



MPIMG

Freie Universität



Berlin

Diplomarbeit

Zum Erwerb des akademischen Grades der Diplom-Biochemikerin

Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems im *Epha4*-Lokus von embryonalen Stammzellen

Eingereicht im Institut für Chemie und Biochemie des
Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

Marina Borschiwer

geb. am 28.09.1988

Berlin, Oktober 2014

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Mundlos am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in der „Development and Disease Group“ von April bis Oktober 2014 angefertigt.

Eingereicht am 30. Oktober 2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Mundlos
Max-Planck-Institut für molekulare Genetik
Innestr. 63-73
14195 Berlin
Tel.: 030/ 8413 1449
E-Mail: mundlos@molgen.mpg.de

2. Gutachter: Prof. Dr. Florian Heyd
Institut für Chemie und Biochemie
Takustr. 6
14195 Berlin
Tel.: 030/ 838 62938
E-Mail: florian.heyd@fu-berlin.de

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Das CRISPR/Cas9-System.....	1
1.1.1 Das mikrobielle Immunsystem CRISPR/Cas.....	1
1.1.2 Genome Engineering mit dem CRISPR/Cas9-System.....	4
1.1.3 Spezifität des CRISPR/Cas9-Systems.....	6
1.1.4 Mausmodell.....	7
1.2 Genregulation.....	8
1.2.1 Regulatorische nichtcodierende Elemente	8
1.2.2 Chromosomale 3D-Struktur	10
1.3 Strukturelle genomische Variationen	11
1.4 Extremitätenfehlbildungen	13
1.4.1 Brachydaktylie	13
1.4.2 EPH Rezeptor A4 (<i>EPHA4</i>) Genlokus.....	14
1.4.3 Paired Box 3 (<i>PAX3</i>)	15
1.5 Zielsetzung	16
2. Material.....	17
2.1 Geräte	17
2.2 Chemikalien	18
2.2.1 Puffer/ Lösungen.....	18
2.2.2 Lösungen für die <i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	18
2.2.3 Färbelösungen für die Skelettpräparationen.....	20
2.2.4 Medien für die Zellkultur	20
2.3 Molekularbiologische Reaktionssysteme/ Kits	21
2.4 Enzyme.....	21
2.5 Bakterienstämme.....	21
2.6 Zelllinien	21
2.7 Tiere	22
2.8 Expressionsvektoren	22
2.9 Software	22
2.10 Oligonukleotide.....	22
2.11 Längenstandards.....	23

3. Methoden	24
3.1 Molekularbiologische Methoden	24
3.1.1 Vektor-Klonierung	24
3.1.2 Bakterientransformation.....	27
3.1.3 Animpfen von Flüssigkulturen.....	27
3.1.4 Glycerinkultur	27
3.1.5 Testverdau	28
3.1.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
3.1.7 Agarosegelelektrophorese	30
3.1.8 Sequenzierung	30
3.1.9 DNA-Isolierung.....	31
3.2 Zellbiologische Methoden.....	33
3.2.1 Herstellen von gelatinisierten Platten.....	33
3.2.2 Aussäen von Feeder-Zellen.....	33
3.2.3 Aussäen von embryonalen Stammzellen.....	33
3.2.4 Splitten von Zellen	33
3.2.5 Bestimmung der Zellzahl	34
3.2.6 Transfektion embryonaler Stammzellen	34
3.2.7 ES-Zellkolonien picken.....	35
3.2.8 Splitten und Einfrieren	36
3.2.9 Morula-Aggregation.....	36
3.3 Histologische Methoden.....	37
3.3.1 Skelettfärbung	37
3.3.2 <i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	37
3.3.3 Mikro-Computertomographie (μ-CT).....	40
4. Ergebnisse	41
4.1 Herstellung des Vektors für das CRISPR/Cas9-System	41
4.1.1 Testverdau zur Überprüfung der Vektorklonierung.....	41
4.1.2 Analyse des Vektors nach Bakterientransformation	42
4.2 Genotypisierung der ES-Zell-Klone	43
4.2.1 Screening nach einer genomischen Deletionen im <i>Epha4</i> -Lokus.....	43
4.2.2 Screening nach einer genomischen Inversion im <i>Epha4</i> -Lokus	46
4.3 Bruchpunkte der CRISPR/Cas9-Konstrukte	48
4.4 Analyse der <i>Pax3</i> -Expression in transgenen Mausembryos	49
4.5 Untersuchung der Extremitätenentwicklung der transgenen Mäuse	51

4.5.1	Analyse des Fingerphänotyps transgener Mäuse im Stadium 3,5 dpp.....	51
4.5.2	Skelettale Extremitäten-Entwicklung der transgenen Mäuse 3,5 dpp.....	53
4.5.3	Skelettale Extremitäten-Entwicklung der transgenen Mäuse (6 Wochen alt).....	54
5.	Diskussion.....	55
5.1	Effizienz des CRISPR/Cas9-Experiments	55
5.2	Schnittverhalten des CRISPR/Cas9-Systems.....	56
5.3	Erzeugung eines Mausmodells mit einer 1,6 Mb Deletion im <i>Epha4</i> -Lokus	58
5.4	Genomische 1,6 Mb Inversion als Nebenprodukt.....	58
5.5	Die Hochregulierung der <i>Pax3</i> -Expression ist mit einem Fingerphänotyp assoziiert	59
5.6	<i>Pax3</i> -Überexpression als Folge von Enhancer-Interaktionen.....	61
6.	Zusammenfassung	63
7.	Literaturverzeichnis.....	64
	Verzeichnisse	i
A	Abkürzungsverzeichnis.....	i
B	Abbildungsverzeichnis.....	iv
C	Tabellenverzeichnis.....	v
	Danksagung	vi
	Selbständigkeitserklärung.....	vii

1. Einleitung

1.1 Das CRISPR/Cas9-System

1.1.1 Das mikrobielle Immunsystem CRISPR/Cas

Das CRISPR/Cas-System ist ein Bestandteil des erworbenen Immunsystems vieler Archeen und Bakterien, das breite Anwendung im Bereich Genome Engineering findet. Mithilfe von CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) ist es möglich, gezielte genomische Modifikationen in lebenden Zellen vorzunehmen, um damit die Funktion und Organisation von Genen in ihrem physiologischen Kontext zu erforschen.

Erste Erwähnung fand CRISPR 1987, als entdeckt wurde, dass sich im Genom von *E. coli*-Bakterien ungewöhnliche repetitive Sequenzen (Repeats) mit einer Länge von 29 nt befinden, die sich mit nichtrepetitiven Sequenzen (Spacer) abwechseln (Ishino, Shinagawa et al. 1987). Im Laufe der Zeit konnte gezeigt werden, dass mindestens 40 % aller Bakterien und 90 % der Archeen CRISPR beinhalten (Mojica, Diez-Villasenor et al. 2000). Neben den Wiederholungssequenzen weisen die CRISPR-Loki eine Reihe proteinkodierender Cas-Gene (CRISPR-assoziierte Gene) auf, nach denen CRISPR in die Typen I - III eingeteilt werden kann (Jansen, Embden et al. 2002, Haft, Selengut et al. 2005, Makarova, Haft et al. 2011).

Die Spacer-Sequenzen sind ein wichtiger Bestandteil des mikrobiellen adaptierten Immunsystems, da sie homolog zu genomischen DNA-Sequenzen von Viren und Phagen sind (Bolotin, Quinquis et al. 2005, Mojica, Diez-Villasenor et al. 2005). Nach einem Virusbefall wird ein Teil der viralen DNA (Protospacer) in das mikrobielle Genom integriert und verbleibt dort als Spacer (Abbildung 1). Der experimentelle Nachweis für CRISPR als adaptierter Abwehrmechanismus wurde 2007 erbracht. Es konnte gezeigt werden, dass nach einem Phagenbefall neue Spacer-Sequenzen in das Bakteriengenom eingefügt werden und die Bakterien danach immun gegenüber Phagen mit den entsprechenden Protospacern sind (Barrangou, Fremaux et al. 2007). Neben den Spacern sind die Cas-Gene entscheidend, da nach ihrer Inaktivierung die Immunität nicht mehr vorhanden ist (Barrangou, Fremaux et al. 2007).

Einleitung

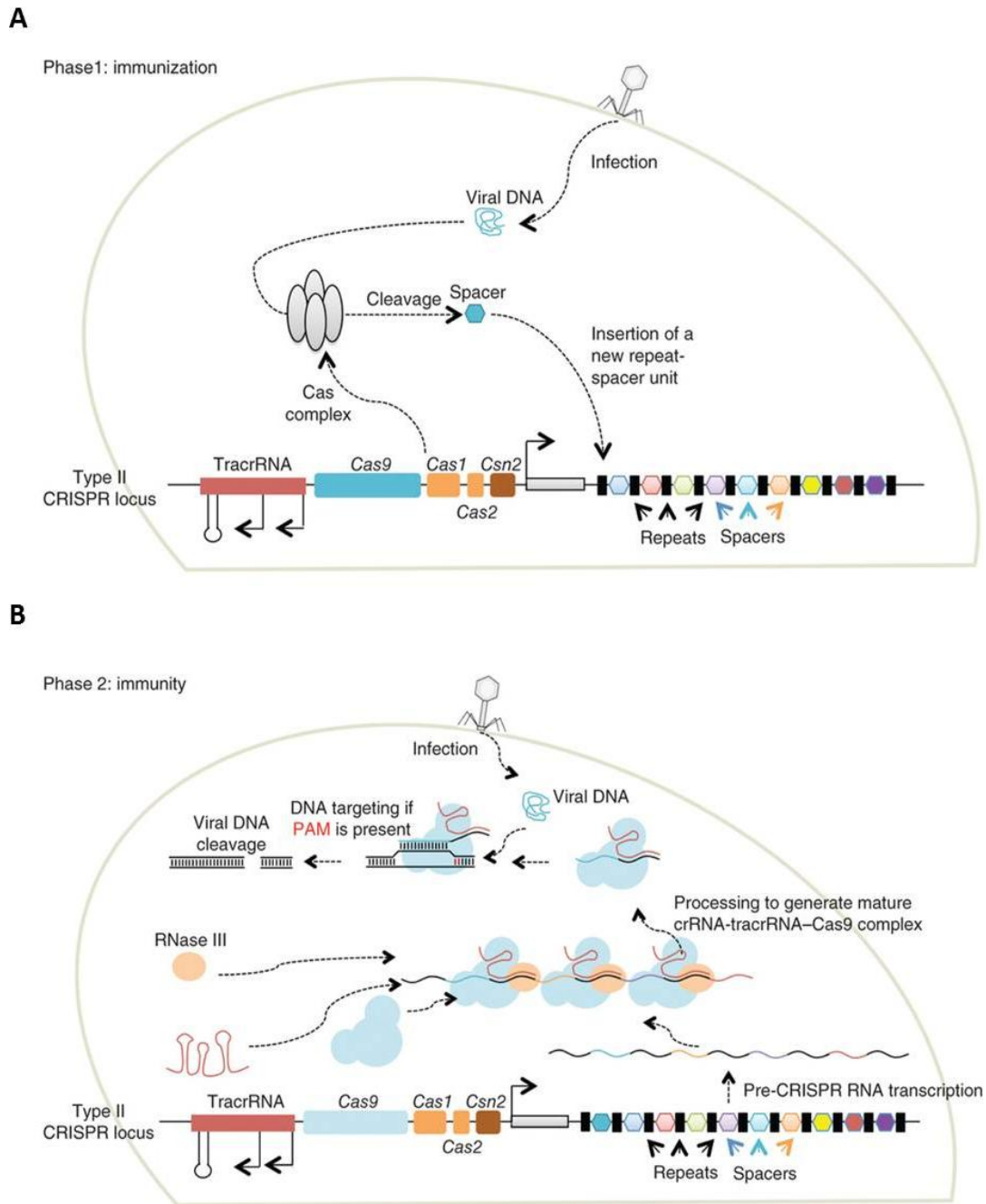


Abbildung 1 Funktionsweise des mikrobiellen Abwehrsystems CRISPR/Cas9

(A) Immunisierung: Virulente DNA wird vom endogenen Cas-Komplex gespalten. Es kommt zum Einbau des Spacers im mikrobiellen Genom innerhalb der CRISPR-Sequenz bestehend aus Spacern und repetitiven Sequenzen (Repeats). (B) Immunabwehr: Die Vorläufer-crRNA wird transkribiert und bildet einen Komplex mit der tracrRNA und dem Cas9-Protein. Nach einer Prozessierung durch die RNase III entsteht der reife crRNA/tracrRNA-Cas9-Komplex. Dieser bindet spezifisch Virus-DNA mit der Erkennungssequenz PAM, indem die crRNA (Spacer) Basenpaarungen mit der Ziel-DNA (Protospacer) eingeht. Daraufhin wird ein Doppelstrangbruch in der Ziel-DNA erzeugt (Abbildung nach Mali et al, Nature Methods 2013).

Die Spacer werden als CRISPR-RNA (crRNA) exprimiert und leiten das Cas-Protein zu seiner Zielregion in der Fremd-DNA (Brouns, Jore et al. 2008). Zunächst wird die Vorstufe der crRNA transkribiert. Diese Vorläufer-crRNA (precursor-crRNA, pre-crRNA) hybridisiert mit der trans-aktivierenden crRNA (tracrRNA) und bildet eine Haarnadelstruktur. Diese setzt sich anschließend mit dem Cas-Protein zu einem Ribonukleoproteinkomplex zusammen. Daraufhin wird die pre-crRNA von der endogenen RNase III prozessiert und es entsteht die reife crRNA (Deltcheva, Chylinski et al. 2011). Die crRNA leitet anschließend den gesamten Komplex zur Ziel-DNA und geht mit dieser spezifisch Watson-Crick-Basenpaarungen ein, worauf ein Doppelstrangbruch (DSB) in dieser Sequenz erzeugt wird (Garneau, Dupuis et al. 2010). Für die Erkennung der Ziel-DNA ist eine kurze Sequenz hinter dem Protospacer, der Protospacer-adjacent Motif (PAM) von besonderer Bedeutung. PAM ist neben der Erkennung der Fremd-DNA essentiell für die Unterscheidung der viralen Protospacer von den eigenen Spacer-Sequenzen und bietet somit Schutz vor einer Autoimmunität (Deveau, Barrangou et al. 2008, Horvath and Barrangou 2010).

Alle natürlich vorkommenden CRISPR-Systeme verwenden Cas-Nukleasen, um DSB in Fremd-DNA zu erzeugen. Die verschiedenen CRISPR-Systeme unterscheiden sich in ihrer Nukleasezusammensetzung sowie in ihrem Mechanismus. Bei CRISPR Typ I wird die neusynthetisierte crRNA an den Cascade-Proteinkomplex (CRISPR-associated complex for antiviral defence) gebunden. In dem Komplex wird die Prozessierung der crRNA sowie der Ziel-DNA von unterschiedlichen Caspasen durchgeführt (Brouns, Jore et al. 2008, Haurwitz, Jinek et al. 2010). CRISPR Typ III hingegen benötigt keine PAM-Sequenz und ist in der Lage, sowohl Fremd-DNA als auch -RNA zu schneiden (Marraffini and Sontheimer 2008). Das am intensivsten erforschte CRISPR/Cas-System ist TYP II, dessen Prinzip im Labor für Genome Engineering genutzt wird. Das CRISPR/Cas-System TYP II ist abhängig von der PAM-Sequenz NGG und besitzt nur eine katalytisch aktive Cas-Nuklease. Cas9 ist ein Multidomänen-Enzymkomplex mit zwei katalytischen Einheiten RuvC und HNH, die jeweils einen der gegenüberliegenden Stränge einer DNA-Helix schneiden (Abbildung 2) (Sapranauskas, Gasiunas et al. 2011).

sgRNA) exprimiert werden, der eine Haarnadelstruktur bildet, oder als separate RNA-Stränge, die miteinander hybridisieren (Cong, Ran et al. 2013). Mit dem Einsatz einer chimären RNA kann jedoch eine 5fach höhere Effizienz erreicht werden (Hsu, Scott et al. 2013). Eine Selektion transfizierter Zellen kann mithilfe einer Koexpression vom GFP oder einem Antibiotikaresistenzgen erfolgen. Das Screening nach positiven Klonen wird anschließend mit einer Durchflusszytometrie oder Antibiotikaselektion durchgeführt.

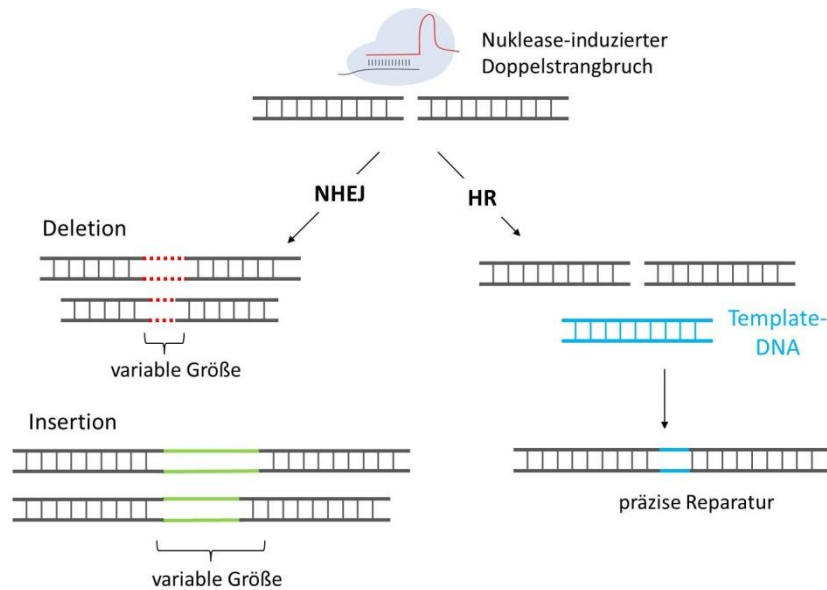


Abbildung 3 Reparaturmechanismen von DNA-Doppelstrangbrüchen

Non-homologous end joining (NHEJ) ist ein fehleranfälliger endogener Reparaturmechanismus, der zu Insertionen oder Deletionen führen kann. Die Homologe Rekombination (HR) ist ein präziser DNA-Reparaturmechanismus, der ein Template benötigt (Abbildung modifiziert nach Sander & Joung, Nature Biotechnology 2014).

Es kann eine Vielzahl chromosomaler Modifikationen mit dem CRISPR/Cas9-System erzeugt werden. Indels als Folge der NHEJ-Reparatur können zu Punktmutationen oder Leserasterverschiebungen führen. Indels und Leserasterverschiebungen führen aber nicht zwingend zu einem Gen-Knockout, da es sich um stille Mutationen handeln kann oder die Mutation durch alternatives Splicing kompensiert wird. Werden jedoch mehrere CRISPR-Konstrukte gleichzeitig verwendet, so kann es zu intra- sowie interchromosomalen Translokationen kommen. Bei der Generierung zweier DSB in einem Chromosom kann es neben Indel-Formationen zu genomischen Deletionen oder Inversionen kommen. Diese Mutationen können heterozygot oder homozygot sein,

homozygote Modifikationen haben jedoch eine geringere Effizienz. Die Effizienz der Erzeugung chromosomaler Deletionen ist umgekehrt proportional zu ihrer Größe (Xiao, Wang et al. 2013). Des Weiteren ist es möglich, genomische Insertionen mit CRISPR zu generieren. Dabei wird neben den CRISPR-Konstrukten ein DNA-Template kotransfiziert, das bei der HR als Vorlage genutzt werden kann. Vergleichbare konventionelle Methoden, mit denen analoge Modifikationen erreicht werden können, sind Transfektionen von Meganukleasen, Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) oder Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALEN). Meganukleasen sind Restriktionsenzyme, die DNA binden und diese schneiden können. Da die Bindung und Katalyse in der gleichen aktiven Domäne stattfinden, ist das Design spezifischer Meganukleasen komplex (Silva, Poirot et al. 2011). ZFN und TALEN sind hingegen Fusionsproteine aus einer DNA-bindenden Domäne sowie der unspezifischen Nuklease Fok I (Urnov, Rebar et al. 2010, Joung and Sander 2013, Reyon, Maeder et al. 2013). Der Vorteil vom CRISPR/Cas9-System ist, dass die DNA-Erkennung durch eine kurze Nukleinsäure stattfindet, die komplementär zur Zielregion ist und somit leichter zu konzipieren ist als die DNA-Bindedomäne eines Proteins. Das Expressions-Plasmid ist außerdem universell, sodass für jedes neue Konstrukt lediglich ein neues Oligonukleotid (Guide-RNA) in den Vektor kloniert werden muss.

1.1.3 Spezifität des CRISPR/Cas9-Systems

Bei der Auswahl der genomischen Zielsequenz ist es wichtig sicherzustellen, dass diese einzigartig ist, sodass nicht andere Bereiche ungewollt prozessiert werden und es zu sogenannten Off-Target-Effekten kommt. Basen-Fehlpaarungen sind im CRISPR/Cas9-System abhängig von ihrer Anzahl sowie Lokalisation tolerierbar (Jinek, Chylinski et al. 2012, Cong, Ran et al. 2013, Jiang, Bikard et al. 2013). Für die Spezifität sind die ersten 8-14 nt unmittelbar vor der PAM-Sequenz von besonderer Bedeutung, es sollte daher beachtet werden, dass potentielle Off-Target-Regionen dort möglichst viele Fehlpaarungen aufweisen. Neben NGG ist auch die Sequenz NAG als PAM wirksam, diese weist jedoch eine deutlich geringere Effizienz auf (Hsu, Scott et al. 2013). Eine Strategie zur Vermeidung von Off-Target-Effekten ist der Einsatz von Cas9-Nickasen. Durch die Mutation D10A in der katalytischen Domänen RuvC oder H840A in HNH, kann diese inaktiviert werden, sodass das Cas9-Enzym nur noch einen Strang der DNA-Doppelhelix schneidet. Werden zwei CRISPR-Konstrukte mit Cas9-Nickasen designt,

die gegenüberliegende DNA-Stränge versetzt schneiden, so entstehen DSB mit überhängenden Enden, deren Reparatur mit erhöhter Präzision erfolgt (Mali, Aach et al. 2013, Ran, Hsu et al. 2013). Bei einem Off-Target-Effekt der Nickase entsteht hingegen nur ein Einzelstrangbruch, der durch die genaue Basen-Exzisions-Reparatur wieder behoben wird (Dianov and Hubscher 2013). Eine Limitierung dieser Methode ist, dass das CRISPR-Design erschwert wird, da mehrere einzigartige Sequenzen gefolgt von PAM in der gewünschten DNA-Region vorhanden sein müssen. Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Spezifität von CRISPR ist eine Verkürzung der Guide-RNA auf 17 nt, was die Variabilität der Off-Target-Regionen verringert ohne die Spezifität zur Zielregion zu beeinträchtigen (Fu, Sander et al. 2014).

1.1.4 Mausmodell

Zur Untersuchung von Krankheiten sind Modellorganismen von großer Bedeutung, da mit ihnen die Funktion und Regulation von Genen in der physiologischen Umgebung untersucht werden können. Somit können neue Erkenntnisse für die Grundlagenforschung gewonnen und neue Therapieformen entwickelt werden. Das CRISPR/Cas9-System konnte neben Bakterien (Jiang, Bikard et al. 2013) bereits bei Hefe (DiCarlo, Norville et al. 2013), Taufliegen (Gratz, Cummings et al. 2013), Zebrafischen (Hwang, Fu et al. 2013), Säugetieren sowie humanen Zellen (Cong, Ran et al. 2013) erfolgreich angewendet werden. Aufgrund der genetischen Ähnlichkeit ist die Maus der bevorzugte Modellorganismus der Humanmedizin. So können Krankheitsbilder sowie ihre Ursachen in einem lebenden Organismus untersucht werden. Die zwei klassischen Methoden transgene Mäuse zu generieren sind die Transfektion embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) (Capecchi 2005) oder die Transfektion durch direkte Mikroinjektion von Zygoten im Ein-Zell-Stadium. Bei der Transfektion von ES-Zellen werden diese mit einem Vektor transfiziert, der für crRNA, tracrRNA und Cas9 codiert. Positive Klone werden nach einer Antibiotikaselektion mit einer Zygote im Morulastadium „aggregiert“. Die Zygote reift zu einer Blastozyste heran und wird schließlich einer pseudoschwangeren Maus implantiert. Die geborenen Mäuse sind chimär und müssen mit einer Wildtyp-Maus gekreuzt werden, um heterozygote transgene Tiere zu erhalten. Bei der direkten Injektion wird eine sgRNA mit der Cas9-mRNA in die Zygote injiziert (Wang, Yang et al. 2013), die wiederum der pseudoschwangeren Maus im Blastozysten-Stadium implantiert wird.

Einleitung

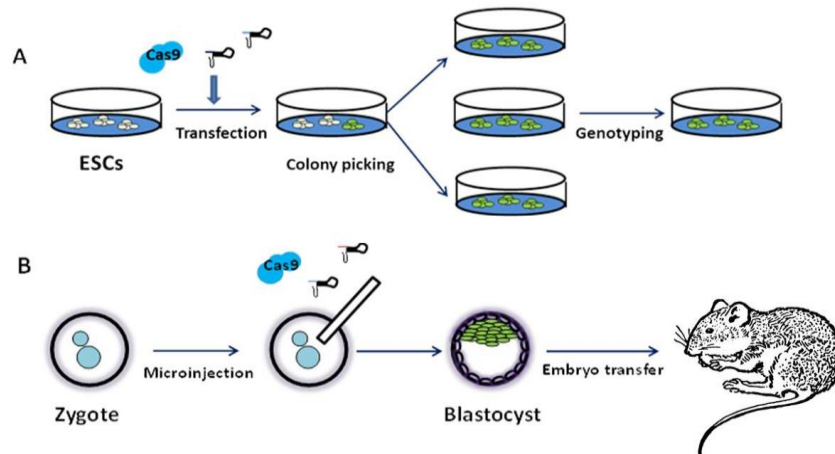


Abbildung 4 ES-Zelltransfektion und direkte Zygoteninjektion

(A) ES-Zellen werden mit einem Vektor transfiziert, der für die Bestandteile des CRISPR/Cas-Systems codiert. Es werden einzelne Zellkolonien gepickt, expandiert und genotypisiert. Anschließend kann eine Aggregation der Zellen für die Generierung einer Mauslinie erfolgen. (B) Cas9 und die chimäre Guide-RNA werden direkt in Zygote injiziert. Nach dem Heranwachsen zu einer Blastocyste wird diese in eine pseudoschwangere Maus implantiert (Abb. modifiziert nach Wang et al, Cell 2013)

1.2 Genregulation

1.2.1 Regulatorische nichtcodierende Elemente

Jede Zelle eines Organismus besitzt die gleiche genetische Information. Durch komplexe Differenzierungsprozesse entstehen im Laufe der Entwicklung unterschiedliche Gewebe und Zelltypen, die sich morphologisch und mechanistisch stark unterscheiden. Die räumliche, zeitliche und gewebespezifische Regulation der Genexpression ist ein komplexer Prozess, der durch ein Zusammenspiel nichtcodierender Elemente des Genoms erfolgt. Bei den nichtcodierenden Bereichen handelt es sich um Promotoren, Enhancer, Silencer sowie Isolatoren. Promotoren stellen die Startpunkte genetischer Expression dar, denn sie rekrutieren die Transkriptionsmaschinerie, zu der die DNA-anhängige RNA-Polymerase III sowie Transkriptionsfaktoren zählen (Lee and Young 2000, Butler and Kadonaga 2002). Um Gene zu transkribieren, müssen diese für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich gemacht werden, denn die Chromatinstruktur ist sehr kompakt. Sie besteht aus Nukleosomen, in denen jeweils 146 DNA-Basenpaare um ein Histonoktamer gewunden sind (Luger, Mader et al. 1997).

Einleitung

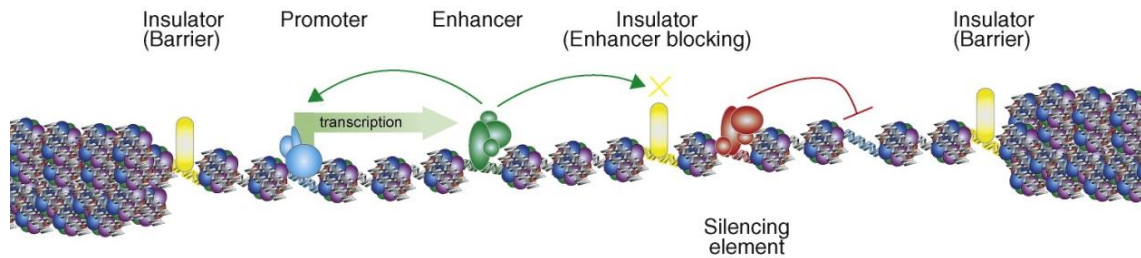


Abbildung 5 Cis-regulatorische Elemente der Genexpression

Enhancer sind regulatorische Elemente, die eine Genexpression aktivieren können, indem sie mit dem entsprechenden Promotor interagieren. Isolator-Elemente stellen Barrieren zwischen aktiven und inaktiven Chromatin dar. Sie haben außerdem eine Enhancerblockierungs-Funktion (Abbildung nach Heintzman und Bing Ren 2009).

Durch die Interaktion von nichtcodierenden Enhancer-Elementen mit Promotorregionen kommt es zur Bindung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren, die eine Dekondensation der dichten Chromatinstruktur und folglich den Beginn der Transkription bewirken (Maston, Evans et al. 2006). Enhancer sind gewebespezifisch aktiv (Heintzman, Hon et al. 2009) und in der Lage, weit entfernte Promotoren zu aktivieren (cis-Regulation), indem es zur Ausbildung von DNA-Schleifen und physischem Kontakt kommt (Dekker 2003). Silencer sind regulatorische Bereiche, die eine Transkription verhindern, indem sie mit dem Promoter direkt oder über Repressorproteine interagieren (Ogbourne and Antalis 1998). Isolatoren sind regulatorische DNA-Bereiche, die eine Barriere- sowie Enhancer-Blockierungsfunktion besitzen. Bei der Barrierefunktion wird die Ausbreitung aktiver Chromatinbereiche und damit die Aktivierung der Genexpression verhindert (Gaszner and Felsenfeld 2006). Die Enhancer-Blockierung besteht darin, die Aktivierung von Promotoren durch bestimmte Enhancer zu verhindern und diese voneinander abzugrenzen (Gaszner M, Felsenfeld G. 2006). Viele Isolator-Elemente werden vom CCCT-Bindungs-Faktor (CTCF) gebunden, einem Protein, das ubiquitär exprimiert wird und Zinkfinger-Motive für eine spezifische DNA-Bindung aufweist (Klenova, Nicolas et al. 1993). Der Großteil von CTCF-Bindestellen ist hochkonserviert und unterscheidet sich nicht innerhalb verschiedener Zelltypen (Chen, Tian et al. 2012). CTCF kann mithilfe von Schleifenbildungen über weite Distanzen inter- und intrachromosomal mit regulatorischen DNA-Bereichen interagieren (Ling, Li et al. 2006, Hou, Zhao et al. 2008).

1.2.2 Chromosomale 3D-Struktur

Chromosomen liegen in einer komplexen dreidimensionalen Struktur vor, deren räumliche Organisation großen Einfluss auf die Expression von Genen hat. Mit neuen 3C (Chromosome Conformation Capture) - basierten Technologien ist es möglich, Einblicke in die chromosomale Architektur und neue Erkenntnisse für die Genregulation zu erhalten.

Die klassische 3C-Methode erlaubt es, Bindestellen zweier Genloki, die im Genom über weite Distanzen miteinander interagieren, auffindig zu machen (Dekker, Rippe et al. 2002). Dabei werden Zellen mit Formaldehyd fixiert, das quervernetzte Chromatin wird isoliert und einem Restriktionsverdau unterzogen. Anschließend werden die Enden der DNA-Fragmente ligiert und es entsteht zirkuläre DNA, die die Sequenzen zweier interagierender DNA-Abschnitte enthält. Nach weiterer Aufreinigung und Amplifizierung kann ermittelt werden, welche DNA-Bereiche mit hoher Frequenz miteinander interagieren (Dekker, Rippe et al. 2002). Die Weiterentwicklungen dieser Technologie, 4C (Circularized Chromosome Conformation Capture) (Zhao, Tavoosidana et al. 2006) und Hi-C (Lieberman-Aiden, van Berkum et al. 2009), ermöglichen die genomweite Ermittlung aller interagierenden Genloki miteinander. Mithilfe dieser Methoden konnte gezeigt werden, dass Chromosomen in regulatorische Einheiten, die topologischen Domänen (TAD), unterteilt werden können (Dixon, Selvaraj et al. 2012).

Einleitung

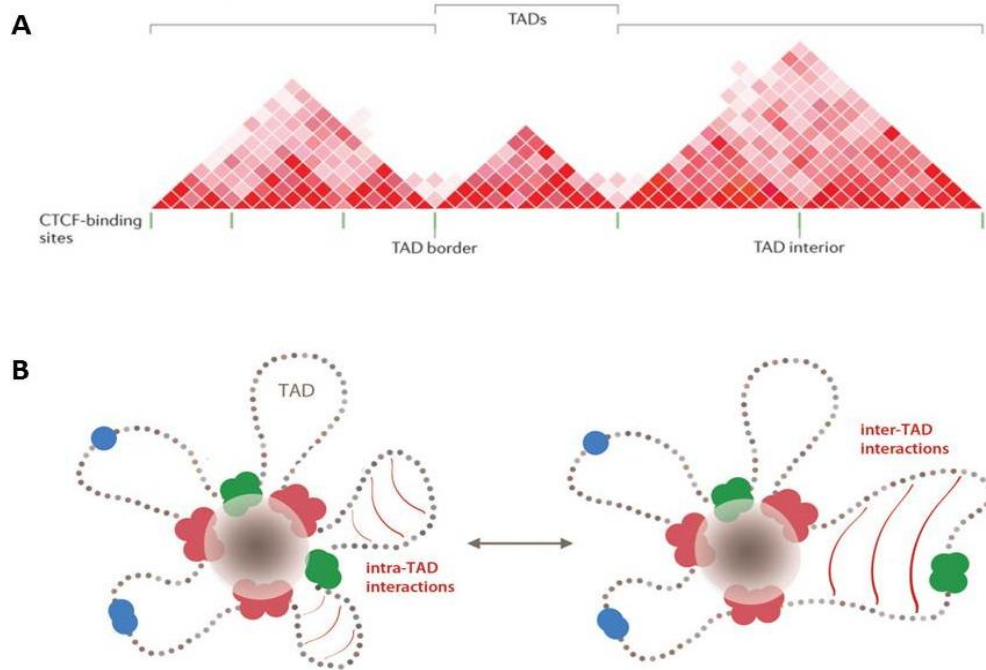


Abbildung 6 Chromosomale Organisation von topologischen Domänen

(A) Schematische Darstellung von TADs in einer Heatmap aus Hi-C Daten. Gezeigt sind intrachromosomale Interaktionen (rot) sowie CTCF-Bindungsstellen (grüne Balken). (B) DNA liegt in einer Schleifenstruktur vor. Innerhalb der regulatorischen Einheiten finden vermehrt Interaktionen statt. Die chromosomale Struktur wird durch Bindeproteine wie CTCF stabilisiert, die Einfluss auf die Expression von Genen üben (modifiziert nach Ong & Corces et al, Nature Reviews 2014; Van Bortle et al, Genome Biology 2014).

TADs zeichnen sich dadurch aus, dass innerhalb der Domänen chromosomale Interaktionen mit hoher Frequenz stattfinden. Zwischen den TADs sind die Interaktionen nur noch schwach vorhanden (Abbildung 4). Die Grenzen der TADs (Isolatoren) zeigen eine erhöhte Anzahl von gebundenen CTCFs. Es konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die Deletion einer TAD-Grenze mit CTCF-Bindungsstellen, zur teilweisen Verschmelzung zweier flankierender TADs führt (Nora, Lajoie et al. 2012). Die genaue Funktion von CTCF sowie weiterer Proteine und Gene im Grenzbereich der TADs konnte noch nicht genau geklärt werden.

1.3 Strukturelle genomische Variationen

Es wurde eine Vielzahl diverser struktureller Variationen im menschlichen Genom identifiziert, die die Ursache vieler genetisch bedingter Erkrankungen darstellt. Die bekanntesten strukturellen Variationen sind chromosomale Aneuploidien, da sie zum

Down- oder Turner-Syndrom führen. Aneuploidien sind Chromosomen-Translokationen, bei denen eine veränderte Anzahl von Chromosomen vorliegt, die mit dem Mikroskop detektiert werden kann. Bleibt die Gesamtmenge der genetischen Information konstant, so handelt es sich um eine balancierte strukturelle Variation, zu der genomische Inversionen zählen. Deletionen oder Insertionen sind hingegen unbalancierte strukturelle Variationen, da sie eine Kopienanzahlvariation (CNV, engl. copy number variation) von Genen aufweisen (Feuk, Carson et al. 2006). Mit der Entwicklung neuer Technologien wie dem Array-CGH (Microarray-basierten komparativen genomische Hybridisierung) oder der Hochdurchsatz-Sequenzierung ist es möglich, mikroskopisch nicht detektierbare strukturelle Variationen von weniger als 3 MB DNA-Länge zu identifizieren und die Ursache vieler Erkrankungen zu beleuchten (Lee and Scherer 2010). Diese submikroskopischen strukturellen Variationen haben eine Mindestgröße von ca. 50 bp und werden so von kleinen Mutationen wie Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, engl. single-nucleotide polymorphism) oder Indels unterschieden (Weischenfeldt, Symmons et al. 2013).

Strukturelle Variationen können unterschiedliche Auswirkungen auf die Genexpression haben, diese kann inhibiert, abgeschwächt oder verstärkt werden. Außerdem kann ein Gen durch eine Deletion oder Duplikation direkt betroffen sein oder indirekt, indem eine Modifikation im Bereich der nichtcodierenden regulatorischen Elemente stattfindet (Cahan, Li et al. 2009). Eine weitere mögliche Folge struktureller Variation ist eine neue räumliche Verknüpfung von Genen, die zu einer ektopischen Genexpression führt (Lettice, Daniels et al. 2011). Um den genetischen Hintergrund von Erbkrankheiten herauszufinden, werden bekannte strukturelle Variationen des Menschen im Zusammenhang mit Symptomen kartiert (Firth, Richards et al. 2009), sodass die Genloki für bestimmte Erkrankungen eingegrenzt werden können. Die Analyse der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen von Symptomen und Phänotypen kann mithilfe von Tiermodellen durchgeführt werden. Die Erforschung humaner Erbkrankheiten erfolgt aufgrund der Ähnlichkeit in der Physiologie und der genomischen Organisation oftmals mit dem Mausmodell. Viele Erkenntnisse sind auf den Menschen übertragbar, sodass gewebe- oder entwicklungspezifische Prozesse aufgedeckt werden können.

1.4 Extremitätenfehlbildungen

Gegenstand dieser Arbeit ist eine genetisch bedingte Fehlbildung der Gliedmaßen von Patienten. Extremitätenfehlbildungen oder Dymelien sind häufig angeborene Fehlbildungen des Menschen. Sie entstehen während der Embryonalentwicklung der Extremitäten und können eine Folge von Genmutationen oder exogenen Faktoren wie Infektionen oder Mangelernährung während der Entwicklung sein. Durch die Vielzahl unterschiedlicher phänotypischer Ausprägungen werden Dymelien in die Formen Brachydaktylie (Kurzfingerigkeit), Oligodaktylie (Fehlen einzelner Finger oder Zehen), Polydaktylie (Überzahl an Fingern oder Zehen), Syndaktylie (Verwachsungen von Fingern oder Zehen) sowie Polysyndaktylie (gleichzeitiges Auftreten von Polydaktylie und Syndaktylie) eingeteilt.

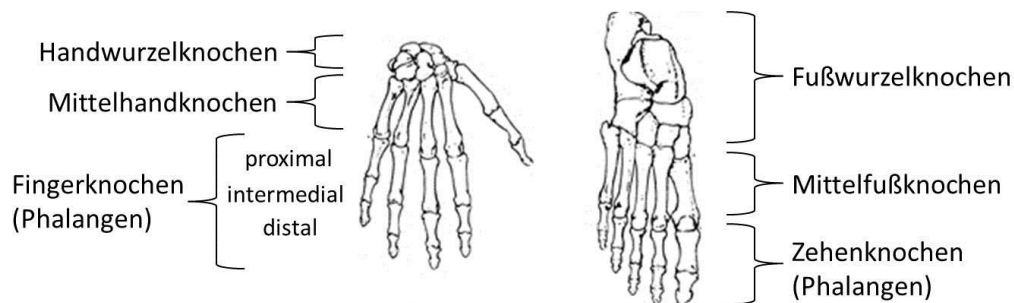


Abbildung 7 Skelettaler Aufbau der Hand und des Fußes eines Menschen

Die menschliche Hand lässt sich in Handwurzelknochen, Mittelhandknochen sowie Fingerknochen unterteilen. Es gibt proximale (zur Körpermitte hin), intermediale und distale (von der Körpermitte entfernt) Fingerknochen. Der Daumen besitzt keinen intermedialen Fingerknochen. Der Fuß besteht aus den Fußwurzelknochen, Mittelfußknochen und den proximalen, intermedialen sowie distalen Zehenknochen. Der große Zeh hat keinen intermedialen Zehenknochen.

1.4.1 Brachydaktylie

Brachydaktylie ist eine Fehlbildung der Extremitäten, die mit einer Verkürzung oder dem Fehlen von Fingergliedknochen (Phalangen) oder Mittelhandknochen (Metacarpalia) einhergeht. Die untersuchten Patienten zeigen eine starke Verkürzung des Daumens sowie der distalen Phalangen von Zeigefinger und Mittelfinger. Der große Zeh ist ebenfalls stark verkürzt. Die Fehlbildung ist genetisch bedingt und konnte zu dem chromosomalen Genlokus 2q35-2q36.1 kartiert werden (Firth, Richards et al. 2009).

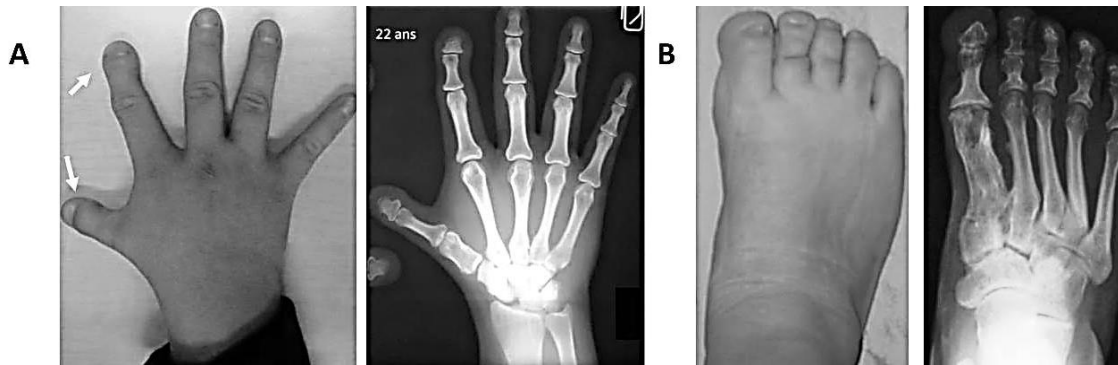


Abbildung 8 Der Extremitäten-Phänotyp der Patienten

Dargestellt sind eine photographische Aufnahme und eine Röntgenaufnahme der rechten Hand sowie des rechten Fußes eines Brachydaktylie-Patienten. (A) Die distalen Fingergliedknochen von Daumen und Zeigefinger sind deutlich verkürzt. (B) Die distalen Fußknochen des großen Zehs zeigen ebenfalls eine signifikante Verkürzung.

1.4.2 EPH Rezeptor A4 (*EPHA4*) Genlokus

Die Brachydaktylie-Patienten weisen eine genomische Deletion von ca. 1,85 Mb im *EPHA4*-Genlokus auf. Der *EPHA4*-Lokus befindet sich auf dem langen Arm (q-Arm) des humanen Chromosoms 2. Das entsprechende Protein EphA4 gehört zur Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und ist an der Entwicklung des Nervensystems sowie der Synapsen-Formierung beteiligt (Klas Kullander, 2002).

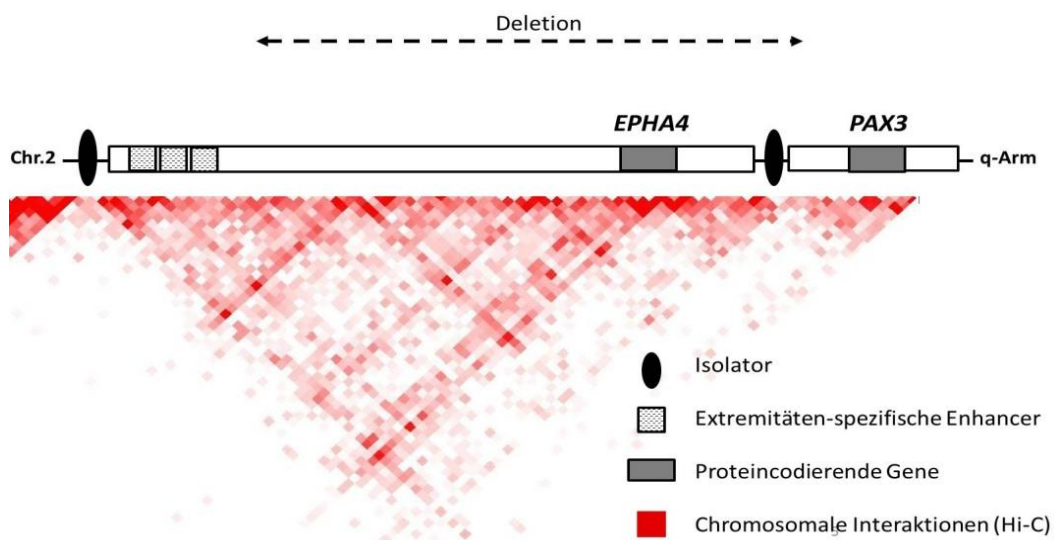


Abbildung 9 Schematische Darstellung des *EPHA4*-Lokus (2q35 - 2q36.1)

Der *EPHA4*-Genlokus ist durch zwei Isolator-Elemente begrenzt und bildet eine topologische Domäne (rot) mit einem Enhancer-Cluster sowie dem *EPHA4*-Gen. In der nächsten topologischen Domäne stromaufwärts und regulatorisch abgegrenzt befindet sich *PAX3*.

Das *EPHA4*-Gen liegt innerhalb einer Genwüste von mehr als 1 Mb. Die Region beginnt mit einem Isolator, der stromaufwärts von einem Verbund von Enhancern (Enhancer-Cluster) gefolgt wird, die spezifisch in den Extremitäten aktiv sind. *EPHA4* befindet sich am Ende der Region, die von einem weiteren Isolator-Element abgeschlossen wird. Der gesamte Bereich zwischen den Isolatoren bildet eine topologische Domäne. Weiter stromaufwärts befindet sich in der benachbarten topologischen Domäne das Gen *PAX3*.

1.4.3 Paired Box 3 (*PAX3*)

Pax3 ist ein Transkriptionsfaktor, der während der Embryonalentwicklung exprimiert wird und an der Entwicklung von Muskeln, dem Herzkreislauf- sowie dem Nervensystem beteiligt ist (Epstein 2000). Pax-Proteine zeichnen sich durch eine charakteristische Proteinstruktur aus. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten (paired domain), die jeweils eine Homöodomäne, ein konserviertes DNA-Bindungsmotiv, beinhalten (Czerny, Schaffner et al. 1993, Dahl, Koseki et al. 1997). Mutationen im *PAX3* Gen führen beim Menschen zu der angeborenen Erbkrankheit Waardenburg-Syndrom Typ I und III (Tassabehji, Read et al. 1992, Hoth, Milunsky et al. 1993). Die Patienten leiden an Gesichtsfehlbildungen, Innenohrschwerhörigkeit sowie Pigmentstörungen von Haut und Augen. Das Waardenburg-Syndrom Typ III geht außerdem mit Anomalien des Muskel- und Skelettsystems der Gliedmaßen einher (Goodman, Lewithal et al. 1982).

Durch den Isolator ist das *PAX3*-Gen regulatorisch vom *EPHA4*-Lokus abgegrenzt und es finden keine oder nur schwache chromosomale Interaktionen mit dem *EPHA4*-Lokus statt. Durch die Deletion, die die Patienten aufweisen, wurden das Isolator-Element sowie ein großer Bereich des *EPHA4*-Lokus entfernt. Eine Verschmelzung der benachbarten topologischen Domänen sowie eine Interaktion des Enhancer-Clusters mit *PAX3* stellen eine mögliche Folge der genomischen Deletion dar.

1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch den Einsatz des CRISPR/Cas9-Systems eine genomische Deletion von 1,6 Mb im *Epha4*-Lokus von embryonalen Stammzellen zu erzeugen. Die genmodifizierten ES-Zellen sollen mittels molekularbiologischer Methoden eingehend charakterisiert und anschließend zur Generierung eines Mausmodells verwendet werden. So können die Folgen der genomischen Deletion auf die Expression des Gens *Pax3* sowie die skelettale Extremitätenentwicklung am lebenden Organismus untersucht werden. *Pax3* ist mit einem Fingerphänotyp beim Waardenburg-Syndrom assoziiert und wird daher als Kandidatengen für die Brachydaktylie betrachtet.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen zur Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems als wirksames Instrument zur Modifikation von DNA im Laboralltag verhelfen. Außerdem soll ein Beitrag zu einem besseren Verständnis der skelettalen Extremitätenentwicklung und chromosomalen Organisation geleistet werden, um die Aufklärung und Therapie von genetisch bedingten Fehlbildungen zu fördern.

2. Material

2.1 Geräte

Tabelle 1 Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Zusatzbezeichnung	Hersteller
Axio Cam	HRC oder MRC5	Zeiss
Pipettierroboter	Biomek NX ^P	BeckmanCoulter
Binokular	MZ 12	Leica
CO ₂ -Inkubator	HEPA Class 100	Thermo
Eismaschine	AF30	Scotsman
Gefrierschrank	-80 °C Forma 906	Thermo
Geldokumentationssystem	Easy Win. 32	Herolab
Gelelektrophoresezubehör	Kämme, Kammer, Schlitten	PeqLab
Heizblock	Ori-Block OV3	Techne
Laborwaage	PB303-S/PH	Mettler Toledo
Neubauer Zellkammer	0,0025 mm	Marienfeld
Pipetten	10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1ml	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipettboy acu	ISS Integra Bioscience
Rollator	Roller mixer SRT9	Suart
Schüttler	G10 Gyrotory	New Brunswick Scientific
Spektrometer	ND-100	NanoDrop
Sterilbank	HERA Safe K109	Thermo
Stoppuhr		Roth
Thermal Cycler	2720	AB Applied Biosystems
Transilluminator		Hartenstein
UV-Dunkelkammer		HEROLAB
Vakuumpumpe		ABM Greiffenberger
Vortex	Microspin FV-2400	Lab4you
Wärmeschrank	Modell 100-800	Memmert
Wasserbad	1008 series	GFL
Zentrifugen	Biofugepico	Thermo
	3417R	Eppendorf
	RC-Superspeed	DuPont Instruments Sorvall
	Megafuge 1,0 Heraeus	Thermo

2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern kein gesonderter Vermerk im Text vorliegt, über die Firmen Sigma, Roth und Merck bezogen.

2.2.1 Puffer/ Lösungen

Tabelle 2 Zusammensetzung der allgemeinen Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
TAE-Puffer	0,04 M Tris, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8
6x Agarosegel-Ladepuffer	15 g Sucrose, 0,175 g Orange G, 50 ml H ₂ O
10x PCR-Reaktionspuffer	750 mM Tris, HCl pH 8,8, 200 mM (NH ₄)SO ₄ , 15 mM MgCl ₂ ; steril filtrieren
PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na ₂ PO ₄ , ad 1 l H ₂ O DEPC
PBST	PBS. 01 % Tween20
SDS-Mix (DNA-Extraktion)	0,85 % SDS, 17 mM EDTA, 170 mM NaCl, 17 mM Tris/ HCl, pH 7,5 + 2 mg/ml ProteinaseK

2.2.2 Lösungen für die *In-situ*-Hybridisierung

Tabelle 3 Zusammensetzung der Lösungen für die *In-situ*-Hybridisierung

Bezeichnung	Zusammensetzung
DEPC-H ₂ O	0,1 % DEPC, ü.N. bei 37°C; Autoklavieren
PBS 10x	80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na ₂ HPO ₄ ; 2,4 g KH ₂ PO ₄ ; pH auf 7,4 einstellen; ad 1 l H ₂ O; autoklavieren
4 % PFA/ PBS	40 g PFA in PBS auflösen bei 55°C, abkühlen auf Eis; pH auf 7,4 mit HCl; ad 1 l PBS, bei -20 °C lagern
PBST	100 ml 10x PBS; 10 ml 10 % Tween 20 in DEPC-H ₂ O; ad 1 l DEPC-H ₂ O
ProteinaseK-Puffer	1 ml 1 M Tris (pH 7,0); 0,1 ml 0,5 M EDTA; ad 50 ml DEPC-H ₂ O

Material

PBST/ Glycin	PBST; Glycin (2 mg/ ml)
RIPA	2,5 ml SDS (10 %); 15 ml NaCl (5 M); 5 ml Nonidet P40, Fluka; 2,5 g Deoxycholate; 1 ml EDTA; 25 ml; Tris (1 M, pH 8,0); ad 500 ml DEPC-H ₂ O
4 % PFA/ 0,2 % Glutaraldehyd in PBS	50 ml 4 % PFA pH 7,4; 400 µl Glutaraldehyd (25 %); 500 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 (nur bei Fixierung am Schluss); 500 µl 10 % Tween20 (nur bei Fixierung am Anfang) Formamid Merck #1.09684.1000
20x SSC	175,3 g NaCl; 88,2 g Natriumcitrat; 800 ml DEPC-H ₂ O; pH 7,0 mit HCl; ad 1 l DEPC-H ₂ O; autoklavieren
Heparin	100 mg/ ml in 4x DEPC-SSC 1 M Zitronensäure in DEPC-H ₂ O
Hybridisierungspuffer	25 ml Formamid; 12,5 ml 20x SSC pH 4,5; 25 µl Heparin; 500 µl 10 % Tween20; ad 1 l H ₂ O bidest
SSC/ FA/ T	100 ml 20x SSC; 500 µl 1 M Tris pH 7,5; 500 µl 10 % Tween 20; ad 1 l H ₂ O bidest
RNase-Lösung	5 ml 5 M NaCl; 500 µl 1 M Tris pH 7,5; 500 µl 10 % Tween 20; ad 50 ml H ₂ O bidest
RNaseA	50 ml RNase-Lösung; 500 µl RNase Stock-Lösung (10 mg/ ml)
5x MABT	100 ml 1 M Maleinsäure pH 7-5; 30 ml 5 M NaCl; 10 ml 10 % Tween 20; ad 200 ml H ₂ O bidest
PBST/ Levamisol	1 l PBST; 500 mg Levamisol
Alkalischer Phosphatasepuffer	12 ml 5 M NaCl; 30 ml 1M MgCl ₂ ; 6 ml 10 % Tween20; 60 ml 1 M Tris pH 9,5; 300 mg Levamisol; ad 600 ml H ₂ O bidest

2.2.3 Färbelösungen für die Skelettpräparationen

Tabelle 4 Zusammensetzung der Färbelösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Alcianblau-Färbelösung	1,4 g Alcianblau, 1 l 70 % techn. EtOH
Alizarinrot-Färbelösung	0,6 g Alizarinrot S, 1 l 95 % techn. EtOH
Färbelösung	33 ml Alcianblau-Färbelösung, Alizarinrot-Färbelösung, 131,25 ml Essigsäure, 819,75 ml techn. EtOH

2.2.4 Medien für die Zellkultur

Tabelle 5 Verwendete Medien für die Stammzellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung
ES Standardmedium	DMEM (4,5 mg/ml Glucose mit Natriumpyruvat, Gibco); 15 % (v/v) FCS, 2 % (v/v) L-Glutamin (Lonza); 50 U/ml Penicillin / Streptomycin (Lonza); 1 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco); 1 % 10 mM β -Mercaptoethanol; 1 % 10 x Nukleoside (Chemicon)
ES Standardmedium mit LIF	45 ml ES Standardmedium; 4,5 μ l LIF
ES Standardmedium mit 20% FCS	DMEM (4,5 mg/ml Glucose, ohne Natriumpyruvat, Lonza); 20% (v/v) FCS; 2 mM L-Glutamin (Lonza); Penicillin / Streptomycin 50 U/ml (Lonza)
Einfriermedium 1	13,38 g DMEM; 10 mL HEPES pH 7,2 ad 1 l H ₂ O
Einfriermedium 2 (mit FCS)	80 ml Einfriermedium; 20 ml FCS
Einfriermedium 3 (2x)	60 ml Einfriermedium; 20 ml FCS, 20 ml DMSO
Gelatine 0,1 %	0,5 g Gelatine; 500 ml dH ₂ O; aufkochen und steril filtrieren

2.3 Molekularbiologische Reaktionssysteme/ Kits

Tabelle 6 Verwendete Reaktionssysteme

Bezeichnung	Hersteller
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey Nagel
NucleoSpin Plasmid	Macherey Nagel
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems

2.4 Enzyme

Tabelle 7 Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Taq	Hauseigen
Trypsin EDTA	BioWhittaker Cambrex
BbsI	Fermentas
ProteinaseK	Boehringer

2.5 Bakterienstämme

Zur Gewinnung der Expressionskonstrukte für die anschließende Stammzelltransfektion wurde der Bakterienstamm E.coli Top 10 verwendet.

2.6 Zelllinien

Es wurden embryonale Stammzellen der Linie G4 (Passage 8,6. Juni 2006, LOT 6) aus der Maus verwendet. Die Stammzellen wurden von Andras Nagy vom Samuel Lunefeld Research Institute in Toronto erhalten. Um diese in einem undifferenzierten Zustand zu bewahren, ist es notwendig, diese auf einer Zellschicht primärer embryonaler Fibroblasten (Feeder) auszusäen. Es wurden CD1- sowie puromycinresistente DR4-Feeder verwendet.

2.7 Tiere

Die Aufzucht und Verpaarung der Tiere wurde freundlicherweise vom Personal des hauseigenen Tierhauses übernommen. Es wurde die Mauslinie C57BL/6 (Black 6) verwendet.

2.8 Expressionsvektoren

Es wurde der pX330 (pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9) Vektor mit der Produktnummer 42230 des Herstellers Addgene verwendet.

2.9 Software

Tabelle 8 Verwendete Computerprogramme

Bezeichnung	Anwendung
Adobe Photoshop	Bildbearbeitung
ApE Plasmid Editor	Auswertung Sequenzierung
Axio Vision 4.6	Digitale Photographie
CRISPR Design Tool (CRISPR Ressourcen Zhang LabBroad MIT)	Guide-RNA Design
DNA Star Seqman	Auswertung Sequenzierung
Easy Win. 32	Geldokumentation
Microsoft Office	Auswertung, Dokumentation
NCBI	Datenbankrecherche
NetPrimer	Primerdesign
Primer3	Primerdesign
UCSC	Datenbankrecherche

2.10 Oligonukleotide

Tabelle 9 Verwendete Oligonukleotide für das Vektordesign für CRISPR

Bezeichnung	Sequenz
GuideL_1_Fwd	CACCG ACGTCTGTTTAAAGACCACG
GuideL_1_Rev	AAACCGTGGTCTTAAAACAGACGTC
GuideL_2_Fwd	CACCGAAGCAAACCTGGGCGAGAT
GuideL_2_Rev	AAACATCTCGCCAAGTTTTGCTTC

Material

GuideR_1_Fwd	CACCGAACCATCATTGAATACGGCG
GuideR_1_Rev	AAACCGCCGTATTCAATGATGGTTC
GuideR_2_Fwd	CACCGCGACATTCAATACCGATGGT
GuideR_2_Rev	AAACACCATCGGTATTGAATGTCGC

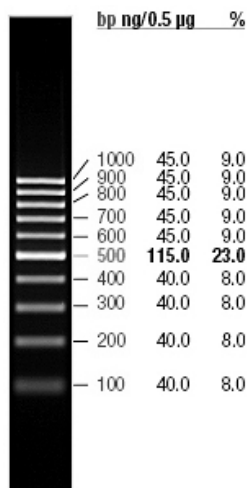
Tabelle 10 Genotypisierungs-Primer

Bezeichnung	Sequenz
GenoR_Fwd	TCTGCCGACATAAAGAAAAAG
GenoR_Rev	CTGAGCATTGTCTTCTCCACA
GenoL_Fwd	TCACAAGTACCAACCTTTCCAA
GenoL_Rev	GACACCTGATGGGTAACATAGAA
New_GenoR_Rev	TGTAACTGGTCCATTGGAAGAAC
U6 Promoter Primer	ACTATCATATGCTTACCGTAAC
Kolonie-PCR Primer	CACGCGCTAAAAACGGACTA

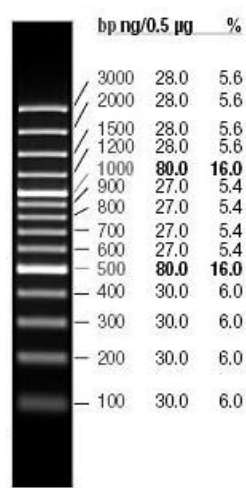
2.11 Längenstandards

Für die Ermittlung der DNA-Fragmentgrößen wurde bei jeder Gelelektrophorese ein Größenstandard aufgetragen. Es wurde der GeneRuler 100bp, 100 bp Plus sowie 1 kb Plus von Fermentas verwendet.

100 bp GeneRuler



100 bp Plus GeneRuler



1 kb Plus GeneRuler

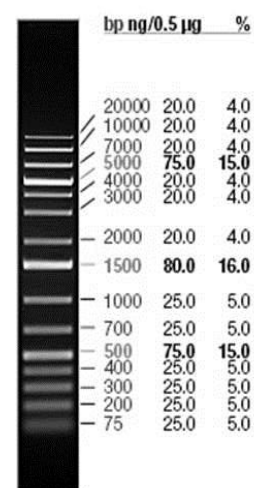


Abbildung 10 Verwendete Längenstandards

3.1.1.1 Guide-RNA Design

Das Design der Guide-RNA wurde mithilfe des CRISPR Design Tools des Zhang Labs durchgeführt. Es wurde eine Guide-RNA-Sequenz mit einer Länge von 20 nt gewählt. Wichtig ist hierbei, dass diese Sequenz einzigartig im Genom ist und potentielle Off-Target-Regionen möglichst viele Fehlpaarungen aufweisen. Außerdem wurde beachtet, dass die komplementäre genomische DNA von einer PAM-Sequenz gefolgt wird. Das NGG ist wichtig für die Bindung des RNA-Protein-Komplexes mit der DNA, ohne diese Sequenz kommt es zu einer Dissoziation des Komplexes (Gasiunas, Barrangou et al. 2012). Der U6-Promotor benötigt ein G am Anfang der Guide-RNA, war dieses in der Sequenz nicht vorhanden, so wurde ein weiteres G angefügt. Das zusätzliche G führt zu keiner Beeinträchtigung der Spezifität Guide-RNA. Da der pX330-Vektor mit BbsI linearisiert wurde, wurden kurze Sequenzen an die Guide-RNA angehängen, die zu den Vektor-Überhängen komplementär waren. So konnte eine Ligation mit dem Vektor gewährleistet werden.

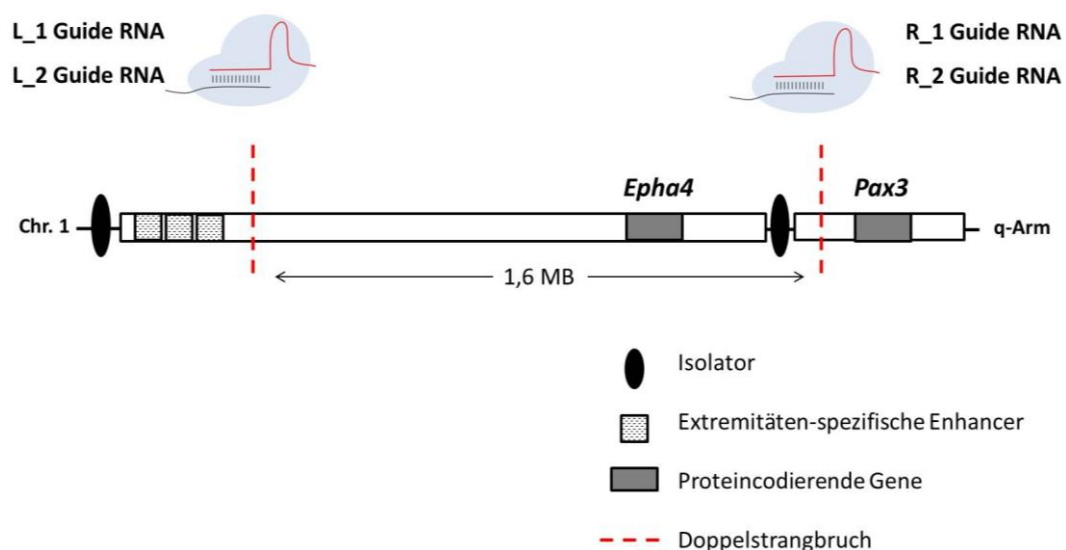


Abbildung 12 Guide-RNA Design für den *Epha4*-Lokus

Um eine Deletion mit dem CRISPR/Cas9-System zu erzielen, müssen CRISPR-Konstrukte rechts und links von dem gewünschten Locus konzipiert werden. Die homologe Region zum humanen *Epha4*-Lokus befindet sich auf dem Chromosom 1 des Mausgenoms. Wegen der geringen Effizienz großer Deletionen wurden jeweils 2 Guide-RNAs auf einer Seite eingesetzt, für die rechte Seite die Guide-RNAs R_1 und R_2 und für die linke Seite L_1 und L_2.

Es wurden Guide-RNAs gewählt, die den Bereich im *Epha4*-Lokus flankieren, der deletiert werden soll (Abbildung 12). Große Deletionen mit dem CRISPR/Cas9-System haben nur eine geringe vorhergesagte Effizienz. Um die Effizienz zu steigern, wurden daher rechts und links von der zu entfernenden Region zwei CRISPR-Konstrukte designt, rechts die Guide-RNAs R_1 und R_2 sowie links die Guide-RNAs L_1 und L_2.

3.1.1.2 Oligonukleotid-Hybridisierung

Als erstes wurden die Oligonukleotide entsprechend der Herstellerangabe in H₂O bidest gelöst. Da es sich bei PX330 um einen doppelsträngigen Vektor handelt, müssen die komplementären Forward- und Reverse-Oligonukleotide zunächst hybridisiert werden. Dazu wurden jeweils 10 µl des Forward- und Reverse-Oligonukleotids mit 10 µl Ligationspuffer (10x) und 70 µl H₂O bidest für 15 min in einem Heizblock erhitzt und für 45 min bei RT abgekühlt.

3.1.1.3 Oligonukleotid-Phosphorylierung

Um sicherzustellen, dass es zur Ligation der Oligonukleotide mit dem DNA-Plasmid und nicht zu einem erneuten Ringschluss des Plasmids kommt, müssen die Oligonukleotide zuerst phosphoryliert und das Plasmid dephosphoryliert werden. Dafür wurden 10 µl der hybridisierten Oligos mit 2 µl ATP (10 mM), 2 µl T4 Polynukleotidkinase-Reaktionspuffer (10x) und 2 µl T4 Polynukleotidkinase versetzt. Der Reaktionsansatz wurde auf 20 µl mit H₂O bidest aufgefüllt und bei 37 °C für 20 min inkubiert. Um die Polynukleotidkinase zu inaktivieren, wurde der Reaktionsansatz anschließend für 10 min auf 75 °C erhitzt.

3.1.1.4 Vektor-Dephosphorylierung

Für die Dephosphorylierung des Vektors wurden 11,6 µl des linearisierten Vektors (1 µg DNA) mit 2 µl 10x Reaktionspuffer für Alkaline Phosphatase (AP), 1 µl fast thermosensitive AP sowie 5,6 µl H₂O bidest versetzt, gemischt, herunterzentrifugiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Um die Enzymaktivität abzustoppen wurde der Ansatz für weitere 5 min auf 75 °C erhitzt.

3.1.1.5 **Ligation**

Für die Ligation des PX330 Vektors mit den Oligonukleotiden wurde ein Reaktionsansatz aus 14 µl H₂O bidest, 1 µl einer 1:10 Verdünnung dephosphorylierten Vektors, 2 µl phosphorylierter Oligonukleotide, 2 µl T4 DNA Ligase Puffer sowie 1 µl T4 DNA Ligase hergestellt. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei RT.

3.1.2 **Bakterientransformation**

Bei der Transformation gelangt der klonierte Vektor über die Plasmamembran in die kompetenten Zellen. Die E.coli Top10 Bakterien wurden als erstes langsam auf Eis aufgetaut. Danach wurden 100 µl der Bakteriensuspension mit 10 µl der Lösung aus der Ligationsreaktion versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Um die Durchlässigkeit der Plasmamembran zu erhöhen, wurden die Bakterien einem Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C für 60 s ausgesetzt. Danach wurden rasch 900 µl SOC Medium hinzugegeben und die Bakterien bei 37 °C unter leichtem Schütteln zur Regeneration inkubiert.

Nach der Regenerationsphase wurden 150 µl der Zellsuspension auf Agar-Platten mit Ampicillin ausgesät, umgedreht und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die verbleibende Zellsuspension wurde für 30 s bei 6000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Pellet ebenfalls ausplattiert.

3.1.3 **Animpfen von Flüssigkulturen**

Um größere Mengen des klonierten Konstrukts zu erhalten, ist es notwendig die transformierten Bakterien in einem großen Volumen zu kultivieren, um später eine hohe Bakteriendichte zu erhalten und daraus den Vektor zu isolieren. Dazu wurden 5 ml LB Medium in einem Reagenzglas vorgelegt, eine einzelne Bakterienkolonie vorsichtig mit einer Pipettenspitze gepickt und zu dem LB Medium gegeben. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln bei 37 °C über Nacht.

3.1.4 **Glycerinkultur**

Glycerinkulturen werden angelegt, damit Bakterienklone dauerhaft im Tiefkühlschrank gelagert werden können und das Vektorkonstrukt weiterhin zur Verfügung steht. Dafür

wurden in fest verschließbaren Kryoröhrchen 800 µl der Zellsuspension einer Flüssigkultur mit 220 µl 85 % Glycerin versetzt. Diese wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.5 Testverdau

Mit dem enzymatischen Testverdau ist es möglich zu überprüfen, ob ein Insert in den pX330-Vektor eingebaut wurde. Der leere pX330-Vektor weist eine BbsI-Schnittstelle auf und wird daher enzymatisch gespalten. Der Vektor mit Insert hat hingegen keine BbsI-Schnittstelle und wird nicht verdaut.

Tabelle 11 Reaktionsansatz für den Testverdau

Volumen	Reagenz
1 µg	DNA
2 µl	Buffer FD Green
1 µl	BbsI
ad 20 µl	H ₂ O bidest

3.1.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR ist eine Methode, um einen definierten DNA-Bereich zu vervielfachen. Die Reaktion besteht aus drei Schritten.

Zuerst wird die DNA-Helix bei einer Temperatur von 94 -96 °C denaturiert, sodass sie einzelsträngig vorliegt. Es handelt sich hierbei um Matrizenstränge. Im nächsten Schritt erfolgt die Primerhybridisierung. Dabei lagern Oligonukleotide (Primer) komplementär an die Matrizen-Stränge, die Primer bilden die Startpunkte für die Vervielfältigung der DNA. Je nach Primersequenz variiert die Hybridisierungstemperatur von 55 -65°C. Die Primer werden mithilfe des Programms Primer3 konzipiert. Die Primersequenz wird so gewählt, dass der GC-Gehalt 40-60 % beträgt und es nicht zur Selbsthybridisierung oder Schleifenbildung der Primer kommt.

Im dritten Schritt erfolgt die Elongation, die von dem Enzym DNA-Polymerase katalysiert wird. Dabei werden die Oligonukleotide durch Anlagerung von Nukleotiden

komplementär zur Matrize verlängert. Die Temperatur entspricht dem Reaktionsoptimum der Polymerase und variiert zwischen 68 °C und 72 °C.

3.1.6.1 Kolonie-PCR

Um herauszufinden, ob die Bakterientransformation erfolgreich war und die Vektoren das korrekte Insert (Guide-Sequenz) aufweisen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei wurde ein PCR-Mastermix nach dem Standard-PCR-Protokoll angesetzt und Aliquots von 50 µl in einer 96well Platte vorgelegt. Als Primer wurde der Kolonie-PCR-Primer verwendet, der an eine Sequenz innerhalb des Vektors bindet. Der zweite Primer stellte das jeweils insertierte Oligonukleotid dar. Anschließend wurden mit einer sterilen Pipettenspitze einzelne Bakterienkolonien gepickt, auf einer Agar-Replikaplatte vorsichtig ausplattiert und anschließend in den PCR-Ansatz gelegt und gut gemischt. Die Replikaplatte wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert. Positiv getestete Kolonien wurden anschließend in einer Flüssigkultur angeimpft.

Tabelle 12 Pipettierschema für den Reaktionsansatz der Kolonie-PCR

Volumen	Reagenz
2 µl	10x PCR-Reaktionspuffer
0,5 µl	dNTPs (1,25 mM)
0,4 µl	Forward Primer
0,4 µl	Reverse Primer
0,25 µl	Taq Polymerase
16,45 µl	H ₂ O bidest

Tabelle 13 Cyclerprogramm für die Kolonie-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
96 °C	5 min	
96 °C	30 s	
55 °C	30 s	x25
72 °C	2 min	
72°C	7 min	
4 °C	∞	

3.1.6.2 PCR für Genotypisierungen

Die Genotypisierungsreaktionen wurden jeweils mit der isolierten genomischen DNA aus ES-Zellen, Amnien, Schwanzspitzen oder Ohrstanzbiopsien von Mäusen durchgeführt.

Tabelle 14 Pipettierschema für den PCR-Ansatz der Genotypisierungsreaktionen

Volumen	Reagenz
5 µl	10x PCR-Reaktionspuffer
1,25 µl	dNTPs (1,25 mM, Fermentas)
1 µl	Forward Primer
1 µl	Reverse Primer
1-2 µl	DNA (40 ng)
ad 50 µl	H ₂ O bidest

Tabelle 15 Cyclerprogramm für die Genotypisierungs-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
96 °C	5 min	
96 °C	30 s	
55 °C	30 s	X35
72 °C	2 min	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

3.1.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten nach ihrer Größe. Das Agarosegel ist ein Polymer mit einer netzartigen Struktur. Wird es mit Nukleinsäuresträngen beladen und ein Gleichstrom angelegt, so wandern die negativ geladenen Fragmente in Richtung des Plus-Pols im Gel, dabei werden die größeren Fragmente stärker zurückgehalten, wodurch es zu einer Größenauftrennung kommt. Die Fragmente werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht, da es die Nukleinsäurebasen interkaliert und infolgedessen eine erhöhte Fluoreszenz-Intensität aufweist. Es wurden 1 % Agarosegele (w/v) verwendet und eine Spannung von ca. 100 V angelegt.

3.1.8 Sequenzierung

Für die Ermittlung der Nukleotidsequenzen wurde die Sanger-Kettenabbruchmethode verwendet (Sanger et al., 1977). Bei dieser Methode werden DNA-Fragmente mithilfe einer DNA-Polymerase sowie Primern amplifiziert. Im Reaktionsansatz befinden sich auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs), von denen jedes eine von vier Farben besitzt. Sobald diese in den neusynthetisierten DNA-Strang eingebaut werden, kommt es zum Kettenabbruch. Die entstandenen DNA-Fragmente werden nun in einer Kapillar-Elektrophorese aufgetrennt, wobei die markierten ddNTPs an den Fragment-Enden mithilfe eines Lasers detektiert werden können. Die Basensequenz kann anschließend in einem Chromatogramm direkt abgelesen werden.

Tabelle 14 Pipettierschema für den Reaktionsansatz der Sequenzierung

Volumen	Reagenz
0,75 µl	5x Sequenzier-Puffer
0,5 µl	BigDye Terminator Reaction Mix
0,5 µl	Forward Primer oder Reverse Primer
2 µl	PCR-Produkt (27-40 ng)
ad 5 µl	H ₂ O bidest

Tabelle 15 Cycler-Programm für die Sequenzierungsreaktion

Temperatur	Zeit	Zyklen
96 °C	1 min	
96 °C	30 s	25x
50 °C	30 s	
60 °C	4 min	
4 °C	∞	

3.1.9 DNA-Isolierung

3.1.9.1 DNA-Isolierung aus dem Agarosegel und PCR-Ansatz

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionsansätzen sowie Agarosegelen wurde gemäß Herstellerangaben mit dem „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Kit durchgeführt.

3.1.9.2 Isolierung der Plasmide aus Bakterienkulturen

Die Isolierung der Vektorkonstrukte aus den transformierten Bakterienkulturen erfolgte gemäß Herstellerangaben mit dem „Nucleospin Plasmid“ Kit von MACHERY NAGEL. Die Expressionskonstrukte wurden in 50 µl H₂O bidest eluiert.

3.1.9.3 **Isolierung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen**

Die ES-Zellen wurden in 48well Platten für eine DNA-Isolierung expandiert, bis eine Konfluenz von über 90 % erreicht wurde. Die Zellen wurden zunächst 1x mit PBS gewaschen. Um einen Zellaufschluss zu erreichen, wurde jeweils 100 µl Lysispuffer und 1 µl Proteinase K (Endkonzentration: 0,2 mg/ml) hinzugefügt, die Platten luftdicht zugeklebt und bei 55 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die lysierten Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, worauf 100 µl Isopropanol und 20 µl 8 M LiCl für die Fällung der DNA zugeführt wurden. Nach einer Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 20 min bei 4 °C wurde der Überstand verworfen. Daraufhin wurde das Pellet mit vorgekühltem 70 % EtOH gewaschen und erneut für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 60 µl H₂O bidest gelöst.

Die Isolierung genomischer DNA in 96well Platten erfolgte am BCRT im Campus Virchow mit der freundlichen Unterstützung von Mohsen Karbasiyan. Es wurde der „Fällungsroboter“ Beckman Coulter Biomek NX^P mit der Biomek Software verwendet.

3.1.9.4 **Isolierung genomischer DNA aus Amnien und Schwanzspitzen**

Es wurden zu jeder Gewebeprobe 0,5 ml SDS-Mix hinzugefügt und bei 55 °C auf dem Schüttler 2-3 h inkubiert, um die Zellen aufzuschließen. Daraufhin musste die DNA von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Dafür wurden 0,25 ml gesättigter 5M NaCl-Lösung zugegeben und 10 min auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Die Proben wurden danach für weitere 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei 9000 rpm und 4 °C zentrifugiert. 500 µl wurden dann in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits gekühltes 70% EtOH vorgelegt war. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm und 4 °C für 20-30 min. Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet mit 70 %EtOH gewaschen, weitere 15 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und anschließend an der Luft getrocknet. Das DNA-Pellet wurde schließlich in 150 µl H₂O bidest gelöst.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Herstellen von gelatinisierten Platten

Damit die Feeder- und ES-Zellen den Boden von Zellkulturschalen bewachsen und gut anhaften, muss dieser mit einer Gelatineschicht bedeckt werden. Die Platten wurden dafür mit 0,1% Gelatine befüllt, sodass die Oberfläche vollständig bedeckt war. Nach 30 min bei 37°C wurde der Gelatineüberstand abgesaugt und die Platten für 10 min bei RT getrocknet.

3.2.2 Aussäen von Feeder-Zellen

Vor dem Ausplattieren von Stammzellen wurden als erstes Feeder-Zellen auf gelatinisierten Platten ausgesät. Damit wurde verhindert, dass es zu einer vorzeitigen Differenzierung der embryonalen Stammzellen kommt. Die Feeder-Zellen lagerten im flüssigen Sickerstoff und wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Um das zellschädigende DMSO zu entfernen, wurden diese in ein Falcon mit 5 ml ES-Standardmedium überführt und bei 12000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet im neuen ES-Standardmedium resuspendiert und auf die gelatinebedeckten Platten aufgetragen. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C für mindestens einen Tag.

3.2.3 Aussäen von embryonalen Stammzellen

Das Auftauen der embryonalen Stammzellen erfolgte analog zu den Feeder-Zellen.

Nach dem Auftauen wurde das Einfriermedium mittels Zentrifugation entfernt, das Zellpellet in ES-Medium + LIF resuspendiert und auf die mit den Feeder-Zellen bewachsenen Platten ausgesät. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C. Das ES-Standardmedium wurde täglich gewechselt.

3.2.4 Splitten von Zellen

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin bedeckt. Die Inkubation erfolgte für 10-15 min im Brutschrank bei 37°C. Danach sollte unter

dem Mikroskop überprüft werden, ob sich die Zellen gut vom Boden gelöst haben. Mit dem doppelten Volumen an ES-Standardmedium wurde die Aktivität des Trypsins gestoppt und die embryonalen Stammzellen durch kräftiges Pipettieren vereinzelt. Schließlich wurden sie auf neue mit Feeder-Zellen bedeckte Platten überführt.

3.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Dabei wurde die Kammer mit der Zellsuspension befüllt, die Zellen in den vier Quadranten der Kammer gezählt und der Mittelwert der Zellzahl berechnet. Um die Gesamtzellzahl zu erhalten, wurde der Mittelwert der gezählten Zellzahl mit dem Verdünnungsfaktor sowie dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert.

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)}}{\text{Gesamtvolumen der Zellsuspension}}$$

3.2.6 Transfektion embryonaler Stammzellen

Einen Tag vor der Transfektion wurden Feeder-Zellen in einer 6well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden 250.000-300.000 ES-Zellen pro Well im ES-Standardmedium mit LIF auf den Feeder-Zellen ausplattiert.

Nach einer Inkubation über Nacht wurde das Medium gegen Standardmedium mit LIF ohne Penicillin / Streptomycin ausgetauscht. Daraufhin wurde das Transfektionsreagenz FuGENE HD auf RT erwärmt. 25 μ l FuGENE HD wurden mit 100 μ l OptiMEM versetzt. Außerdem wurden jeweils 5-8 μ g des klonierten Plasmids mit 1 μ g pSuperior.puro, einem Plasmid mit einem Puromycinresistenzgen, sowie 125 μ l OptiMEM gemischt. Der DNA-Mix wurde mit 125 μ l FuGENE-Mix versetzt, bei RT für 15 min inkubiert und tropfenweise auf ein Well der 6well Platte gegeben. Die ES-Zellen wurden mit drei unterschiedlichen CRISPR-Konstrukt-Kombinationen transfiziert.

Tabelle 16 CRISPR-Konstrukte für die ES-Zelltransfektion

Konstrukt	Guide RNA	Eingesetzte Stoffmenge/ Plasmid
1	L_1 + R_1	8 µg
2	L_2 + R_2	8 µg
3	L_1 + R_1 + L_2 + R_2	5 µg

Nach zwölf Stunden Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C wurde das Medium gegen Standardmedium mit LIF getauscht, um den Zellen eine Regeneration zu ermöglichen.

Am nächsten Tag wurden die Zellen jeweils 4 x 6cm Platten mit puromycinresistenten DR4-Feeder ausgesät und eine Puromycinselektion gestartet. Dafür wurde das Standardmedium mit LIF mit 2 µg/ml Puromycin versetzt und auf die Zellen gegeben. Die Selektion wurde im Brutschrank bei 37°C für 48 h durchgeführt, dabei wurde das Medium täglich gewechselt. Nach der Puromycinselektion wurde das Selektionsmedium gegen Standardmedium mit LIF ausgetauscht. Die transfizierten ES-Zellen regenerierten im Brutschrank bei 37°C für 4-6 Tage. Ein Mediumwechsel erfolgte täglich. Sobald einzelne Zellkolonien gut sichtbar herangewachsen waren, konnten sie gepickt und in eine 96well Platte überführt werden. Die Zellen wurden weitere 2 - 3 Tage expandiert. Danach konnte ein Teil der Zellen eingefroren werden, wobei der Rest für eine Genotypisierung noch weitere vier Tage expandiert wurde.

3.2.7 ES-Zellkolonien picken

Es wurden einen Tag zuvor 96-Well-Platten mit Gelatine und Feeder-Zellen vorbereitet. 2-3 Stunden vor dem Picken wurde das Medium gewechselt. Danach wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen. Es wurde nochmals so viel PBS zugegeben, dass der Boden bedeckt war. 30 µl der Trypsin/ EDTA-Lösung wurden in U-förmige 96well Platten vorgelegt. Als nächstes wurden einzelne Zellkolonien mit einer 10 µl-Pipette gepickt und in die Typsin/ EDTA-Lösung überführt. Nach 10-15minütiger Inkubation im Brutschrank wurden 60 µl Stammzellmedium hinzugegeben. Durch kräftiges Pipettieren wurden die Zellkolonien vereinzelt und in die am Vortag vorbereiteten Platten mit Feeder-Zellen transferiert. Die Zellen wurden für 2-3 Tage im Brutschrank inkubiert.

3.2.8 Splitten und Einfrieren

Zuerst wurden die 96-well-Platten mit den Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden 50 µl Trypsin/ EDTA hinzugefügt und 10 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Es wurden U-förmige 96well Platten mit 50 µl 2x Einfriermedium pro well vorbereitet. Außerdem wurden 200 µl ES Standardmedium in gelatinisierte 96well Platten vorgelegt. Diese können später für DNA-Präparationen verwendet werden.

Nach 10 min Inkubation wurden 100 µl Einfriermedium auf die trypsinisierten Zellen gegeben und die Zellen durch kräftiges Pipettieren resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 50 µl auf die 96well-Platte mit 2x Einfriermedium gegeben, gut mit Parafilm verschlossen und in Styroporboxen bei -80 °C eingefroren. Weitere 50 µl Zellsuspension wurden auf die gelatinisierte 96well gegeben und für eine DNA-Präparation 3-4 Tage im Brutschrank gelagert. Die verbleibenden 50 µl Zellsuspension wurden ebenfalls eingefroren.

3.2.9 Morula-Aggregation

Die Aggregation ist eine Methode, Mauslinien aus ES-Zellen zu generieren. Bei einer diploiden Aggregation werden die transfizierten ES-Zellen mit einem Embryo im Morula-Stadium 2,5 dpc zusammengebracht. Diese wachsen zu einem chimären Embryo heran, das im Blastocysten-Stadium in eine pseudoschwangere weibliche Maus transferiert werden kann. Bei der tetraploiden Aggregation wird der Embryo ausschließlich aus ES-Zellen generiert und ist nichtchimär.

Die Aggregation wurde freundlicherweise von Lars Wittler aus der AG Hermann des MPI durchgeführt.

3.3 Histologische Methoden

3.3.1 Skelettfärbung

Die Färbung erfolgte in Alizarinrot sowie Alcianblau. Alizarin ist ein roter Farbstoff der einen chemischen Komplex mit Calcium bildet und daher für die Färbung von Knochengewebe verwendet wird. Alcianblau hingegen führt zu einer Blaufärbung der Glykosaminoglykane im Knorpelgewebe. Um das Skelett einer Maus sichtbar zu machen, muss diese zuvor gründlich präpariert und weitestgehend von Haut und Fettgewebe befreit werden. Die Lagerung kann in 100 % technischen EtOH erfolgen.

Als Erstes wurde das EtOH abgekippt und die Färbelösung auf die Präparate gegeben. Die Inkubation erfolgte für drei Tage bei RT auf dem Wippschüttler. Um die Intensität der Färbung zu erhöhen, wurde die Färbelösung nach einem Tag ausgetauscht. Als Nächstes wurde die Färbelösung abgekippt und die Präparate mit 1 % KOH bedeckt, um das übriggebliebene Gewebe zu verdauen. Sobald die Phalangen sichtbar wurden, wurde die Lösung abgekippt, 0,3 % KOH auf die Präparate gegeben und diese über Nacht bei RT inkubiert. Um die Präparate lagerungsfähig zu machen, wurde das KOH gegen 30 % Glycerin ausgetauscht. Am nächsten Tag wurden die Skelettpräparate mit 0,3 % KOH gewaschen und mit 60 % Glycerin für einen weiteren Tag versetzt. Die Lagerung konnte schließlich in 80 % Glycerin erfolgen. Die Analyse und das Fotografieren der Skelettpräparate wurden mit dem Bionokular, einer CCD-Kamera sowie der AxioVision-Software durchgeführt.

3.3.2 *In-situ*-Hybridisierung

Bei der *In-situ*-Hybridisierung (ISH) handelt es sich um eine Methode zur Sichtbarmachung von Nukleinsäuren auf zellulärer Ebene oder im gesamten Gewebe. Dabei binden Digoxigenin (DIG) - markierte RNA-Sonden komplementär an die zu untersuchenden Nukleinsäuren. Die Sonden werden von einem Antikörper, der mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt ist, spezifisch gebunden. In Anwesenheit chromogener Reagenzien kommt es zur Bildung einer Färbung, die mikroskopisch untersucht werden kann.

3.3.2.1 **Whole Mount *In-situ*-Hybridisierung**

Besonders eignet sich die ISH zum Nachweis von RNA in Embryos, wodurch eine Aussage über die Genexpression gewebespezifisch und in unterschiedlichen Entwicklungsstadien getroffen werden kann.

Vorbereitung

Zunächst wurden Embryonen im Stadium E10,5 in PBS präpariert, wobei die Amnien entfernt wurden. Danach wurden die Embryos in 4 % PFA/PBS über Nacht bei 4 °C fixiert. Am nächsten Tag folgten zwei Waschschrte in PBST auf Eis, worauf die Embryos in einer aufsteigenden Methanol-Reihe von 25 %, 50 %, 75 % in PBST für jeweils 10 min dehydriert wurden. Die Lagerung erfolgte bei - 20 °C.

Tag 1

Um die Embryos für die Hybridisierung vorzubereiten, wurden sie über eine absteigende Methanolreihe von 75 %, 50 %, 25 % in PBST auf Eis rehydriert. Es folgten zwei Waschschrte in PBST. Danach wurden die Embryos in 6 % Wasserstoffperoxid in PBST für 1 h auf Eis gebleicht. Nach weiteren drei Waschschrten in PBST erfolgte ein Proteinaseverdau, um das Gewebe für die Sondenhybridisierung zugänglicher zu machen. Der Verdau erfolgte mit 10 µg/ml ProteinaseK in ProteinaseK-Puffer für 3 min auf dem Schüttler. Danach wurden Embryos jeweils zweimal in PBST/ Glycin, in reinem PBST sowie dreimal in RIPA-Puffer und PBST gewaschen. Es erfolgte eine weitere Fixierung in 4 % PFA/ 0,2 % Glutaraldehyd in PBS/ 0,1 % Tween20. Danach wurden die Embryos erneut in PBS gewaschen, um die Fixierlösung zu entfernen. Als nächsten wurden die Embryos auf die Hybridisierungsreaktion vorbereitet. Sie wurden in einer Lösung aus Hybridisierungspuffer und PBS (1:1) bei RT 10 min und danach in reinem Hybridisierungspuffer gewaschen. Darauf folgt eine Inkubation in dem Hybridisierungspuffer bei 65 °C für 1 h. Währenddessen erfolgt die Denaturierung der Sonden bei 80 °C für 5 min. Anschließend wurde der Sondenmix hergestellt, indem der Hybridisierungsmix mit tRNA (100 µg/ ml) sowie mit DIG-markierten Sonden im Verhältnis 1:100 (25 µg/ ml) versetzt wurde. Anschließend wurde der Hybridisierungsmix hergestellt. Dafür wurde zuerst Hybridisierungspuffer mit tRNA im Verhältnis von 1:100 mit einer tRNA-Endkonzentration von 100 µg/ ml versetzt. 10 µl

Sondenmix wurden zu 1ml der tRNA-Lösung zugefügt, sodass die Sondenkonzentration 0,25 µg/ ml betrug. Die Sondenhybridisierung der Embryos erfolgte in bei 65 °C ü.N.

Tag 2

Am nächsten Tag wurden die überschüssigen Sonden durch Waschen mit Hybridisierungspuffer bei 65 °C entfernt. Daraufhin erfolgte ein Waschschrift mit einer Lösung aus Hybridisierungspuffer und RNase-Lösung im Verhältnis 1:1 für 5 min bei RT. Danach fand der RNA-Verdau der Embryos mit der RNase-Lösung mit einer RNaseA-Konzentration von 100 µg/ml für 2 x 30 min bei 37 °C statt. Anschließend wurden sie in einer Lösung von RNase/ SSC/ FA/ T (1:1) bei RT inkubiert und anschließend auf 65 °C erhitzt. Es folgten Waschschriffe (2 x 5min, 3 x 10 min, 6 x 30 min) mit der reinen SSC/ FA/ T-Lösung bei 65 °C. Daraufhin wurden die Embryos mit einer 1:1 Lösung SSC/ FA/ T und MABT für 10 min bei RT gewaschen sowie mit MABT für 2 x 10 min bei RT. Um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden, wurden die Embryos in 10 % BBR in MABT für 1 h bei RT inkubiert. Währenddessen konnte der DIG-Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung in 1% BBR in MABT für 1 h bei 4 °C vorinkubiert. Die Inkubation der Embryos in Antikörperlösung erfolgte bei 4 °C auf dem Schüttler über Nacht.

Tag 3

Am nächsten Tag wurden die ungebundenen Antikörper durch Waschen mit PBST / 0,05% Levamisol / Tetramisol für 3 x 5 min bei RT entfernt. Levamisol inhibiert endogene intestinale Phosphatasen, wodurch eine unspezifische Färbung vermieden wird. Danach wurden sie für 8 x 1 h mit PBST / Levamisol erneut gewaschen und über Nacht bei 4 °C gelassen.

Tag 4

Am letzten Tag erfolgte die Färbung der gebundenen Sonden. Dafür wurden die Embryos zunächst im frischen alkalischen Phosphatase-Puffer gewaschen. Die Färbung wurde mit BM Purple AP Substrat im Dunkeln durchgeführt. Jeder Embryo wurde für mindestens 1 h in 1,5 ml Färbelösung inkubiert. Am Ende wurden die Embryos im alkalischen Phosphatase-Puffer gewaschen und in 4 % / PFA / PBS / 0,2 % Glutaraldehyd und 5 mM EDTA fixiert. Die Embryos konnten schließlich bei 4 °C

gelagert werden. Die Aufnahme der Bilder wurde mit dem Binokular sowie der Software AxioVision durchgeführt.

3.3.3 Mikro-Computertomographie (μ -CT)

Zur Visualisierung der Extremitäten-Skelette wurden μ -CT-Aufnahmen in der Abteilung für Humangenetik der Charité im Campus Virchow mit der freundlichen Unterstützung von Hardy Chen und Dr. Francisca Martinez-Real durchgeführt.

Bei dieser Methode wird die Probe mit Röntgenstrahlen zerstörungsfrei durchleuchtet. Die Röntgenstrahlen interagieren mit den Elektronen des Untersuchungsobjekts und durchleuchten dieses oder werden abgelenkt. Da Knochenmaterial eine hohe Elektronendichte aufweist, wird kein Kontrastmittel benötigt. Die Probe muss mindestens einen Tag in techn. Ethanol gelagert werden. Die Röntgenquelle sowie der Detektor sind fest angebracht und das Untersuchungsobjekt rotiert kontinuierlich. Das Objekt befindet sich in einer Kunststoffkapillare und muss mithilfe von Parafilm und Styropor gut fixiert werden. Die erhaltenen Querschnittsbilder können daraufhin mithilfe einer computergestützten Bildrekonstruktion als dreidimensionales Modell dargestellt werden. Es wurde das Gerät BRUKER microCTSkyScan 1172 (RJL Micro & Analytic) verwendet. Das Gerät ermöglicht eine Vermessung von Objekten mit einem Durchmesser bis 50 mm und einer Länge bis 70 mm. Die Auswertung der Daten sowie die Bildrekonstruktion erfolgte mit der Software NRcon, CTAp sowie CTVol (SKYSCAN).

Tabelle 17 Messparameter der μ -CT Aufnahmen

Auflösung	Spannung	Strom	Sonstiges
Große Pixel 23,7 μ m	81 kV	124 μ A	0,5 mm Aluminiumfilter

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung des Vektors für das CRISPR/Cas9-System

Gegenstand der Experimente war die Implementierung des CRISPR/Cas9-Systems in ES-Zellen der Maus. Es sollte eine genomische Deletion von ca. 1,6 Mb im *Epha4*-Lokus erzeugt werden. Dazu wurde im ersten Teil der Arbeit ein Vektorkonstrukt kloniert, das die Expressionskassetten aufweist, die für das CRISPR/Cas9-System notwendig sind. Der pX330-Vektor beinhaltet das Cas9-Gen und codiert außerdem für die chimäre crRNA. Der Vektor wurde jeweils mit einer von vier spezifischen Guide-RNA-Sequenzen kloniert.

4.1.1 Testverdau zur Überprüfung der Vektorklonierung

Der enzymatische Testverdau zeigt, ob der Vektor ein Insert beinhaltet (Abbildung 13). Die Negativkontrolle ist der leere pX330-Vektor. Dieser weist eine BbsI-Schnittstelle auf und zeigt nach dem Testverdau eine starke Bande in Agarosegel. Die klonierten Plasmide mit den vier Inserts sowie die Positivkontrolle haben hingegen zwei Banden im Agarosegel. Plasmide können die Konformation offen und supercoiled annehmen, was zu unterschiedlichen Fragmentgrößen führt.

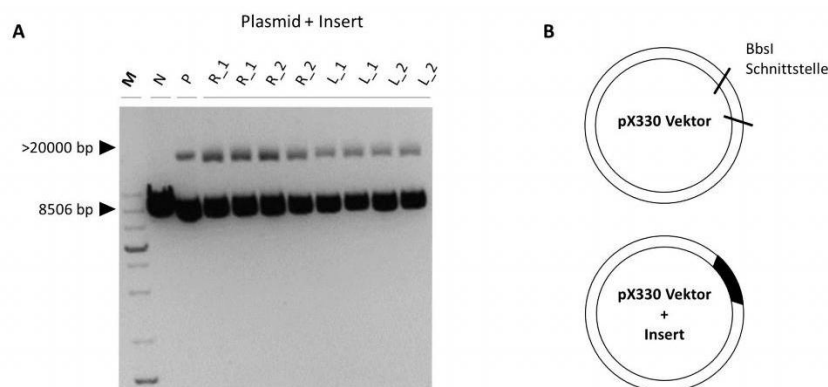


Abbildung 13 Enzymatischer Testverdau zur Überprüfung der pX330-Vektor-Klonierung

(A) M: Marker GeneRuler 1 kb Plus. Die Negativkontrolle (N) ist der leere pX330 Vektor und zeigt eine Bande. Wegen der BbsI-Schnittstelle liegt dieser linearisiert vor. Die Positivkontrolle (P) ist der Vektor mit einem Insert aus einem vorherigen Experiment von Katerina Kraft. Die Positivkontrolle zeigt zwei Banden. Die Vektoren mit den Inserts R_1, R_2, L_1 und L_2 weisen ebenfalls zwei Banden im Agarosegel auf. (B) Schematische Darstellung des pX330-Vektors mit und ohne Insert. Der Vektor mit Insert besitzt keine BbsI-Schnittstellen mehr.

4.1.2 Analyse des Vektors nach Bakterientransformation

Zur Vervielfältigung der klonierten Vektorkonstrukte wurde eine *E.coli*-Transformation durchgeführt. Um die erfolgreiche Transformation zu bestätigen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (Abbildung 14A). Außerdem wurden die Plasmide aus der Bakterienkultur aufgereinigt und sequenziert, um die Klonierung weiter zu überprüfen und zu sehen, ob die Inserts eine richtige Orientierung aufweisen. Die vier Sequenzen aus der Plasmidaufreinigung zeigen, dass das entsprechende Insert vorhanden ist und eine korrekte Orientierung aufweist (Abbildung 14B-E).

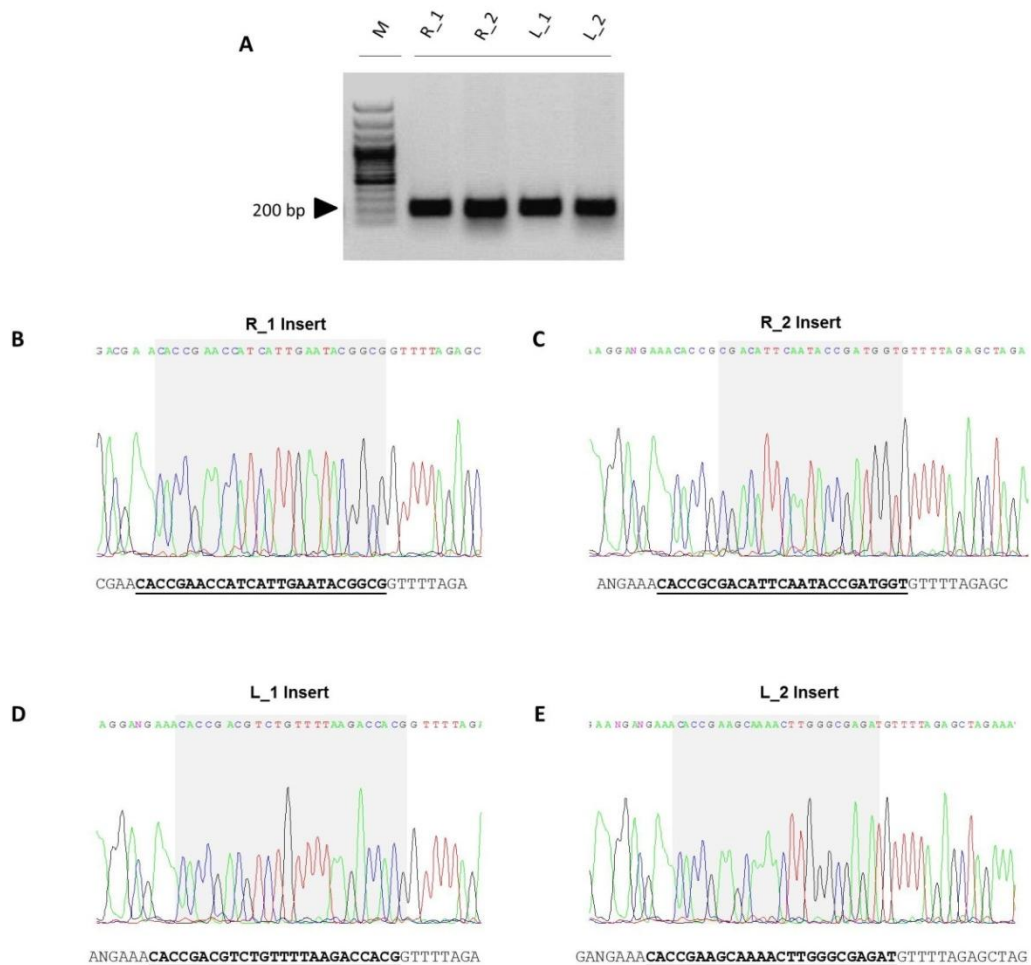


Abbildung 14 Kolonie-PCR und Sequenzierung der klonierten Plasmide mit Insert

(A) M: Marker GeneRuler 100 bp Plus; L_1-R_2: Produkte der Kolonie-PCR vier unterschiedlicher Bakterienkulturen. Gelbild der Kolonie-PCR der transformierten Bakterienkulturen mit den pX330-Vektoren. Es wurden vier Flüssigkulturen angesetzt. Die Sequenzen zeigen einen Teil der vier Vektorkonstrukte mit (B) dem R_1 Insert, (C) R_2 Insert, (D) L_1 Insert und (E) L_2 Insert. Die Sequenzen weisen keine Abweichungen auf und haben eine korrekte Orientierung.

4.2 Genotypisierung der ES-Zell-Klone

Die ES-Zellen wurden mit dem klonierten pX330-Vektor sowie einem Puromycin-Resistenzvektor kotransfiziert. Für die Transfektion wurden drei unterschiedliche CRISPR-Konstrukt-Kombinationen verwendet. Nach einer Antibiotikaselektion wurden einzelne Zellkolonien gepickt und neu ausgesät. Aufgrund der geringen vorhergesagten Effizienz genomischer Deletionen, wurden für jedes Konstrukt insgesamt 200 Klone gepickt. Anschließend wurde ein Screening nach Klonen durchgeführt, die eine genomische Deletion als Folge der CRISPR/Cas9-Prozessierung aufweisen.

Tabelle 18 CRISPR-Konstrukt-Kombinationen

Konstrukt	1	2	3
Guide-RNA	L_1 + R_1	L_2 + R_2	R_1 + L_1 + R_2 + L_2

4.2.1 Screening nach einer genomischen Deletionen im *Epha4*-Lokus

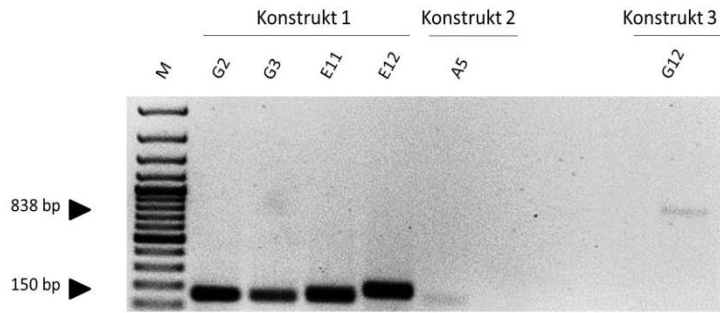
Das Screening wurde mithilfe einer PCR-Reaktion durchgeführt (Abbildung 15A). Die Primer wurden so designt, dass nur im Falle einer Deletion ein Produkt vorhanden ist, da diese außerhalb der Bruchpunkte binden und eine Distanz von mehr als 1,6 Mb aufweisen (Abbildung 15B). Für das Konstrukt 1 konnten vier Klone gefunden werden. Die Banden im Agarosegel entsprechen einer Fragmentlänge von 150 bp. Dies entspricht dem PCR-Produkt, das nach dem Schneiden der CRISPR-Konstrukte R_1 und L_1 resultiert. Die Konstrukte 2 und 3 weisen jeweils einen positiven Klon mit einer schwachen Bande im Agarosegel auf. Das PCR-Produkt des Klons G12 vom Konstrukt 3 hat eine Fragmentlänge von 853 bp, das entspricht dem erwarteten Produkt nach einer Prozessierung durch die Konstrukte R_2 und L_2. Die Effizienz des Konstrukts 1 für die Erzeugung einer genomischen Deletion von ca. 1,6 Mb entspricht 2 %. Mit den Konstrukten 2 und 3 konnte eine genomische Deletion mit einer Effizienz von jeweils 0,5 % erreicht werden.

Das Chromatogramm aus der Sequenzierung des PCR-Produkts des Klons G2 zeigt den genauen Bruchpunkt der Deletion (Abbildung 15C). In der Sequenz ist ein Indel vorhanden, eine Insertion des Nukleotids Cytidin. Die Deletion hat eine Fragmentlänge von 1.671.839 bp. Die Klone der Konstrukte 2 und 3 wurden expandiert, eine erneute Genotypisierung zeigte jedoch kein PCR-Produkt, sodass die Bruchpunkte nicht weiter untersucht werden konnten.

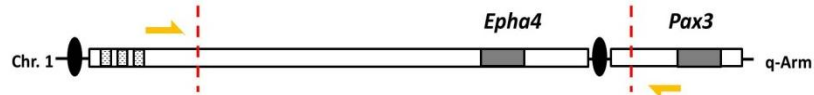
Ergebnisse

Deletion

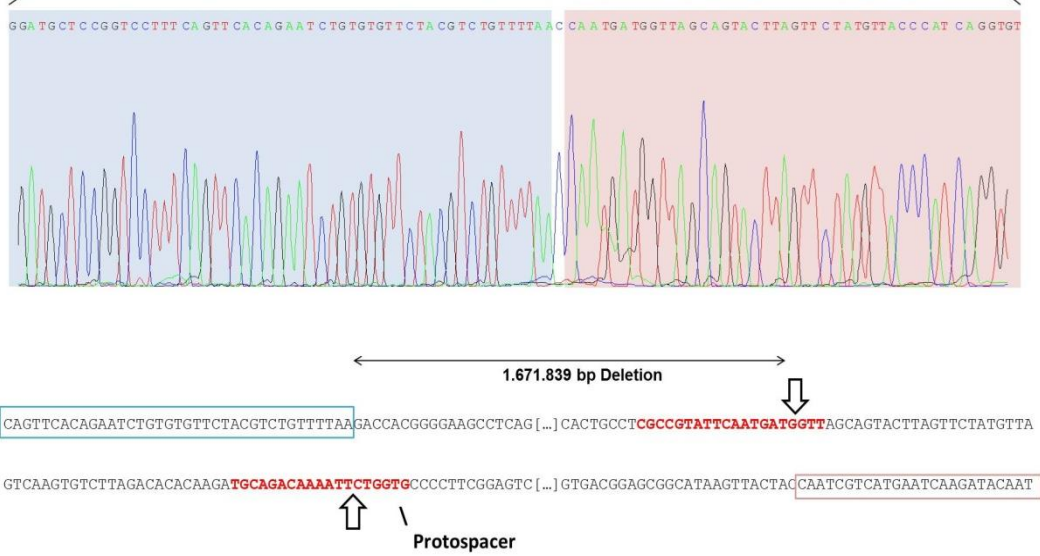
A



B



C



D

Wildtyp Referenz

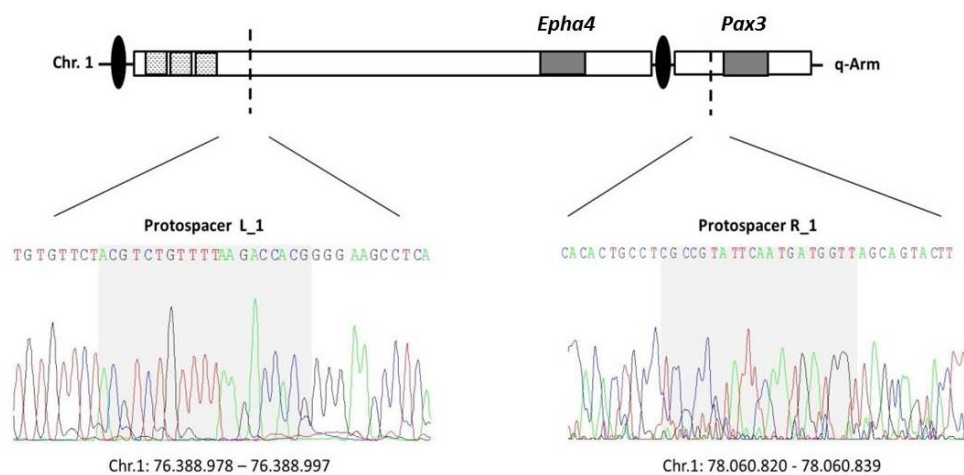
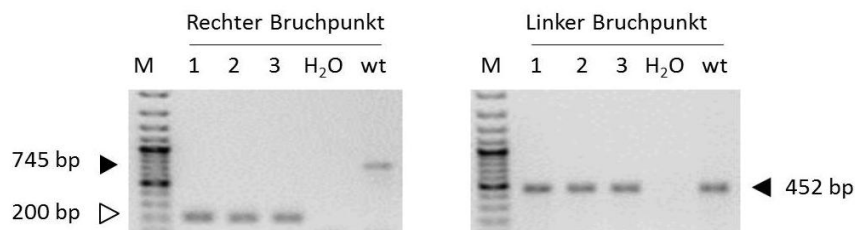


Abbildung 15 Genotypisierung von ES-Zell-Klonen mit einer Deletion im *Epha4*-Lokus

(A) M: Marker GeneRuler 100 bp Plus. G2-G12: ES-Zell-Klone. Agarosegel mit den PCR-Produkten der positiven Klone der Konstrukte 1, 2 und 3 mit einer genomischen Deletion. Konstrukt 1 hat 4 positive Klone, die PCR-Produkte haben eine Länge von 150 bp. Konstrukt 2 zeigt einen positiven Klon mit einem PCR-Produkt von 150 bp. Konstrukt 3 hat ebenfalls einen positiven Klon, das PCR-Produkt entspricht 838 bp. (B) Schematische Darstellung des *Epha4*-Locus der Maus. Die Primer (gelbe Pfeile) befinden sich außerhalb der Bruchpunkte. Das Chromatogramm des Klons G2 zeigt den genauen Bruchpunkt und eine Insertion des Nukleotids Cytidin. (C) Die Sequenz der genomischen DNA mit den erzeugten Bruchpunkten (weiße Pfeile). Sequenzen, die im Chromatogramm der Klone vorhanden sind, sind hervorgehoben (blauer und roter Kasten) (D) Chromatogramme der CRISPR-Bindungsregionen aus nichttransformierten ES-Zellen als Wildtyp-Referenz.

Der ES-Zellklon G2 wurde diploid und tetraploid aggregiert, um Mauslinien zu generieren. Die Embryos aus der tetraploiden Aggregation wurden für Experimente außerhalb dieser Arbeit verwendet. Die tetraploiden Embryos sind nicht chimär. Durch eine Genotypisierung der tetraploiden Amnion-DNA kann Erkenntnis darüber gewonnen werden, ob die Deletion heterozygot oder homozygot ist. Bei der Genotypisierung von ES-Zellen, können hingegen Wildtyp-PCR-Produkte aufgrund der Feeder-Zellen entstehen und das Resultat verfälschen.

2. Allel



Rechte Sequenz:

AGAAAACATATTTTTTTTAAAGGATGCCAG.. [545bp] .. **TCAATGATGGTT**AGCAGTACTTAGTTCTATG
 TCTTTTGTATAAAAAAATTCCTACGGTC.. [545bp] .. AGTTACTACCAATCGTCATGAATCAAGATAC

Abbildung 16 Genotypisierung des 2. Allels der ES-Zellklone mit einer Deletion

M: Marker GeneRuler 100 bp Plus; 1-3: Amnion-DNA-Proben aus tetraploider Aggregation; Wt: Wildtyp Positivkontrolle. Die Gelbilder zeigen die PCR-Produkte für die rechte und linke Wildtyp-Region. Die WT-Kontrolle weist hier ebenfalls eine Bande auf. Das PCR-Produkt des rechten Bruchpunkts ist kleiner als die WT-Kontrolle. Die Sequenzierdaten des PCR-Produkts eine Deletion von 545 bp.

Die DNA-Proben aus den Amnien zeigen ein Produkt für die PCR der rechten und linken Wildtyp-Region (Abbildung 16). Auffällig ist, dass das PCR-Produkt für den rechten Bruchpunkt deutlich kleiner ist als die Wildtypkontrolle. Die Sequenz des PCR-Produkts bestätigt eine Deletion von 545 bp auf dem zweiten Allel.

4.2.2 Screening nach einer genomischen Inversion im *Epha4*-Lokus

Neben Deletionen wurde ein Screening nach genomischen Inversionen durchgeführt (Abbildung 17). Um Inversionen zu finden, wurden die Bereiche um die möglichen Bruchpunkte, in denen die CRISPR-Konstrukte binden, mittels PCR amplifiziert. Ein Produkt ist nur möglich im Falle einer Inversion, da in Wildtyp-DNA die Primer-Bindungsstellen zu weit entfernt wären und die Primer außerdem dieselbe Orientierung aufweisen würden. Es konnten 3 Klone des Konstrukts 1 mit einer Inversion gefunden werden. Es wurden der rechte und linke Bruchpunkt untersucht.

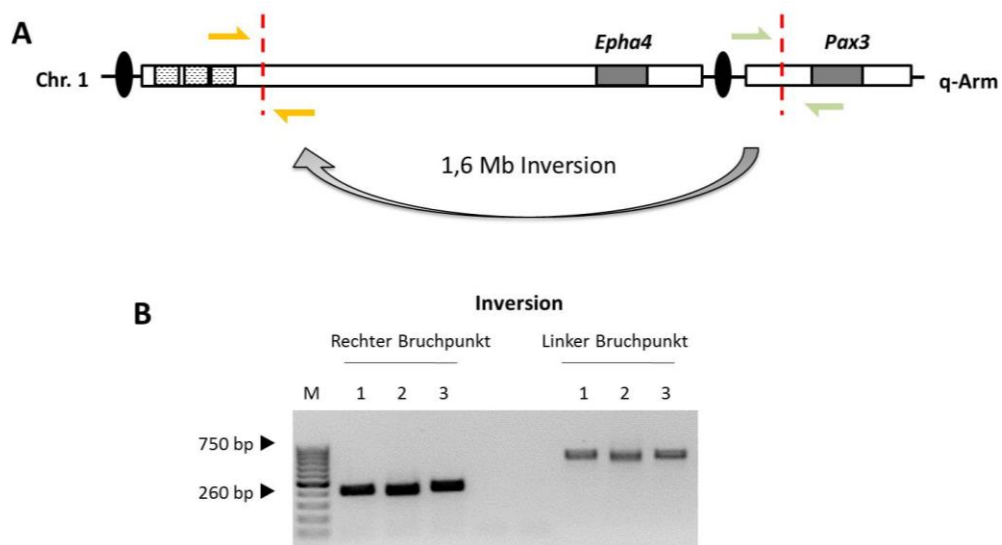


Abbildung 17 Genotypisierung von ES-Zell-Klonen mit einer Inversion

(A) Schematische Darstellung des *Epha4*-Locus. Die PCR-Primer flankieren die Bruchpunkte der Inversion. (B) M: Marker GeneRuler 100 bp; 1-3: ES-Zell-Klone; Wt: Wildtyp Positivkontrolle. Agarosegelbild mit den PCR-Produkten für den rechten und linken Bruchpunkt der ES-Zell-Klone mit einer 1,6 Mb Inversion.

Des Weiteren wurde eine Sequenzierung der Bruchpunktregionen der ES-Zell-Klone mit einer Inversion durchgeführt (Abbildung 18). Die generierte genomische Inversion beträgt 1.671.839 bp.

Ergebnisse

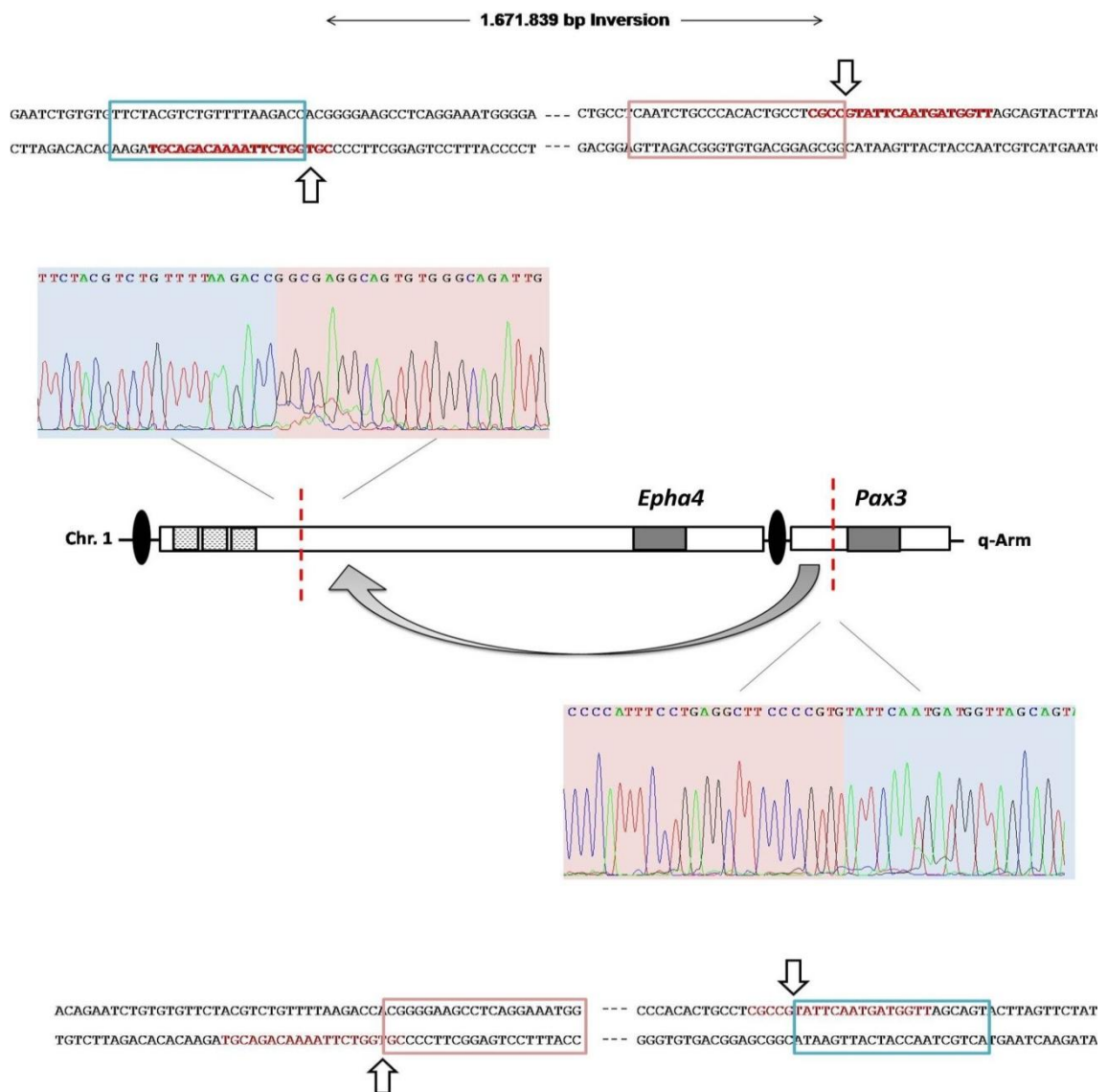


Abbildung 18 Untersuchung der Bruchpunkte der genomischen Inversion

Die weißen Pfeile zeigen die Doppelstrangbrüche in der genomischen DNA-Sequenz innerhalb der Protospacer (Rot). Die Distanz zwischen den Doppelstrangbrüchen und die Fragmente Länge der Inversion beträgt 1.671.839 bp. Die Chromatogramme der Sequenzierdaten zeigen den linken und rechten Bruchpunkt der Inversion (Übergang von Rot und Blau). Für die Sequenzierung wurde genomische DNA der ES-Zell-Klone verwendet.

Um zu ermitteln, ob es sich um eine homozygote oder heterozygote Inversion handelt, wurde mit den Klonen eine PCR durchgeführt (Abbildung 19). Die Primer binden an dieselben Bereiche im Wildtyp-Genom, sodass die Region um die CRISPR-Bindungsstellen amplifiziert wird. Alle drei Klone mit der Inversion zeigen ein PCR-Produkt im Agarosegel für den rechten und linken Bruchpunkt. Bei dem Produkt kann es sich jedoch um ein Signal der Feederzellen handeln, daher sollte das Resultat kritisch betrachtet werden.

Ergebnisse

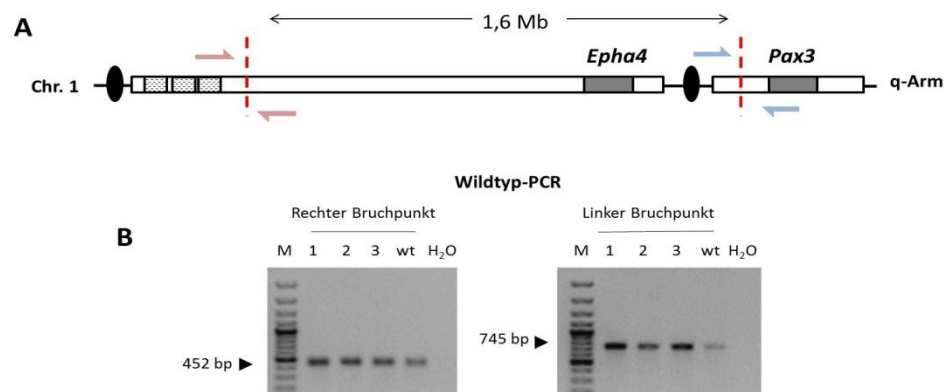


Abbildung 19 Genotypisierung des 2. Allels von ES-Zell-Klonen mit einer Inversion

(A) Schematische Darstellung des *Epha4*-Locus. Die PCR-Primer flankieren die die CRISPR-Bindungsstellen im Wildtyp-Genom. (B) M: Marker GeneRuler 100 bp Plus; 1-3: ES-Zell-Klone; Wt: Wildtyp, Positivkontrolle. Agarosegelbild mit den PCR-Produkten für die Wildtyp-Region der ES-Zell-Klone mit einer 1,6 Mb Inversion. Analyse des zweiten Allels der Klone auf Homozygotie.

4.3 Bruchpunkte der CRISPR/Cas9-Konstrukte

Um das Schneideverhalten des CRISPR/Cas9-Systems in der genomischen DNA zu untersuchen, wurden die Sequenzierdaten der ES-Zellklone analysiert und so die genauen Bruchpunkte der CRISPR/Cas9-Prozessierung ermittelt (Tabelle 19). Die Bruchstellen der CRISPR/Cas9-Konstrukte variieren deutlich, befinden sich jedoch innerhalb der CRISPR-Bindungssequenzen. Es ist die Tendenz erkennbar, dass Doppelstrangbrüche in der Nähe der PAM-Sequenz erzeugt werden. Statistisch wurden die Doppelbrüche 6,2 bp hinter PAM (R_1 Guide-Sequenz des Klons E12 wegen unzureichender Datenqualität ausgenommen) generiert.

Tabelle 19 Bruchpunkte innerhalb der CRISPR-Bindungssequenzen

ES-Zell-Klon	L_1 Guide-Sequenz	R_1 Guide-Sequenz
G2 - 1. Allel	ACGTCTGTTTAA↓GACCACG (NGG)	AACCATCATTG↓AATACGGCG (NGG)
G2 - 2. Allel	kein Bruchpunkt	AACCATCATTGA↓ATACGGCG (NGG)
G3	ACGTCTGT↓TTTAAGACCACG (NGG)	AACCATCATTGAATA↓CGGCG (NGG)
E11	ACGTCTGTTTAAAGACC↓ACG (NGG)	AACCATCATTGAA↓TACGGCG (NGG)
E12	ACGTCTGTTTAAAGAC↓CACG (NGG)	(AACC↓ATCATTGAATACGGCG (NGG))
Inversion	ACGTCTGTTTAAAGACC↓ACG (NGG)	AACCATCATTGAATAC↓GGCG (NGG)

4.4 Analyse der *Pax3*-Expression in transgenen Mausembryos

Das Gen *Pax3* flankiert den *Epha4*-Lokus und besitzt außerdem regulatorische Funktionen in der Embryonalentwicklung. Daher wurde der Einfluss der 1,6 Mb Deletion im *Epha4*-Lokus auf die Genaktivität von *Pax3* untersucht.

Um die Expression des Gens *Pax3* zu analysieren, wurde eine *In-Situ*-Hybridisierung (ISH) mit transgenen Mausembryos im Stadium E10,5 durchgeführt (Abbildung 20). Die Embryos resultieren aus einer diploiden Aggregation genetisch modifizierter ES-Zellen mit der 1,6 Mb Deletion im *Epha4*-Locus. Die Embryos sind hochchimär. Als Vergleich wurden Wildtyp-Embryos (Black 6) im Stadium E10,5 verwendet. Vor der ISH wurde eine Genotypisierung der genomischen DNA aus den Amnien der Embryos zur Bestätigung der Deletion vorgenommen.

Im Wildtyp-Embryo ist eine Expression von *Pax3* im Mesencephalon (Mittelhirn) sowie Metencephalon (Hinterhirn) zu sehen. Ein starkes Signal konnte außerdem im Kiemenbogen sowie den Somiten detektiert werden. In den Extremitätenknospen wird *Pax3* mittig im proximalen Bereich exprimiert. Im transgenen Embryo wird *Pax3* ebenfalls stark im Mesencephalon und Metencephalon sowie dem Kiemenbögen und den Somiten exprimiert. Anders als im Wildtyp-Embryo wird *Pax3* stark im distalen Bereich der vorderen und hinteren Extremitätenknospen exprimiert. Das Signal bricht vor dem anterioren Ende der Extremität im Bereich der Zone polarisierender Aktivität (ZPA) ab. In der proximalen Extremitätenknospe ist *Pax3* ebenfalls wie in dem Wildtyp-Embryo deutlich detektierbar.

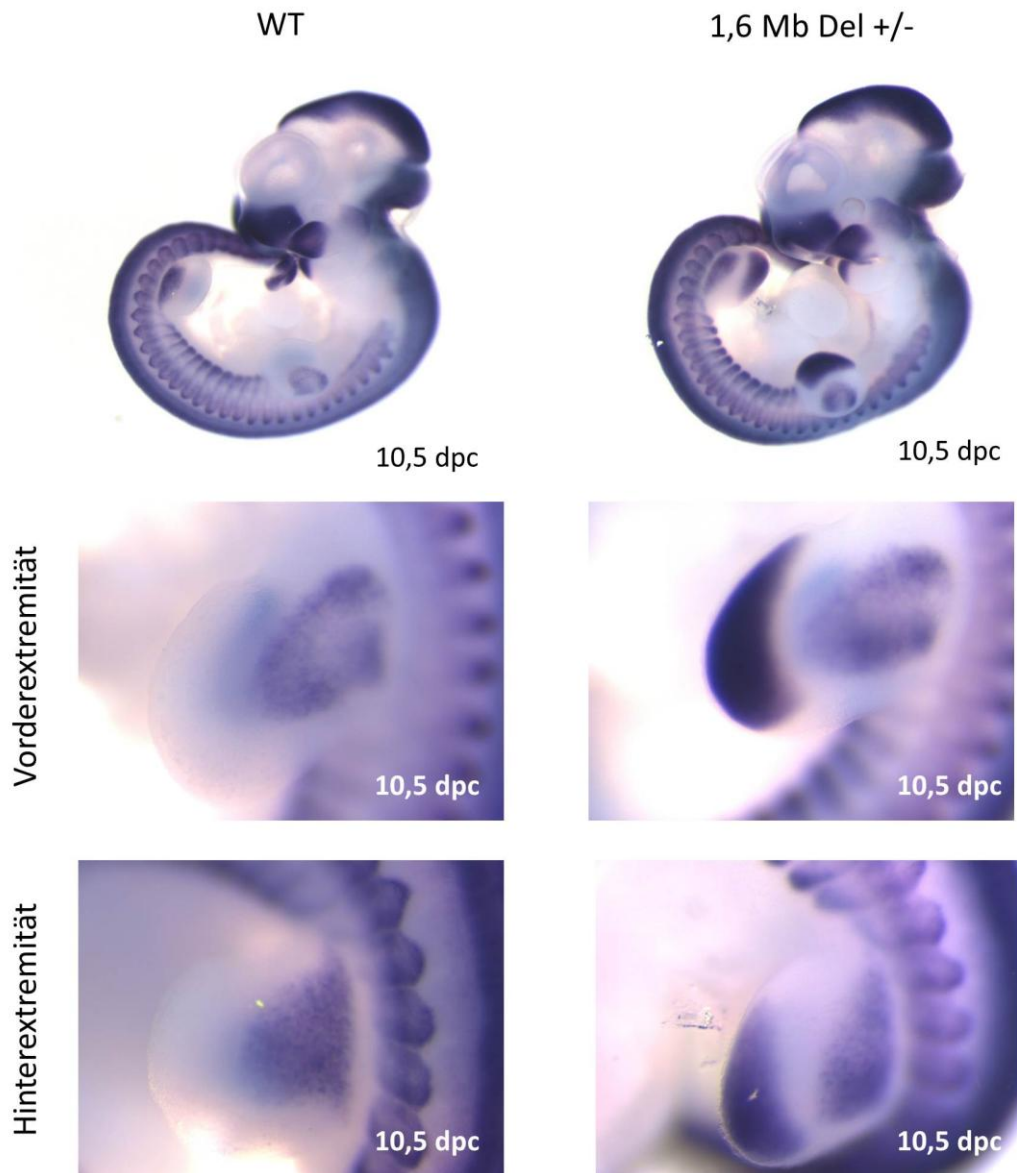
Pax3 In-situ-Hybridisierung

Abbildung 20 Hochregulierung der *Pax3*-Expression im transgenen Mausembryo

Ein Vergleich der WT-Embryos mit den chimären Embryos (1,6 Mb Deletion) zeigt, dass *Pax3* in beiden Fällen im Mittel- sowie Vorderhirn, den Kiemenbögen und den Somiten exprimiert wird. In den Vorder- und Hinterextremitäten der WT-Embryos ist ein Signal im proximalen Bereich zu sehen. In den chimären Embryos ist ebenfalls ein Signal im proximalen Bereich der Extremitäten vorhanden. Daneben ist eine ektopische Expression von *Pax3* im distalen Ende der Extremitätenknospe detektierbar. Das Signal endet abrupt im anterioren Teil der Extremität.

4.5 Untersuchung der Extremitätenentwicklung der transgenen Mäuse

Beim Menschen resultiert eine homozygote Deletion im *Epha4*-Lokus in skelettalen Fehlbildungen der Finger und Zehen. Die Patienten haben Verkürzungen von Zeigefinger und Daumen sowie des großen Zehs. Da die transgenen Mausembryos eine vergleichbare genetische Aberration wie diese Patienten aufweisen, wurden sie nach der Geburt nach morphologischen und skelettalen Fehlbildungen untersucht, um den Einfluss der Deletion auf die Entwicklung der Extremitäten zu ermitteln. Die chimären Mäuse mit einer Deletion wurden nach acht Wochen mit Black 6-Mäusen verpaart. Die F1-Generation bestand daraufhin aus heterozygoten transgenen Tieren sowie Wildtyp-Mäusen. Alle untersuchten Tiere wurden mittels PCR genotypisiert.

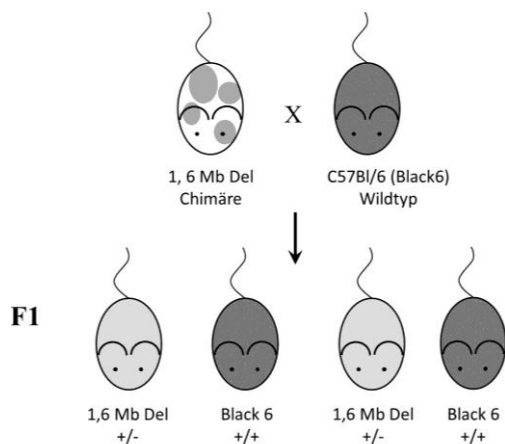


Abbildung 21 Verpaarungsschema der chimären Mäuse mit Wildtyp-Mäusen

Die F1-Generation nach der Kreuzung einer chimären Maus mit einer Wildtyp-Maus besteht aus heterozygoten transgenen Mäusen und Wildtyp-Mäusen.

4.5.1 Analyse des Fingerphänotyps transgener Mäuse im Stadium 3,5 dpp

3,5 Tage nach der Geburt wurden die Wildtyp- sowie transgenen 1,6 Mb Del.-Mäuse vergleichend untersucht (Abbildung 22). Die transgenen Mäuse sind körperlich unauffällig, bei genauer Betrachtung der vorderen Extremitäten ist jedoch deutlich erkennbar, dass der zweite Finger signifikant verkürzt ist im Vergleich zu der Wildtypmaus. Besonders auffällig wird die Verkürzung, wenn der zweite und fünfte Finger (kleine Finger) miteinander verglichen werden. Bei der Wildtypmaus ist der zweite Finger deutlich größer als der kleine Finger. Bei der transgenen Maus haben der zweite und der kleine Finger eine vergleichbare Größe. In den Hinterextremitäten der transgenen Maus sind keine morphologischen Auffälligkeiten erkennbar.

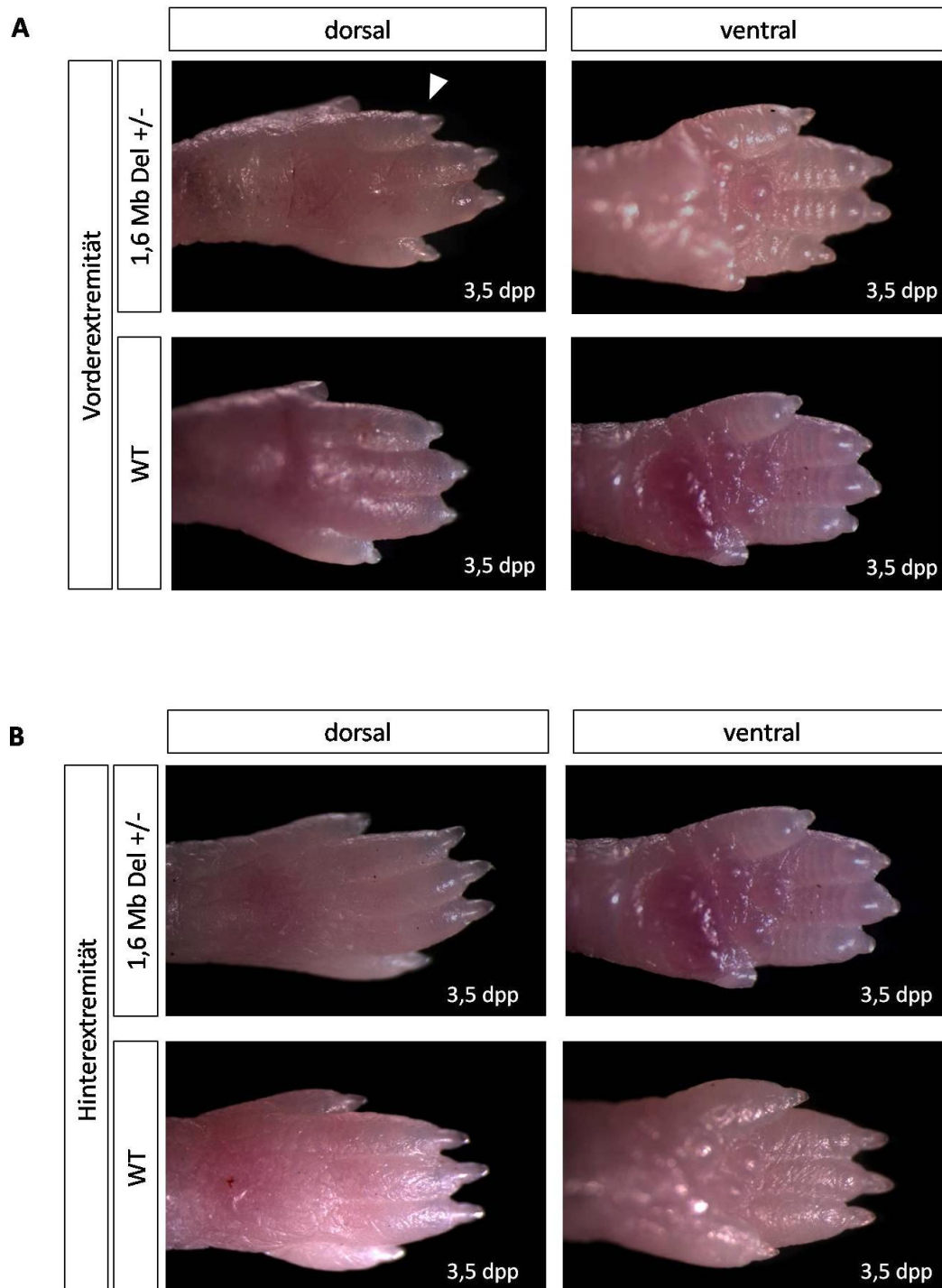


Abbildung 22 Untersuchung des Extremitätenphänotyps transgener Mäuse 3,5 dpp

(A) Dorsale und ventrale Ansicht der vorderen Extremität der transgenen Maus mit einer 1,6 Mb-Deletion und einer Wildtyp-Maus. Beim Vergleich der Gliedmaßen wird deutlich, dass der zweite Finger der transgenen Maus signifikant verkürzt ist. (B) Dorsale und ventrale Ansicht der hinteren Extremität von transgener und Wildtyp-Maus. Beide Extremitäten sind morphologisch unauffällig und normal entwickelt.

4.5.2 Skelettale Extremitäten-Entwicklung der transgenen Mäuse 3,5 dpp

Um den Fingerphänotyp genauer zu untersuchen, wurden Skelettpräparationen mit anschließender Skelett- und Knorpelfärbung durchgeführt (Abbildung 23). Es wurden die hinteren und vorderen Extremitäten der Wildtypmaus sowie der transgenen Maus des Stadiums 3,5 dpp verwendet.

Bei Betrachtung der Präparate wird deutlich, dass die intermediale Phalange (zweite Phalange) in der Vorderextremität der transgenen Maus deutlich kürzer ist als beim Wildtyp. Besonders deutlich wird dies bei einem Vergleich des zweiten und fünften Fingers. Beim Wildtyp ist die intermediale Phalange des zweiten Fingers deutlich größer als die des kleinen Fingers. Bei der transgenen Maus ist hingegen kein Größenunterschied zu sehen. Es sind keine weiteren skelettalen Abnormitäten erkennbar.

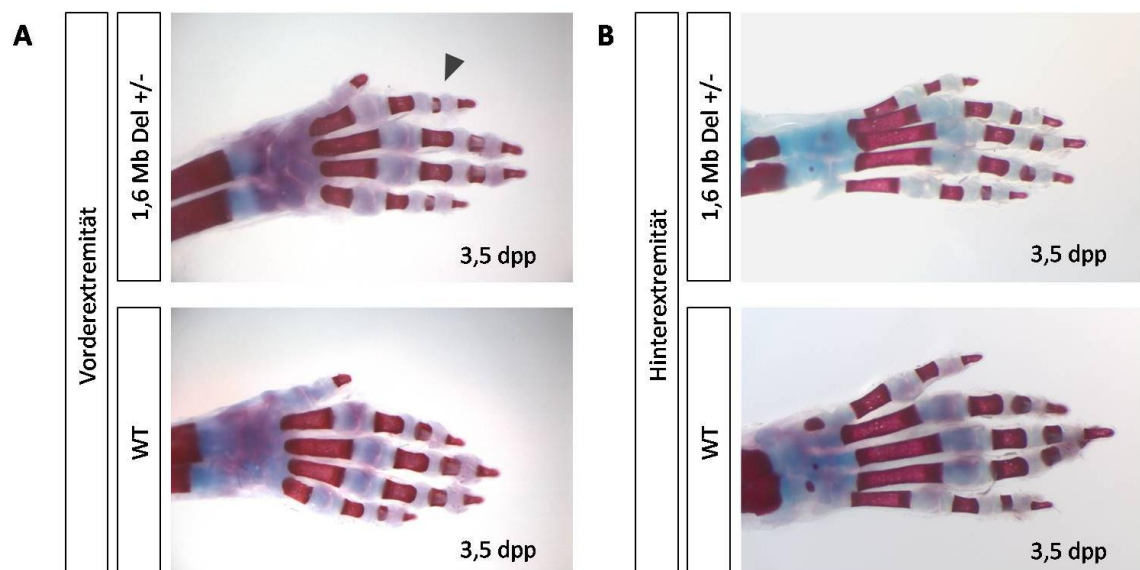


Abbildung 23 Skelett- und Knorpelfärbung der Extremitäten transgener Mäuse 3,5 dpp

(A) Skelett- (rot) und Knorpelfärbung (blau) der Vorderextremität einer transgenen und Wildtyp-Maus. Die transgene Maus zeigt eine signifikante Verkürzung der intermedialen Phalange des zweiten Fingers (schwarzer Pfeil) auf. (B) Skelett- (rot) und Knorpelfärbung (blau) der hinteren Extremität einer transgenen und Wildtyp-Maus. Die intermediale Phalange des zweiten Zehs der transgenen Maus zeigt ebenfalls eine leichte Verkürzung im Vergleich zum Wildtyp.

4.5.3 Skelettale Extremitäten-Entwicklung der transgenen Mäuse (6 Wochen alt)

Um den Fingerphänotyp nach Abschluss der Ossifikation der Gliedmaßen zu analysieren, wurden μ -CT-Aufnahmen der Extremitäten von 6 Wochen alten Mäusen vorgenommen. In den Aufnahmen ist das Knochengewebe der Gliedmaßen zu sehen (Abbildung 24).

Die Extremitäten der transgenen Maus sehen unauffällig aus und zeigen eine normale Skelettentwicklung. Bei einem Vergleich mit dem Wildtyp wird außerdem deutlich, dass der zweite Finger keine Verkürzung mehr aufweist und die intermediale Phalange eine normale Größe hat. In den Hinterextremitäten der transgenen Maus sind ebenfalls keine skelettalen Anomalien zu erkennen.

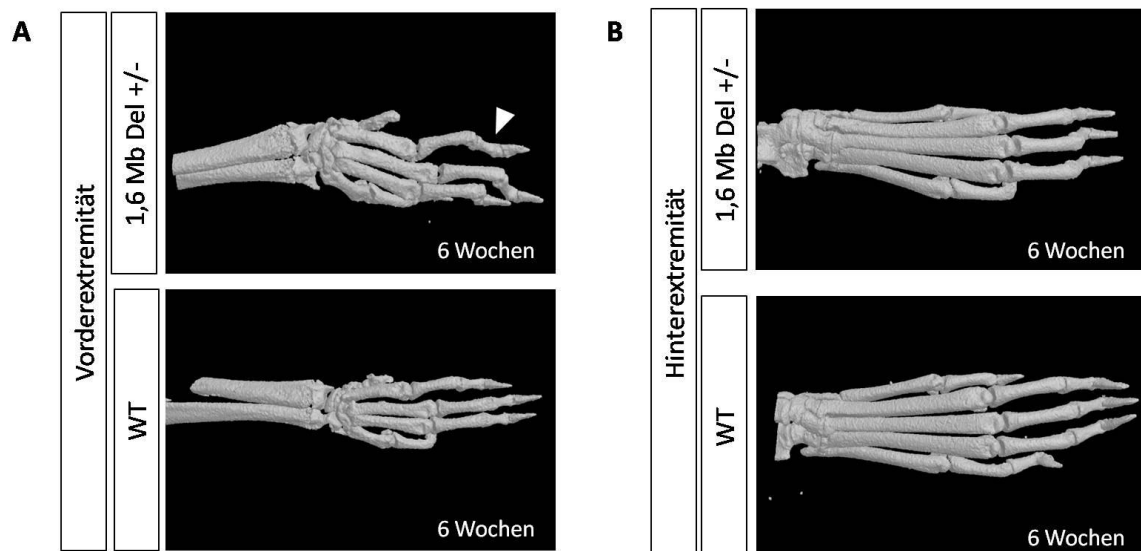


Abbildung 24 μ -CT-Aufnahmen der Extremitäten transgener Mäuse (6 Wochen alt)

(A) μ -CT-Aufnahme der Vorderextremität von einer Wildtyp-Maus und 1,6 Mb Del-Mutante. Die Mutante zeigt eine normale Extremitäten-Entwicklung ohne Auffälligkeiten. (B) μ -CT-Aufnahme der hinteren Extremität von einer Wildtyp-Maus und 1,6 Mb Del-Mutante. Die Mutante zeigt ebenfalls eine normale Extremitäten-Entwicklung.

5. Diskussion

Das CRISPR/Cas9-System ist ein wirksames Instrument zur Generierung einer Vielzahl struktureller Variationen in lebenden Zellen. Es wurde angewandt, um eine genomische Deletion von 1,6 Mb im *Epha4*-Lokus von embryonalen Stammzellen der Maus zu erzeugen und ein Mausmodell zu erhalten. Patienten mit der entsprechenden Deletion leiden an skelettalen Fehlbildungen der Finger und Zehen.

5.1 Effizienz des CRISPR/Cas9-Experiments

CRISPR/Cas9 ist eine neuartige Methode zur Modifikation von DNA *in vivo* und *in vitro*, die erst seit 2013 im Labor Anwendung findet (Cong, Ran et al. 2013). Aufgrund der fehlenden Erfahrung im Laboralltag mit dem System sowie der geringen Effizienz genomischer Deletionen wurden unterschiedliche CRISPR-Konstrukt-Kombinationen designt und eingesetzt. Die vorhergesagte Effizienz der Erzeugung von Deletionen mit einer Größe von 1 Mb mit CRISPR beträgt ca. 1 % (Canver, Bauer et al. 2014). Es wurden daher drei Transfektionsansätze für die Generierung einer Deletion verwendet. Die Transfektionsansätze 1 und 2 enthielten jeweils zwei unterschiedliche CRISPR/Cas9-Konstrukte, die rechts und links vom *Epha4*-Lokus schneiden. Der dritte Transfektionsansatz enthielt vier CRISPR/Cas9-Konstrukte, sodass jeweils zwei spezifisch für die rechte und linke Seite vom *Epha4*-Lokus waren. Mit der Konstrukt-Kombination 1 konnte eine Deletion von 1,6 Mb mit einer Effizienz von 2 % erreicht werden. Die Konstrukte 2 und 3 erzeugten Deletionen mit einer Effizienz von 0,5 %. Durch den Einsatz mehrerer Konstrukte auf jeder Seite des *Epha4*-Lokus konnte keine erhöhte Effizienz erreicht werden. Eine Möglichkeit die Effizienz der Transfektion mit vier CRISPR-Konstrukten zu verbessern, wäre die eingesetzte Plasmidmenge zu reduzieren. Es wurden für das Konstrukt 3 jeweils 5 µg Plasmid-DNA verwendet, sodass die DNA-Gesamtmenge 20 µg betrug. Durch eine Anpassung der Plasmidkonzentration sowie die Verwendung einer alternativen Transfektionsstrategie wie der Elektroporation oder direkten Injektion in Zygoten kann möglicherweise eine Verbesserung der Effizienz von CRISPR erreicht werden. Eine weitere potenzielle Ursache für die unterschiedlichen Effizienzen ist die Zugänglichkeit der DNA innerhalb der CRISPR-Bindungssequenzen. Die Struktur von Chromosomen kann stark variieren.

Nukleosomen können unterschiedlich dicht gepackt sein und dadurch die Zugänglichkeit der DNA und die Bindung von CRISPR/Cas9-Komplexen beeinflussen. Mithilfe eines Hypersensitivitäts-Assays können offene DNA-Regionen (hypersensitive Regionen) ausfindig gemacht werden, da DNA hier zugänglich für den Verdau durch DNaseI ist. Die Daten aus dem Assay können schließlich in das Design der Guide-RNA eingebunden werden. Eine Alternative zur Erhöhung der CRISPR-Effizienz ist die Auswahl der Basensequenz GGG als PAM. Diese Sequenz führt zu einer höheren Bindungsfrequenz von Cas9 und somit zu einer Steigerung der DNA-Prozessierungsrate (Kuscu, Arslan et al. 2014).

Eine genaue Charakterisierung der Klone mit den CRISPR-Konstrukten 2 und 3 war nicht möglich. Nach einer weiteren Expansion der ES-Zellen und erneuter DNA-Isolation konnte keine Deletion mehr detektiert werden. Eine Erklärung für diesen Effekt ist, dass es sich bei diesen ES-Zellkolonien um gemischte Kolonien aus WT-Zellen und genmodifizierten Zellen handelt. Gemischte Kolonien können vorkommen, wenn WT-Zellen eine Antibiotikaselektion überleben, gemeinsam auf einer Platte mit transfizierten ES-Zellen weiterwachsen und anschließend gepickt werden. Bei einer Expansion der ES-Zellen nach der ersten Genotypisierung können die genmodifizierten Zellen von den WT-Zellen überwachsen werden, sodass diese nicht mehr detektierbar sind. Aufgrund dieses Effekts ist es wichtig, regelmäßig Genotypisierungen durchzuführen, um reine Zellkolonien zu gewährleisten. Außerdem muss beachtet werden, dass die Zellkolonien vereinzelt wachsen und eine Konfluenz von 70-80 % nicht übersteigen, da es sonst zu einer Vermischung der Kolonien kommt.

5.2 Schnittverhalten des CRISPR/Cas9-Systems

Der Vorteil des hier verwendeten Experimentendesigns ist, dass die Genotypisierung mit einer PCR-Reaktion erfolgen kann. Die gewählten Primer binden außerhalb der Bruchpunkte und nur im Falle einer Deletion ist ein Produkt zu erwarten. Dieses Verfahren ermöglicht ein schnelles Screening nach mehreren hundert Zellklonen gleichzeitig. Eine alternative Methode ist die Genotypisierung mittels Southern Blot, diese ist jedoch zeit- und materialaufwändig.

Die Auswertung der Sequenzierdaten der genmodifizierten ES-Zellklone hat ergeben, dass DSB im Durchschnitt ca. 6 nt vor PAM mit CRISPR erzeugt wurden. Dies steht im

Widerspruch zu der Literaturvorhersage, dass DSB in der Regel 3 nt vor der PAM-Sequenz generiert werden (Jinek, Jiang et al. 2014). Besonders auffällig ist, dass die Bruchstelle innerhalb der Protospacer der genomischen DNA zwischen 3 und 12 nt vor PAM liegt und damit deutlich variiert. Es ist die Tendenz erkennbar, dass DSB mit CRISPR bevorzugt in PAM-Nähe erzeugt werden, eine Aussage über das exakte Schneideverhalten kann aber nicht getroffen werden. In der genomischen DNA des ES-Zellklons G2 ist außerdem ein Indel vorhanden. Dies ist eine typische Folge der fehleranfälligen endogenen NHEJ-Reparatur. Eine Methode diesen Reparaturmechanismus zu umgehen ist der Einsatz von CRISPR-Nickasen, bei denen eines der zwei katalytischen Zentren der Cas9-Nuklease inhibiert ist.

Aufgrund der Tolerierbarkeit von Fehlpaarungen durch das CRISPR/Cas9-System innerhalb der Erkennungssequenz ist es erforderlich zu prüfen, ob DSB in möglichen Off-Target-Regionen generiert wurden. Bei Off-Targets kann es sich um Gene oder wichtige regulatorische Elemente handeln, deren Modifikation funktionelle Folgen mit sich bringen kann. Zur Untersuchung von Off-Target-Effekten eignet sich das T7-Endonuklease I Surveyor Assay. Die T7-Endonuklease I erkennt Watson-Crick-Basenfehlpaarungen, die ein mögliches Resultat des NHEJ darstellen, und schneidet die DNA an dieser Stelle. Die geschnittenen DNA-Fragmente können anschließend mit einer Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Eine Strategie zur Vermeidung von Off-Target-Effekten ist der Einsatz von Guide-RNAs, deren CG-Basengehalt 35 % nicht übersteigt. Ein höherer CG-Gehalt führt zu stabileren RNA-DNA-Hybriden und einer größeren Tolerierbarkeit von Fehlpaarungen (Lin, Cradick et al. 2014). Eine entscheidende Limitierung des CRISPR/Cas9-Systems ist die Abhängigkeit von der PAM-Sequenz NGG oder NAG. Dadurch ist es nicht möglich den Protospacer in der genomischen DNA frei auszuwählen, da dieser von PAM gefolgt werden muss. Um den Anwendungsbereich von CRISPR zu erweitern, ist es wichtig, mikrobielle CRISPR/Cas-Systeme weiter zu erforschen und neue Cas-Proteine mit weiteren Erkennungssequenzen zu ausfindig zu machen.

5.3 Erzeugung eines Mausmodells mit einer 1,6 Mb-Deletion im *Epha4*-Lokus

Mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems ist es möglich gewesen, innerhalb des limitierten Zeitraums für diese Arbeit transgene Mäuse mit einer genomischen Deletion von mehr als 1,6 Mb zu erzeugen. Die herkömmliche Methode zur Generierung transgener Tiere ist das *Cre/loxP*-System. Dieses geht mit aufwendigen Klonierungen und vielen Verpaarungen von Mauslinien einher und kann dadurch mehr als ein Jahr in Anspruch nehmen. Bei *Cre* handelt es sich um DNA-Rekombinasen, die die Spaltung und erneute Verknüpfung von DNA-Strängen katalysieren, *loxP* ist dabei die Erkennungssequenz. Für die Erzeugung einer Deletion müssen *loxP*-Sequenzen den zu entfernenden Bereich flankieren (Yu and Bradley 2001). Die Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems zur Erzeugung transgener Mäuse besteht im Wesentlichen aus den Schritten der Vektor-Klonierung, Bakterientransformation, ES-Zelltransfektion, Selektion und Aggregation, sodass bereits nach wenigen Monaten transgene Mauslinien hergestellt werden können. Mithilfe von CRISPR ist die erste Mausgeneration, die aus den genmodifizierten ES-Zellen generiert wurde, chimär für den gewünschten Genotyp. In der F1-Generation befinden sich heterozygote und in der F2-Generation homozygote Tiere, sofern der Genotyp nicht letal ist. Eine Charakterisierung der Maus-DNA aus der tetraploiden Aggregation hat gezeigt, dass die 1,6 Mb Deletion heterozygot ist. Auf dem zweiten Allel kam es außerdem zu einer weiteren Deletion von 545 bp als Folge einer DNA-Prozessierung durch die Guide-Sequenz R_1. Die Deletion befindet sich in einer Genwüste und betrifft keine Gene oder regulatorischen Elemente wie Transkriptionsfaktoren oder CTCF-Sites. Diese Deletion zeigt jedoch, dass die DNA-Prozessierung mit CRISPR ein fehleranfälliger Prozess ist und die Erzeugung eines einzelnen Doppelstrangbruchs unvorhersehbare Folgen haben kann.

Für eine mögliche medizinische Anwendung in der Gentherapie ist daher weitere Forschung und detaillierteres Wissen über den Mechanismus von CRISPR erforderlich.

5.4 Genomische 1,6 Mb-Inversion als Nebenprodukt

Neben der genomischen Deletion ist es gelungen, ES-Zellen mit einer Inversion von 1,6 Mb zu erzeugen. Die CRISPR-Effizienz für die Inversion ist mit 1,5 % vergleichbar mit

der Deletion, die 2 % betrug. Die Effizienz der genomischen Inversion von dieser Größe ist überraschend, da der Prozess einer solchen Modifikation komplizierter erscheint. Zunächst entsteht dabei eine 1,6 Mb Deletion als Folge von zwei DSB, daraufhin kommt es zu einer Neuorientierung des herausgeschnittenen DNA-Stranges sowie einer Neuverknüpfung der geschnittenen Enden. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt sowie die gute Effizienz ist das Vorliegen der genomischen DNA in einer Schleifenstruktur. Dadurch befinden sich die CRISPR-Bindungsstellen in räumlicher Nähe und eine Neuverknüpfung der Enden ist wahrscheinlich.

5.5 Die Hochregulierung der *Pax3*-Expression ist mit einem Fingerphänotyp assoziiert

Das Gen *PAX3* hat wichtige regulatorische Funktionen während der Embryonalentwicklung und ist außerdem die Ursache eines Extremitäten-Phänotyps beim Waardenburg-Syndrom. *PAX3* wurde daher als Kandidatengen für die Brachydaktylie der Patienten betrachtet und seine Expression im Mausmodell näher untersucht.

Die *In-situ*-Hybridisierung der Maus-Embryos mit der heterozygoten Deletion im *Epha4*-Lokus hat gezeigt, dass *Pax3* eine starke ektopische Expression im distalen Bereich der vorderen und hinteren Extremitätenknospe im Stadium E10,5 aufweist. Die neugeborenen transgenen Mäuse zeigen einen Fingerphänotyp mit einer deutlichen Verkürzung des zweiten Fingers. Die Brachydaktylie der transgenen Mäuse ähnelt somit stark dem Fingerphänotyp der Patienten, die Verkürzungen von Zeigefinger und Daumen aufweisen. Eine Verkürzung des Daumens wurde bei den transgenen Mäusen nicht beobachtet, der Daumen von Mäusen ist im Allgemeinen nur rudimentär ausgeprägt. Skelettfärbungen haben gezeigt, dass eine deutliche Verkürzung der intermedialen Phalange des zweiten Fingers und Zehs dem Phänotyp der Mäuse zugrunde liegt. Überraschenderweise ist bei diesen Mäusen sechs Wochen nach der Geburt kein Phänotyp mehr zu erkennen. μ -CT-Aufnahmen bestätigen, dass diese Mäuse keine Auffälligkeiten der Extremitäten sowie Phalangen mehr aufweisen. Eine mögliche Ursache für das Verschwinden des Phänotyps innerhalb des Wachstums ist, dass die erzeugte Deletion heterozygot ist und kompensatorische Effekte des zweiten Allels während der Entwicklung eintreten. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die

Deletion nur eine Verzögerung der Ossifikation und des Längenwachstums der Extremitäten hervorruft, die im späteren Stadium nicht mehr zu sehen ist. Daher ist es notwendig, die transgenen Mäuse weiter zu kreuzen, um homozygote Tiere für die Deletion des *Epha4*-Lokus zu erhalten. Die Vermutung liegt nahe, dass eine homozygote Deletion mit einem stärker ausgeprägten Fingerphänotyp verbunden ist, der während der Entwicklung nicht mehr kompensiert werden kann, da beide Allele betroffen sind.

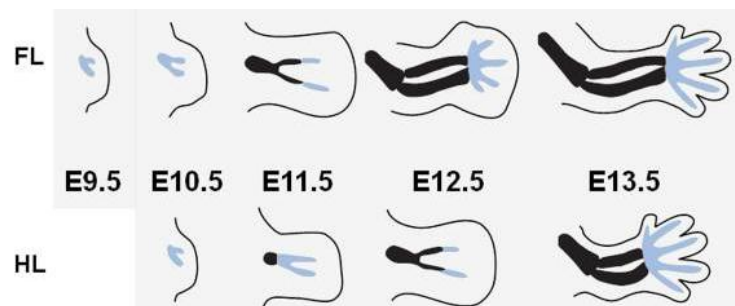


Abbildung 25 Schematische Darstellung der Extremitäten-Entwicklung der Maus

Dargestellt sind fünf Entwicklungsstadien der Vorder- (FL) und Hinterextremität (HL). Im embryonalen Stadium E9,5 kommt es zur Ausbildung der Extremitätenknospe aus den Mesenchymzellen (blau). Bis zum Stadium E13,5 kommt es zur Differenzierung von Stylopod (Oberarm/ -schenkel), Zeugopod (Unterarm/ -schenkel) und Autopod (Hand/ Fuß). Ab E11,5 bildet sich Knorpelgewebe (schwarz), bei E13,5 sind die Finger differenziert. Modifiziert nach Taher, Collette et al. (2011).

Eine genaue Aussage darüber, ob eine Hochregulierung der *Pax3*-Expression die Ursache des Phänotyps ist, kann noch nicht zweifelsfrei getroffen werden. Es ist sinnvoll, eine weitere *In-situ*-Hybridisierung für *Pax3* in dem Embryonalstadium E13,5 durchzuführen, um die *Pax3*-Expression in den Fingern zu untersuchen. Im Stadium E10,5 besteht die Extremitätenknospe aus Mesenchymzellen, die erst in den Folgetagen kondensieren und zu Muskel-, Nerven- und Knorpelgewebe der späteren Gliedmaßen differenzieren (siehe Abbildung 25). Wird *Pax3* in den Fingern der Mausembryos in dem Stadium E13,5 ebenfalls ektopisch exprimiert, so ist ein Zusammenhang mit einer Störung des Fingerwachstums wahrscheinlich.

5.6 **Pax3-Überexpression als Folge von Enhancer-Interaktionen**

Pax3 ist regulatorisch durch ein Isolator-Element von dem *Epha4*-Lokus abgegrenzt. Durch die Erzeugung einer genomischen Deletion von 1,6 Mb im *Epha4*-Lokus, wurde ein großer Teil dieser Region entfernt, einschließlich des *Epha4*-Gens und Isolators. Aufgrund der Deletion befindet sich das Gen *Pax3* nun in räumlicher Nähe zu dem extremitätenspezifischen Enhancer-Cluster. Die transgenen Mäuse zeigen zudem eine ektopische *Pax3*-Expression im distalen Bereich der Extremitätenknospe, bei Wildtyp-Mäusen hingegen wird *Pax3* nur im proximalen Bereich exprimiert. Eine mögliche Ursache der ektopischen *Pax3*-Genexpression ist eine Verschmelzung von zwei topologischen Domänen aufgrund der Entfernung des Isolators. Dieser erfüllte zuvor eine Barrierefunktion für die beiden topologischen Domänen sowie eine Enhancer-Blockierungsfunktion für *Pax3*. Als Folge der Verschmelzung der TADs kann es zu einer Interaktion von *Pax3* mit den extremitätenspezifischen Enhancern kommen, die mit einer Hochregulierung und ektopischen Expression von *Pax3* einhergeht.

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Enhancer-Wirkung auf *Pax3* ist die CRISPR-Interferenz (CRISPRi). Werden die beiden aktiven Zentren RuvC und HNH von Cas9 durch Mutationen inaktiviert, so verliert das Enzym seine Nuklease-Aktivität, bleibt jedoch in der Lage, DNA spezifisch zu binden (Jinek, Chylinski et al. 2012). Das katalytisch inaktivierte Protein dCas9 („dead“ Cas9) kann zur Untersuchung von Genregulation und –expression genutzt werden. Eine DNA-Bindung durch den dCas9-Komplex kann zur Stilllegung von Genen führen, da RNA-Polymerasen oder Transkriptionsfaktoren sterisch gehindert werden (Qi, Larson et al. 2013). Der Prozess ist ähnlich der RNA-Interferenz, es kommt jedoch nicht zu einer Degradierung des Genprodukts. Weiterhin kann dCas9 mit einer Effektor- oder Repressordomäne fusioniert werden, sodass eine Verstärkung oder Repression der Genaktivität erfolgt (Cheng, Wang et al. 2013, Gilbert, Larson et al. 2013). Durch eine Fusionierung von dCas9 mit dem extremitätenspezifischen Enhancer und eine anschließende Transfektion von ES-Zellen kann eine mögliche Hochregulierung von *Pax3* erzielt werden.

Eine Wechselwirkung von *Pax3* mit dem Enhancer-Cluster kann mithilfe eines 3C- oder 4C-Experiments näher untersucht werden. Der Vorteil des 4C-Experiments ist, dass nur ein Interaktionspartner festgelegt werden muss. So können alle regulatorischen Elemente auffindig gemacht werden, mit denen *Pax3* in den Extremitäten interagiert. 4C ist jedoch mit einer Fixierung der Zellen verbunden, eine detektierte Interaktion

stellt damit nur eine Momentaufnahme dar. Um die Interaktion von *Pax3* mit den Enhancern in lebenden Zellen zu untersuchen, ist es möglich, diese mit fluoreszenzmarkierten und katalytisch inaktivierten CRISPR/dCas9-Konstrukten zu transfizieren. Gewünschte DNA-Sequenzen werden im Genom durch die modifizierten CRISPR-Konstrukte spezifisch gebunden. Die Detektion der markierten dCas9-Proteine kann schließlich mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgen. Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzmarker ist es zudem möglich, mehrere Sequenzen innerhalb des Genoms gleichzeitig sichtbar zu machen, um eine Wechselwirkung mehrerer Interaktionspartner zu untersuchen. Der Vorteil gegenüber einer Fluoreszenz-*In-situ*-Hybridisierung ist hierbei, dass keine spezifischen Antikörper benötigt werden (Anton, Bultmann et al. 2014).

Zur weiteren Analyse der Struktur der topologischen Domänen im Bereich des *Epha4*-Lokus können die ES-Zellen mit der genomischen Inversion zur Generierung einer Mauslinie aggregiert werden. Erfüllt der Isolator eine Enhancer-Blockierungsfunktion, so ist eine normale *Pax3*-Expression und unauffällige Extremitätenentwicklung der transgenen Mäusen zu erwarten. Die Inversion führt nicht zu einem Verlust des Isolators, der sich weiterhin zwischen *Pax3* sowie dem Enhancer-Cluster befindet und diese voneinander abschirmt. Eine funktionelle Verschmelzung der TADs ist ebenfalls nicht zu erwarten, da der Isolator weiterhin eine Barriere darstellt. Mithilfe von CRISPR ist es außerdem möglich, nur das Isolator-Element, das den *Epha4*-Lokus von *Pax3* abgrenzt, zu entfernen. Somit kann ermittelt werden, ob der Isolator ausreicht, um die topologischen Domänen durch seine Barrierefunktion aufrecht zu halten. Das mögliche Resultat wäre eine Verschmelzung der topologischen Domänen oder der Erhalt der separaten regulatorischen Einheiten. Schließlich kann mit CRISPR ein Rescue-Experiment durchgeführt werden, indem CRISPR zur Erzeugung einer spezifischen DNA-Insertion eingesetzt wird (Matsunaga and Yamashita 2014). Es ist noch nicht genau geklärt, wie topologische Domänen organisiert sind und welche regulatorischen Elemente die Verantwortung für ihre Abgrenzung tragen. Durch eine Insertion des zuvor entfernten Isolators vor *Pax3* in den ES-Zellen mit der 1,6 Mb-Deletion ist eine erneute regulatorische Trennung der topologischen Domänen möglich. Dadurch kann die Wirkung der Enhancer auf *Pax3* unterbunden werden, sodass eine normale *Pax3*-Expression mit einer unauffälligen Extremitätenentwicklung die Folge wäre.

6. Zusammenfassung

CRISPR/Cas9 ist ein Bestandteil des mikrobiellen Immunsystems zur Abwehr von Fremd-DNA, das in der Lage ist, Ziel-DNA spezifisch zu binden und Doppelstrangbrüche zu erzeugen. Des Weiteren stellt es ein wirksames Werkzeug der Gentechnik zur DNA-Modifikation dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das CRISPR/Cas9-System im *Epha4*-Lokus von embryonalen Maus-Stammzellen angewandt. Brachydaktylie-Patienten, die an Finger-Verkürzungen leiden, haben eine genomische Deletion von mehr als 1,5 Mb in diesem Genlokus. Dieser bildet eine topologische Domäne, die von Isolator-Elementen begrenzt wird. In dem Lokus sind extremitätenspezifische Enhacer sowie das Gen *Epha4* vorhanden, das an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt ist. Stromaufwärts befindet sich in der benachbarten topologischen Domäne das Gen *Pax3*, das während der Embryonalentwicklung exprimiert und mit einem Fingerphänotyp beim Waardenburg-Syndrom assoziiert wird. Eine *Pax3*-Fehlregulierung wurde daher als mögliche Ursache der Brachydaktylie untersucht. Es wurde eine genomische Deletion im *Epha4*-Lokus von Maus ES-Zellen mit dem CRISPR/Cas9-System generiert, die der Deletion der Patienten entspricht. Mithilfe von Genotypisierungen konnten die ES-Zellklone mit einer erfolgten Deletion ermittelt werden. Neben genomischen Deletionen wurden zudem genomische Inversionen von 1,6 Mb als Nebenprodukt erhalten. Aus den ES-Zellen mit einer Deletion wurde anschließend eine Mauslinie generiert. Die Deletion eines Isolator-Elements im *Epha4*-Lokus kann zur Verschmelzung der zwei benachbarten topologischen Domänen führen, sodass *Pax3* in räumliche Nähe mit den extremitätenspezifischen Enhacern gelangt und mit ihnen interagiert. Mithilfe einer *In-situ*-Hybridisierung konnte eine ektopische *Pax3*-Expression in den Extremitätenknospen der Mausembryos detektiert werden. Die transgenen Mäuse zeigten einen Fingerphänotyp, der mit Skelettfärbungen und μ -CT-Aufnahmen weiter untersucht wurde.

Gegenstand dieser Arbeit war die Anwendung der Methode CRISPR/Cas9, um den Einfluss einer genomischen Deletion auf eine seltene Knochenfehlbildung zu untersuchen und damit einen Beitrag zum besseren Verständnis der Knochenentwicklung sowie Genregulation zu leisten.

7. Literaturverzeichnis

Anton, T., S. Bultmann, H. Leonhardt and Y. Markaki (2014). "Visualization of specific DNA sequences in living mouse embryonic stem cells with a programmable fluorescent CRISPR/Cas system." *Nucleus* 5(2): 163-172.

Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero and P. Horvath (2007). "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes." *Science* 315(5819): 1709-1712.

Bolotin, A., B. Quinquis, A. Sorokin and S. D. Ehrlich (2005). "Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin." *Microbiology* 151(Pt 8): 2551-2561.

Brouns, S. J., M. M. Jore, M. Lundgren, E. R. Westra, R. J. Slijkhuis, A. P. Snijders, M. J. Dickman, K. S. Makarova, E. V. Koonin and J. van der Oost (2008). "Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes." *Science* 321(5891): 960-964.

Butler, J. E. and J. T. Kadonaga (2002). "The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression." *Genes Dev* 16(20): 2583-2592.

Cahan, P., Y. Li, M. Izumi and T. A. Graubert (2009). "The impact of copy number variation on local gene expression in mouse hematopoietic stem and progenitor cells." *Nat Genet* 41(4): 430-437.

Canver, M. C., D. E. Bauer, A. Dass, Y. Y. Yien, J. Chung, T. Masuda, T. Maeda, B. H. Paw and S. H. Orkin (2014). "Characterization of Genomic Deletion Efficiency Mediated by Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats (CRISPR)/Cas9 Nuclease System in Mammalian Cells." *J Biol Chem* 289(31): 21312-21324.

Capecchi, M. R. (2005). "Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century." *Nat Rev Genet* 6(6): 507-512.

Chen, H., Y. Tian, W. Shu, X. Bo and S. Wang (2012). "Comprehensive identification and annotation of cell type-specific and ubiquitous CTCF-binding sites in the human genome." *PLoS One* 7(7): e41374.

Cheng, A. W., H. Wang, H. Yang, L. Shi, Y. Katz, T. W. Theunissen, S. Rangarajan, C. S. Shivalila, D. B. Dadon and R. Jaenisch (2013). "Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system." *Cell Res* 23(10): 1163-1171.

Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini and F. Zhang (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." *Science* 339(6121): 819-823.

Cui, X., D. Ji, D. A. Fisher, Y. Wu, D. M. Briner and E. J. Weinstein (2011). "Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases." *Nat Biotechnol* 29(1): 64-67.

Czerny, T., G. Schaffner and M. Busslinger (1993). "DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site." *Genes Dev* 7(10): 2048-2061.

Dahl, E., H. Koseki and R. Balling (1997). "Pax genes and organogenesis." *Bioessays* 19(9): 755-765.

Dekker, J. (2003). "A closer look at long-range chromosomal interactions." *Trends Biochem Sci* 28(6): 277-280.

- Dekker, J., K. Rippe, M. Dekker and N. Kleckner** (2002). "Capturing chromosome conformation." *Science* 295(5558): 1306-1311.
- Deltcheva, E., K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, M. R. Eckert, J. Vogel and E. Charpentier** (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." *Nature* 471(7340): 602-607.
- Deveau, H., R. Barrangou, J. E. Garneau, J. Labonte, C. Fremaux, P. Boyaval, D. A. Romero, P. Horvath and S. Moineau** (2008). "Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*." *J Bacteriol* 190(4): 1390-1400.
- Dianov, G. L. and U. Hubscher** (2013). "Mammalian base excision repair: the forgotten archangel." *Nucleic Acids Res* 41(6): 3483-3490.
- DiCarlo, J. E., J. E. Norville, P. Mali, X. Rios, J. Aach and G. M. Church** (2013). "Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems." *Nucleic Acids Res* 41(7): 4336-4343.
- Dixon, J. R., S. Selvaraj, F. Yue, A. Kim, Y. Li, Y. Shen, M. Hu, J. S. Liu and B. Ren** (2012). "Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions." *Nature* 485(7398): 376-380.
- Epstein, J. A.** (2000). "Pax3 and vertebrate development." *Methods Mol Biol* 137: 459-470.
- Feuk, L., A. R. Carson and S. W. Scherer** (2006). "Structural variation in the human genome." *Nat Rev Genet* 7(2): 85-97.
- Firth, H. V., S. M. Richards, A. P. Bevan, S. Clayton, M. Corpas, D. Rajan, S. Van Vooren, Y. Moreau, R. M. Pettett and N. P. Carter** (2009). "DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources." *Am J Hum Genet* 84(4): 524-533.
- Fu, Y., J. D. Sander, D. Reyon, V. M. Cascio and J. K. Joung** (2014). "Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs." *Nat Biotechnol* 32(3): 279-284.
- Garneau, J. E., M. E. Dupuis, M. Villion, D. A. Romero, R. Barrangou, P. Boyaval, C. Fremaux, P. Horvath, A. H. Magadan and S. Moineau** (2010). "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA." *Nature* 468(7320): 67-71.
- Gasiunas, G., R. Barrangou, P. Horvath and V. Siksnys** (2012). "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(39): E2579-2586.
- Gaszner, M. and G. Felsenfeld** (2006). "Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms." *Nat Rev Genet* 7(9): 703-713.
- Gilbert, L. A., M. H. Larson, L. Morsut, Z. Liu, G. A. Brar, S. E. Torres, N. Stern-Ginossar, O. Brandman, E. H. Whitehead, J. A. Doudna, W. A. Lim, J. S. Weissman and L. S. Qi** (2013). "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes." *Cell* 154(2): 442-451.
- Goodman, R. M., I. Lewithal, A. Solomon and D. Klein** (1982). "Upper limb involvement in the Klein-Waardenburg syndrome." *Am J Med Genet* 11(4): 425-433.
- Gratz, S. J., A. M. Cummings, J. N. Nguyen, D. C. Hamm, L. K. Donohue, M. M. Harrison, J. Wildonger and K. M. O'Connor-Giles** (2013). "Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease." *Genetics* 194(4): 1029-1035.

- Haft, D. H., J. Selengut, E. F. Mongodin and K. E. Nelson** (2005). "A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes." *PLoS Comput Biol* 1(6): e60.
- Haurwitz, R. E., M. Jinek, B. Wiedenheft, K. Zhou and J. A. Doudna** (2010). "Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease." *Science* 329(5997): 1355-1358.
- Heintzman, N. D., G. C. Hon, R. D. Hawkins, P. Kheradpour, A. Stark, L. F. Harp, Z. Ye, L. K. Lee, R. K. Stuart, C. W. Ching, K. A. Ching, J. E. Antosiewicz-Bourget, H. Liu, X. Zhang, R. D. Green, V. V. Lobanekov, R. Stewart, J. A. Thomson, G. E. Crawford, M. Kellis and B. Ren** (2009). "Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression." *Nature* 459(7243): 108-112.
- Horvath, P. and R. Barrangou** (2010). "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea." *Science* 327(5962): 167-170.
- Hoth, C. F., A. Milunsky, N. Lipsky, R. Sheffer, S. K. Clarren and C. T. Baldwin** (1993). "Mutations in the paired domain of the human PAX3 gene cause Klein-Waardenburg syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome type I (WS-I)." *Am J Hum Genet* 52(3): 455-462.
- Hou, C., H. Zhao, K. Tanimoto and A. Dean** (2008). "CTCF-dependent enhancer-blocking by alternative chromatin loop formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(51): 20398-20403.
- Hsu, P. D., D. A. Scott, J. A. Weinstein, F. A. Ran, S. Konermann, V. Agarwala, Y. Li, E. J. Fine, X. Wu, O. Shalem, T. J. Cradick, L. A. Marraffini, G. Bao and F. Zhang** (2013). "DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases." *Nat Biotechnol* 31(9): 827-832.
- Hwang, W. Y., Y. Fu, D. Reyon, M. L. Maeder, P. Kaini, J. D. Sander, J. K. Joung, R. T. Peterson and J. R. Yeh** (2013). "Heritable and precise zebrafish genome editing using a CRISPR-Cas system." *PLoS One* 8(7): e68708.
- Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura and A. Nakata** (1987). "Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product." *J Bacteriol* 169(12): 5429-5433.
- Jansen, R., J. D. Embden, W. Gaastra and L. M. Schouls** (2002). "Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes." *Mol Microbiol* 43(6): 1565-1575.
- Jiang, W., D. Bikard, D. Cox, F. Zhang and L. A. Marraffini** (2013). "RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems." *Nat Biotechnol* 31(3): 233-239.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna and E. Charpentier** (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." *Science* 337(6096): 816-821.
- Jinek, M., F. Jiang, D. W. Taylor, S. H. Sternberg, E. Kaya, E. Ma, C. Anders, M. Hauer, K. Zhou, S. Lin, M. Kaplan, A. T. Iavarone, E. Charpentier, E. Nogales and J. A. Doudna** (2014). "Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation." *Science* 343(6176): 1247997.
- Joung, J. K. and J. D. Sander** (2013). "TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(1): 49-55.
- Klenova, E. M., R. H. Nicolas, H. F. Paterson, A. F. Carne, C. M. Heath, G. H. Goodwin, P. E. Neiman and V. V. Lobanekov** (1993). "CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken *c-myc* gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms." *Mol Cell Biol* 13(12): 7612-7624.

- Kuscu, C., S. Arslan, R. Singh, J. Thorpe and M. Adli** (2014). "Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease." *Nat Biotechnol* 32(7): 677-683.
- Lee, C. and S. W. Scherer** (2010). "The clinical context of copy number variation in the human genome." *Expert Rev Mol Med* 12: e8.
- Lee, T. I. and R. A. Young** (2000). "Transcription of eukaryotic protein-coding genes." *Annu Rev Genet* 34: 77-137.
- Lettice, L. A., S. Daniels, E. Sweeney, S. Venkataraman, P. S. Devenney, P. Gautier, H. Morrison, J. Fantes, R. E. Hill and D. R. FitzPatrick** (2011). "Enhancer-adoption as a mechanism of human developmental disease." *Hum Mutat* 32(12): 1492-1499.
- Lieber, M. R.** (2008). "The mechanism of human nonhomologous DNA end joining." *J Biol Chem* 283(1): 1-5.
- Lieberman-Aiden, E., N. L. van Berkum, L. Williams, M. Imakaev, T. Ragoczy, A. Telling, I. Amit, B. R. Lajoie, P. J. Sabo, M. O. Dorschner, R. Sandstrom, B. Bernstein, M. A. Bender, M. Groudine, A. Gnirke, J. Stamatoyannopoulos, L. A. Mirny, E. S. Lander and J. Dekker** (2009). "Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome." *Science* 326(5950): 289-293.
- Lin, Y., T. J. Cradick, M. T. Brown, H. Deshmukh, P. Ranjan, N. Sarode, B. M. Wile, P. M. Vertino, F. J. Stewart and G. Bao** (2014). "CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences." *Nucleic Acids Res* 42(11): 7473-7485.
- Ling, J. Q., T. Li, J. F. Hu, T. H. Vu, H. L. Chen, X. W. Qiu, A. M. Cherry and A. R. Hoffman** (2006). "CTCF mediates interchromosomal colocalization between Igf2/H19 and Wsb1/Nf1." *Science* 312(5771): 269-272.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond** (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* 389(6648): 251-260.
- Makarova, K. S., D. H. Haft, R. Barrangou, S. J. Brouns, E. Charpentier, P. Horvath, S. Moineau, F. J. Mojica, Y. I. Wolf, A. F. Yakunin, J. van der Oost and E. V. Koonin** (2011). "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems." *Nat Rev Microbiol* 9(6): 467-477.
- Mali, P., J. Aach, P. B. Stranges, K. M. Esvelt, M. Moosburner, S. Kosuri, L. Yang and G. M. Church** (2013). "CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering." *Nat Biotechnol* 31(9): 833-838.
- Marraffini, L. A. and E. J. Sontheimer** (2008). "CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA." *Science* 322(5909): 1843-1845.
- Maston, G. A., S. K. Evans and M. R. Green** (2006). "Transcriptional regulatory elements in the human genome." *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7: 29-59.
- Matsunaga, T. and J. K. Yamashita** (2014). "Single-step generation of gene knockout-rescue system in pluripotent stem cells by promoter insertion with CRISPR/Cas9." *Biochem Biophys Res Commun* 444(2): 158-163.
- Mojica, F. J., C. Diez-Villasenor, J. Garcia-Martinez and E. Soria** (2005). "Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements." *J Mol Evol* 60(2): 174-182.

- Mojica, F. J., C. Diez-Villasenor, E. Soria and G. Juez** (2000). "Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria." *Mol Microbiol* 36(1): 244-246.
- Nora, E. P., B. R. Lajoie, E. G. Schulz, L. Giorgetti, I. Okamoto, N. Servant, T. Piolot, N. L. van Berkum, J. Meisig, J. Sedat, J. Gribnau, E. Barillot, N. Bluthgen, J. Dekker and E. Heard** (2012). "Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre." *Nature* 485(7398): 381-385.
- Ogbourne, S. and T. M. Antalis** (1998). "Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes." *Biochem J* 331 (Pt 1): 1-14.
- Qi, L. S., M. H. Larson, L. A. Gilbert, J. A. Doudna, J. S. Weissman, A. P. Arkin and W. A. Lim** (2013). "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression." *Cell* 152(5): 1173-1183.
- Ran, F. A., P. D. Hsu, C. Y. Lin, J. S. Gootenberg, S. Konermann, A. E. Trevino, D. A. Scott, A. Inoue, S. Matoba, Y. Zhang and F. Zhang** (2013). "Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity." *Cell* 154(6): 1380-1389.
- Reyon, D., M. L. Maeder, C. Khayter, S. Q. Tsai, J. E. Foley, J. D. Sander and J. K. Joung** (2013). "Engineering customized TALE nucleases (TALENs) and TALE transcription factors by fast ligation-based automatable solid-phase high-throughput (FLASH) assembly." *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 12: Unit 12 16.
- Sapranaukas, R., G. Gasiunas, C. Fremaux, R. Barrangou, P. Horvath and V. Siksnys** (2011). "The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res* 39(21): 9275-9282.
- Silva, G., L. Poirot, R. Galetto, J. Smith, G. Montoya, P. Duchateau and F. Paques** (2011). "Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy." *Curr Gene Ther* 11(1): 11-27.
- Taher, L., N. M. Collette, D. Muruges, E. Maxwell, I. Ovcharenko and G. G. Loots** (2011). "Global gene expression analysis of murine limb development." *PLoS One* 6(12): e28358.
- Tassabehji, M., A. P. Read, V. E. Newton, R. Harris, R. Balling, P. Gruss and T. Strachan** (1992). "Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene." *Nature* 355(6361): 635-636.
- Urnov, F. D., E. J. Rebar, M. C. Holmes, H. S. Zhang and P. D. Gregory** (2010). "Genome editing with engineered zinc finger nucleases." *Nat Rev Genet* 11(9): 636-646.
- Wang, H., H. Yang, C. S. Shivalila, M. M. Dawlaty, A. W. Cheng, F. Zhang and R. Jaenisch** (2013). "One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering." *Cell* 153(4): 910-918.
- Weischenfeldt, J., O. Symmons, F. Spitz and J. O. Korbil** (2013). "Phenotypic impact of genomic structural variation: insights from and for human disease." *Nat Rev Genet* 14(2): 125-138.
- Xiao, A., Z. Wang, Y. Hu, Y. Wu, Z. Luo, Z. Yang, Y. Zu, W. Li, P. Huang, X. Tong, Z. Zhu, S. Lin and B. Zhang** (2013). "Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish." *Nucleic Acids Res* 41(14): e141.
- Yu, Y. and A. Bradley** (2001). "Engineering chromosomal rearrangements in mice." *Nat Rev Genet* 2(10): 780-790.

Zhao, Z., G. Tavoosidana, M. Sjolinder, A. Gondor, P. Mariano, S. Wang, C. Kanduri, M. Lezcano, K. S. Sandhu, U. Singh, V. Pant, V. Tiwari, S. Kurukuti and R. Ohlsson (2006). "Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions." *Nat Genet* 38(11): 1341-1347.

Verzeichnisse

A Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
3C	Chromosome Conformation Capture
4C	Circularized Chromosome Conformation Capture
Abb.	Abbildung
ad	auf
bp	Basenpaare
ca.	circa
Cas	CRISPR-assoziierte Gene
Cascade	CRSIPR-associated complex for antiviral defence
Chr.	Chromosom
CNV	copy number variation/ Kopienanzahlvariation
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	CRISPR-RNA
CTCF	CCCT-Bindungsfaktor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	<i>aqua bidestillata</i> / zweifach destilliertes Wasser
Del	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpc	days post coitum
dpp	days post partum
DSB	Doppelstrangbruch
E	Embryonalstadium

Verzeichnisse

E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>Epha4</i>	Eph Rezeptor A4
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
et al.	et alteri
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
FL	Forelimb/ Vorderextremität
Fwd	Forward
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
h/Std	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O bidest	<i>aqua bidestillata</i> / zweifach destilliertes Wasser
HL	Hindlimb/ Hinterextremität
HR	Homologe Rekombination
ISH	<i>In-situ</i> -Hybridisierung
l	Liter
LB	Medium Luria Bertani Medium
Lif	Leukämiehemmender Faktor
M	Molar
MABT	maleic acid buffer containing Tween 20/ Maleinsäure mit Tween20
Mb	Megabasenpaare
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA/ Boten-RNA
NHEJ	Non-homologous end joining
nm	Nanometer
nt	Nukleotide

Verzeichnisse

Oligo	Oligonukleotid
PAM	Protospacer-adjacent Motif
<i>Pax3</i>	Paired Box 3
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
pH	potential Hydrogenii
pre-crRNA	precursor (Vorläufer) CRISPR-RNA
Rev	Reverse
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer/ RIPA Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate
Sek	Sekunde
sgRNA	Single Guide-RNA
SNP	single-nucleotide polymorphism / Einzelnukleotid-Polymorphismen
Sp	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SSC	Standart Saline Citrate
TAD	topologische Domäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (DNA-Polymerase)
TBST	Tris-buffered saline Tween 20
tracrRNA	transaktivierende CRISPR-RNA
Tris	Tri-Hydroxymethyl-aminoethan
Ü.N.	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp
ZFN	Zinkfinger-Nuklease
μ	Mikro

B Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Funktionsweise des mikrobiellen Abwehrsystems CRISPR/Cas9.....	2
Abbildung 2 Der CRISPR/Cas9-Ribonukleoproteinkomplex.....	4
Abbildung 3 Reparaturmechanismen von DNA-Doppelstrangbrüchen	5
Abbildung 4 ES-Zelltransfektion und direkte Zygoteninjektion.....	8
Abbildung 5 Cis-regulatorische Elemente der Genexpression	9
Abbildung 6 Chromosomale Organisation von topologischen Domänen	11
Abbildung 7 Skelettaler Aufbau der Hand und des Fußes eines Menschen	13
Abbildung 8 Der Extremitätenphänotyp der Patienten.....	14
Abbildung 9 Schematische Darstellung des EPHA4-Lokus (2q35 - 2q36.1).....	14
Abbildung 10 Verwendete Längenstandards	23
Abbildung 11 pX330-Vektor und das Guide-RNA-Insert.....	24
Abbildung 12 Guide RNA Design für den <i>Epha4</i> -Lokus	25
Abbildung 13 Enzymatischer Testverdau zur Überprüfung der pX330-Klonierung	41
Abbildung 14 Kolonie-PCR und Sequenzierung der klonierten Plasmide mit Insert	42
Abbildung 15 Genotypisierung von ES-Zell-Klonen mit einer Deletion im <i>Epha4</i> -Lokus	45
Abbildung 16 Genotypisierung des 2. Allels der ES-Zellklone mit einer Deletion	45
Abbildung 17 Genotypisierung von ES-Zell-Klonen mit einer Inversion	46
Abbildung 18 Untersuchung der Bruchpunkte der genomischen Inversion.....	47
Abbildung 19 Genotypisierung des 2. Allels von ES-Zell-Klonen mit einer Inversion.....	48
Abbildung 20 Hochregulierung der <i>Pax3</i> -Expression im transgenen Mausembryo	50
Abbildung 21 Verpaarungsschema der chimären Mäuse mit Wildtyp-Mäusen	51
Abbildung 22 Untersuchung des Extremitätenphänotyps transgener Mäuse 3,5 dpp.....	52
Abbildung 23 Skelett- und Knorpelfärbung der Extremitäten transgener Mäuse 3,5 dpp	53
Abbildung 24 μ -CT Aufnahmen der Extremitäten transgener Mäuse (6 Wochen alt)	54
Abbildung 25 Schematische Darstellung der Extremitäten-Entwicklung der Maus	60

C Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte	17
Tabelle 2 Zusammensetzung der allgemeinen Puffer und Lösungen	18
Tabelle 3 Zusammensetzung der Lösungen für die <i>In-Situ</i> Hybridisierung	18
Tabelle 4 Zusammensetzung der Färbelösungen	20
Tabelle 5 Verwendete Medien für die Stammzellkultur.....	20
Tabelle 6 Verwendete Reaktionssysteme.....	21
Tabelle 7 Verwendete Enzyme	21
Tabelle 8 Verwendete Computerprogramme.....	22
Tabelle 9 Verwendete Oligonukleotide für das Vektordesign für CRISPR	22
Tabelle 10 Genotypisierungs-Primer.....	23
Tabelle 11 Reaktionsansatz für den Testverdau	28
Tabelle 12 Pipettierschema für den Reaktionsansatz der Kolonie-PCR	29
Tabelle 13 Cyclerprogramm für die Kolonie-PCR.....	29
Tabelle 14 Pipettierschema für den Reaktionsansatz der Sequenzierung	31
Tabelle 15 Cycler-Programm für die Sequenzierungsreaktion	31
Tabelle 16 CRISPR-Konstrukte für die ES-Zelltransfektion.....	35
Tabelle 17 Messparameter der μ -CT Aufnahmen.....	40
Tabelle 18 CRISPR-Konstrukt-Kombinationen	43
Tabelle 19 Bruchpunkte der ES-Zellklone innerhalb der CRISPR-Bindungssequenzen.....	48

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Mundlos für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik in Berlin anfertigen zu dürfen.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Darío García Lupiáñez und Katerina Kraft für die intensive Betreuung im Labor, euren Ideenreichtum und die vielen konstruktiven Anregungen. Katerina, du hast mir die Welt der Stammzellkultur eröffnet, dir immer Zeit für mich genommen und entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Unsere Kaffeepausen werden mir fehlen.

Vielen herzlichen Dank an die gesamte AG Mundlos für die tolle Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die netten gemeinsamen Abende. Vielen Dank für die guten Ratschläge und die Unterstützung an Asita Stiege, Nicole Rösener, Norbert Brieske, Ivana Jerkovic, Dr. Daniel Ibrahim, Sinje Geuer, Anja Will, Bjørt Kragesteen, Dr. Francisca Martinez-Real, Martin Franke, Dr. Malte Spielmann, Izabela Harabula, Dr. Guillaume Andrey, Georgeta Leonte, Rieke Fischer, Arunima Murgai und Christina Paliou. Ich hätte mir keine bessere Arbeitsgruppe für diese Zeit wünschen können.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung und das Vertrauen bedanken, ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Freunden und natürlich meinem Freund für die moralische Unterstützung und schöne Zeit außerhalb des Instituts.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass ich die Arbeit weder in dieser noch in einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe.

Berlin, den 30.10.2014