentosum – Facts and Perspectives. *Aktuelle Dermatologie*, 2018; 44(05):232 – 236.
- 5) Böckmann L, Martens C, Emmert S; Innovationen in der onkologischen Dermatologie. *Spitzenforschung in der Dermatologie. Innovationen und Auszeichnungen 2018*, hrsg. von der ALPHA Informations-GmbH, Lampertheim 2018; 28 - 38.
- 6) Boeckmann L, Schäfer M, Semmler ML, Bernhardt T, Martens MC, Ulrich M, Glatzel A, Hinz B, Nebe B, Vollmar B, Langer P, Metelmann H, Bekeschus S, Suhm C, Fischer T, Emmert S; Entwicklungsplattform für innovative onkologische Therapien am Beispiel des häufigsten menschlichen Krebses – Hautkrebs. *Spitzenforschung in der Dermatologie. Innovationen und Auszeichnungen 2018*, hrsg. von der ALPHA Informations-GmbH, Lampertheim 2019; 12-21.
- 7) Boeckmann L, Martens MC, Kakkassery V, Heindl LM, Emmert S; Molekulargenetische Untersuchungen als Basis zielgerichteter Therapien beim Basalzellkarzinom am Auge. *Der Ophthalmologe*, 2020; 117(2):106-112.
- 8) Boeckmann L, Martens MC, Schoen MP, Haenssle HA, Emmert S; Molecular biology of basal and squamous cell carcinomas. *Advances in experimental medicine and biology*, 2020; 1268:171-191.
- 9) Martens MC, Emmert S, Boeckmann L; Sunlight, vitamin D and xeroderma pigmentosum. *Advances in experimental medicine and biology*, 2020;1268:319-331.
- 10) Martens MC, Boeckmann L, Emmert S; Genetisch bedingte Hauterkrankungen – Xeroderma pigmentosum und das CEDNIK-Syndrom. *Aktuelle Dermatologie*, 2020; 46(08/09):375-378.
- 11) Boeckmann L, Bernhardt T, Schäfer M, Semmler ML, Glatzel A, Martens MC, Ulrich M, Thiem A, Tietze J, Jung O, Panzer R, Fischer T, Emmert S; Experimental Research at the Clinic and Policlinic for Dermatology and Venerology. *Aktuelle Dermatologie*, 2020; 46(08/09):370–374.
- 12) Martens MC, Emmert S, Boeckmann L; Genetisch bedingte UV-Empfindlichkeit. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 2021; 169(2):114-123.

- 13) Martens MC, Edelkamp J, Seebode C, Schäfer M, Stähle S, Krohn S, Jung O, Escobar HM, Emmert S, Boeckmann L; Generation and characterization of a CRISPR/Cas9-mediated SNAP29 knockout in human fibroblasts. *Biomedicines*, 2021; *eingereicht*.

7.4 Publierte Vorträge und Poster (Abstracts)

- 1) Martens C, Lehmann J, Seebode C, Emmert S. Genetics-UV-Immune Competency: What do we know about the Carcinogenesis, the Risks and the Prevention. *J Deutsch Derm Ges.* 2017; 15: 45.
- 2) Lehmann J, Seebode C, Martens MC, Emmert S. Xeroderma Pigmentosum: An Update. *Anticancer Res.* 2017; 37(6): 3335.
- 3) Martens MC, Seebode C, Lehmann J, Emmert S. Molecular Pathology of Skin Cancer Photocarcinogenesis: An Update. *Anticancer Res.* 2017; 37(6): 3334-3335.
- 4) Martens MC, Lehmann J, Seebode C, Emmert S. Generation of a Snap29 knockout in murine keratinocytes using CRISPR/Cas9. *Exp Dermatol.* 2018; 27(3): E9-E10.
- 5) Martens MC, Schäfer M, Lehmann J, Seebode C, Boeckmann L, Emmert S. Generation and Characterization of a SNAP29 knockout in immortalized human fibroblasts using CRISPR/Cas9. *Exp Dermatol.* 2019; 28(3): E45-E46.
- 6) Emmert S, Martens MC, Boeckmann L; Molecular Pathology and Clinical Management of Xeroderma Pigmentosum. *Anticancer Res.* 2019; 39(6): 3277.
- 7) Boeckmann L, Martens MC, Emmert S; Photocarcinogenesis of Non-Melanoma Skin Cancer: An Update. *Anticancer Res.* 2019; 39(6): 3275-3276.
- 8) Martens MC, Seebode C, Lehmann J, Boeckmann L, Emmert S; Generierung von CRISPR/Cas9-vermittelten Knockout-Zelllinien zur Erforschung von Genfunktionen am Beispiel einer SNAP29-Knockout-Zelllinie. *J Deutsch Derm Ges.* 2020; 18: S2 69 (P99).

7.5 Sonstige Vorträge und Posterpräsentationen

- 1) Martens MC, Lehmann J, Seebode C, Emmert S. Generation and characterization of a *Snap29* knockout in immortalized murine keratinocytes using CRISPR/Cas9. 3. ADF (Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung) Round Table 2016 in Bad Segeberg.
- 2) Martens MC, Lehmann J, Seebode C, Emmert S. Generation and characterization of a *Snap29* knockout in immortalized murine keratinocytes using CRISPR/Cas9. Hongkong 2017, Hongkong University, Exkursion einer Delegation der Universität

Rostock zur Vertiefung Traditionell Chinesischer Medizin und zur Diskussion eigener Forschungsthemen.

- 3) Martens C, Emmert S. Genodermatosen und molekulare Diagnostik/CRISPR. Fachseminar „Aktuelle Begutachtungsprobleme in der Dermatologie“ 2018 vom Medizinischen Dienst des Spitzenverbandes Bund der Krankenkassen in Fulda.
- 4) Martens MC. Generierung und Charakterisierung eines *SNAP29* Knockout in menschlichen Fibroblasten mittels CRISPR/Cas9. 9. Forschungsworkshop der Universitätsmedizin Rostock 2018.

7.6 Danksagungen

Hiermit möchte ich mich zuerst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Steffen Emmert bedanken, der mir die Möglichkeit eröffnet hat, in seinem Forschungslabor diese Dissertation zu erarbeiten. In dieser Zeit hat er es mir ermöglicht, einige Publikationen als Erstautorin zu veröffentlichen und an weiteren mitzuwirken. Ich bin dankbar für seine Unterstützung und seine Ratschläge zu dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Betreuerinnen Dr. rer. nat. Christina Seebode und Dr. rer. nat. Janin Lehmann für die praktischen Tipps und die hilfreichen Diskussionen über meine Forschungsergebnisse bedanken.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. agr. Barbara Nebe, der Leiterin des Arbeitsbereichs Zellbiologie der Universitätsmedizin Rostock, die mich in ihr Labor aufnahm, als ein Wasserrohrbruch im dermatologischen Forschungslabor die Weiterarbeit verhinderte. Innerhalb des Arbeitsbereichs möchte ich mich vor allem bei Dr. rer. nat. Susanne Stählke für ihre Hilfe mit dem Durchflusszytometer bedanken.

Danke an die Deutsche Stiftung Dermatologie, die meine Forschungsarbeit mit einem Stipendium 2017 unterstützt hat.

Danke auch an Dr. rer. nat. Lars Böckmann, der die Leitung des dermatologischen Forschungslabors übernahm und mich in den letzten Zügen meiner Arbeit betreut hat. Mein Dank geht auch an Mirijam Schäfer, M.Sc., die mich bei der weiteren Charakterisierung meiner KO-Zellen unterstützt.

Danke an meine Freunde, die mir Mut zugesprochen haben, wenn etwas mal nicht geklappt hat oder sich in die Länge zog.

Und vor allem danke ich meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums und vor allem auch während der Arbeit an dieser Dissertation.

7.7 Thesen

1. Das CEDNIK-Syndrom ist eine seltene, autosomal-rezessive neurokutane Erkrankung mit einer *loss-of function* Mutation im *SNAP29*-Gen. Das Akronym CEDNIK beschreibt den Symptomkomplex aus zerebraler Dysgenese (*CErebral Dysgenesis*), Neuropathie (*Neuropathy*), Ichthyose (*Ichthyosis*) und Palmoplantarkeratose (*Keratoderma*).
2. SNAP29 ist ein SNARE (*Soluble NSF Attachment Protein [SNAP] Receptor*)-Protein, das in Membranfusion, epidermale Differenzierung, primäre Zilienbildung und Autophagie involviert ist.
3. Die CRISPR/Cas9-Methode ist eine innovative Methode zur zielgerichteten DNA-Modifikation mittels einer Endonuklease (Cas9) und zweier RNA-Sequenzen, der crRNA (CRISPR-RNA) und tracrRNA (transaktivierende crRNA), die zur einfacheren Anwendung zu einer einzigen Führungs-RNA (engl.: *single guide RNA* = sgRNA) kombiniert werden. Die Induktion eines Doppelstrangbruchs durch Cas9 leitet die Reparatur der DNA ein. Ziel ist eine Gendisruption durch kleine Insertionen oder Deletionen.
4. Durch transiente Transfektion eines Cas9- und sgRNA-tragenden Plasmids konnten murine, heterozygote *Snap29^{+/-}* Keratinozyten aus der immortalisierten Zelllinie C5N generiert werden. Es gelang die Modifikation eines Allels (c.180delG) in Exon 1 von *Snap29*.
5. Die frustrane Generierung muriner, SNAP29-defizienter Keratinozyten kann durch eine geringe *on-target* Aktivität, eine erhöhte allgemeine Letalität und eine erhöhte Sensitivität auf die Puromycinselektion und damit verbundener Letalität bedingt sein.
6. Lentivirale Transduktion ist bei geringer Virenüberstandverdünnung effizienter als transiente Transfektion in den verwendeten murinen und humanen Zelllinien.
7. Humane Zelllinien zeigen bei lentiviraler Transduktion mit dem Plasmid pLJM1-EGFP eine höhere Transduktionseffizienz als murine Zellen, was an der Pseudotypisierung mit VSV-G oder an einer speziesabhängigen Expression des CMV-Promotors des *EGFP*-Gens liegen kann.
8. Die Effizienz von Transfektionsreagenzien ist von der verwendeten Zelllinie abhängig. Das optimale Transfektionsreagenz sollte daher individuell bestimmt werden.

9. Durch lentivirale Transduktion eines Cas9- und sgRNA-tragenden Plasmids konnte ein kompletter, homozygoter *SNAP29*-Knockout (c.169_196delinsTTCGT) in der immortalisierten, humanen Fibroblastenzelllinie MRC5Vi erzeugt werden.
10. Die homozygote Modifikation von *SNAP29* kann durch ein zweizeitiges Geschehen mit einer Doppelstrangbruchreparatur anhand des bereits mittels *non-homologous end-joining* modifizierten Stranges durch Homologie-geleitete Reparatur erklärt werden.
11. Jede mit einem Cas9- und sgRNA-tragenden Plasmid lentiviral transduzierte Zelle kann durch die Integration der transduzierten DNA ins Wirtszellgenom im Verlauf eine potenzielle Knockout-Zelle sein.
12. Mit der hier generierten *SNAP29*-Knockout-Zelllinie können weitere Funktionen des Proteins und sein Einfluss auf die Ziliogenese, die Autophagie und den Sonic hedgehog- sowie Notch-Signalweg erforscht werden.