

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin
III. Medizinische Klinik und Poliklinik (Nephrologie/ Rheumatologie/ Endokrinologie)

Prof. Dr. Tobias B. Huber

Generierung von NPR3-, MERTK- und ITM2B-Knockout-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Sina Wittösch
aus Glückstadt

Hamburg 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 02.05.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr Linda Diehl

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Florian Grahammer

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	8
1.1	Anatomie und Physiologie der Niere	8
1.1.1	Glomeruläre Filtration.....	8
1.1.2	Podozyten nehmen eine entscheidende Rolle in der Filtration ein	8
1.1.3	Die Schlitzmembran	9
1.1.4	Molekularer Aufbau der Schlitzmembran.....	9
1.1.5	Signalfunktion der Schlitzmembran	11
1.2	Auswirkungen von Gendefekten auf die Nierenfunktion.....	11
1.3	Wissenschaftliche Grundlagen.....	12
1.4	Aktueller Stand des Großprojektes	12
1.5	NPR3	13
1.5.1	Aufbau	13
1.5.2	Funktion.....	14
1.5.3	Relevanz.....	14
1.6	MERTK	14
1.6.1	Aufbau	14
1.6.2	Funktion.....	15
1.6.3	Relevanz.....	16
1.7	ITM2B	17
1.7.1	Aufbau	17
1.7.2	Funktion.....	17
1.7.3	ITM2B und seine Assoziation zu neurologischen Erkrankungen.....	18
1.7.4	Relevanz.....	18
1.8	Ziel des Projektes	19
1.9	CRISPR/Cas9-System	19
2.	Material und Methoden	21
2.1	Verbrauchsmaterialien, Chemikalien	21
2.2	Geräte	25
2.3	Zellkultur	27
2.3.1	Kultivierung von Zellen.....	27
2.3.1.1	Besonderheiten der Maus-Podozyten (undifferenzierter Status)	27
2.3.1.2	Besonderheiten der Maus-Podozyten (differenzierter Status)	27
2.3.1.3	Besonderheiten der humanen Podozyten.....	28
2.3.1.4	Besonderheiten der HEK-293 Zellen	28
2.3.2	Splitten von Zellen.....	28

2.3.3	Zellzahlbestimmung	29
2.3.4	Einfrieren von Zellen	29
2.3.5	Auftauen von Zellen	30
2.4	Design der gRNA für das CRISPR/ Cas9 Genome Editing.....	30
2.5	Klonierung der gRNA in den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector und Transformation von DH5 Competent Cells	31
2.5.1	Klonierung der gRNA in den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector.....	31
2.5.2	Transformation der DH5α™ Competent Cells.....	33
2.5.3	LB-Agarplatten mit 100µg/ml Ampicillin	33
2.6	Analyse der transformierten Bakterien.....	33
2.7	Vervielfältigung der DNA-Menge mittels Maxikultur und Maxiprep	34
2.8	Transfektionen der verschiedenen Zell-Typen	36
2.8.1	Etablierung der Transfektion von Maus-Podozyten	36
2.8.2	Etablierung der Transfektion von humanen Podozyten	38
2.8.3	Etablierung der Transfektion von HEK-Zellen	39
2.9	Auswahl funktionstüchtiger gRNAs mittels Restriktionsassay.....	39
2.9.1	DNA-Isolation für kleine Zellpellets	40
2.9.2	DNA-Isolation für große bzw. viele Zellpellets.....	40
2.9.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese	41
2.9.3.1	Liste der verwendeten Primer	43
2.9.4	Aufreinigung des PCR-Produktes.....	44
2.9.5	Restriktionsassay und Gelelektrophorese	45
2.9.5.1	Liste der verwendeten Restriktionsenzyme	47
2.10	FACS-Sorting transfizierter Zellen	48
2.11	Handling der Klone in 96-well-Platten.....	48
2.12	Genotypisierung der Klone mittels Restriktionsassay	49
2.12.1	DNA-Isolation der Zellen in 96-well-Plates	49
2.12.2	PCR.....	49
2.12.2.1	Liste der verwendeten Primer für Klonvalidierung	50
2.12.2.2	PCR-Protokolle	50
2.12.3	Restriktionsverdau.....	51
2.13	Genotypisierung der Klone mittels Sequenzierung.....	51
2.13.1	PCR.....	51
2.13.2	DNA-Isolation aus dem Gel.....	51
2.13.3	TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	52
2.14	Validierung der Klone auf Proteinebene: Western Blot	53
2.14.1	Proteinisolation und Messung der Proteinkonzentration.....	53

2.14.1.1	Bestandteile des 2x Laemmli.....	54
2.14.1.2	Messung der Proteinkonzentration.....	54
2.14.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE) und Western Blot.....	55
2.14.2.1	Liste der verwendeten Antikörper.....	56
2.15	Karyotypisierung von Zellen.....	57
2.16	Quantitative PCR.....	58
2.16.1	RNA-Isolation.....	58
2.16.2	Bildung von cDNA: Reverse Transkription.....	59
2.16.3	TaqMan® Gene Expression Assay.....	60
3.	Ergebnisse.....	61
3.1	NPR3.....	61
3.1.1	Design der gRNAs.....	61
3.1.2	Klonierung der gRNAs in den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector und Transformation von DH5 Competent Cells.....	61
3.1.3	Transfektion humaner Podozyten.....	62
3.1.4	Auswahl funktionstüchtiger gRNAs mittels Restriktionsassay.....	64
3.1.5	FACS-Sorting transfizierter Zellen.....	67
3.1.6	Mikroskopisches Screeningverfahren.....	68
3.1.7	Genotypisierung der Klone mittels Restriktionsassay.....	69
3.1.7.1	gRNA 3.....	70
3.1.7.2	gRNA 4.....	70
3.1.8	Genotypisierung der Kandidaten mittels Sequenzierung.....	71
3.1.8.1	Wildtyp-Kandidaten.....	71
3.1.8.2	Knockout-Kandidaten.....	73
3.1.9	Validierung der Klone auf Proteinebene: Western Blot.....	76
3.1.9.1	Karyotypisierung.....	77
3.1.9.2	Zusammenfassendes Ergebnis.....	78
3.2	MERTK.....	78
3.2.1	Design der gRNAs.....	78
3.2.2	Klonierung der gRNAs in den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector und Transformation von DH5 Competent Cells.....	79
3.2.3	Transfektion muriner Podozyten.....	79
3.2.4	Auswahl funktionstüchtiger gRNAs mittels Restriktionsassay.....	80
3.2.5	FACS-Sorting transfizierter Zellen.....	83
3.2.6	Mikroskopisches Screeningverfahren.....	83
3.2.7	Genotypisierung der Klone mittels Restriktionsassay.....	83

3.2.7.1	gRNA 2	84
3.2.7.2	gRNA 4	86
3.2.8	Genotypisierung der Kandidaten mittels Sequenzierung	87
3.2.8.1	Wildtyp-Kandidaten	87
3.2.8.2	Knockout-Kandidaten	91
3.2.9	Validierung der Klone auf Proteinebene: Western Blot.....	98
3.2.10	Quantitative PCR.....	98
3.2.11	Zusammenfassendes Ergebnis	99
3.3	ITM2B	100
3.3.1	Design der gRNAs.....	100
3.3.2	Klonierung der gRNAs in den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector und Transformation von DH5 Competent Cells.....	100
3.3.3	Transfektion humaner Podozyten	100
3.3.4	Auswahl funktionstüchtiger gRNAs mittels Restriktionsassay	101
3.3.5	FACS-Sorting transfizierter Zellen	101
3.3.6	Mikroskopisches Screeningverfahren.....	101
3.3.7	Genotypisierung der Klone mittels Restriktionsassay	102
3.3.8	Genotypisierung der Kandidaten mittels Sequenzierung	102
3.3.8.1	Wildtyp-Kandidaten	102
3.3.9	Validierung der Klone auf Proteinebene: Western Blot.....	105
3.3.10	Zusammenfassendes Ergebnis	106
4.	Diskussion	107
4.1	Einleitung	107
4.2	Alternative genome editing Strategien	107
4.2.1	Zink-Finger Nukleasen (ZFN)	107
4.2.2	TALENs	107
4.2.3	Meganukleasen	108
4.2.4	CRISPR/Cas9.....	108
4.3	Diskussion des Knockoutgenerierungsprozesses für NPR3	108
4.4	Diskussion des Knockoutgenerierungsprozesses für MERTK.....	112
4.5	Diskussion des Knockoutgenerierungsprozesses für ITM2B	115
4.6	Ausblick.....	116
5.	Zusammenfassung.....	117
6.	Referenzen.....	119
7.	Abkürzungsverzeichnis	127
8.	Abbildungsverzeichnis	129
9.	Lebenslauf	131

10.	Danksagung.....	132
11.	Eidesstattliche Versicherung	133

1. Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Niere

1.1.1 Glomeruläre Filtration

Mit 20% des Herz-Zeit-Volumens ist die Niere eines der am besten durchbluteten Organe des menschlichen Körpers (1,2). In den Glomeruli werden täglich 180 Liter Primärharn durch Ultrafiltration des Blutes gebildet und anschließend über die Bowman-Kapsel und den Harnpol in das Tubulussystem geleitet. Der Primärharn wird anschließend auf seinem Weg zur Blase durch Sekretions- und Rückresorptionsprozesse modifiziert bis schlussendlich der Endharn ausgeschieden werden kann. Auf diese Weise wird das Blut von harnpflichtigen Substanzen befreit, ohne jedoch Bestandteile, wie Zellen und Proteine, zu verlieren (3).

Die kleinste funktionelle Untereinheit der Niere – das Nephron – besteht aus einem Glomerulus und dem sich ihm anschließenden abführenden Tubulussystem, wobei der Filtrationsprozess im Glomerulus über die dreischichtige Filtrationsbarriere stattfindet (4). Die Kapillaren des gewundenen Gefäßknäuels sind mit einem fenestrierten Endothel ausgekleidet, das wiederum einer breiten glomerulären Basalmembran aufliegt. In den Kapselraum hineinragend liegt als viszerales Blatt der Bowman-Kapsel ein besonderer epithelialer Zelltyp den Kapillaren urineits auf (5,6). Die sogenannten Podozyten bilden das Herzstück der Filtrationsbarriere und spielen sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch eine entscheidende Rolle (7). Die besondere Architektur dieser dreischichtigen Barriere sorgt für die Bildung des Ultrafiltrats. Über Ladungs- und Größenselektivität werden Zellen, Makromoleküle und Proteine im Blut zurückgehalten, ohne dass es zu einer Verstopfung des Filters kommt (5,8–11).

Verliert die Niere jedoch ihre Funktion, ist dem in den meisten Fällen ein Funktionsverlust der Filtrationsbarriere vorausgegangen. Als klinisches Kennzeichen wird für gewöhnlich eine Albuminurie festgestellt (5).

1.1.2 Podozyten nehmen eine entscheidende Rolle in der Filtration ein

Eine Schlüsselrolle in der Filtration spielt der Podozyt. Dies ist eine hochdifferenzierte und in ihrer Beschaffenheit einzigartige Epithelzelle, die sich morphologisch in drei sowohl strukturelle als auch funktionelle Elemente unterteilt (10,12). So werden von einem voluminösen Zellkörper aus multiple primäre und sekundäre Ausläufer ausgesendet, die in Fußfortsätzen enden und so ein komplexes, Oktopus-artiges Netzwerk aufbauen (4,10,13,14). Häufig werden Podozyten mit Neuronen verglichen sowohl aufgrund ihrer ähnlichen Entwicklung als auch weil beide als postmitotische Zellen nur limitierte Möglichkeiten der Selbsterneuerung besitzen (12,13). Während der Entwicklung des Podozyten wandern die lateralen Zell-Zell-Kontakte nach unten und bilden zwischen den neu gebildeten Fußfortsätzen eine ganz besondere Form des interzellulären Kontaktes, die sogenannte Schlitzmembran (13). Warum die Fortsätze dabei nur mit Fußfortsätzen benachbarter Podozyten interagieren, ist bis heute nicht bekannt (15). Bildlich gesprochen umklammern die Podozyten mit ihren interdigitierenden Fußfortsätzen und der dazwischenliegenden Schlitzmembran die Kapillaren und sorgen durch diese einmalige drei-dimensionale Gestalt für das Zurückhalten von Proteinen, Makromolekülen und Zellen während der Filtration (4,5). Ein wichtiger Bestandteil der Fußfortsätze ist Aktin, im Gegensatz zu den primären und sekundären Ausläufern, deren Stabilität durch Mikrotubuli vermittelt wird (14,16). Für die Integrität und Funktion der Podozyten sind außerdem sowohl die Zell-Zell-Kontakte als auch die Zell-Matrix-Kontakte entscheidend (15). Die Adhäsion an die glomeruläre Basalmembran wird über eine Reihe von Rezeptoren vermittelt, unter

anderem Integrine, Syndecane und Dystroglycan, die ihrerseits alle mit Aktin interagieren können (17).

1.1.3 Die Schlitzmembran

Sowohl das Pronephros im Zebrafisch, die Nephrozyten in *Drosophila melanogaster*, als auch die Nieren von Säugetieren verfügen über diese einzigartige und im Tierreich stark konservierte Struktur – die Schlitzmembran (18). Sie bezeichnet die Gesamtheit, bestehend aus dem extrazellulären Raum zwischen interdigitierenden Podozyten-Fußfortsätzen und den diversen Molekülen, die diesen Spalt überbrücken und so einen äußerst besonderen Zell-Zell-Kontakt herstellen (5). Es ist keine andere Struktur im Körper bekannt, die auf diese Weise einen derartigen großen Spalt überbrückt (19). Über den konkreten Aufbau dieser besonderen Struktur wird seit Langem gerätselt. Als Pioniere in diesem Forschungsfeld konnten Rodewald und Karnovsky 1974 die erste genauere Beschreibung der Schlitzmembran liefern, die für ungefähr zwei Jahrzehnte Bestand hatte und als „zipper-like structure“ bezeichnet wurde (20). So ging man davon aus, dass Moleküle, ausgehend von der Zellmembran der Podozyten-Fußfortsätze, in die Mitte des interzellulären Spaltes ragten und dort durch eine Überlagerung zu einer verdichteten Mittellinienstruktur führten (21). Neuere Erkenntnisse gehen jedoch nicht mehr davon aus, dass es sich um ein solches Reißverschlussartiges und vor allem statisches Sieb mit einer passiven Funktion handelt, sondern beschreiben die Schlitzmembran vielmehr als eine flexible, sich an Umwelteinflüsse anpassende und aus vielen Schichten bestehende Barriere, die auch in Signaltransduktionsprozessen eine wichtige Rolle spielt (20,22). Jedoch sind bis heute die exakte molekulare Struktur und die Mechanismen, die Struktur und Funktion der Schlitzmembran regulieren, nicht vollends aufgedeckt (23).

1.1.4 Molekularer Aufbau der Schlitzmembran

Die molekulare Zusammensetzung der Schlitzmembran zeichnet sich vor allem durch eine Kombination verschiedenartiger, in ihrer Funktion noch nicht vollends entschlüsselter, interzellulärer Verbindungsproteine und Podozyten-spezifischer Moleküle aus, welche in ihrer Funktion die entscheidende Rolle einnehmen. So wurden Moleküle, die zur Gruppe der tight junctions gehören, wie beispielsweise Zonula occludens 1 oder Occludin entdeckt (20,24). Die Schlitzmembran exprimiert gleichzeitig auch Proteine, die in die Gruppe der Adherens junction einzuordnen sind. Als wichtige Vertreter dieses Zell-Zell-Kontaktes wurde P-Cadherin, verschiedene Unterarten der Catenin-Familie sowie Fat1 gefunden (25,26). Eine weitere Gruppe von Zellkontakten, die für interzelluläre Signalweitergabe notwendig ist, konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Connexin-43 als ein gap junction Protein zeigt sogar eine Hochregulation während podozytärer Stresssituationen (27). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es in Podozyten auch zu einer Expression von zuvor als Synapsen-spezifisch angesehenen Proteinen kommt. So wurde das Schlitzdiaphragma in dem Paper von M. Rastaldi et al. als eine synaptische Verbindung definiert (28). Viele dieser genannten Moleküle, wie bestimmte tight oder adherens junctions gehen eine Verbindung mit Nephrin ein (19). Das 1998 entdeckte Adhäsionsmolekül Nephrin gehört zu der Immunglobulin Superfamilie und wird den Podozyten-spezifischen Molekülen zugeordnet (20,29,30). Es zählt zu den wichtigsten Komponenten der Schlitzmembran und konnte als ursächlicher Gendefekt für das autosomal-rezessiv vererbte nephrotische Syndrom vom finnischen Typ identifiziert werden (31).

Es folgte die Entdeckung diverser anderer Proteine. Neph1 gilt darunter als weiterer strukturgebender Hauptbestandteil der Schlitzmembran, während hingegen die Rolle des intrazellulären Podocins noch nicht endgültig geklärt ist (32,33). Neph1 (nephrin-like protein 1) ist ein Typ 1 Transmembranprotein der Immunglobulin Superfamilie. Es konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen zu perinatalem Tod bei Mäusen führt, wodurch die funktionelle Wichtigkeit hervorgehoben wird (32). Neueren Erkenntnissen zufolge ist dies im menschlichen Organismus hingegen nicht letal (34). Die Bildung eines Komplexes aus Nephrin und Neph1 ist evolutionär stark konserviert (35). In der Schlitzmembran wurde jedoch deutlich häufiger die Verbindung zwischen zwei Nephrin- oder zwei Neph1-Molekülen gefunden, wobei das häufiger vorkommende Neph1 die schmalere Bereiche der Schlitzmembran überspannt (5,22). Durch Strukturanalyse wurde der IgG Domänen ähnliche Aufbau von Nephrin und seine Ähnlichkeit mit z.B. Titin oder Obscurin im Skelettmuskel erkannt. So könnten Neph1 und Nephrin als molekulare Federn funktionieren, vergleichbar mit Titin innerhalb der kontraktile Elemente der Skelettmuskulatur (22,36). Dies könnte ein weiterer Erklärungsansatz für die enorme Flexibilität und Anpassungsfähigkeit der Schlitzmembran sein.

Ebenfalls spezifisch für Podozyten gilt das zur Stomatin-Proteinfamilie gehörige Podocin, welches unter anderem über zytosolische Interaktion für die Rekrutierung Nephrins verantwortlich ist und somit ebenfalls essentiell für den Aufbau der Schlitzmembran ist (33,37). Vergleicht man die quantitative Expression in Maus-Podozyten, so kommen Podocin-Neph1-Nephrin in einem Verhältnis von ~ 10:2:1 vor (12). Die Bildung der ausgereiften Schlitzmembran mitsamt diesen Podozyten-spezifischen Molekülen wird erst in den späteren Stadien der Entwicklung des Glomerulums vorgenommen (38).

Insgesamt können diesen beschriebenen Molekülen bzw. Molekülgruppen zusammenfassend folgende Aufgaben zugeschrieben werden. Erstens sorgen sie für eine Verankerung des Filters an die glomeruläre Basalmembran und verbinden die Schlitzmembran darüber hinaus auch mit dem Aktin-Zytoskelett. Desweiteren ist es ihnen möglich die Plastizität der podozytären Fußfortsätze zu beeinflussen, denn sie sind Teil eines Signalkomplexes, der extrazelluläre und intrazelluläre Signale integriert und vermittelt. Der zuletzt beschriebene Punkt umfasst einen komplexen Aspekt der Schlitzmembran, der in jüngster Vergangenheit großes Interesse weckte. Ob sie auch als Filter für Makromoleküle dienen und somit die Ultrafiltration des Blutes ermöglichen, kann nicht mit vollständiger Gewissheit postuliert werden (19).

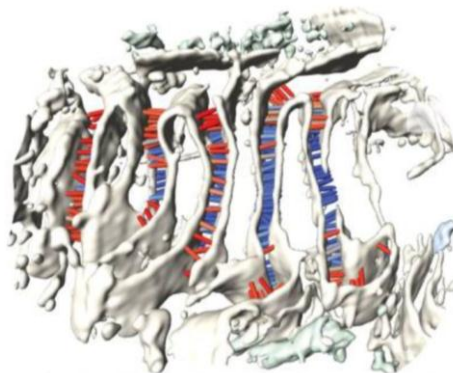


Abbildung 1: Die **Schlitzmembran**. Zwischen den interdigitierenden Fußfortsätze der Podozyten bildet sich ein Spalt, der in seiner morphologischen Gesamterscheinung mitsamt der ihn überbrückenden Molekülen als Schlitzmembran bezeichnet wird.

1.1.5 Signalfunktion der Schlitzmembran

Immer wieder wird sie als ein „signaling hub“ bezeichnet, wodurch schlussendlich die Vorstellung des starren, unflexiblen Siebes vollends verdrängt wurde (20). Heute weiß man, dass diese interzelluläre Verbindung aus einer heterogenen Gruppe von Molekülen eine einzigartige und vor allem dynamische Struktur ist, die für die Integrität der Filtrationsbarriere sorgt (20,39). Die Gesamtheit der Signalvorgänge können in drei Abschnitte unterteilt werden. Zunächst erreichen Signale von außen die Struktur, die dann innerhalb des Podozyten Effekte oder Signalkaskaden auslösen und schließlich den Podozyten in unterschiedlicher Form verlassen (19). Zusammenfassend werden Podozyten hauptsächlich drei unterschiedlichen Quellen von Reizen ausgesetzt. Zum einen erleben sie einen dauerhaften, aber variablen mechanischen Druck bedingt durch die Filtration. Den Einfluss dessen beschrieben Endlich et al. in ihrer Arbeit (40). Ihren Erkenntnissen zufolge kann zu hoher glomerulärer Druck in Form einer Hypertension eine Glomerulosklerose auslösen (40). Podocin gilt hierbei als der mögliche Rezeptor für mechanischen Stress (41). Als zweiter Punkt einkommender Signale wird die Architektur der Zellen per se genannt (19). Die hohe Polarität des Zellaufbaus der Podozyten muss sich zum einen zunächst entwickeln und anschließend muss die komplexe 3D Struktur aufrechterhalten werden. Dabei scheinen spezifische Moleküle, die auch eine Verbindung zur Schlitzmembran zeigen, den enormen Unterschied zwischen apikalen und basolateralen Anteilen aufzubauen (19). Der dritte Aspekt der einkommenden Signale ist die Exposition der Podozyten gegenüber parakrinen und autokrinen Hormonen, von denen dem VEGF-Signaling eine besonders wichtige Rolle zugeschrieben wird (42). Anschließend werden die Signale verarbeitet und weitergeleitet, wobei die Phosphorylierung von Nephrin einen fundamentalen Einfluss auf die Funktion und Erhaltung der Podozyten hat (19). So werden beispielsweise auch Interaktionen mit anderen Schlitzmembrankomponenten gestärkt (19). Effekte dieser Signalverarbeitung werden zum einen in der Modellierung des Aktinzytoskeletts beobachtet, welches zu großen Anteilen die Morphologie des Podozyten bestimmt und somit auch die Funktion des Glomerulums (19,43). Ein Beispiel hierfür ist die Phosphorylierung von Nephrin an Tyrosinresten und deren Verbindung mit Aktin, wodurch eine dauerhafte Kommunikation zwischen den extrazellulären Bestandteilen und dem Inneren der Podozytenfortsätze ermöglicht wird (5).

1.2 Auswirkungen von Gendefekten auf die Nierenfunktion

Wird die Bildung von Nephrin durch einen Gendefekt oder durch einen gezielten Knockout unterbunden, so geht die ursprüngliche Morphologie der Schlitzmembran verloren (44). Die Fußfortsätze der Podozyten verschwinden und anstelle des Schlitzdiaphragmas werden tight junctions gebildet (45). Ähnliche morphologische Veränderungen können auch beim Fehlen von Podocin oder Neph1 beobachtet werden (32,46,47). Dieser charakteristische Verlust der Fußfortsätze und somit auch der Schlitzmembran wird als „effacement“ bezeichnet und korreliert meist mit einem Einsetzen der Proteinurie (4). Dadurch wird noch einmal die wichtige Verbindung zwischen einem Funktionsverlust der Podozyten und der Zerstörung der Filtrationsbarriere mit folgender Proteinurie deutlich (7,19). Insgesamt wurden mittlerweile >50 Gene identifiziert, deren Mutationen eine fokal segmentale Glomerulosklerose oder ähnliche, mit einem nephrotischen klinischen Erscheinungsbild einhergehende Erkrankungen auslösen können (48). Zu einem Podozyten-Effacement kommt es aber nicht nur bei hereditären Erkrankungen, sondern auch bei unterschiedlichen Schädigungen oder Stresssituationen des

Podozyten (15). Gemeinsam ist allen Prozessen, dass es zu einem Verlust der typischen Struktur der Fußfortsätze kommt, was mit einer verminderten Filterfunktion als Folge einhergeht (15). Diese morphologische Veränderung wird unter anderem einem Zusammenbruch des Aktin-Zytoskelettes der Fußfortsätze zugeschrieben, was keinen passiven Prozess darstellt, sondern auf diversen und komplexen Signalvorgängen basiert (49). Wie bereits erwähnt, ermöglicht eine Phosphorylierung von Tyrosinresten des Nephrins eine Modifikation und Anpassung der Aktinstruktur in den Podozyten-Fortsätzen (50,51). Aber auch in anderen Signalkaskaden wird der Phosphorylierung von Thyrosin- oder Threoninresten des Nephrins eine wichtige Rolle zugeschrieben (5). Des Weiteren geht beim Effacement die Schlitzmembran als interpodozytärer Kontakt verloren und wird durch tight junctions ersetzt, um gesteigerte Adhäsionskräfte einem drohenden Zellverlust entgegenzustellen (52).

1.3 Wissenschaftliche Grundlagen

Die Hochregulation der Phosphorylierung von Tyrosinresten bei podozytärer Schädigung ist bekannt, jedoch ist noch unklar, welche Tyrosinkinase außer Src-Kinasen involviert sind (15). Auch die vollständige Entschlüsselung aller Schlitzmembrankomponenten ist noch nicht gelungen. Dies führte zu dem Projekt der Gruppe um Fakler und Grahammer in Freiburg.

Es besteht kein Zweifel darin, dass die Schlitzmembran ein zentraler Baustein im Filtrationsprozess ist. Versucht man jedoch ihre genaue Funktionsweise zu definieren, stößt man auf viele Unklarheiten und Kontroversen. Auch wenn einige Erkenntnisse über die molekularen Bestandteile und auch ihre strukturelle Beschaffenheit vorliegt, konnten bis heute die exakten Mechanismen der Signalvorgänge und deren Dynamik nicht eindeutig benannt werden und in ein vollständiges und zusammenhängendes Bild gebracht werden. Auch die funktionelle Bedeutung wirft weiterhin unbeantwortete Fragen auf. Da jedoch die meisten glomerulären Erkrankungen Einfluss auf die Schlitzmembran haben, ist das Wissen über deren molekulare Bestandteile sowie deren Funktion, die Grundlage, um podozytäre Pathomechanismen zu verstehen.

Um auf diese Fragen Antworten zu finden, wurde das im SFB 1140 KIDGEM geförderte Projekt ins Leben gerufen. Dabei dienen Nephrin, Neph1 und Podocin als Hauptbestandteile des Schlitzmembrangerüsts als Ausgangspunkt der proteomischen Analyse. Ziel des Projektes ist es, weitere relevante Protein-Protein-Interaktionen mit den drei Hauptbestandteilen aufzudecken, durch die der Aufbau und die Diversität der Schlitzmembran besser charakterisiert werden kann. Anschließend sollen diese Kandidaten genauer in *in-vitro* und *in-vivo* Experimenten charakterisiert werden und der Effekt eines Knockouts auf die Schlitzmembran analysiert werden. Dabei sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass identifizierte Kandidaten auch für hereditäre nephrotische Syndrome verantwortlich sein könnten.

1.4 Aktueller Stand des Großprojektes

Zur Identifikation des Interaktoms von Nephrin, Neph1 und Podocin wurden mittels einer Multiepitop und Knockout-kontrollierten Affinitätsreinigung Interaktoren isoliert und anschließend durch eine hochauflösende Massenspektrometrie definiert (53). Als Ausgangsmaterial dienten Membranpräparationen aus Rattenglomeruli. Die Antikörper richteten sich im ersten Schritt gegen Nephrin, Neph1 und Podocin und im zweiten reversen Schritt gegen die neu identifizierten Proteine. Als Negativ-Kontrolle wurden Mäuse mit einem Nephrin-/ Neph1- oder Podocin-Knockout verwendet. Das identifizierte Interaktom aus ungefähr 30 Proteinen enthielt unterschiedliche funktionelle Gruppen, wie eine Reihe von Signalproteinen sowie Struktur- und

Matrixproteinen, aber auch Proteine mit noch unbekannter Funktion. Insgesamt konnten einem Großteil der identifizierten Proteine keine bekannte Assoziation mit der Schlitzmembran zugeordnet werden. Trotz einiger Überlappungen zwischen den Proteomen der drei Kandidaten konnte ein hohes Maß an Spezifität festgestellt werden. Wie bereits zuvor beschrieben, wurden Nephrin, Neph1 und Podocin in jeder Kombination mit aufgereinigt, wodurch ihre starke Interaktion untereinander nochmals gezeigt werden konnte. Aus allen ermittelten Interaktoren rückten drei in ein näheres Interesse: MERTK, ANPRC und ITM2B wurden alle in hohem Maße in Kombination mit Nephrin, Neph1, sowie ITM2B auch in Kombination mit Podocin identifiziert. Aufgrund ihres unerwarteten Auftretens und ihrer bereits bekannten Funktionen und daraus ergebenden Mutmaßungen bezüglich glomerulärer Funktionen, sind sie in den Fokus zukünftiger Experimente gelangt. Für diese drei Kandidaten konnte bereits gezeigt werden, dass eine Expression in Podozyten vorliegt, die auch funktionelle Wichtigkeit besitzt. Mittels RNA mediertem Knockdown in Nephrozyten aus *Drosophila melanogaster*, wurde bei einem Knockdown eine verminderte Albuminaufnahme in den Nephrozyten beobachtet, was die funktionelle Relevanz von ANPRC, MERTK und ITM2B innerhalb der Schlitzmembran beweist.

1.5 NPR3

1.5.1 Aufbau

NPR3 gehört zur Familie der natriuretischen Peptidrezeptoren, von denen er der dritte von drei Rezeptoren für natriuretische Peptide ist. Als Synonyme werden auch die Namen ANPRC oder NPR-C verwendet, die als Abkürzung für atrial natriuretic peptide receptor C stehen und das Genprodukt beschreiben. Das humane Gen NPR3 mit 8 Exonen und 7 Intronen befindet sich auf Chromosom 5p13-14, während hingegen die murine Variante auf Chromosom 15 lokalisiert ist (54).

Alle Mitglieder der natriuretischen Peptidrezeptoren enthalten eine große extrazelluläre Domäne von ungefähr 450 Aminosäuren für die Ligandenbindung. In der Membran sind sie über eine 20 Aminosäuren lange einzelne Transmembrandomäne verankert. NPR1 und NPR2 weisen zusätzlich eine große intrazelluläre Domäne auf, bestehend aus einer kinase homology domain, einer Dimerisationsdomäne und einer C-terminalen Guanylatzyklase, wodurch folglich cGMP bei Aktivierung synthetisiert wird (55). NPR3 hingegen weist lediglich eine 37 Aminosäuren lange intrazelluläre Domäne auf, die keine Guanylatzyklaseaktivität beinhaltet, die anderen Domänen zeigen eine hohe Vergleichbarkeit zu NPR1 und NPR2 (55,56). Der NPR3-Rezeptor liegt als Dimer vor, der über Disulfidbrücken verbunden ist. Insgesamt ist das Protein 64-66 kDa groß (57). NPR3 ist der am weitesten verbreitete und am stärksten exprimierte Rezeptor für natriuretische Peptide und kommt in den Nebennieren, dem Gehirn und Herz, sowie der Niere, den Mesenterien und in der glatten Gefäßmuskulatur vor (54,56).

Ebenfalls in der Gruppe dieser Proteine befinden sich die sogenannten atrialen natriuretischen Peptide, zu denen die drei Hormone ANP, BNP und CNP zählen. Dabei wird ANP vor allem bei Dehnung des kardialen Vorhofs ausgeschüttet und wirkt anschließend auf endo- und parakrinem Weg als Blutdrucksenker und kardialer Hypertrophie entgegen. Auch BNP wird bei kardialen Stresssituationen wie Volumenbelastung transkribiert und freigesetzt und verhindert dabei lokal ventrikuläre Fibrose. Das dritte natriuretische Peptid unterscheidet sich ein wenig von den anderen, denn es spielt weniger in kardialen Zusammenhang eine Rolle, sondern in der endochondralen Ossifikation und stimuliert so das Wachstum der langen Knochen (55). Es wird aber auch in Endothelzellen exprimiert und kürzlich wurde ebenfalls eine kardiovaskuläre Aktivität beschrieben (58).

1.5.2 Funktion

Der erste Natriuretic Peptide Receptor (NPR-1) wird sowohl durch ANP als auch BNP aktiviert, wohingegen CNP den zweiten Natriuretic Peptide Receptor (NPR-2) aktiviert. Aufgrund der vorliegenden Guanylatzyklase löst eine Aktivierung die Synthese von cGMP aus, welches die meisten Effekte vermittelt. Im Gegensatz dazu steht das Genprodukt von NPR3, dessen Hauptfunktion die Entfernung der natriuretischen Peptide aus der Zirkulation mittels einer Rezeptor-medierten Internalisation und Degradation ist. Aus diesem Grund wird er auch als Clearance-Rezeptor bezeichnet. Somit ist er primär für die Kontrolle der Konzentration der natriuretischen Peptide verantwortlich (55). Ein Ligandenmolekül bindet stets zwei Rezeptormoleküle, wobei die Selektivität für die Liganden folgendermaßen aussieht: ANP > CNP ≥ BNP (55,59). Osteocrin, ein körpereigenes Protein, kann ebenfalls an den NPR-3 Rezeptor binden und konkurriert um die Bindungsstelle. So kann Osteocrin lokal das CNP-Level während kritischer Perioden der Knochenentwicklung steigern (60). Es konnten aber auch durch mehrere Forschungsgruppen Signalfunktionen festgestellt werden (55). Obwohl der Rezeptor keine enzymatische Aktivität aufweist, kann über ein inhibitorisches G-Protein (G_i) eine Hemmung der Adenylatzyklase hervorgerufen und die Phospholipase C aktiviert werden (57).

1.5.3 Relevanz

Insgesamt ist NPR3 am geringsten untersucht und es liegen nur wenige Untersuchungen vor, die einen renalen Einfluss postulieren. Hinzu kommt, dass die Liganden ANP, BNP und CNP sehr kleine Proteine (13-16 kDa) sind, die ungehindert die glomeruläre Filtrationsbarriere passieren können und so mit dem Rezeptor interagieren könnten. Dies macht den Rezeptor im Zusammenhang mit der starken Expression in der Schlitzmembran sehr interessant für weitere Nachforschungen.

1.6 MERTK

1.6.1 Aufbau

Das Gen MERTK codiert auf dem Chromosom 2 (2q13) die aus 19 kodierenden Exons bestehende Tyrosin-Protein-Kinase Mer. Das Enzym besteht aus 984 Aminosäuren und umfasst eine Größe von 109 kDa. Einzuordnen lässt sich Mer in die Gruppe der TAM-Rezeptoren, zu denen sowohl Tyro3 als auch Axl und Mer zählen (61). Dabei besteht die größte Ähnlichkeit zwischen Axl und Mer (62). Erste Analysen und Sequenzierung der cDNA von MERTK im Jahre 1994 ergab, dass c-Mer das zelluläre homologe Protoonkogen des viralen Onkogens v-ryk mit einer zu 83% übereinstimmenden Aminosäuresequenz ist (62). Exprimiert wird MERTK in einem weiten Spektrum von Zellen des Immunsystems, sowie in Pigmentepithelzellen der Retina als auch anderen Epithelzellen beispielsweise in den Reproduktionsorganen, der Lunge oder auch der Nieren (63). Kürzlich wurde gezeigt, dass in der Niere die Kinase vornehmlich auf glomerulären Endothelzellen exprimiert wird, wohingegen in vorherige Daten Immunfluoreszenzstainings MERTK sowohl in glomerulären Endothelzellen als auch Mesangialzellen lokalisierten (64,65). Posttranslational wird das Protein durch Autophosphorylierung, Glykosylierung und Ubiquitinierung modifiziert.

MERTK ist ein Transmembranprotein, das aus einem intra- und extrazellulären Anteil, sowie einer transmembranären Domäne besteht. Die verlängerte extrazelluläre Domäne enthält zwei Fibronectin- und zwei IgG-Domänen und weist somit eine ähnliche Topologie wie die Schlitzmembranproteine Nephrin und Nephr1

auf (31,66). Eine Einzel-Helix verbindet transmembranär den äußeren Anteil mit dem zytoplasmatischen Anteil, der als Tyrosinkinase eine enzymatische Aktivität besitzt (66). Bindet ein Ligand an die IgG-Domänen, so führt dies zu einer Dimerisierung und anschließender Aktivierung der Kinasefunktion (67). In vielen Zellen wird durch die Phosphorylierung der Phosphoinositol-3-Kinase/AKT-Weg aktiviert. Als mögliche Liganden konnten Gas6 und Protein S identifiziert werden, wobei Protein S die höhere Affinität zu MERTK aufweist (68–70).

1.6.2 Funktion

TAM-Rezeptoren gelten im adulten Gewebe als Homöostase-Regulatoren und spielen bei diversen zellbiologischen Prozessen, sowie organregulatorischen Vorgängen in unterschiedlichen Zusammenhängen eine wichtige Rolle.

Besonders hoch werden sie in vielen verschiedenen Immunzellen exprimiert, wodurch sich auch ihr großer Einfluss auf das Immunsystem erklären lässt. So agieren sie als pleiotrope Inhibitoren der angeborenen Immunantwort gegen Pathogene (71). MERTK im Speziellen verringert renale Inflammation, indem die Immunantwort über Toll-like-Rezeptoren gehemmt wird. Dieser Prozess wird über eine Aktivierung von STAT1 ausgelöst, wodurch die Produktion von SOCS1 und SOCS3 induziert wird, die wiederum als Suppressoren der Zytokin-Signalübertragung agieren (64). Auch Makrophagen beeinflusst Mer auf eine inhibitorische Weise. Durch die Aktivierung des Rezeptors wird ein hemmender Signalweg in Makrophagen ausgelöst, der die TNF-Alpha-Produktion über eine Blockade des Transkriptionsfaktors NFκB reguliert. Dies führt bei supprimiertem MERTK zu einer vermehrten TNF-Alpha-Produktion in entzündetem Gewebe (72).

Eine weitere zentrale Funktion von MERTK ist die Phagozytose von apoptotischen Zellen und Membranen in Geweben. Um diesen Prozess effizient durchzuführen, ist das Protein essentiell (71,73). Die Liganden Gas6 und Pros1 (Protein S) dienen hierbei als Bindeglied. Das auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen exprimierte Apoptosesignal Phosphatidylserin (PtdSer) bindet an Gas6 oder Pros1, das wiederum an den entsprechenden TAM-Rezeptor bindet. Dabei sind Mer und Axl von besonderer Bedeutung (74). Dieser Prozess spielt allgegenwärtig und dauerhaft eine große Rolle. Ein wichtiges Beispiel ist die erbliche Erkrankung Retinitis pigmentosa, die durch eine Mutation im MERTK-Gen verursacht wird und zu einer Netzhautdegeneration führt (75,76). Mittlerweile sind 79 verschiedene Mutationsvarianten bekannt (77). Patienten werden zunächst mit normaler Retina geboren, verlieren aber bis ca. zwei Monate nach der Geburt nahezu alle Photorezeptoren aufgrund der fehlenden Phagozytosefunktion des Retinaepithels, die im Normalfall über Mer vermittelt wird (78). Doch auch in anderen Zusammenhängen ist die Phagozytose von apoptotischen Zellen sehr relevant. Nach Inflammationsprozessen muss eine hohe Anzahl apoptotischer Zellen wieder entfernt werden, um die Entzündungsreaktion vollständig zu beenden. Dies betrifft vor allem die hohe Anzahl von Granulozyten und Lymphozyten, die zuvor ins Gewebe eingewandert sind (79). Auch im zentralen Nervensystem konnte die Wichtigkeit der phagozytischen Funktion von MERTK gezeigt werden. So wurde in Astrozyten der MERTK-Signalweg nachgewiesen, der zu einer Elimination von Synapsen führt und damit die neuronale Aktivität entscheidend mit beeinflusst (80). Ebenso konnte die Regulation der nicht-entzündlichen Clearance von toten Nervenzellen in Mikroglia-Zellen den TAM-Rezeptoren zugeschrieben werden. Dabei zeigten Mer- und Axl-defiziente Mäuse Akkumulationen von apoptotischen Zellen im ZNS (81).

Findet die Phagozytose nicht vollständig statt, kommt es zu einer Ansammlung von nekrotischen Zellen. Dies kann als Quelle für Autoantigene dienen und liefert somit

einen Erklärungsansatz für die Entstehung von autoimmunen Erkrankungen (82). Somit wurde eine Verbindung zu den TAM-Rezeptoren erstellt, denn ein Mangel im Signaling dieser kann in der Pathogenese chronischer Inflammation und Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielen (71). In der Arbeit von Lu et al. konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einem dreifachen Knockout aller drei TAM-Rezeptoren lebensfähig sind und in den ersten 2-3 Wochen nach der Geburt noch keinerlei Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp-Vergleich zeigten (83). Jedoch entwickelten sie im Verlauf das klinische Erscheinungsbild von Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus Erythematoses (SLE) und der Rheumatoiden Arthritis. Die Mäuse zeigten geschwollene Gelenke, IgG Ablagerungen in der Niere und anderen Geweben, Splenomegalie, Lymphadenopathie, erhöhte Spiegel an Antikörpern gegen beispielsweise Doppelstrang-DNA oder Phospholipide (84). Aber auch der einzelne Mer-Mangel ist ausreichend, um Autoimmunerkrankungen auszulösen (85). In unterschiedlichen Veröffentlichungen konnte auch der Einfluss von MERTK in der Niere gezeigt werden. Werden Mäuse mit nephrotoxischem Serum zur Induktion einer Nephritis behandelt, so war ein Mer-Mangel oder kompletter Knockout mit einer gesteigerten renalen Inflammation assoziiert, beziehungsweise scheint MERTK die Symptome einer mit nephrotoxischem Serum induzierten Nephritis zu verbessern (64,65,86). Patienten mit einem systemischen Lupus Erythematoses zeigten signifikant höhere Plasma-Level von sMer, sAxl und GAS6, wenn sie eine Lupusnephritis vorwiesen (87). In der Studie von Wu et al. gingen die Autoren sogar so weit, dass sie die Plasmakonzentrationen von sMer als Maß für die Krankheitsaktivität eines SLE betrachten (88). Auch bei einer diabetischen Nephropathie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer Makroalbuminurie höhere Werte an Mer im Blut und Urin aufwiesen als Patienten mit diabetischer Nephropathie aber einer Normoalbuminurie. Dies war die erste Studie, die zeigte, dass lösliche TAM Rezeptoren in den Urin ausgeschieden werden und die Nieren als Quelle dieser gesehen werden können (61).

Die eine Seite des Spektrums sind die beschriebenen autoimmunen Erscheinungsbilder, doch die Tam-Rezeptoren zeigen auch eine Assoziation mit der anderen Seite des Spektrums, den proliferativen Erkrankungen. Die Verbindung der TAM-Rezeptoren zum Krebs ist seit den 90er Jahren bekannt (62,89). In unterschiedlichen Krebsarten wie Leukämien, dem kolorektalem Karzinom oder auch dem Brustkrebs wurde eine Überexpression oder Hochregulation der TAM-Rezeptoren als auch Gas6 entdeckt. Zudem zeigt eine erhöhte Aktivität im TAM-Signaling eine starke Assoziation mit dem Voranschreiten einer Krebserkrankung, Metastasierung und Therapieresistenz (71).

1.6.3 Relevanz

Die pathogenetische Bedeutung von MERTK ist unumstritten und es ist deutlich geworden, dass das Protein in vielen Prozessen und Vorgängen Einfluss nimmt. So ist eine Assoziation zwischen MERTK und dem SLE vorhanden und könnte möglicherweise als Teil der Pathogenese einer Lupusnephritis gesehen werden (90). So bleibt auch weiterhin die genaue Verbindung zwischen dem beschriebenen Phänotyp und der podozytenspezifischen Funktion als Teil der Schlitzmembran unklar. Auch wird das weitere Interesse dadurch geweckt, dass MERTK eine Tyrosinkinase ist und die Tyrosinphosphorylierung als ein sehr wichtiger Vorgang in der Podozytenhomöostase identifiziert worden ist, jedoch wurde eine mögliche Beteiligung von MERTK in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht. Auch rückte Mer ins Interesse für die Entwicklung neuer antiinflammatorischer

Therapieansätze. Glucocorticoide wirken antiinflammatorisch aufgrund einer Verstärkung des Signalweges über TAM-Rezeptoren durch eine Hochregulation von Mer (91,92). Es stellt sich somit die Frage, ob dies als mögliches neues therapeutisches Ziel bei Autoimmunerkrankungen genutzt werden könnte.

1.7 ITM2B

1.7.1 Aufbau

Das Integral Membrane Protein 2B, auch ITM2B, kodiert auf dem langen Arm des Chromosom 13 (genauer 13q14.2) für das 266 Aminosäuren lange Protein BRI2 oder auch BRI (93,94). Es gehört einer evolutionär stark konservierten Multigen-Familie an und wird vor allem ubiquitär im Gehirn exprimiert (95). Dort ist es sowohl in der grauen als auch weißen Substanz zu finden und wurde als Bestandteil bestimmter Populationen von metabotropen GABA_B Rezeptoren im Säugetiergehirn gefunden (93,96). Aber auch in peripheren Organen wie dem Pankreas, in Herz, Niere und Leber oder auch in der Plazenta konnte das Protein nachgewiesen werden (97). Es handelt sich um ein integrales Typ II Transmembranprotein mit einer einzelnen transmembranären Domäne zwischen Aminosäure 52 und 74 (95). Es schließen sich ein kurzer intrazellulärer N-Terminus und ein verlängerter extrazellulärer C-Terminus an. Neben der transmembranären Domäne beinhaltet das Protein auch eine BRICHOS-Domäne, eine N-Glykosylierungsstelle am Asparagin und eine Konsensussequenz für proteolytische Prozessierung durch Furin oder das Furin-like Enzyme (95,98). Die BRICHOS-Domäne ist eine 100 Aminosäure lange und in unterschiedlichen Proteinen vorkommende Sequenz, die als Chaperon agiert (98).

BRI2 wird posttranslational in mehreren Schritten prozessiert. Zunächst wird das aus 23 Aminosäuren bestehende C-terminale BRI23-Peptid und die entsprechende Konsensussequenz für Furin und Furin-like Proteasen abgespalten (94). Membranständig verbleibt das mature BRI2 (mBRI2), das wiederum ihren extrazellulären Anteil, die BRICHOS-Domäne, mit Hilfe der Protease ADAM10 in den Extrazellulärraum freisetzt. Dieser Anteil wird als BRI2C (soluble Form) bezeichnet (99). Schlussendlich schneidet die Protease SPPL2B (Signal peptide peptidase-like 2B) das verbliebene mBri2 innerhalb der Membran, wodurch folgende zwei Produkte in das Zytosol abgegeben werden: das C-peptide und die BRI2 intrazelluläre Domäne (= BRI2 ICD) (100,101).

1.7.2 Funktion

Die zelluläre Funktion von ITM2B ist noch nicht vollends und präzise entschlüsselt worden und nur einzelne Bausteine sind bekannt (97). Es wird ITM2B eine beeinflussende Rolle beim Auswachsen von Neuriten zugeschrieben, die über Phosphorylierungen gesteuert wird (97). Eine sehr interessante Interaktion geht ITM2B mit dem Amyloid-Beta A4 Precursor Protein (APP) ein. Dabei nimmt ITM2B eine regulatorische Rolle in dessen Prozessierung ein und beeinflusst inhibitorisch die Peptidaggregation eines Spaltproduktes und ist somit ein Bestandteil der Pathophysiologie der Alzheimer-Erkrankung (102).

APP ist ein Typ-I-Transmembranprotein und wird ubiquitär in menschlichem Gewebe exprimiert, vor allem jedoch im zentralen Nervensystem, wo es in der neuronalen Differenzierung, Neurogenese, in synaptischen Funktionen, Apoptose und Zellproliferation involviert ist (103,104). Posttranslational wird APP durch unterschiedliche Sekretasen gespalten (95). Die β -Sekretase setzt die APP Ektodomäne (sAPP β) frei und das Membran-gebundene 99 Aminosäuren lange Fragment (C99) bleibt zurück (105). Anschließend wird der C99-Anteil von der γ -Sekretase mittels intramembranöser Proteolyse in zwei Peptide geteilt. Es entsteht

das Amyloid beta Peptid und die APP intracellular Domain (AID/ AICD). Letztere ist ein Regulator des Zelltods, der Gentranskription und der Calcium Homöostase (105). Das Amyloid Beta Peptid kommt in zwei unterschiedlichen Formen unterschiedlicher Länge vor, mit einmal 40 Aminosäuren (Amyloid-beta protein 40) und 42 Aminosäuren (Amyloid-beta protein 42) (95,105). Alternativ können auch α -Sekretasen APP innerhalb der Amyloid beta Sequenz schneiden und lösliches APP α (sAPP α) produzieren sowie ein Membran-gebundenes C83 Fragment (106). Amyloid Beta ist in der Vergangenheit sehr in den Fokus der Alzheimer-Forschung gerückt, denn charakteristisch für die Erkrankung sind Amyloid-Ablagerungen, die hauptsächlich durch Amyloid-Beta Protein 42 gebildet werden (95,105). Es konnte in vitro gezeigt werden, dass die Bildung solcher pathogener Oligomere Langzeitpotenzierung inhibiert, für Fehlfunktionen von Synapsen sorgt und sowohl dendritische Spines schädigt als auch zum Absterben von Neuronen führt (107). ITM2B gilt im Allgemeinen als ein Inhibitor der Amyloid-Beta-Peptidaggregation und Ablagerung in Fibrillen durch eine Interaktion mit APP (102). Der inhibitorische Effekt wird über eine Blockierung der Schnittstellen der APP-prozessierenden Sekretasen erreicht (108). Bei der Interaktion zwischen ITM2B und APP sind jeweils die transmembranen Regionen involviert, wohingegen die BRICHOS-Domäne als „Anti-Amyloid“ Chaperone Domäne bezeichnet wird und die Amyloid-Beta 40 und -42 Fibrillenformation in vitro inhibiert (95,102).

1.7.3 ITM2B und seine Assoziation zu neurologischen Erkrankungen

Deutlich seltener als sporadische Alzheimer Erkrankungen sind familiäre Formen der Demenz, die durch Genmutationen ausgelöst werden und in früherem Lebensalter einsetzen. Sowohl ITM2B als auch APP co-lokalisieren mit Amyloid-Beta Läsionen in sporadischer Alzheimer Erkrankung und eine Mutationen in ihren Genen löst familiäre Formen der Demenz aus (95). 1999 konnte gezeigt werden, dass die neurodegenerative Erkrankung Familial British Dementia (FBD) durch eine Mutation im ITM2B Gen ausgelöst wird. Eine einzelne Basensubstitution im BRI2 Gen sorgt dafür, dass die Aminosäure Arginin das Stopcodon ersetzt und das Leseraster somit für weitere 33 Basenpaare offen bleibt (93). Das um elf Aminosäuren verlängerte BRI2 Protein entsteht. Ein vergleichbarer Gendefekt liegt der Familial Danish Dementia (FDD) zugrunde. Eine Insertion sorgt für einen Frameshift im ITM2B-Gen und ein um die gleiche Aminosäureanzahl verlängertes Protein von 277, anstelle von 266 Aminosäuren, entsteht (109). Beide verlängerten Translationsprodukte können weiterhin an der Furin-Prozessierungsstelle geschnitten werden, wodurch ein 34 Aminosäuren langes Peptid jeweils entsteht, das jedoch unterschiedliche Sequenzen in den zwei unterschiedlichen Formen der Demenz aufweist (Abri in FBD und ADan in FDD). Dieses akkumuliert anschließend in Amyloid-Plaques im Gehirn und sorgt für die neurologische Symptomatik (93,109).

1.7.4 Relevanz

In der frühen renalen Entwicklung, wenn das metanephrische Mesenchym sich ausbildet, konnte eine Expression von ITM2B beobachtet werden (110). Doch trotz dieser bekannten Expression in der Niere sowie der klaren Assoziation des ITM2B-Gens mit bestimmten Erkrankungen, wurde bis heute noch kein renaler Phänotyp berichtet. Dies macht es zu einem interessanten Target aktueller Forschung.

Welche genaue nephrologische Rolle ITM2B einnimmt, bleibt weiterhin ungeklärt. In der nicht prozessierten Form könnte ITM2B in der Stabilisierung und Organisation makromolekularer Proteinkomplexe von Wichtigkeit sein. Ebenso liegen keine Daten

dazu vor, ob die Erkenntnisse über bekannte Funktionen im neurologischen System auf die Nieren übertragbar sind oder nicht.

1.8 Ziel des Projektes

Steigende Prävalenz der chronischen Nierenerkrankung und die Tatsache, dass die Ursache der meisten Fälle von terminaler Niereninsuffizienz in glomerulären Erkrankungen begründet liegt, machen die Forschung immer unentbehrlicher (19). Mittlerweile sind bereits 15% der Amerikaner von einer chronischen Nierenerkrankung betroffen und weltweit ungefähr jeder 10. Bürger, was das Gesundheitssystem vor allem langfristig vor enorme Kosten und Hürden stellen wird (111,112). Es ist unumstritten, dass die Schlitzmembran eine Schlüsselfunktion in der Funktionsfähigkeit der Niere besitzt und somit auch stets potenziell Ziel von Medikamenten sein könnte (5). Doch trotz jahrelanger Forschung konnte der exakte Aufbau der Schlitzmembran noch immer nicht bis ins letzte Detail entschlüsselt werden (19). In vorangegangenen Projekten wurden die drei genauer beschriebenen Proteine MERTK, ITM2B und ANPRC als potenzielle Kandidaten wichtiger Funktionen herausgefiltert. Nun soll ihre Funktion und Rolle in der Podozyten- und Schlitzmembranbiologie genauer identifiziert werden. Dazu soll im ersten Schritt ein durch CRISPR/Cas9 medierter Knockout in Zellkultur-Podozyten vollzogen werden, um die Effekte auf die Zellbiologie genauer zu untersuchen.

1.9 CRISPR/Cas9-System

Die Abkürzung CRISPR steht für „clustered regularly interspaced palindromic repeats“ und Cas9 für “CRISPR associated protein 9”. Es beschreibt eine Technologie, welche ermöglicht, Veränderungen am Genom vorzunehmen (113). Ursprünglich stammt das System aus der Immunitätsbildung in Bakterien, wird jedoch mittlerweile auch als ein Tool in der Wissenschaft verwendet. Das System wurde erstmals im Jahre 1987 im *E. coli* Bakterium beschrieben und ist Teil des prokaryotischen adaptiven Immunsystems (114). Nach und nach wurde dieses Prinzip auch in anderen Bakterien und in Archaeen entdeckt (115). Mittlerweile geht man davon aus, dass das CRISPR/Cas System in fast 40% der sequenzierten Bakterien und in fast 90% der sequenzierten Archaeen Genome vorliegt (116). Der CRISPR Locus besteht aus sich wiederholenden palindromischen Sequenzen, die immer wieder durch variable Sequenzen, sogenannte Spacer, unterbrochen werden (115). Kommt es zu einer Infektion von Bakterien mit Phagen, so wird die Fremd-DNA zunächst mithilfe einer Cas Nuklease in kleinere DNA-Fragmente zerschnitten und diese anschließend in die Bereiche der Spacer integriert (117). Bei erneuter Infektion werden die Sequenzen der inserierten DNA-Fragmente transkribiert. Es entsteht die sogenannte crRNA, die die Cas-Nuklease zu der Ziel-DNA führen kann. Die Ziel-DNA ist in diesem Fall die DNA der Infektion auslösenden Viren, die nun durch die Nuklease zerschnitten wird. Auf diese Weise haben die Bakterien eine Immunität gegen diesen bestimmten Virus entwickeln können (117,118). Diese Erkenntnisse über die Funktion und Rolle der Nucleasen der Cas Familie und der anderen CRISPR Elemente wurden erst 2007 gesammelt (118).

In der Forschung wird dieses System als Tool genutzt, um gezielt das Genom zu verändern. Beim Genome Editing wird an einer spezifischen Stelle im Genom mithilfe einer Nuklease ein Doppelstrangbruch der DNA induziert. Anschließend stehen zwei unterschiedliche Reparaturmechanismen zur Verfügung, die durch die Zelle aktiviert werden. Zum einen kann eine Ligation der DNA-Enden vorgenommen werden, sodass es zu einer Insertion oder Deletion von ein oder mehreren Nukleotiden kommen kann (115). Dies wird als Non-homologous end joining (NHEJ) bezeichnet.

Die andere Strategie wird als Homology-directed repair (HDR) bezeichnet. Hierbei wird ein Template genutzt, um den Bereich des Doppelstrangbruches zu kopieren. Es kommt aber in jedem Fall zu einer Veränderung des Genoms mit unterschiedlichen Folgen. Die möglichen Anwendungsgebiete dieser Genome Editing Methode sind vielfältig. Es kann in der Gentherapie monogenetischer Erkrankungen eingesetzt werden, wie beispielsweise der zystischen Fibrose, in der Behandlung infektiöser Erkrankungen wie HIV, oder auch in der Krebstherapie. Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet ist in der Forschung die Generierung von Tier- und Zellkulturmodellen, indem bestimmte Gene gezielt ausgeschaltet werden (113).

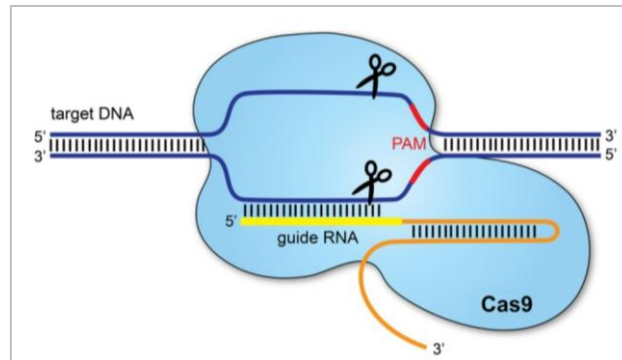


Abbildung 2: **CRISPR/Cas9 System.** Die designte gRNA führt die Cas9 Nuklease an einen spezifischen Locus im Genom. An dieser Stelle wird ein Doppelstrangbruch der Ziel-DNA erzeugt. (Abbildung entnommen aus (113))

2. Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien

0,05% Trypsin-EDTA (1x)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
100 bp DNA ladder	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
200µl tip 10x96 tips, stack	tipone
2-Mercaptoethanol	Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
2-Propanol	Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes with Cell-strainer Cap	Corning Inc., Corning, USA
50 ml CELLSTAR® Polypropylen Röhren	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Acrylamid (30%) Rotiphorese® Gel	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Amaxa™ Basic Nucleofector™ Kit for Primary Mammalian Epithelial Cells	Lonza, Basel, Schweiz
Ammonium Peroxodisulfate (APS)	Panreac AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Antifect N liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Anti-ITM2B Antibody, rabbit	Sigma-Aldrich, Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Anti-Mouse, polyclonal, goat, HRP-linked Antibody	Agilent Technologies Pathology, Flow Cytometry, Specific Proteins (Dako), Hamburg, Deutschland
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
APS (10%), Ammonium Peroxidsulfat	Panreac AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aval	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
Biosphere® Filter Tip 10 µl farblos	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tip 1000 µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tip 100 µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tip 20 µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tip 20 farblos	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tip 200 µl farblos	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Bromphenolblau	Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BsaAI	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
BsaWI	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
BseYI	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA

BstYI	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
Cac8I	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
Cell Scraper	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
cellstar® tubes 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Chirurgische Einmal-Skalpelle	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
cOmplete ULTRA Tablets, mini Protease Inhibitor Cocktail tablets	Roche, Basel, Schweiz
Counting Slides	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA
CryoPure Gefäß 1,0 ml weiß	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Deoxynucleotide Set, 100 mM	Sigma-Aldrich, Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DMEM Medium (1x)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
DPBS (1x)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
DTT	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
EDTA	
EGTA	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Erlenmeyerkolben	
Essigsäure (100% glacial)	Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Chemsolute, Renningen, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FBS, Qualified, Heat inactivated	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
FspI	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
Gel Loading Dye Purple (6x)	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
GeneArt™ CRISPR Nuclease Vector Kit	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
GeneArt™ Genomic Cleavage Detection Kit	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Glycerin	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HBSS, calcium, magnesium, no phenol red	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
HEPES Buffer solution (1M)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
HpyAV	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
Impfschlingen	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe,

	Deutschland
KaryoMAX™ Colcemid™ Solution in PBS	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MEM NEAA (100X) non essential amino acids	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Methanol	Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mikroröhre 1,5 ml mit Verschluss	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Mikrotestplatte 96 well, F	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Multiply®-µStrip Pro 8er Kette	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ EDTA EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid·Na ₂ -salt	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
NaCl (5 M)	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Na-Deoxycholate Natriumdesoxycholat	Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaF (0,5 M)	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Neon Transfection System 100 µL Kit	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
NPR-C Antibody, mouse	Santa Cruz Biotechnology, DALLA, USA
Nukleotidsequenzen (Standard Oligos)	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Parafilm (4 IN.X125FT.)	Bemis Company, Inc., Oshkosh, USA
Pen Strep	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
PfIF1	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
PhosSTOP EASY pack	PHOSS-RO Sigma-Aldrich, Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phusion Buffers (GC Buffer)	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Phusion Buffers (HF Buffer)	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Promotion	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA

Pierce BCA Protein Assay Kits	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Pipettenspitze 10µl, tip stackpack	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitze 1000µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitze 200µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitze 200µl, tip stackpack	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen MultiFlex®-Tips, 1-200µl	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pmli	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
Polyacrylamid (30%) Rotiphorese®	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Potassium chloride solution	Sigma-Aldrich, Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Proteinmarker (11-245 kDa)	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
QIAfilter Plasmid Midi and Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Reagenzienreservoir	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Reagiergefäß 2,0 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Reagiergefäß, 0,5 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Micro Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Roti®-Block (10x)	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
RPMI Medium	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Salzsäure (1N) 1 mol/l	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 37%	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS (20%)	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipette 10ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Serologische Pipette 25 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Serologische Pipette 5ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Sodium Pyruvat 100mM (100x)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA

StyD4I	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
TC20® automated cell counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA
TC-Platte 12 well, Standard F	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
TC-Platte 24 well, Standard F	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
TC-Platte 48 well, Standard F	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
TC-Platte 6 well, Standard F	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
TC-Platte 96 well, Standard F	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
TC-Schale 100, Cell+	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
TC-Schale 100, standard	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
TC-Schale 60, Standard	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
TERGITOLÔ solution	Sigma-Aldrich, Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethylenediamin	Sigma-Aldrich, Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Thermo Scientific DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) Promotion	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
TOPO™ TA Cloning™ Kit for Sequencing	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA
TRIS-hydrochlorid	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TRIZMA(R) BASE BIOPERFORMANCE CERTIF&	Sigma-Aldrich, Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypan blue stain (0,4%)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
TWEEN®20	Sigma-Aldrich, Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xhol	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
α-Actinin, mouse	Santa Cruz Biotechnology, DALLA, USA
β-Actin, mouse	Sigma-Aldrich, Merck Chemicals GmbH, An affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 1: Auflistung aller verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.

2.2 Geräte

Absaugsystem mit Vakuumpumpe	Integra Vacusafe
Absorbance microplate reader	sunrise TECAN
Bildschirm für Mikroskop	Nikon
CoolCell™ LX Cell Freezing Container	Corning® Sigma-Aldrich

	CLS432002
Electrophoresis Power Supply	Pharmacia Biotech EPS 200
Electrophoresis Power Supply	Pharmacia Biotech EPS 601
Elektrophoresekammern	Peqlab biotechnologie GmbH
Feinwaage	sartorius
Floureszenzmikroskop	Nikon eclipse Ts2
Gefrierschrank -80°C	Thermoscientific
Geldokumentationssystem	Syngene a division of the synoptic group
Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat
Heizofen Zentrifugenraum	Memmert
Inkubator Zellkultur, 32°C	HERAcell 150i
Inkubator Zellkultur, 37°C	HERAcell 150i
Kipp-/Rollenmischer	Phoenix Instrument RS-TR05
Mehrkanalpipette 0,5-10µl	8-Kanal Discovery Comfort Pipette
Mehrkanalpipette 20-200µl	8-Kanal Discovery Comfort Pipette
Mikrobiologischer Brutschrank, 37°C	Heraeus Typ B 6030
Mikroskop für die Zellkultur	Nikon Eclipse TS100 (C-W10 x B/22)
Mikrowelle	Bosch
Neon™ Transfection System	Invitrogen, MPK5000
Nucleofector™	2b Device Lonza, AAB-1001
QuantStudio 3 Real-Time-PCR-System	Thermo scientific
Powersupply	Bio-Rad
Schüttelinkubator für Bakterienkultur	GFL Schüttelinkubator Bestell-Nr. 3032
Spectrophotometer	DeNovix DS-11
Sprout Minizentrifuge	Biozym
TC20™ automated cell counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA
Thermoal Cyler C1000™	Bio-Rad
ThermoMixer C	Eppendorf 1,5 ml
Thermomixer comfort	Eppendorf 1,5 ml
Tischzentrifuge	Thermo scientific, Heraeus Fresco 17 centrifuge
Tischzentrifuge	Eppendorf centrifuge 5910R
Trans-Blot®Turbo™ Transfer System	Bio-Rad
Ultra Rocker Rocking Platform	Bio-Rad
Vortexer	Heidolph Reax top
Wasserbad	Julabo Corio C
Wasserbad, Zellkultur	GFL, Typ 1002
Western Blot Developer	Amersham Imager 600
Zellkulturhood	HERAsafe, Heraeus instruments Typ HS 18/2 1996
Zellkulturzentrifuge	Heraeus sepatech, megafuge 1.0R

Zentrifuge	Heraeus Biofuge primo R
Zentrifuge	eppendorf centrifuge 5810

Tabelle 2: Auflistung aller verwendeten Geräte.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kultivierung von Zellen

Für die verschiedenen Experimente wurden unterschiedliche Zelllinien verwendet. Für die Generierung des MERTK Knockouts wurde eine murine immortalisierte Podozytenzelllinie verwendet, die an der Universität Greifswald durch Professor Dr. K. H. Endlich generiert wurde. Weitere Bezeichnungen dieser Zelllinie sind Endlich-Zellen oder E11-Zellen. Im Gegensatz zur physiologischen Situation, sind diese Podozyten weiterhin teilungsfähig und noch nicht terminal differenziert. Ihre Kultivierung wurde in einem 32 °C warmen Brutschrank mit 5,0% CO₂ in 10cm-Zellkulturschalen vorgenommen (119).

2.3.1.1 Besonderheiten der Maus-Podozyten (undifferenzierter Status)

Alle zwei bis drei Tage wurde das Zellkulturmedium folgender Zusammensetzung gewechselt (119).

Zusammensetzung	Volumen
Gibco RPMI Medium ((+) L glutamin)	500 ml
FBS	50 ml
Pen/Strep	5 ml
Gamma-Interferon (100 U/ml)	50 µl

Tabelle 3: Zusammensetzung des Maus-Podozyten Mediums für den undifferenzierten Status.

Die Zellen sind aus den Glomeruli von Mäusen gewonnen worden, die das immortalisierende SV40 large T Antigen unter der Kontrolle des Interferon- γ (INF- γ) induzierten H-2Kb Promoter enthielten. Durch Zugabe von Interferon- γ in das Nährmedium der Zellen wird eine Proliferation der Zellen ermöglicht. Ein bis zwei Mal wöchentlich wurden die Zellen mit einer Ausdünnung von 1:4 oder 1:3 gesplittet.

2.3.1.2 Besonderheiten der Maus-Podozyten (differenzierter Status)

Um die Zellen ausdifferenzieren zu lassen, wurde eine 70-80% konfluente Zellkulturschale in einem 37°C Brutschrank für 13 Tage kultiviert. Während dieser Zeit wurde Interferon- γ -freies Nährmedium verwendet, um die Proliferation zu stoppen. Durch regelmäßige mikroskopische Kontrollen konnte der Differenzierungsprozess überwacht werden und die morphologischen Veränderungen beobachtet werden.

Zusammensetzung	Volumen
Gibco RPMI Medium ((+) L glutamin)	500 ml
FBS	50 ml
Pen/Strep	5 ml

Tabelle 4: Zusammensetzung des Maus-Podozyten Mediums für den differenzierten Status

2.3.1.3 Besonderheiten der humanen Podozyten

Sowohl der Knockout für ITM2B als auch für NPR3 wurden in einer humanen immortalisierten Podozytenzelllinie, auch Moin-Zellen genannt, vorgenommen (120). Diese wurden ebenfalls bei 32°C kultiviert und benötigten folgende Zusammensetzung des Mediums sowohl im undifferenzierten als auch differenzierten Status:

Zusammensetzung	Volumen
Gibco RPMI Medium ((+) L glutamin)	500 ml
FBS	50 ml
Pen/Strep	5 ml
Moin Supplement	3,5 ml

Tabelle 5: Zusammensetzung des Mediums humaner Podozyten.

Moin Supplement

Zusammensetzung	Volumen
Pyruvat	0,5 ml
MEM	0,5 ml
HEPES	2,5 ml

Tabelle 6: Zusammensetzung des Moin Supplements.

Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage durch Neues ersetzt und die Passagierung fand ebenfalls ein bis zwei Mal in der Woche statt mit einer Ausdünnung von 1:3 oder 1:4.

2.3.1.4 Besonderheiten der HEK-293 Zellen

Als dritte Zelllinie wurden HEK-293-Zellen verwendet. HEK steht für human embryonic kidney und ist eine seit den 1970er Jahren bestehende immortalisierte Krebszelllinie. Aufgrund ihrer einfachen Handhabung und der vergleichsweise einfachen Transfektionsmöglichkeit stellte sie eine passagere Alternative für die überaus schwierige Transfektion der Podozytenzelllinien dar. HEK-293 Zellen wurden bei 37°C kultiviert und benötigten folgendes Medium:

Zusammensetzung	Volumen
Gibco DMEM Medium	500 ml
FBS	50 ml
Pen/Strep	5 ml

Tabelle 7: Zusammensetzung des Mediums für HEK-293 Zellen.

Das Splitten der Zellen musste aufgrund höherer Teilungsrate alle zwei Tage durchgeführt werden. Im Zuge dessen wurde auch das Medium gewechselt.

2.3.2 Splitten von Zellen

Zunächst wurde das verbrauchte Medium aus den Zellkulturschalen mit einer Vakuumpumpe abgesogen. Um jegliches FBS zu entfernen, werden die Zellen mit 4 ml 1x PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Die Ablösung der Zellen von der

Oberfläche der Zellkulturschale wird mithilfe einer fünf-minütigen Inkubation mit 1 ml Trypsin bei 32°C erreicht. Anschließend wurden die Zellen mit 4 ml Medium in einem 15 ml Falcon Tube gesammelt und bei 1200 G bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Entsprechend der gewünschten Konfluenz wurden zwischen 200 µl und 500 µl der Zellsuspension in eine neue, mit 7 ml vorgewärmten Zellkulturmedium befüllte Zellkulturschale erneut ausplattiert. Die Inkubation im Brutschrank wurde bei 32 °C fortgeführt.

2.3.3 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzählung wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesogen und die Zellen mit 1x DPBS gewaschen. Um die adhärennten Zellen von der Oberfläche der Schale zu lösen, wurde das identische Protokoll wie auch beim Splitten der Zellen verwendet. Das durch die Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde in 1 ml Medium erneut resuspendiert. In ein steriles 0,5 ml Eppendorf Tube wurden nun 5 µl Trypan blue stain (0,4%) mit 5 µl der Zellsuspension vermischt und diese 10 µl auf eine Zählkammer pipettiert. Mit dem Zellzählgerät wurde die Anzahl der Zellen in 1 ml Medium bestimmt. Entsprechend der gewünschten Zellzahl wurde das dazugehörige Volumen der Zellsuspension für nachfolgende Schritte verwendet.

2.3.4 Einfrieren von Zellen

Um Zellen langfristig zu lagern und gleichzeitig ihre Vitalität aufrecht zu erhalten, ist die Kryokonservierung unumgänglich. Für eine mittelfristige Lagerung sind Temperaturen von -80°C ausreichend, jedoch sollten Zellen für eine langfristige Lagerung in Stickstoff eingefroren werden. Jedoch bilden sich durch den Prozess des Einfrierens Eiskristalle innerhalb der Zellen, die die Zellmembran verletzen und die Zellen absterben lassen. Um dies zu verhindern, wurde dem Zellkulturmedium 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugefügt. Dies ist ein Gefrierschutzmittel, das die Entstehung von Eiskristallen verhindert, indem es den Gefrierpunkt von Wasser herabsetzt. Der für Zellen kritischste Moment ist das Einfrieren aufgrund der Bildung von Eiskristallen und das Auftauen bedingt durch die Toxizität des DMSO. Um Zellen möglichst schonend einzufrieren, sollte dieser Prozess möglichst langsam und das Auftauen möglichst schnell durchgeführt werden (121).

In den verschiedenen Versuchen dieser Arbeit wurden sowohl Zellen aus 10 cm Schalen als auch Zellen aus 6-well-plates eingefroren. Die Methode des Einfrierens ist bis auf kleine Anpassungen identisch.

Zunächst wurde das Medium mit einer Vakuumpumpe abgesogen und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen von der Oberfläche wurden diese für 5 Minuten bei 32°C mit 1 ml Trypsin pro 10 cm Schale und 200 µl für 6-well-plates inkubiert und dann mit zusätzlichen 4 ml Medium (2 ml Medium) in 15 ml Falcon Tubes überführt. Pro Klon bzw. Zelllinie wurden in den meisten Versuchen vier konfluente 10 cm Schalen verwendet, die in ein gemeinsames 15 ml Falcon Tube gesammelt worden sind. Die 6-well-plates enthielten pro Well einen anderen Klon und wurden somit separat gehandhabt. Nach einer Zentrifugation bei 1200 G und 4°C für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 6 ml (oder 0,5 ml bei 6-well-plates) des jeweils spezifischen und mit 10 % DMSO versetzten Mediums resuspendiert. Jeweils 1 ml (oder 0,5 ml bei 6-well-plates) Zellsuspension wurde in 6 CryoPure Gefäße gefüllt. Da die 6-well-plates in jedem Well einen anderen Klon enthielten, wurde das gesamte resuspendierte Zellpellet in ein Cryo-Tube gegeben. Die Tubes wurden anschließend in einen Corning® CoolCell™ LX

Cell Freezing Container gestellt. Dieser sorgt für eine gleichmäßige Verringerung der Temperatur um 1°C pro Minute.

2.3.5 Auftauen von Zellen

Entsprechend der Anzahl wurden Zellkulturschalen mit 10 ml Nährmedium befüllt und im 37°C Inkubator vorgewärmt. Anschließend wurde die gefrorenen Zellsuspension in den Cryo-Tubes im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Sobald dieser Prozess vollständig abgeschlossen war, wurde der gesamte Inhalt des Tubes in die Zellkulturschale pipettiert und die Zellen durch Schwenken der Schale gleichmäßig verteilt. Durch den starken Verdünnungseffekt wird die Toxizität des DMSO herabgesetzt. Trotz dessen wurde das Medium am Folgetag gewechselt, um die schädliche Exposition zu entfernen.

2.4 Design der gRNA für das CRISPR/ Cas9 Genome Editing

Die Entscheidung über die richtige guide-RNA (gRNA) ist einer der entscheidendsten Schritte für das Gelingen der gesamten Methode. Die gRNA besteht aus zwei Komponenten: aus einer Zielsequenz von 19-20 Basenpaaren und einer PAM Sequenz. PAM steht für „protospacer adjacent motif“ und ist als Abfolge folgender Basen definiert: NGG. Zudem befindet sie sich immer am 3' Ende der Zielsequenz und ist verantwortlich für die spezifische Bindung an das Zielgen. Um eine gRNA zu designen ist ein online gRNA Design Tool notwendig. Ich habe für alle gRNAs das Programm Chopchop genutzt, welches von der Harvard Universität zur Verfügung gestellt wird (122). Anhand von Angaben über das Zielgen, ob dessen Transkriptionsprodukt exprimiert werden soll oder nicht (Knockout oder Knockin) sowie die Spezies, erstellt die Suchmaschine eine Liste möglicher gRNAs, die wiederum folgende Angaben beinhaltet: Sequenz der gRNA, Lage im Genom, Strang (+ oder -), GC-Gehalt in %, Selbstkomplementarität, Off-targets und die Effizienz. Besondere Bedeutung wurden der Genomlokalisierung und möglicher Off-targets zugesprochen. Um eine wirksame Mutation zu erlangen, sollte diese möglichst in den ersten Exons des Proteins stattfinden, damit bei einer Leserasterverschiebung ein großer Teil des Proteins betroffen ist. Off-targets entstehen bei signifikanter Homologie zu anderen Genen. Das User Manual „GeneArt® CRISPR Nuclease Vector Kit“ verweist hierbei auf die Autoren Fu et al., die sich für eine Toleranz gegenüber möglicher Off-targets bei 1-3 Veränderungen in der Basenabfolge aussprechen (123,124). Die ausgewählte gRNA kann prinzipiell sowohl auf dem codierenden als auch auf dem nicht-codierenden Strang liegen. Es gilt nur die Voraussetzung zu beachten, dass sich die PAM Sequenz am 3' Ende der Sequenz befindet. Nach Auswahl einer möglichen gRNA wurden weitere und detailliertere Informationen ermittelt. In einer vom Online-Programm erstellten Graphik wurde die räumliche Beziehung der gRNA zu dem Genabschnitt, sowie die Lage möglicher Primer und Restriktionsenzyme dargestellt (siehe Abbildung 3). Darüber hinaus wurden Primer genauer beschrieben hinsichtlich ihrer Sequenz, der Schmelztemperatur (T_M Temperatur), Off-targets und der Produktgröße. Bei der Auswahl der Primer ist auf eine PCR-Produktgröße zwischen 400 und 600 Basenpaaren zu achten, sowie auf eine Melting Temperature von ca. 60°C. Desweiteren dürfen Primer nicht die PAM Sequenz enthalten. Restriktionsenzyme werden mit roten oder grünen Kästchen symbolisiert. Rot dargestellte weisen noch weitere Restriktionsorte auf, währenddessen grün dargestellte nur eine einzige Schnittstelle zeigen (siehe Abbildung 3). Hierbei ist wichtig, ein Restriktionsenzym zu wählen, das die gRNA zwei bis vier Basenpaare upstream der PAM-Sequenz schneidet und nur ein einziges Mal im Bereich der ausgewählten Primer schneiden

kann. Pro Gen sollten jeweils zwei gRNAs mit dazugehörigem Restriktionsenzym und Primern ausgewählt werden. Um eine gerichtete Klonierung in den Vektor vorzunehmen, müssen der gRNA fünf Nukleotide als sticky ends an jeweils beide Enden gehängt werden. Für den Vorwärtsstrang gilt folgende Sequenz: 5'... - GTTTT – 3'. Diese Sequenz ist komplementär zu der überhängenden Sequenz CAAA im Vektor. Dasselbe Prinzip gilt für den reversen Strang, an den folgende Sequenz angehängt werden muss: 3'-GTGGC-...5'. Dies ist komplementär zu folgender überhängenden Sequenz im Vektor: CACCG. Auf diese Weise wird verhindert, dass es zu einer falschen Orientierung der gRNA im Vektor kommt, oder dass sich der Vektor ohne Insert der gRNA schließt. Außerdem muss bei der Generierung darauf geachtet werden, dass alle Sequenzen in der Orientierung vom 5' zum 3' Ende vorliegen.

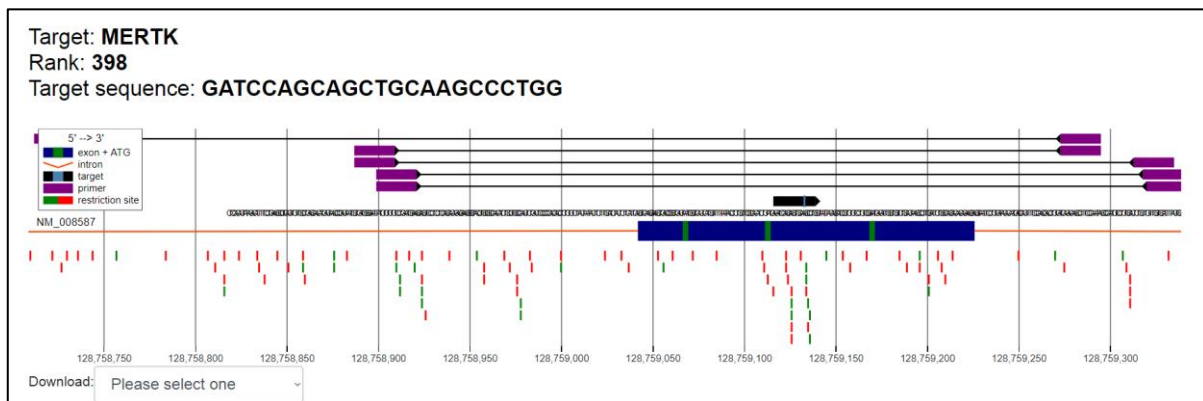


Abbildung 3: Design einer geeigneten gRNA. Das gRNA-Design-Programm stellt die Sequenz, mögliche Primer und Restriktionsenzyme bezüglich ihrer Lokalisation zueinander und im umliegenden Genabschnitt dar.

2.5 Klonierung der gRNA in den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector und Transformation von DH5 Competent Cells

2.5.1 Klonierung der gRNA in den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector

Ziel dieser und auch nachfolgender Schritte im CRISPR/Cas9 Protokoll ist es, transfektionsfähige Plasmid-DNA herzustellen, die dann von Zellen der Zielzelllinie aufgenommen werden kann. Dazu muss die gRNA in den vom Kit bereitgestellten GeneArt® CRISPR Nuclease Vector eingefügt werden. Die Klonierung erfolgte mittels des GeneArt® CRISPR Nuclease Vector Kit. Der erste Schritt der Klonierung bestand in der Aneinanderlagerung gleicher Mengen des Forward- und Reverse-Oligonukleotidstranges. Die von Thermo Fischer bestellten Nukleotidsequenzen wurden ungelöst geliefert und mussten zunächst mit der korrekten Menge an 10 mmol Tris-Puffer (pH 8,5) gelöst werden, um eine Konzentration von 100 µmol zu erreichen. Anschließend wurde folgende Reaktion bei Raumtemperatur in ein RNase freies 1,5 ml Eppendorf Tube gegeben.

Zusammensetzung	Volumen
Forward Strand Oligonukleotide (100µM)	5 µl
Reverse Strand Oligonukleotide (100µM)	5µl
10x Oligonucleotide Annealing Buffer	2µl
DNase/RNase-freies H ₂ O	8µl
GESAMTVOLUMEN	20µl

Tabelle 8: Reaktionszusammensetzung der Annealing Reaktion.

Für vier Minuten musste diese Reaktion bei 95°C in einem Heizblock inkubieren. Danach wurde der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur für fünf bis zehn Minuten auf 25°C abgekühlt. Im nächsten Schritt fand eine zwei-schrittige Verdünnung der 25 µM Doppelstrangoligonukleotide bis hin zu einer Konzentration von 5 nM statt. Alle Reaktionsschritte wurden ebenfalls in RNase freien 1,5 ml Eppendorf Tubes bei Raumtemperatur durchgeführt. Zum Mischen der Proben wurde ein Vortexmischer verwendet.

Zusammensetzung	Volumen
25 µM ds oligonucleotide stock	2 µL
DNase/RNase-freies H ₂ O	98µl
GESAMTVOLUMEN	100µl

Tabelle 9: Reaktionszusammensetzung für den ersten Verdünnungsschritt.

Nach dieser ersten Verdünnung lag eine Konzentration von 500 nM vor. Diese Lösung wurde für den nächsten Verdünnungsschritt verwendet.

Zusammensetzung	Volumen
500 nM ds oligonucleotide solution	1 µL
10x Oligonucleotide Annealing Buffer	10 µL
DNase/RNase-freies H ₂ O	89 µL
GESAMTVOLUMEN	100µl

Tabelle 10: Reaktionszusammensetzung für den zweiten Verdünnungsschritt.

Nun lagen die Doppelstrangoligonukleotide in der richtigen Konzentration von 5 nM für die nachfolgende Ligationsreaktion mit dem Vektor vor. Der GeneArt® CRISPR Nuclease Vector stammt aus dem Kit und enthält verschiedene Komponenten. Eine Ampicillinresistenz ermöglicht eine Selektion transformierter *E. coli*. OFP (orange fluorescence protein) fungiert als Reporter gen, um eine spätere FACS-Sort-Analyse zu ermöglichen.

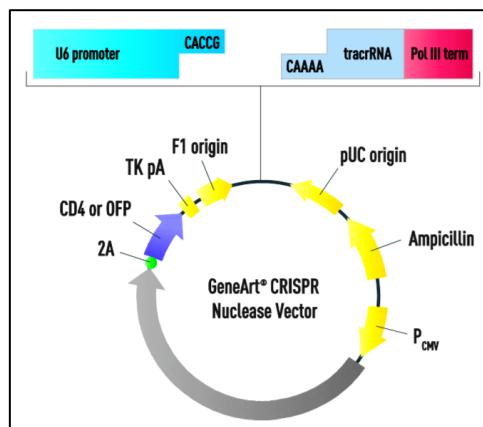


Abbildung 4: GeneArt® CRISPR Nuclease Vector. Verschiedene Komponenten sind für die Durchführung der Methode essentiell. Damit eine gerichtete Ligation stattfinden kann sind die überstehenden Enden entscheidend. Direkt vor diesen ist der U6 Promoter lokalisiert, der es ermöglicht mit U6 Primern eine Sequenzierung vorzunehmen (siehe Abschnitt 2.6). Um transformierte Bakterien von nicht transformierten Bakterien zu unterscheiden, wird die Ampicillin-Resistenz benötigt. Das integrierte OFP ermöglicht im Verlauf einen FACS-Sort. (124)

Alle folgenden Komponenten der Ligationsreaktion sollten auf Eis aufgetaut werden, das Pipettieren sollte jedoch bei Raumtemperatur erfolgen. Die Reaktion wurde in folgender Reihenfolge in ein 1,5 ml Eppendorf Tube pipettiert.

Zusammensetzung	Volumen
5x Ligation Buffer	4 µl
Linearized GeneArt® CRISPR Nuclease Vector	1 µl
ds oligonucleotide (5 nM)	2 µl
DNase/RNase-freies H ₂ O	11 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
GESAMTVOLUMEN	19 µl

Tabelle 11: Reaktionszusammensetzung der Ligationsreaktion.

Die Reaktion sollte nur auf- und abpipettiert werden und nicht mit einem Vortexmischer durchgemischt werden. Es folgte eine Inkubationszeit von mindestens zehn Minuten bis maximal zwei Stunden ebenfalls bei Raumtemperatur. Danach wurde die Reaktion auf Eis gestellt.

2.5.2 Transformation der DH5α™ Competent Cells

Der nächste Schritt bestand in der Transformation kompetenter *E. coli* Zellen. Dafür wurden Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells genutzt. Auf 50 µl der Bakterien wurden 10 µl der Ligationsreaktion pipettiert und durch das Schnippen mit einem Finger gemischt. Es folgte eine Inkubation von 30 Minuten auf Eis. Die Transformation der Bakterien wurde mittels der Heat Shock Methode erreicht. Dabei wird durch plötzliche Temperaturerhöhung eine Porenbildung der Plasmamembran der Bakterien erreicht, durch die dann die Plasmid-DNA in die Zellen eindringen kann. Der Heat Shock wurde bei 42°C für 30 Sekunden in einem Thermomixer durchgeführt. Danach wurden die Bakterien sofort für zwei Minuten auf Eis gestellt. Um ein bestmögliches Ergebnis zu erhalten, wurden die Bakterien in 200 µl LB-Medium in 15 ml Falcon Tubes überführt und für 30 Minuten bis eine Stunde in einem Schüttelinkubator bei 160 rpm inkubiert. Im letzten Schritt wurden 250 µl Bakteriensuspension auf vorgewärmten LB-Agarplatten mit 100µg/ml Ampicillin mit einer Impföse ausgestrichen und so vereinzelt, dass die nachfolgende Über-Nacht-Inkubation bei 37°C Einzelzellkolonien ergibt.

2.5.3 LB-Agarplatten mit 100µg/ml Ampicillin

Am Vortag wurde der LB-Agar vorbereitet. Dafür wurden 35 g LB-Agar in 1l dH₂O aufgelöst und zum Autoklavieren gegeben. In die handwarm abgekühlte Lösung wurden 1ml Ampicillin (100 mg/ml) gegeben. Die Lagerung des ausgehärteten Agars erfolgte bei 4°C.

2.6 Analyse der transformierten Bakterien

Bevor weitere Schritte eingeleitet werden konnten, musste zunächst die erste Qualitätskontrolle vorgenommen werden. Dazu wird die Sanger-Sequenzierung genutzt. Die DNA aus den Bakterien wurde isoliert und der Teil des eingeschleusten Vektors, der die gRNA enthält, sequenziert. So wurde sichergestellt, dass die gRNA im Vektor zu 100 % ihrer Sequenz entspricht.

Es wurden pro Kondition vier Kolonien von der Agarplatte ausgewählt, die dann in LB-Medium mit 100 mg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C in 15 ml Falcon Tubes kultiviert wurden.

LB-Medium

Zusammensetzung	Volumen/ Masse
dH ₂ O	100 ml
LB-Medium	2 g
Ampicillin (100 mg/ml)	100 µl

Tabelle 12: Zusammensetzung des LB-Mediums.

Die Lagerung des Mediums erfolgte bei 4°C.

Die Plasmid-DNA-Isolation aus den Minikulturen wurde mithilfe des Zyppy™ Plasmid Miniprep Kits durchgeführt. Durch eine alkaline Lyse der Bakterien wurde die DNA zunächst freigesetzt. Es folgten eine Neutralisation und Aufreinigungsschritte mit Hilfe der Fast-Spin column technology.

Zu 600 µl der *E. coli* Kultur in einem 1,5 ml Eppendorf Tube wurden 100 µl des 7x Lysis Buffer hinzugegeben. Die Mischung erfolgte durch 4-6-maliges Invertieren mit anschließender Inkubation von ein bis maximal zwei Minuten. Eine blaue Färbung der Proben indizierte vollständige Lyse der Bakterien. Zur Neutralisation der alkalischen Lyse wurden 350 µl kalter Neutralisationspuffer hinzugegeben. Erneutes Invertieren sorgte für die Durchmischung. Es war eine Farbveränderung von blau zu gelb ersichtlich sowie ein Ausfallen der Proben. Die folgende Zentrifugation bei 16.000 G für zwei Minuten ließ den Zelldebris als Pellet formen. Die DNA befand sich im flüssigen Überstand (~ 900 µl), der anschließend in die Zymo-Spin™ IIN columns überführt wurde. Eine erneute Zentrifugation bei 16.000 G für 15 Sekunden ließ die Flüssigkeit durch die Säule in den Auffangbehälter fließen. Dabei findet eine Adsorption der DNA an die Säule durch alkoholhaltige und leicht saure Pufferbedingungen statt. Der Flow-through wurde verworfen. Zur Aufreinigung der gebundenen DNA wurden 200 µl Endo-Wash Buffer auf die Säule gegeben und eine erneute Zentrifugation bei 16.000 G für 15 Sekunden folgte. Dieser Schritt wurde mit 400 µl Zyppy Wash Buffer und einer Zentrifugation für 30 Sekunden wiederholt. Der Flow-through wurde erneut verworfen und um sicherzustellen, dass sämtlicher Puffer entfernt wurde, schloss sich eine weitere Zentrifugation bei 16.000 G für 15 Sekunden an. Die Säule wurde nun auf ein sauberes 1,5 ml Eppendorf Tube gesetzt, 30 µl Zyppy Elution Buffer wurden senkrecht auf die Säule gegeben und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Der Elution Buffer enthält 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) und 0,1 mM EDTA. Zur Elution der DNA wurde erneut bei 16.000 G für 15 Sekunden zentrifugiert.

Die Sequenzen der jeweiligen Proben wurden mittels Sanger-Sequenzierung ermittelt, die von SeqLab durchgeführt wird (125). Der verwendete Primer ist der U6 Primer, der in der Standardliste des SeqLab zu finden ist. Die Auswertung erfolgte mittels Unipro UGENE und NCBI. Dabei wurde ein Vergleich des Sequenzierungsergebnisses mit der Basenabfolge der gRNA vorgenommen. Nur bei 100-prozentiger Übereinstimmung, wurde die generierte gRNA verwendet.

2.7 Vervielfältigung der DNA-Menge mittels Maxikultur und Maxiprep

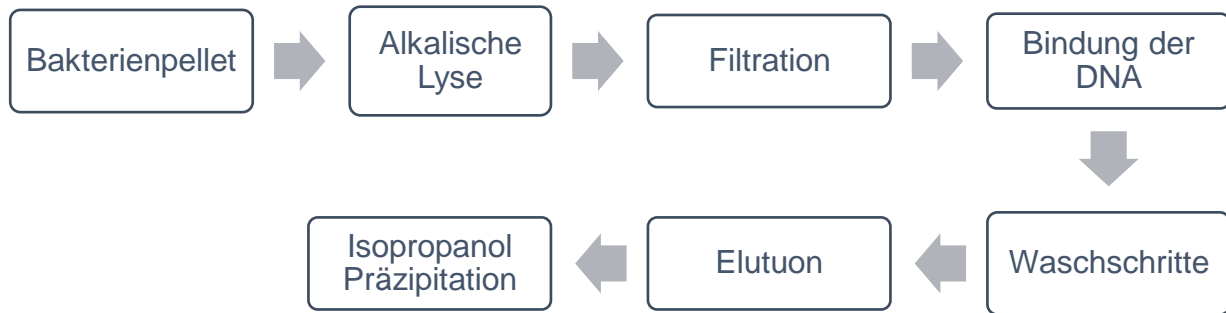


Abbildung 5: *Maxiprep*. In schematisierter und vereinfachter Form werden die wichtigsten Schritte der Isolation und Aufreinigung der in Bakterien vervielfältigten DNA dargestellt.

Nachdem die gRNA erfolgreich in den Vektor kloniert worden ist, musste nun die Menge an Plasmid-DNA vervielfältigt, dann isoliert und aufgereinigt werden, um schlussendlich die Transfektion einer Zelllinie vornehmen zu können.

Dafür wurden am Vortag 100 ml LB-Medium (mit 100 mg/ml Ampicillin) mit 100 µl der Bakterien-Mini-Kultur versetzt. Die Inkubation fand über Nacht in autoklavierten Erlenmeyerkolben bei 37°C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator statt. Am Folgetag wurde die Isolation der Plasmid-DNA aus den Bakterien mithilfe des QIAfilter Plasmid Midi and Maxi Kit vorgenommen. Das Protokoll beruht auf einer alkalischen Lyse, der Bindung der DNA an eine Säule unter salzarmen und niedrigen pH-Wert-Bedingungen, der anschließenden Reinigung und der Elution der DNA mit einem Puffer mit hoher Salzkonzentration. Aufkonzentrierung und Entsalzung der eluierten DNA wird durch Isopropanol erreicht. Die 100 ml Bakteriensuspension aus der Übernachtskultur wurden auf zwei 50 ml Falcon Tubes aufgeteilt und in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 6000 G für 15 Minuten zu einem Bakterienzellpellet zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und beide Bakterienpellets wurden in insgesamt 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert, indem die Lösung so lange auf- und abpipettiert wurde, bis keine sichtbaren Zellrückstände mehr vorlagen. Die Lösung aus beiden Falcon Tubes wurde in ein gemeinsames Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 10 ml Puffer P2 (200 mM NaOH; 1% SDS (w/v)) hinzugegeben. Zum Mischen wurden die Falcon Tubes invertiert und ein Farbwechsel zu einheitlichem blau war bei guter Durchmischung ersichtlich. Der Puffer P2 ist ein alkalischer Lysepuffer. Zur vollständigen Lyse wurde eine Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur eingehalten. Die Lyse wurde durch 10 ml des bei 4°C gekühlten Puffer P3 (3.0 M Kaliumdodecylsulfat, pH 5.5) neutralisiert. Die Mischung wurde ebenfalls durch Invertieren erreicht. Es bildete sich ein flockig-weißes Präzipitat, das genomische DNA, Proteine und Zellschrott beinhaltet. Gute Durchmischung sollte vorgenommen werden, damit auch das Kaliumdodecylsulfat (KDS) ausfällt. Der Farbwechsel zu farblos indiziert, dass auch SDS ausgefallen ist. Das Lysat wurde nun sofort in den Filter (QIAfilter Cartridge) umgefüllt, auf dessen Austrittsöffnung eine Kappe zuvor aufgeschraubt worden ist. Es folgte eine Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Das Präzipitat stieg langsam nach oben und lagerte sich oben auf der Flüssigkeit ab. Dies sorgte dafür, dass sich beim Filtrationsschritt die Poren nicht sofort verschlossen. Während dieser Zeit wurde die Säule (QIAGEN-tip) vorbereitet, indem 10 ml des QBT Puffers (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% Isopropanol (v/v); 0.15% Triton® X-100 (v/v)) auf diese gegeben wurden, um sie durchgängig zu machen. Dieser Puffer enthält Chemikalien, die für eine Senkung der Oberflächenspannung sorgen und so ein automatischer, Gravitationskraft-getriebener Durchfluss der Flüssigkeit ermöglicht wird. Nach der 10-minütigen

Inkubation des Lysats, wurde dieses nun auf die Säule filtriert, um alle festen Bestandteile zurückzuhalten. Anschließend floss das Filtrat durch die Säule in den Auffangbehälter darunter. Die nächsten zwei Schritte umfassten zwei identische Waschvorgänge. Zwei Mal hintereinander wurden 30 ml des QC Puffers (1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% Isopropanol (v/v)) auf die Säule gegeben, der entsprechend der Gravitation durch die Säule floss. Der erste Waschschrift hat die Funktion, Kontaminationen aufgrund der vorangegangenen Schritte zu entfernen. Der zweite Waschschrift ist vor allem bei großen Volumina der Kulturen oder bei bestimmten Bakterienstämmen, die große Mengen an Kohlenhydraten bilden, notwendig. Nach der Aufreinigung konnte die Plasmid-DNA nun eluiert werden. Dafür wurden 15 ml QF-Puffer (1.25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8.5; 15% Isopropanol (v/v)) verwendet. Die Säule wurde dafür auf ein 50 ml Falcon Tube gestellt, um die eluierte DNA dort aufzufangen. Im Folgenden wurde die DNA mit 10,5 ml raumwarmem Isopropanol präzipitiert und dann bei 8400 G und 4°C für 50 Minuten zentrifugiert, um ein DNA-Pellet zu erhalten. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das fast farblose Pellet markiert, um es im Verlauf erneut lokalisieren zu können. Bei offenem Falcon Tube fand eine Austrocknung des Pellets an der Luft für mindestens zehn Minuten statt, bevor die DNA in 200 µl sterilem H₂O wieder aufgelöst wurde. Die Qualität und Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde photometrisch mit einem Spektrophotometer gemessen. Als Negativ-Kontrolle wurde steriles Wasser verwendet. Die Konzentration der DNA wurde in ng/µl angegeben und durch die Absorption bei 260 nm bestimmt. Um die Reinheit zu überprüfen, wurde zusätzlich die Absorption bei 230 nm und bei 280 nm gemessen. Dies gibt Aufschluss über den Gehalt an organischen Substanzen beziehungsweise an Proteinen und Phenolen. Das Verhältnis zwischen der Absorption bei 260 zu derer bei 280 zeigt dementsprechend Verunreinigungen mit Proteinen an. Der Wert sollte bei 1,8 bis 2,0 liegen (126). Die Plasmid-DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert und für die jeweiligen Transfektionen bei Raumtemperatur aufgetaut. Alle in den darauffolgenden Schritten genutzte DNA für Transfektionen wurde mit dieser Aufreinigungsmethode hergestellt.

2.8 Transfektionen der verschiedenen Zell-Typen

2.8.1 Etablierung der Transfektion von Maus-Podozyten

In freundlicher Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene wurde es uns ermöglicht, deren Neon™ Transfection System zu nutzen.

Der Weg zu dieser erfolgreichen Transfektionsmethode beinhaltete die initiale Austestung verschiedener Transfektionsprotokolle. Generell ist dabei anzumerken, dass die Transfektion von Podozyten per se herausfordernd ist, da es sich um sehr empfindliche Zelllinien handelt. Im Folgenden werde ich dasjenige Protokoll beschreiben, welches zu einer Transfektion der E11 Zellen geführt hat.

Für jede Transfektion wurde eine 70-100% konfluente 10 cm Schale benötigt, die ein bis wenige Tage vor der Transfektion vorbereitet wurde. Pro Kondition wurden 1.000.000 Zellen für die Transfektion mit diesem System in einem 15 ml Falcon Tube benötigt. Die Zellzählung wurde wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, durchgeführt. Das dementsprechende Volumen an Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon Tube gegeben und es schloss sich eine weitere Zentrifugation bei 1200 G und Raumtemperatur für fünf Minuten an. Der Überstand wurde mit der Vakuumpumpe

abgesogen und es wurden 2 ml 1x PBS auf das Zellpellet gegeben. Mit identischen Einstellungen wurde eine Zentrifugation von zwei Minuten vorgenommen und ebenfalls der Überstand abgesogen. Dies sorgte für eine komplette Entfernung aller Medium- und FCS-Rückstände. Anschließend wurde das Neon™ Transfection System in der Zellkultur, sowie das Neon Transfection System 100 µL Kit für die Transfektion verwendet. Zunächst mussten 3 ml des E2 Elektrolyt-Puffers in das Neon® Tube gegeben werden, welches dann in die Neon® Pipetten Station eingebracht wurde. Nun wurde das Zellpellet in 110 µl R-Buffer resuspendiert und 3 µg Plasmid-DNA hinzugegeben. Mit den kleinen Greifärmchen der Neon® Pipette wurde ein Neon® Tip aufgesteckt. Der Neon® Tip dient bei der Transfektion als Elektroporationskammer. Sie enthält eine vergoldete Elektrode, die für die Entstehung eines starken elektrischen Feldes sorgt. Durch die Bauform und Anordnung der Komponenten wird die Lücke zwischen beiden Elektroden vergrößert, während hingegen die Oberfläche jeder Elektrode minimiert wird. Dies sorgt für ein gleichförmigeres elektrisches Feld, einer nur geringfügigen pH-Wert-Änderung, weniger Bildung von Ionen und zu fast keiner Hitzeentwicklung. Als nächstes wurde die Zell-DNA-Puffer Suspension in den Neon® Tip ohne die Transfektion störende Luftblasen aufgenommen und in das mit dem E2-Puffer gefüllte Neon® Tube in der Transfektionseinheit gestellt. Nahe am Boden des Neon® Tubes befindet sich die zweite Elektrode, die das elektrische Feld aufbauen wird. Für die Transfektion mussten folgende Parameter bestimmt werden: Voltage, Width und Pulses. Für die Transfektion der Maus-Podozyten wurden folgende Einstellungen verwendet: 1000 V, 40 ms und 2 Impulse. Sobald Luftblasen in der Transfektionskammer aufgestiegen waren, wurden die Zellen sofort in die mit vorgewärmtem Medium befüllte Zellkulturschale gegeben und verteilt. Die Zellen wurden in den 32°C-Inkubator zurückgestellt. Am darauffolgenden Tag konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie das Ergebnis beurteilt werden. Dafür wurden die Zellen zunächst bei 10-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch beurteilt. Die ungefähre Anzahl toter Zellen, sowie die Morphologie der Zellen sind für die weitere Beurteilung relevant. Um die Effizienz der Transfektion beurteilen zu können, wird die Anwesenheit des Orange-Flourescence-Protein (OFP) im Vektor ausgenutzt. Bestrahlt man die Zellen mit einer Wellenlänge von 560 nm Licht, so leuchten alle OFP exprimierenden Zellen rot-orange auf. Auf diese Weise wird zwischen Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben und den Zellen ohne Plasmid unterschieden. Somit erhält man einen Eindruck über den Erfolg beziehungsweise die Effizienz der Transfektion.

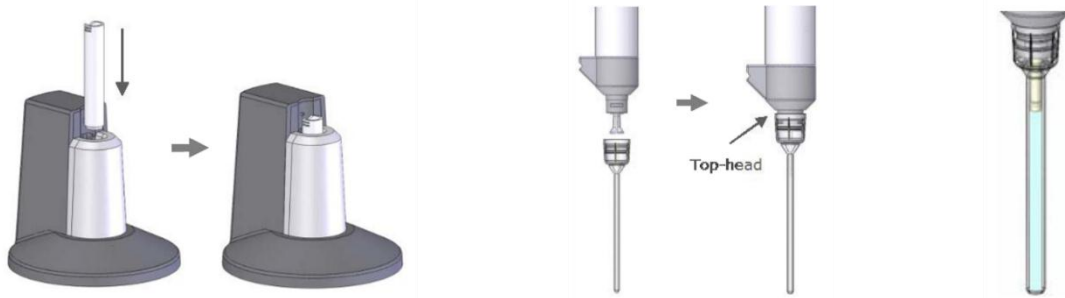


Abbildung 6: Das Neon™ Transfection System. Links zeigt eine Darstellung der Transfektionskammer mit dem mit E2-Puffer befüllten Neon® Tube. In der Mitte ist die Neon® Tip zu sehen, die auf die Pipette aufgesteckt wird. Anschließend kann in die Spitze die Zellsuspension aufgesogen werden. (127)

2.8.2 Etablierung der Transfektion von humanen Podozyten

Die Transfektion humaner Podozyten zeigte ähnliche Schwierigkeiten wie die der Maus-Podozyten. Wurden milde Transfektionskonditionen angewendet, so nahm keine der Zellen die Plasmid-DNA auf, wurden harsche Konditionen genutzt, so starben die Zellen. Im Folgenden werde ich die Elektroporation mit dem System von Lonza vorstellen, die zu einem zufriedenstellenden Ergebnis geführt hat. Der Nucleofector™ 2b Device (Lonza, AAB-1001) wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Kerstin Kutsche des Zentrums für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin und des Instituts für Humangenetik zur Verfügung gestellt. Die nötigen Puffer entnahm ich aus dem Amaxa™ Basic Nucleofector™ Kit for Primary Mammalian Epithelial Cells (Lonza, VPI-1005) und die Küvetten lagen vorrätig in unserem Labor vor. Die Anzahl der Zellen wurde in diesem Fall nicht bestimmt. Es wurde pro Kondition eine zu ca. 90% konfluente 10-cm Schale genutzt. Zur Ablösung der Zellen von der Zellkulturschale wurde 0,05%iges Trypsin verwendet und eine Inkubation von fünf Minuten bei 32°C angeschlossen. Während dieser Zeit wurde die Vorbereitung des Puffers getätigt. Zu 100 µl M1 Puffer aus dem Kit (Mischungsverhältnis der Nucleofactor Solution zum Supplement: 4,5:1) wurden 5 µg DNA hinzugegeben. Zur guten Durchmischung musste die Lösung einige Sekunden gevortext werden. Bis die Zellen zur Verwendung bereit sind, wurde die DNA-Puffer-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem sich die Zellen durch das Trypsin abgelöst hatten, wurden sie zusammen mit 4 ml Medium in einem Falcon gesammelt und bei 1200 G und Raumtemperatur für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und 2 ml PBS auf das Zellpellet gegeben. Eine erneute Zentrifugation mit den identischen Einstellungen folgte für eine bis drei Minuten mit anschließender Entfernung des Überstandes. Das Zellpellet wurde nun in den 100 µl M1 Puffer und DNA resuspendiert und sofort in die für das Transfektionsgerät vorgesehene Küvetten überführt. Die Küvetten wurden in die entsprechende Vorrichtung gestellt und das Programm zur Transfektion ausgewählt. Die effizienteste Transfektion mit der besten Überlebensquote wurde mit dem Programm T013 erreicht. Angaben über die einzelnen Parameter dieses Programms werden vom Hersteller nicht angegeben. Nach der Elektroporation wurden die Zellen schnellstmöglich in eine bereits mit vorgewärmtem Medium gefüllte 6-cm-Zellkulturschale zurückgeführt. Dazu wurde die Küvette mehrmals mit Medium gefüllt und anschließend geleert. Die Zellen wurden zurück in den 32°C Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag konnte der Erfolg der Transfektion mittels Fluoreszenz-Mikroskopie beurteilt werden. Es galten die identischen Einstellungen, wie auch bei der Transfektion der Maus-Podozyten.

2.8.3 Etablierung der Transfektion von HEK-Zellen

An verschiedenen Positionen der CRISPR/Cas9 Methode müssen Qualitätskontrollen vorgenommen werden. Nach erfolgreicher Klonierung sollte die Effizienz und das mutagene Vermögen der gRNAs kontrolliert werden. Dies wird mit einer Transfektion und anschließender Analyse der transfizierten Zellen durchgeführt. Ist die Transfektion jedoch schwierig oder wenig effizient, so lassen sich die Ergebnisse der Kontrolle schwer interpretieren. Aus diesem Grund dienen die mit hoher Effizienz transfizierbaren „Human embryonic kidney“ Zellen (HEK-Zellen) bei der Qualitätskontrolle humaner gRNAs als Hilfsmittel. Aufgrund ihres menschlichen Ursprungs ist ihre Verwendung auf diejenigen Proteine mit humanem Zielgen beschränkt. Die Transfektion von HEK-Zellen wurde mit Calciumchlorid vorgenommen. Alle verwendeten Materialien wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. med. Nicola Tomas bereitgestellt. Am Vortag wurden 1.000.000 Zellen in einer 10-cm-Schale ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde dann ungefähr zweieinhalb Stunden vor der Transfektion das Medium gewechselt. Direkt vor der Transfektion wurde das Transfektionsreagenz vorbereitet. Es wurde mit Tube B begonnen.

Folgendes Pipettierschema gilt pro 10cm Schale

Tube A		Tube B	
Zusammensetzung	Volumen	Zusammensetzung	Volumen
H ₂ O	245 µl	2x HBSS	300 µl
CaCl ₂	45 µl		
DNA (10µg)			

Tabelle 13: Pipettierschema für die Transfektion von HEK-Zellen.

Anschließend wurde der Inhalt von Tube A mit der 1000 µl Pipette in Tube B getropft. Die Durchmischung wurde dadurch erreicht, dass die 1000 µl Pipette in Tube B getaucht wurde und durch Drücken des Stempels Luftblasen erzeugt werden, die langsam nach oben stiegen. Danach wurde die Flüssigkeit einmal auf- und abpipettiert. Nach einer 20- bis 30-minütigen Inkubationszeit wurden pro 10-cm-Schale 600 µl des Transfektionsreagenz auf das Medium der Zellen getropft. An diesen Stellen konnte eine Farbveränderung durch die lokale pH-Verschiebung zu leicht gelblich beobachtet werden. Die Platte wurde vorsichtig in alle Richtungen geschwenkt und wieder zurück in den 37°C Inkubator gestellt. Durch die Calciumionen wird die Beschaffenheit der Zellmembran so verändert, dass es zu einer Aufnahme der DNA kommt. Nach ungefähr 24 Stunden konnte das Ergebnis mittels Fluoreszenzmikroskopie, wie oben beschrieben, beurteilt werden.

2.9 Auswahl funktionstüchtiger gRNAs mittels Restriktionsassay

Bis zu diesem Punkt ist bewiesen worden, dass die gRNA korrekt in den Vektor integriert worden ist und die Transfektion von Zellen mit ausreichender Effizienz und Überlebensrate etabliert worden ist. Nun stellt sich die Frage, ob die gRNA suffizient an die Zielsequenz binden kann, sodass die Nuklease aus dem Vektor Doppelstrangbrüche im Zielgen verursachen kann. Die dazu verwendete Methode ist ein Enzymverdau. Aus transfizierten Zellen isolierte DNA wurde amplifiziert und aufgereinigt und dann mit dem spezifisch ausgewähltem Restriktionsenzym verdaut. Die Analyse wurde mithilfe einer Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

2.9.1 DNA-Isolation für kleine Zellpellets

Für die DNA-Isolation wurden die Zellen als Zellpellet benötigt. Zunächst musste das Medium abgesogen werden und die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen. Mit 0,05%igem Trypsin und einer Inkubation von 5 Minuten bei 32°C lösten sich die Zellen von der Oberfläche. Mit zusätzlichem Medium wurden die Zellen in ein 15 ml Falcon Tube überführt. Es folgte eine Zentrifugation zur Bildung eines Zellpellets bei 1200 G für fünf Minuten und bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen. Um alle Mediumrückstände zu entfernen wurden 2 ml 1x PBS auf das Zellpellet gegeben und eine erneute Zentrifugation bei identischen Einstellungen für zwei Minuten vorgenommen. Der Überstand wurde ebenfalls entfernt und das Zellpellet auf Eis gestellt. Die anschließende DNA-Extraktion wurde mithilfe des GeneArt™ Genomic Cleavage Detection Kits vorgenommen. Es wurde ein Mastermix entsprechend der Anzahl der Zellpellets mit folgender Zusammensetzung vorbereitet.

Zusammensetzung	Volumen
Cell Lysis Buffer	50 µl
Protein Degradier	2 µl

Tabelle 14: Zusammensetzung des Lysepuffers für die DNA-Isolation.

Das Zellpellet wurde in 50 µl Lysepuffer resuspendiert und in PCR-Tubes pipettiert. Folgendes Thermocycler-Programm wurde für die DNA-Extraktion verwendet.

Temperatur	Dauer
68°C	15 min
95°C	10 min
4°C	∞

Tabelle 15: Thermocycler-Programm der DNA-Isolation.

Das Produkt konnte nun weiterverwendet werden oder zur Aufbewahrung bei -20°C gelagert werden.

2.9.2 DNA-Isolation für große bzw. viele Zellpellets

Handelte es sich um größere Mengen an Zellen, wie zum Beispiel aus einer 10-cm-Zellkulturschale oder um viele Zellpellets, so wurde die DNA-Isolation mithilfe eines selbst hergestellten Puffers vorgenommen. Die Zusammensetzung des Lyse-Puffers ist wie folgt.

Zusammensetzung	Volumen	Endkonzentration
Kaliumchlorid, 1 M (KCl)	2,5 ml	50 mM
Magnesiumchlorid, 1 M (MgCl ₂)	75 µl	1,5 mM
Tris, 1 M	500 µl	10 mM
NP40	225 µl	0,45 %
Tween-20	225 µl	0,45 %

ad 50 ml H₂O

Tabelle 16: Zusammensetzung des Lysepuffers für die DNA-Isolation großer Zellpellets.

Diese Lösung kann bei Raumtemperatur einige Monate gelagert werden. Als einziges Reagenz muss Proteinase K (10 mg/ml) in einer Verdünnung von 1:100 frisch hinzugefügt werden. Die Zellen, vorliegend in einer 6- oder 10-cm-Schale, wurden mit 3-5 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend auf Eis gestellt. Es wurden erneut 5 ml PBS auf die Zellen pipettiert, die dann mit einem Cell Scraper von der Oberfläche der Schale geschabt wurden. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden möglichst alle Zellen aufgenommen und in einem 15 ml Falcon Tube gesammelt. Um ein Zellpellet zu erhalten, schloss sich eine Zentrifugation bei 1200 G und 4°C für fünf Minuten an. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet entsprechend seiner Größe in 300-500 µl des Lysepuffers resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei 60°C für eine Stunde in einem Wärmeschrank. Zur Entfernung von Zelldebris war nach dieser Inkubation eine Zentrifugation bei 5000G und Raumtemperatur für fünf Minuten erforderlich. Um die Enzymaktivität der Proteinase K zu inaktivieren, wurde die Probe für zehn Minuten auf 96°C erhitzt. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -20°C.

2.9.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine seit fast 40 Jahren bestehende Methode zur exponentiellen Amplifikation eines mit Primern spezifisch festgelegten DNA-Abschnittes. Die nötigen Reaktionsschritte sind temperaturabhängig und können durch immer wiederkehrende Abfolge von Erhitzen und anschließendem Abkühlen der Reagenzien beliebig oft wiederholt werden. Auf diese Weise können Tausende bis Millionen von Kopien des DNA-Templates produziert werden. Für jede Polymerase-Kettenreaktion werden bestimmte Standard-Reagenzien benötigt. Als Ausgangspunkt der Vervielfältigung ist eine DNA-Vorlage essenziell. Die Synthese der Amplikate wird von einem Enzym, der DNA-Polymerase, übernommen. Zur Eingrenzung der Zielsequenz wird ein DNA-Primerpaar benötigt. Beide Primer binden dabei jeweils komplementär die 3' Enden der Zielsequenz sowohl des kodierenden als auch nicht-kodierenden Stranges des DNA-Templates. Darüber hinaus sind die Primer essenziell für die Bindung der DNA-Polymerase an das Template. Damit die Polymerase neue DNA-Stränge aufbauen kann, müssen Nukleotide (dNTPs) vorliegen. Für die optimale Aktivität und Stabilität der DNA-Polymerase sind optimale Pufferbedingungen notwendig, die meist unter anderem durch die Anwesenheit von Magnesium- und Calciumionen geschaffen werden. Die richtige Wahl der Temperaturen als auch die Dauer der einzelnen Reaktionen hängen von verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel dem verwendeten Enzym, der Konzentration von dNTPs oder auch von der Schmelztemperatur der Primer ab. Der Beginn der PCR ist die Initialisierungsphase bei mehr als 90°C für einige Minuten, wodurch die Polymerase aktiviert wird. Anschließend beginnt die eigentliche Reaktionsabfolge der PCR. Der erste Schritt ist die Denaturierung des Doppelstranges. Mit Temperaturen zwischen 94 und 98°C für 20-30 Sekunden

werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren aufgebrochen, sodass es zu einem Auseinanderbrechen des Doppelstranges kommt. Der nächste Schritt ist das sogenannte Annealing oder die Primerhybridisierung. Durch Abkühlung aller Komponenten auf 50-65°C für 20-40 Sekunden können die Primer an das 3'Ende des kodierenden als auch nicht-kodierenden Einzelstranges binden. Die Festlegung der exakten Temperatur ist von großer Wichtigkeit, da sowohl die Effizienz als auch Spezifität sehr stark dadurch beeinflusst werden. Eher niedrig angesetzte Temperaturen sorgen für eine gute, jedoch eher unspezifische Hybridisation. Ist die Temperatur höher angesetzt, so wird das Bindevermögen bei erhöhter Spezifität geschwächt. Eine typische Annealing Temperatur ist 3-5°C geringer als die vorgeschlagene Schmelztemperatur (T_M Temperatur) der Primer. Darüber hinaus spielt die Komplementarität der Primersequenz zur Zielsequenz eine Rolle, denn nur dann können Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden. Während der Annealing-Zeit wird sich ebenfalls die Polymerase an den Primern anlagern. Der nächste Schritt ist die Elongation. Die Höhe der Temperatur wird durch das verwendete Enzym und dessen Temperaturoptimum bestimmt. Die Temperatur der Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* liegt meist bei 72°C. Das Enzym wird nun mithilfe der Nukleotide aus dem Reaktionsansatz einen DNA-Strang vom 5' Ende hin zum 3'Ende komplementär zu der Vorlage synthetisieren. Als ungefährender Richtwert für die Dauer, kann davon ausgegangen werden, dass die Polymerase 1000 Basen pro Minute synthetisieren kann. Ist die Elongation abgeschlossen, so beginnt der Zyklus erneut bei der Denaturierung. Auf diese Weise wird die Menge der Kopien pro Zyklus verdoppelt und die Menge wächst exponentiell an. Nach dem letzten Zyklus kann eine abschließende Elongation für 5-15 Minuten angeschlossen werden, um eine Beendigung aller Elongationen zu sichern. Für eine sichere Lagerung des PCR-Produktes schließt sich eine Inkubation bei 4-15°C an. Eine spezielle Form der PCR ist die Touchdown-PCR, die für einen Teil der Proben verwendet worden ist. Hierbei werden pro Zyklus unterschiedliche Annealing Temperaturen verwendet, beginnend bei der höchsten. Dadurch werden nur die Sequenzen amplifiziert, die mit einer hohen Bindungsspezifität synthetisiert worden sind.

Anschließend wurde die Analyse der PCR mit einer Agarosegelelektrophorese vorgenommen. Durch ein gleichförmiges elektrisches Feld werden die geladenen Moleküle durch die Poren im Gel transportiert und es findet eine Auftrennung und damit isoelektrische Fokussierung entsprechend ihrer Länge statt. Die Migration der DNA-Fragmente wird durch verschiedene Faktoren wie die Gelkonzentration, die Größe der DNA-Fragmente und der Höhe der angelegten Spannung beeinflusst. Stets wandern kleinere Moleküle schneller als größere, was zu der beschriebenen Auftrennung führt. Die Banden werden anschließend unter UV-Licht-Bestrahlung durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid ersichtlich.

In den nachfolgenden Experimenten wurden 1,5 %ige Agarosegele verwendet. Dafür wurde die Agarose in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) durch kurzes Aufkochen aufgelöst und nach Abkühlung mit 3 µl Ethidiumbromid versetzt. Die noch flüssige Agaroselösung wurde dann in den Gelträger gegossen und zur Polymerisation für ungefähr eine halbe Stunde stehen gelassen. Anschließend wurde der Gelträger in einer Elektrophoresekammer platziert und die Taschen mit den Proben beladen. Da es sich bei dieser Gelelektrophorese um eine Kontrolle der PCR handelte, wurden nur 3 µl des PCR-Produktes geladen, um möglichst viel Volumen für die anschließende Aufreinigung zu belassen. Bei allen Reaktionsansätzen mit dem Enzym Phusion ist die Zugabe des Gel Loading Dye Purple (6x) notwendig. Wurde die PCR mit DreamTaq angesetzt, so muss kein zusätzlicher Farbstoff

hinzugefügt werden. Um die Banden einer Länge zuordnen zu können, wurde mindestens eine Tasche mit 7µl der 100 bp DNA ladder befüllt.

Für die folgenden Gene und guide-RNAs wurde der folgende Reaktionsansatz und das folgende Programm im Thermocycler verwendet:

MERTK: gRNA 1 + gRNA 2 + gRNA 4 + gRNA 5 + gRNA 6
 ITM2B: gRNA 3
 NPR3: gRNA 4 + gRNA 5

Zusammensetzung	Volumen	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Template/ DNA	2 µl	94°C	5 Minuten	1
Dream-Taq	14 µl	94°C	45 Sekunden	
Primer F (10 µM)	1 µl	60°C	30 Sekunden	40
Primer R (10 µM)	1 µl	72 °C	40 Sekunden	
dH ₂ O	10 µl	72 °C	5 Minuten	1
GESAMTVOLUMEN	28 µl	4 °C	∞	

Tabelle 17: Zusammensetzung der PCR-Reaktion und Programm im Thermocycler. Diese Auflistung gilt für folgende Protein und gRNAs: MERTK, gRNA 1 + 2 + 4 + 5 + 6, ITM2B, gRNA 3 und NPR3, gRNA 4 + 5.

Für die folgenden Gene und guide-RNAs wurde der folgende Reaktionsansatz und das folgende Programm im Thermocycler verwendet:

MERTK: gRNA 3 + gRNA 4 + gRNA 5
 NPR3: gRNA 1 + gRNA 2

Zusammensetzung	Volumen	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Template/ DNA	2 µl	98°C	3 Minuten	1
5x Phusion buffer (HF)	10 µl	98°C	30 Sekunden	10 Zyklen
dNTPs (10 mM)	1 µl	65°C	30 Sekunden	(-0,5°C pro Zyklus)
Primer F (10 µM)	1 µl	72 °C	30 Sekunden	
Primer R (10 µM)	1 µl	98°C	30 Sekunden	
Phusion (Enzym)	0,5 µl	60 °C	30 Sekunden	25
dH ₂ O	34,5 µl	72 °C	30 Sekunden	
GESAMTVOLUMEN	50 µl	72 °C	7 Minuten	1
		4 °C	∞	

Tabelle 18: Zusammensetzung der PCR-Reaktion und Programm im Thermocycler. Diese Auflistung gilt für folgende Protein und gRNAs: MERTK, gRNA 3 + 4 + 5 und NPR3, gRNA 1 + 2.

Die gRNA 4 für MERTK wurde in beiden Konditionen aufgelistet, weil die erste Überprüfung der gRNA mit der Phusion-PCR vorgenommen wurde, im späteren Verlauf aber die DreamTaq PCR verwendet wurde.

2.9.3.1 Liste der verwendeten Primer

gRNA	Forward Primer (vom 5' zum 3' Ende)	Reverse Primer (vom 5' zum 3' Ende)
ITM2B		
1	TTCACTCGATTTGCTACAAAC	CTCTTGGGCTCGTCCTTCTT

2	CTTAAAAATCCAGTTGCTGCCT	CGTATTGTCTATGGCACCAGAA
3	CCTAGAGACCAATGTCCCAGTC	TCTGGCTGAAGGTCACAGATAA
MERTK		
1	AAACTCCAATCTTCTGCTCTGC	CTGCTTTGGAGGTGGTATTAGC
2	TGATGGGGAATTATGTGTGTGT	CTAAAATGCACCAAACAAGCAG
3	GACAGTTTCACTGAGTTGCCTG	TGCCTTGCTCAATGATAACAAG
4	GAGGGCCATTTATATTTGGTGA	TGCCAGACTATCCATCTCCTTT
5	TGTTCTCTTTGAAGCATAGCCA	TGGCACCTCTTAGCAACACTTA
6	GCTCTGCTTCTGGTTAAAGCAT	GTGACCGATCCACTTTCTTAGC
NPR3		
1	AGATCGAGGTGCTGGTGTACT	TACTCAGAGTCCTTGTGCTGGA
2	TTACACCCGGTGAACCTTTTTCT	AGTAACACCAGCACCTCGATCT
4	TCCAGCACAAAGGACTCTGAG	CTGGCAAAGTGGAAACTGGG
5	AGATCGAGGTGCTGGTGTACT	ACGATGTCTTCCAGATCCAAGT

Tabelle 19: Liste aller verwendeten Primer.

2.9.4 Aufreinigung des PCR-Produktes

Zeigte die Überprüfung der PCR eine spezifische Bande, so konnte das PCR-Produkt aufgereinigt werden, um es für die nächste Reaktion nutzen zu können. Dafür habe ich das folgende Kit verwendet: QIAquick PCR Purification Kit. Ziel dieser Aufreinigung ist es, das PCR-Produkt von Primern und anderen Reagenzien aus der PCR zu befreien.

Vorbereitend sollten die QIAquick Säulen auf die entsprechenden Auffangtubes gesetzt werden. Zur Ermöglichung der Bindung der DNA an die spezielle Silicamembran und dem ersten Entfernen der ungewünschten Primer wird der Puffer PB benötigt. Das fünf-fache Volumen des PCR-Produktes wurde zu dem PCR-Produkt hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Lösung wurde nach Durchmischung auf die QIAquick Säule pipettiert und für eine Minute bei 17000 G und Raumtemperatur zentrifugiert. Auch alle weiteren Zentrifugationsschritte wurden bei diesen Einstellungen durchgeführt. Die Flüssigkeit im Auffangbehälter kann verworfen werden, währenddessen die DNA unter hohen Salzkonzentrationen und optimalem pH-Wert an die Säule adsorbiert worden ist. Durch die Anwesenheit von chaotropen Salzen, werden Wasserstoffbrückenbindungen gestört, was die Adsorption von Nukleinsäuren ermöglicht. Der optimale pH-Wert liegt bei $\leq 7,5$ und ist essentiell für ein effizientes Bindeverhalten der DNA. Es folgte ein Waschschriff mit 750 μ l des Puffers PE und einer anschließenden Zentrifugation bei identischen Einstellungen. Die DNA bleibt weiterhin an der Säule gebunden, während hingegen alle Arten von Kontaminationen und Verunreinigungen, wie Primer, Enzyme oder einzelne Nukleotide abgewaschen werden. Der Puffer ist Ethanol-haltig und entfernt somit auch Salze. Der Flow-through wurde erneut verworfen. Um verbliebenen Puffer vollständig zu entfernen, wurde ein weiteres Mal zentrifugiert. Die Columns wurden nun auf ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gesetzt. Die unter niedrigen Salzbedingungen und alkalischem pH-Wert stattfindende Elution wurde mit 30 μ l EB-Puffer (10 mM Tris·Cl, pH 8,5) durchgeführt. Nach einer Minute Inkubation schloss

sich eine erneute Zentrifugation an. Das Elutionsprodukt konnte entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C gelagert werden.

2.9.5 Restriktionsassay und Gelelektrophorese

An diesem Punkt des Prozesses liegt der Fokus auf der funktionellen Analyse der ausgewählten gRNAs. Dabei dient ein Enzymverdau als diagnostisches Mittel, ob die gRNA für nachfolgende Transfektionen einsetzbar ist oder nicht. Pro gRNA-Überprüfung wurden vier Reaktionsansätze mit den jeweils aufgereinigten PCR-Produkten vorbereitet. Die DNA unbehandelter Zellen derselben Zelllinie mit identischen Primern amplifiziert dient als Negativ-Kontrolle. Sowohl die Negativ-Kontrolle als auch die zu überprüfende DNA-Probe wurde jeweils einmal als Reaktionsansatz mit dem spezifischen Enzym und einmal ohne dieses Enzym angesetzt. Das Restriktionsenzym ist beim gRNA-Design so ausgewählt worden, dass seine Erkennungssequenz 2-3 Basenpaare upstream der PAM-Sequenz liegt, also im Bereich von CRISPR/Cas9-bedingten Mutationen. Eine Veränderung dieser Erkennungssequenz führt dazu, dass das Enzym nicht an die DNA binden und sie in zwei kürzere Fragmente zerschneiden kann. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei der optimalen Reaktionstemperatur für das jeweilige Enzym, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, um das Ergebnis sichtbar zu machen. Hierfür musste der Gel Loading Dye Purple (6x) hinzugefügt werden.

Prinzipiell bringt die Methode zwei mögliche Resultate hervor. Dadurch wird ermöglicht, dass man zwischen Zellen mit einer CRISPR/Cas9 ausgelösten Mutation von Zellen, die der Prozedur zwar unterzogen worden sind, jedoch keine Mutation aufweisen, unterscheiden kann. Zeigen Proben ein identisches Bild wie die Negativkontrolle, so kann davon ausgegangen werden, dass diese Zellen keine Mutationen aufweisen und das Restriktionsenzym ungehindert die DNA zerschneidet. In diesen beiden Fällen zeigt der Ansatz ohne Restriktionsenzym eine starke Bande, die im Ansatz mit dem Enzym komplett verschwindet und anstatt dessen zwei DNA-Fragmente geringerer Länge erscheinen. Handelt es sich im Gegensatz dazu um DNA, die eine CRIPR/Cas9 Mutation enthält, so zeigt der Ansatz ohne Enzym erneut eine dicke Bande, jedoch verschwindet diese nicht komplett im Ansatz mit Enzym. Dort sind nun drei Banden sichtbar. Da die Effizienz der gRNA nie bei 100 % liegt und auch nicht 100 % der Zellen transfiziert worden sind, sind neben der ungeschnittenen Bande auch wieder die zwei geschnittenen Banden sichtbar.

Aus dieser Erkenntnis ergeben sich auch Grenzen dieser Methode. Da die Transfektionseffizienz in einigen Fällen bei unter 10% lag und dies die Erkennung einer ungeschnittenen Bande in dem Reaktionsansatz mit einem Enzym fast unmöglich machte, wurden zwei alternative Vorgehensweisen etabliert. Zum einen wurde durch die Zuhilfenahme einer anderen, viel effizienter zu transfizierenden Zelllinie eine Transfektionseffizienz von mehr als 50% erreicht und somit konnte diese falsch-negative Bewertung vermieden werden. Der zweite Ansatz bedient sich den Möglichkeiten des FACS-Sorting. Nach erfolgreicher Transfektion wurden aus dem Zellgemisch aus transfizierten und untransfizierten Zellen zunächst im FACS-Sorter all die Zellen mit einem positivem Transfektionssignal in ein 1,5 ml Eppendorf Tube sortiert und aus diesen die DNA-Probe gewonnen. So wurden zu 100% transfizierte Zellen mittels Restriktionsverdau analysiert und die Stärke der ungeschnittenen Bande zeigte automatisch auch die Effizienz der gRNA an.

Kann trotz allem keine ungeschnittene Bande in der Probe mit Enzym detektiert werden, so kann davon ausgegangen werden, dass die gRNA nicht funktionstüchtig ist. Das Erscheinungsbild der Agarosegelelektrophorese ist somit identisch mit dem der Wildtyp-DNA.

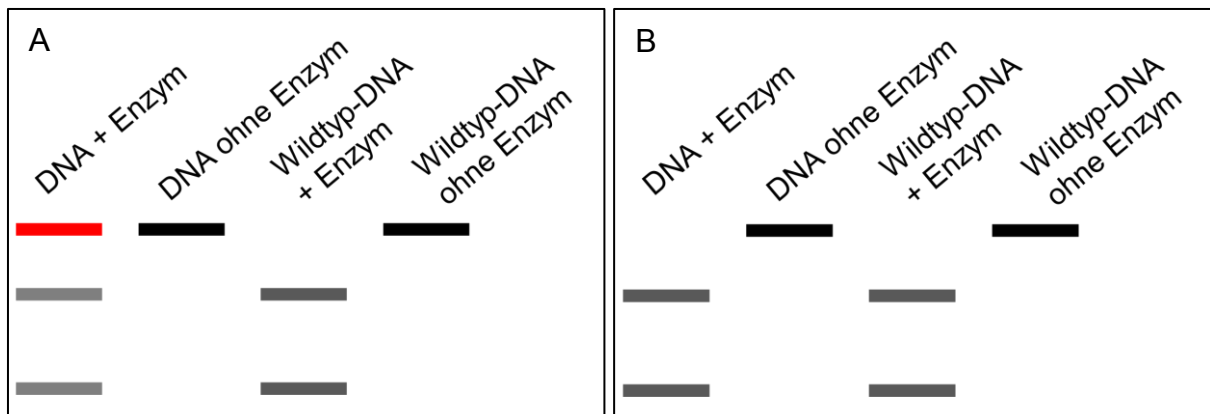


Abbildung 7: **Mögliche Ergebnisse des Restriktionsassays.** A. Die rot markierte Bande zeigt vom Restriktionsenzym ungeschnittenes DNA-Material an. Dies deutet darauf hin, dass die designte gRNA bei diesen Zellen eine Veränderung an der gewünschten Stelle vorgenommen hat. Somit ist diese gRNA funktionstüchtig. B. Das Bandenmuster der Wildtyp-DNA und der zu untersuchenden DNA stimmen überein. Somit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass diese gRNA nicht funktionstüchtig ist.

Für den Enzymverdau wurden alle Reaktionskomponenten in ein PCR-Tube pipettiert. Die Stärke der Bande in der Gelelektrophorese nach der PCR entschied über das verwendete Volumen des aufgereinigten PCR-Produktes in die Reaktion. Für die zweistündige Inkubation bei entsprechender Temperatur wurde ein Thermo Cycler verwendet.

Es wurden folgende Reaktionen für die einzelnen Proteine und unterschiedlichen gRNAs verwendet.

NPR3 gRNA 1 + 2

Mit Enzym		Ohne Enzym	
Zusammensetzung	Volumen	Zusammensetzung	Volumen
PCR-Produkt	15 µl	PCR-Produkt	15 µl
Puffer	2 µl	Puffer	2 µl
Enzym	1 µl	Enzym	0 µl
dH ₂ O	2 µl	dH ₂ O	3 µl
GESAMTVOLUMEN	20 µl	GESAMTVOLUMEN	20 µl

Tabelle 20: Zusammensetzung der Reaktion des Enzymverdaus für NPR3, gRNA 1+2.

MERTK gRNA 1

Mit Enzym			Ohne Enzym		
Zusammen- setzung	Volumen	Volumen (WT)	Zusammen- setzung	Volumen	Volumen (WT)
PCR-Produkt	10 µl	3 µl	PCR-Produkt	10 µl	3 µl
Puffer	2 µl	1 µl	Puffer	2 µl	1 µl
Enzym	1 µl	1 µl	Enzym	0 µl	1 µl
dH ₂ O	7 µl	5 µl	dH ₂ O	8 µl	5 µl
GESAMT- VOLUMEN	20 µl	10 µl	GESAMT- VOLUMEN	20 µl	10 µl

Tabelle 21: Zusammensetzung der Reaktion des Enzymverdaus für MERTK, gRNA 1.

MERTK gRNA 2 + 3 + 4 + 5 + ITM2B gRNA 3 + 4 + NPR3 gRNA 4

Mit Enzym		Ohne Enzym	
Zusammensetzung	Volumen	Zusammensetzung	Volumen
PCR-Produkt	3 µl	PCR-Produkt	3 µl
Puffer	1 µl	Puffer	1 µl
Enzym	1 µl	Enzym	0 µl
dH ₂ O	5 µl	dH ₂ O	6 µl
GESAMTVOLUMEN	10 µl	GESAMTVOLUMEN	10 µl

Tabelle 22: Zusammensetzung der Reaktion des Enzymverbaus für MERTK, gRNA 2 + 3 + 4 + 5, ITM2B, gRNA 3 + 4 und NPR3, gRNA 4.

MERTK gRNA 6

Mit Enzym			Ohne Enzym		
Zusammensetzung	Volumen	Volumen (WT)	Zusammensetzung	Volumen	Volumen (WT)
PCR-Produkt	3 µl	6 µl	PCR-Produkt	3 µl	6 µl
Puffer	1 µl	1 µl	Puffer	1 µl	1 µl
Enzym	1 µl	1 µl	Enzym	0 µl	0 µl
dH ₂ O	5 µl	2 µl	dH ₂ O	6 µl	3 µl
GESAMT-VOLUMEN	10 µl	10 µl	GESAMT-VOLUMEN	10 µl	10 µl

Tabelle 23: Zusammensetzung der Reaktion des Enzymverbaus für MERTK, gRNA 6.

NPR3 gRNA 5

Mit Enzym		Ohne Enzym	
Zusammensetzung	Volumen	Zusammensetzung	Volumen
PCR-Produkt	10 µl	PCR-Produkt	10 µl
Puffer	2 µl	Puffer	2 µl
Enzym	1 µl	Enzym	0 µl
dH ₂ O	7 µl	dH ₂ O	8 µl
GESAMTVOLUMEN	20 µl	GESAMTVOLUMEN	20 µl

Tabelle 24: Zusammensetzung der Reaktion des Enzymverbaus für NPR3, gRNA 5.

2.9.5.1 Liste der verwendeten Restriktionsenzyme

	Name des Restriktionsenzym	Verwendeter Puffer	Temperatur der Reaktion
ITM2B, gRNA 3	<i>Cac8I</i>	Cut Smart	37°C
ITM2B, gRNA 4	<i>PfIF1</i>	Cut Smart	37°C
MERTK, gRNA 1	<i>AvaI</i>	Cut Smart	37°C
MERTK, gRNA 2	<i>StyD4I</i>	Cut Smart	37°C
MERTK, gRNA 3	<i>PmlI</i>	Cut Smart	37°C
MERTK, gRNA 4	<i>HpyAV</i>	Cut Smart	37°C
MERTK, gRNA 5	<i>BsaAI</i>	Cut Smart	37°C

MERTK, gRNA 6	<i>BsaWI</i>	Cut Smart	60°C
NPR3, gRNA 1	<i>FspI</i>	Cut Smart	37°C
NPR3, gRNA 3	<i>BseYI</i>	NEBuffer 1.1	37°C
NPR3, gRNA 4	<i>BstYI</i>	NEBuffer 2.1	60°C
NPR3, gRNA 5	<i>XhoI</i>	Cut Smart	37°C

Tabelle 25: Liste der verwendeten Restriktionsenzyme.

2.10 FACS-Sorting transfizierter Zellen

Nach der funktionellen Analyse der gRNAs wurden Zellen der Zielzelllinie erneut transfiziert. Anschließend wurden die Zellen einem FACS-Sorting unterzogen. Ziel der Prozedur ist es, die transfizierten Zellen zu isolieren und in 96-well-Platten zu Einzelzellen pro Well zu vereinzeln. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass genetisch identische Zellklone aus einer Zelle entstehen. Die dafür verwendeten 96-well-Platten wurden am Vortag mit 180 µl Medium gefüllt. Kurz vor dem Sort wurde das Medium von den Zellkulturschalen aspiriert und die Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen. Mit 0,05%igem Trypsin wurden die Zellen von der Platte nach fünf-minütiger Inkubation bei 32°C abgelöst und in zusätzlichen 4 ml Medium bei 1200 G und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden erneut 2 ml 1x PBS auf das Zellpellet gegeben und eine weitere Zentrifugation bei 1200 G und Raumtemperatur für 3 Minuten schloss sich an. Anschließend wurde das Zellpellet in 250 µl 1x HBSS resuspendiert und durch den Filter der 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes with Cell-strainer Cap (12x 75 mm) in die Tubes überführt. Es wurden weitere 250 µl 1x HBSS in die Tubes gegeben. Der Deckel wurde mit sterilem Parafilm abgedeckt. Die Zellen wurden auf Eis zur FACS-Sort-Core Facility des UKEs gebracht. Die Zellsortierung wurde mit dem FACS AriaFusion vorgenommen. Erster Schritt dieser Methode ist die hydrodynamische Fokussierung. Dabei werden die Zellen perlenschnurartig in einem minimalen Wasserstrom aufgereiht. So können diese einzeln mithilfe eines Lasers analysiert werden. Das nachfolgende Bauteil ist die Nozzle, durch die der gleichmäßige Flüssigkeitsstrom in Tropfen vereinzelt wird und diese elektrisch aufgeladen werden. Diese Ladung ermöglicht eine Ablenkung in einem elektrischen Feld und die anschließende Platzierung in 96-well-Platten bzw. in einem anderen Sammelgefäß. Das Ziel dieses FACS-Sortings ist es, transfizierte Zellen vereinzelt in die 96-well-Platte zu platzieren. Zunächst wurde die vitale Zellpopulation gegenüber Zelldebris herausgefiltert. Dabei ist der forward scatter ein Maß für die Zellgröße und der side scatter ein Maß für die Granularität. Im zweiten Schritt wurden Zell-Doupletten eliminiert. Aus der verbleibenden Population wurden die transfizierten Zellen aufgrund ihrer Expression des orange-flourescence-protein (OFP) gefiltert und dann als einzelne Zellen in eine 96-well-Platte verteilt. Pro Sort wurden fünf oder zehn 96-well-Platten mit Zellen befüllt. Nach Abschluss des FACS-Sortings wurden die Zellen sofort in den 32°C Inkubator gestellt.

2.11 Handling der Klone in 96-well-Platten

Etwa eine Woche nach der Zellsortierung wird das erste Mal das Medium der Zellen gewechselt. Dafür wurde eine Multichannel-Pipette verwendet. Das Medium wurde zunächst mit einer Multichannel-Absaugpumpe abgesogen, die Zellen mit 100 µl 1x PBS gewaschen und anschließend 200 µl vorgewärmtes Medium erneut auf die Zellen gegeben. Weiterhin wöchentlich wurde das Medium gewechselt. Ab etwa der

zweiten Wochen konnten die einzelnen Wells unter einem Lichtmikroskop kontrolliert werden, um wachsende Kolonien zu identifizieren. Der Übersichtlichkeit wegen wurden die Wells mit sichtbaren Kolonien einer einzelnen Zelle auf dem Deckel der Zellkulturplatten gekennzeichnet. Sobald die Mehrzahl der detektierten Kolonien das gesamte Well bedeckt haben, wurde diejenige 96-well-Platte gesplittet. Die eine Hälfte der Zellen diente der Genotypisierung, die zweite Hälfte der Aufrechterhaltung der Klone. Das Medium wurde abgesogen und jedes Well mit 100 µl 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden 50 µl 0,05%iges Trypsin auf jedes Well gegeben und es folgte eine Inkubation für 5 Minuten bei 32°C. Währenddessen wurden zwei neue 96-well-Platten mit je 150 µl Medium pro Well gefüllt. Nach der Inkubation wurden weitere 50 µl Medium auf das Trypsin-Zell-Gemisch gegeben und zwei Mal 50 µl in jeweils die vorbereiteten 96-well-plates pipettiert. Nach ungefähr einer Woche waren die gesplitteten Platten erneut konfluent und die DNA konnte isoliert werden. Die zweite Platte wurde nun von einer 96-well-Platte in eine 48-well-Platte übertragen. Zur Identifikation der einzelnen Klone wurden sie nach einem gleichbleibenden Schema benannt. Zunächst wird das Zielprotein genannt, anschließend die verwendete gRNA. Darauffolgend wird die Nummer der Platte genannt, die vor dem FACS-Sorting beschriftet worden ist. Der letzte Teil des Klonnenamen ist auf das Well zurückzuführen, in dem der Klon gewachsen ist.

2.12 Genotypisierung der Klone mittels Restriktionsassay

Ob die gewachsene Kolonie einem Wildtyp- oder einem Knockout-Klon entsprang, musste nun untersucht werden. Um einen ersten Hinweis zu erhalten, wurde erneut die Methode des Restriktionsassays angewendet. Das Prinzip entspricht demselben wie bereits in Kapitel 2.9 genauer für die Validierung der gRNAs beschrieben. Die isolierte DNA aus den Kolonien wurde mithilfe einer PCR amplifiziert. Es wurden hierfür jeweils Primer verwendet, die den Bereich der gRNA umschließen. Anschließend wurde das PCR-Produkt einem Enzymverdau unterzogen.

2.12.1 DNA-Isolation der Zellen in 96-well-Plates

Zur DNA-Isolation wurde die „hotshot“ Methode verwendet mit folgender Pufferzusammensetzung:

Alkaliner Lysepuffer (pH 12)		Neutralisationspuffer (pH 5)	
Zusammensetzung	Konzentration	Zusammensetzung	Konzentration
NaOH	25 mM	Tris-HCl	40 mM
Na ₂ EDTA	0,2 mM		

Tabelle 26: Zusammensetzung des Lysepuffers für die DNA-Isolation.

Das Medium der 96-well-Platte wurde zunächst aspiriert, dann folgte ein Waschschrift mit 200 µl 1x PBS. Danach wurden 50 µl des alkalinen Lysepuffers auf jedes Well gegeben und um ein Verdampfen zu verhindern, wurde die Oberfläche der Zellkulturplatte mit Parafilm bedeckt und der Deckel geschlossen. Zur Lyse musste eine Temperatur von 95 °C für 30 Minuten einwirken. Anschließend sollten Platte und Lysat nach Parafilmablösung bei 4°C abkühlen, damit 50 µl des Neutralisationspuffers dem Lysat hinzugefügt werden konnten. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C.

2.12.2 PCR

Die Durchführung der PCR entspricht der in Kapitel 2.9.3 beschriebenen Methode.

2.12.2.1 Liste der verwendeten Primer für Klonvalidierung

gRNA	Forward Primer (vom 5' zum 3' Ende)	Reverse Primer (vom 5' zum 3' Ende)
ITM2B		
1	TTCACTCGATTTTCGCTACAAAC	CTCTTGGGCTCGTCCTTCTT
2	CTTAAAAATCCAGTTGCTGCCT	CGTATTGTCTATGGCACCAGAA
3	CCTAGAGACCAATGTCCCAGTC	TCTGGCTGAAGGTCACAGATAA
MERTK		
2	TGATGGGGAATTATGTGTGTGT	CTAAAATGCACCAAACAAGCAG
4	GAGGGCCATTTATATTTGGTGA	TGCCAGACTATCCATCTCCTTT
NPR3		
3	CCGTCAATTACAAACACTTGGA	AGTAACACCAGCACCTCGATCT
4	TCCAGCACAAGGACTCTGAG	CTGGCAAAGTGGAAACTGGG

Tabelle 27: Liste der verwendeten Primer für die Klonvalidierung.

2.12.2.2 PCR-Protokolle

NPR3 gRNA 3

Zusammensetzung	Volumen	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Template/ DNA	2 µl	98°C	3 Minuten	1
5x Phusion buffer (HF)	10 µl	98°C	30 Sekunden	10 Zyklen
dNTPs (10 mM)	1 µl	65°C	30 Sekunden	(-0,5°C pro Zyklus)
Primer F (10 µM)	1 µl	72 °C	30 Sekunden	
Primer R (10 µM)	1 µl	98°C	30 Sekunden	
Phusion (Enzym)	0,5 µl	60 °C	30 Sekunden	25
dH ₂ O	34,5 µl	72 °C	30 Sekunden	
GESAMTVOLUMEN	50 µl	72 °C	7 Minuten	1
		4 °C	∞	

Tabelle 28: Zusammensetzung der PCR-Reaktion und Programm im Thermocycler. Diese Auflistung gilt für folgende Protein und gRNAs: NPR3, gRNA 3.

NPR3 gRNA 4 + MERTK gRNA 2 + MERTK gRNA 4 + ITM2B gRNA3

Zusammensetzung	Volumen	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Template/ DNA	2 µl	94°C	5 Minuten	1
Dream-Taq	14 µl	94°C	45 Sekunden	
Primer F (10 µM)	1 µl	60°C	30 Sekunden	40
Primer R (10 µM)	1 µl	72 °C	40 Sekunden	
dH ₂ O	10 µl	72 °C	5 Minuten	1
GESAMTVOLUMEN	28 µl	4 °C	∞	

Tabelle 29: Zusammensetzung der PCR-Reaktion und Programm im Thermocycler. Diese Auflistung gilt für folgende Protein und gRNAs: NPR3, gRNA 4, MERTK, gRNA 2 + 4 und ITM2B, gRNA 3.

2.12.3 Restriktionsverdau

Konnten nach der PCR und der anschließenden Gelelektrophorese eindeutige Banden entdeckt werden, so wurde wie bereits in Abschnitt 2.9.4 genauer beschrieben, die DNA aufgereinigt und dann für einen anschließenden Restriktionsverdau verwendet. Dabei wurden die jeweiligen für die verwendete gRNA spezifischen Restriktionsenzyme eingesetzt. Diese sind der Tabelle 25 zu entnehmen. Anhand der Bandenverteilung konnte so eine erste Aussage über den vermutlichen Genotyp des Klons getroffen werden. Sobald eine ungeschnittene Bande in der Kondition mit Enzymzusatz detektiert wurde, erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit, dass es sich hierbei um einen Knockout-Klon handeln könnte. Dieser wurde dann für die nachfolgenden Experimente ausgewählt.

2.13 Genotypisierung der Klone mittels Sequenzierung

Nachdem eine grobe Orientierung mithilfe des Restriktionsassays vorgenommen wurde, wurde im nächsten Schritt der genaue Genotyp des Klons ermittelt. Hierfür wurde die Sanger-Sequenzierung als Methode der Wahl ausgesucht.

2.13.1 PCR

Für eine Sequenzierung musste zunächst der Genabschnitt amplifiziert werden. Das hierfür verwendete Protokoll ist in Abschnitt 2.9.3 bereits genauer erläutert. Es wurden die Primer aus der Tabelle 27 verwendet.

2.13.2 DNA-Isolation aus dem Gel

Konnte nach der PCR eine eindeutige Bande detektiert werden, so wurde diese mit einem Cutter-Messer unter möglichst kurzzeitiger UV-Licht-Bestrahlung zur Verhinderung von Mutationen ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt. Anschließend folgte die DNA-Isolation aus dem Gel mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits. Zunächst wurde das Gel mitsamt des Epis auf der Feinwaage gewogen und das Gewicht des Gelstückes berechnet. Anschließend wurde die 3-fache Menge des Gewichtes in mg an μl des Buffer QG hinzugegeben. In einem 50°C Heizblock wurde das Gel nun für ungefähr 10 Minuten in dem Puffer aufgelöst, indem alle zwei Minuten das Gemisch gevortext wurde. Sobald das Gel komplett in Lösung gegangen war, wurde die einfache Menge an Isopropanol des Gelgewichtes hinzugefügt und gut durchmischt. Im nächsten Schritt soll die DNA an die Säule binden. Dafür wurden die QIAquick spin columns in die dafür vorgesehenen Tubes gestellt und die Lösung hineinpipettiert. Für eine Minute wurde dies nun bei höchster Drehzahl zentrifugiert. Während dieses Schrittes bindet die DNA an die Säule. Die Flüssigkeit im Auffangbehälter kann verworfen werden. Es folgte eine weitere kurze Zentrifugation, um jegliche Flüssigkeit zu entfernen. Mit 750 μl des PE Puffers und einer Inkubation von 5-10 Minuten und einer Zentrifugation für eine Minute bei schnellster Drehzahl wurde die gebundene DNA gewaschen. Im nächsten Schritt konnten die QIAquick columns auf saubere 1,5 ml Eppendorf Tubes gesetzt werden. Es folgte die Elution der DNA mit 30 μl des Puffers EB. Vor der nachfolgenden Zentrifugation sollte eine Inkubation für 1 Minute eingehalten werden. Im Epi befand sich nun die isolierte DNA. Diese DNA konnte nun für die Klonierung in einen Vektor verwendet werden, um eine anschließende Sequenzierung zu ermöglichen.

2.13.3 TOPO TA Cloning Kit for Sequencing

Ziel dieses Abschnittes der Arbeit ist die Sanger-Sequenzierung des PCR-Produktes. Da das PCR-Produkt jedoch nur wenige hundert Basenpaare lang ist, kann die Sequenzierung nicht direkt vorgenommen werden, da die Fehlerquote zu Beginn der Sequenzierung zu hoch und das Ergebnis dementsprechend nicht vertrauenswürdig wäre. Aus diesem Grund wurde das PCR-Produkt in den pCR™4-TOPO® Vektor kloniert. Hierfür wurde das TOPO™ TA Cloning™ Kit for Sequencing verwendet. Zu Beginn wurde folgende Reaktion in ein 1,5 ml Eppendorf Tube pipettiert und vermischt:

Zusammensetzung	Volumen
Fresh PCR product	4 µl
Salt Solution	1 µl
TOPO® vector	1 µl
GESAMTVOLUMEN	6 µl

Tabelle 30: Zusammensetzung der Ligationsreaktion.

Diese Reaktion wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Grundvoraussetzung dieser Ligationsreaktion ist die Polymerase-Kettenreaktion mit einer Taq-Polymerase, denn diese hängt unabhängig vom Template ein Desoxyadenosin an das 3'Ende des PCR-Produktes. Damit eine einfache und gerichtete Ligation ermöglicht wird, enthält der Vektor einen Thymidinüberhang. Für die Transformation wurden die Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells verwendet. Die Mischung der Bakterien mit dem Reaktionsgemisch wurde durch Berührung mit dem Finger vorgenommen. Es folgte eine weitere Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Da es sich um chemisch kompetente Zellen handelt, wurde die Heat Shock Methode erneut für die Transformation verwendet. Die Bakterien wurden für 30 Sekunden in einen 42°C warmen Heizblock und danach für zwei Minuten auf Eis gestellt. Durch den plötzlichen Temperaturunterschied werden Poren in der Zellmembran eröffnet und die Aufnahme des Vektors so ermöglicht. Anschließend wurden die Bakterien auf 37°C vorgewärmten Ampicillin-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aufgrund einer im Vektor enthaltenen Ampicillinresistenz überlebten nur diejenigen Bakterien, die den Vektor während des Heat Shocks aufgenommen hatten. Auf diese Weise wurden die Bakterien selektioniert. Die Isolation der DNA aus den Bakterien wurde über Amplifikation in einer Minikultur und anschließenden Miniprep vollzogen (genaues Protokoll analog zum Maxiprep siehe Abschnitt 2.7 auf Seite 34). Für die Sequenzierung wurde aus der Standardliste des Seqlabs der T3 Primer ausgewählt.

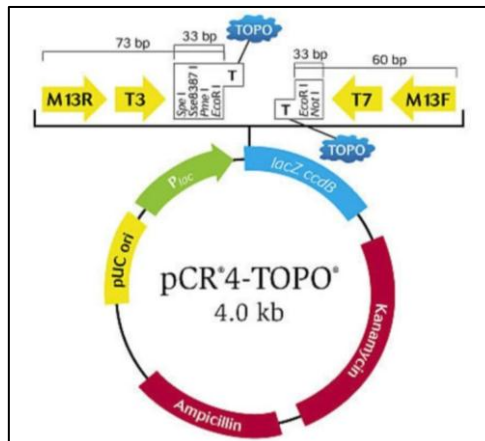


Abbildung 8: **pCRTM4-TOPO[®] Vektor**. Diese Graphik zeigt den Aufbau des pCRTM4-TOPO[®] Vektors, der für die Klonierung und anschließender Sequenzierung verwendet wurde. Die für die Selektion wichtigen Antibiotika-Resistenzen gegen Ampicillin und Kanamycin sind in Rot dargestellt. Für die Sequenzierung wurde der T3 Primer verwendet, der vor der Insertionsstelle lokalisiert ist.

2.14 Validierung der Klone auf Proteinebene: Western Blot

2.14.1 Proteinisolation und Messung der Proteinkonzentration

Für die Proteinisolation wurde der RIPA-Puffer, bestehend aus folgenden Komponenten, verwendet:

Zusammensetzung	Volumen	Endkonzentration
Tris/ HCl (pH 7,5) (1M)	5,0 ml	50 mM
EGTA (0,5 M)	200 µl	1,0 mM
EDTA (0,5 M)	200 µl	1,0 mM
Triton X-100 (10% w/v)	10 ml	1,0 %
SDS (20%)	0,5 ml	0,1 %
NaF (0,5 M)	10 ml	50 mM
NaCl (5 M)	3,33 ml	150 mM
Na-Deoxycholate	500 mg	0,5 %
ad 90 ml ddH ₂ O		

Tabella 31: Zusammensetzung des RIPA-Puffers.

Zu 1 ml dieses Lysepuffers werden folgende Bestandteile direkt vor Benutzung hinzugefügt:

Zusammensetzung	Volumen	Endkonzentration
2-Mercaptoethanol	1 µl	0,1 % (v/v)
Natriumorthovanadat	10 µl	1,0 mM
cOmplete [™] ULTRA Tablets, Mini, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail	40 µl	
PhosSTOP [™]	50 µl	

Tabella 32: Zusammensetzung des Lyse-Puffers.

RIPA steht für Radioimmunoprecipitation assay buffer und sorgt für eine Lyse der Zellen und Lösung der Proteine. Sowohl die Hinzugabe von Protease- und Phosphataseinhibitoren als auch das Arbeiten auf Eis sorgt für eine möglichst geringe Dephosphorylierungsrate und geringfügige Proteindegradation, um ein möglichst realitätsnahes Ergebnis zu erhalten. In allen Experimenten wurden adhärente Podozyten in Zellkulturschalen verwendet. Zunächst wurde das Medium

aspiriert und die Zellen zwei Mal mit kaltem 1x PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Anschließend wurden 7,5 ml des kalten 1x PBS auf die Zellen gegeben und diese mit einem cell scraper von der Oberfläche der Zellkulturschale entfernt. Nach mehrfachem Abspülen der Oberfläche wurden die Zellen mit einer Stabpipette in ein 15 ml Falcon Tube überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1200 G für 5 Minuten und bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100-150 µl RIPA Lyse Puffer entsprechend der Größe des Pellets resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf Tubes überführt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 4°C auf Eis. Zur Differenzierung zwischen Protein und Zelldebris schloss sich eine Zentrifugation bei 1000 G für 15 Minuten bei 4°C an. Die isolierten Proteine befanden sich im Überstand, der in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf Tube pipettiert wurde. In einem Verhältnis von 1:1 wird der Überstand mit dem Elektrophoresepuffer Laemmli (+DTT) versetzt und anschließend bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Um eine mögliche Messung der Proteinkonzentration durchführen zu können, wurden vor der Zugabe des Laemmli-Puffers 5 µl des Überstandes in einem separaten Tube aufbewahrt. Die Lagerung aller Proteinisolate erfolgt bei -20°C.

2.14.1.1 Bestandteile des 2x Laemmli

Zusammensetzung	Volumen	Endkonzentration
Tris (pH 6,8) 1,5 M	33,3 ml	0,1 M
Bromphenolblau	1 g	
SDS (20% m/V)	100 ml	4 %
Glycerin	100 ml	
Ad 500 ml ddH ₂ O		

Tabelle 33: Zusammensetzung des 2x Laemmli.

Vor der Benutzung werden zu 900 µl 2x Laemmli 100 µl DTT (1 M) hinzugefügt.

2.14.1.2 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration wird mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits vorgenommen. Das Prinzip beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch Anwesenheit von Proteinen im alkalischen Milieu. Dadurch wird eine kolorimetrisch messbare Farbreaktion hervorgerufen, bei der Bicinchoninsäure (BCA) einen Komplex mit einwertigen Kupferionen bildet, der mit violetter Farbe erscheint. Dieser Farbstoff besitzt die größte Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die gemessene Lichtabsorption ist proportional zum Proteingehalt in der Probe. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in der Probe wird ein Proteinstandard mit definierten BSA-Konzentrationen (bovines Serum-Albumin) zwischen 25 und 2000 µg/ml verwendet. Zunächst wurden 1-2 µl der Proben 1:50 oder 1:100 mit dH₂O verdünnt. In eine 96 Well Mikroplatte wurden dann in zweifacher Ausführung jeweils 10 µl des BSA-Standards in aufsteigender Konzentration, sowie ein Leerwert und die zu bestimmenden Proben pipettiert. Danach werden 200 µl des BCA-Reagenzes auf jede Probe hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Dieses besteht aus Reagenz A und B, die im Verhältnis 50:1 vermischt worden sind. Es folgt eine Inkubation bei 37°C für 30 Minuten bei Dunkelheit. Daraufhin wurde die Absorption bei 562 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse wurde mithilfe von Excel durchgeführt. In einem Koordinatensystem wurde auf der y-Achse die mittlere Absorption gegen die Protein-Konzentration auf

der x-Achse aufgetragen. Mit den Werten des Albumin-Standards entstand eine lineare Funktion der Funktionsgleichung $f(x)=mx+c$. Die Konzentration der unbekanntenen Proben konnte durch Zuhilfenahme dieser Gleichung und der gemessenen Absorptionen bestimmt werden. Dazu wurde der Mittelwert der jeweils zwei gemessenen Werte der Proben bestimmt. Um verfälschte Ergebnisse zu vermeiden, wurde der Leerwert abgezogen.

2.14.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE) und Western Blot

Die sowohl qualitative als auch quantitative Analyse der aus den Zellen isolierten Proteine wurde mittels einer Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot vorgenommen. Auf der Membran befindliche Proteine sind Antikörpern zugänglich und können so durch bestimmte Verfahren sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe der Gelelektrophorese werden Proteine zwischen 5 und 250 kDa auf einem Polyacrylamid-basierendem Gel ihrer Größe nach aufgetrennt. Um diese Auftrennung zu ermöglichen, müssen die Proteine denaturiert und in linearer Form vorliegen. Dies wird zum einen durch Aufkochen und zum anderen durch das Detergenz SDS erreicht. SDS steht für Natriumdodecylsulfat und interagiert als anionisches Tensid mit den Proteinen. Dadurch erhalten die Proteine proportional zu ihrer Größe eine gleichmäßig verteilte negative Ladung. Diese sorgt für eine gegenseitige Abstoßung der Moleküle. Die nun in der Primärstruktur vorliegenden Proteine wandern aufgrund der angelegten Spannung in Richtung der Anode (Pluspol). Die Molekülmasse bestimmt jeweils, wie schnell das Protein durch das Gel wandern kann: längere Proteine wandern weniger weit als kürzere. So kommt es zu einer Auftrennung der Proteine proportional zu ihrer Größe. Abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins wurden selbst hergestellte 7,5%-ige, 10%-ige oder auch 15%-ige Polyacrylamidgele verwendet. Nach der Vorbereitung der Gele wurden die 10 oder 15 Taschen des Gels mit dem Probenmaterial beladen. Am linken Rand des Gels wurde stets ein Proteingrößenmarker (11-245 kDa) geladen, um im späteren Verlauf die Banden einer molekularen Masse zuordnen zu können. Das verwendete Lysatvolumen variierte in Abhängigkeit vom Versuchsaufbau. Alle noch unbeladenen Taschen wurden mit 2x Laemmli + DTT beladen, um eine möglichst gerade Lauffront zu erhalten. Entsprechend der zwei unterschiedlichen Phasen des Gels werden auch zwei unterschiedliche Einstellungen benötigt. Der obere Teil des Gels, auch bezeichnet als Sammelphase, enthält einen geringeren Polyacrylamidanteil und sorgt für eine Konzentrierung aller Proteine auf einer Ebene. Dies fand in allen Versuchen bei 70 V für 30 Minuten statt. In der anschließenden Trennphase findet die Separation der Proteine anhand ihrer Größe statt. Als konstante Variable wurden 0,03 A für ein Gel und 0,05 A für zwei Gele verwendet. Die Laufzeit variierte zwischen 60 und 105 Minuten, abhängig von der erwarteten Proteinmasse und des Polyacrylamidanteils. Sobald die Gelelektrophorese abgeschlossen war, wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran im Blotting-Verfahren transferiert. Dafür wurden bereits gebrauchsfertige PVDF-Membranen (Polyvinylidendifluorid) verwendet (Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs). Um diesen Transfer zu ermöglichen, wurde erneut ein elektrisches Feld aufgebaut, welches senkrecht zu dem Polyacrylamid-Gel steht. Erneut wandern die weiterhin negativ geladenen Proteine zum Plus-Pol, in diesem Fall auf die Membran. An der Membran werden die Proteine durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen an der Oberfläche festgehalten. Für das *Blotting* wurde das Trans-Blot Turbo Transfer System von BioRad verwendet und in den meisten Versuchen wurde das Turbo-Blotting Programm ausgewählt. Die Blotting-Zeit betrug 7 Minuten bei 25 V und 1,3

A. In einigen Ausnahmefällen bei Proteinen mit molekularem Gewicht von über 150 kDa wurde die Zeit auf 15 Minuten ausgedehnt. Der nun folgende Schritt wird als *Blocking* bezeichnet und dient der Belegung aller noch freien Bindungsstellen auf der Membran, um ein möglichst hintergrundarmes Ergebnis im späteren Verlauf zu erhalten. Hierfür wurde der Roti-Block verwendet (verdünnt in VE-Wasser). Die Membran wurde für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rollschüttler inkubiert. Zur Visualisierung spezifischer Proteinbanden wird die Membran mit ausgewählten Antikörpern gefärbt. Sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper wurden in Waschpuffer angesetzt und die Primärantikörper wurden zur Wiederverwendung bei 4°C gelagert. Die Inkubation im Primärantikörper fand bei 4°C über Nacht auf einem Rollschüttler in einem 50 ml Falcon Tube statt. Um unspezifische Bindungen zu entfernen, wurde die Membran am darauffolgenden Tag drei Mal 5 Minuten lang in Waschpuffer gewaschen. Anschließend werden die Primärantikörper von einem Sekundärantikörper gebunden. Die Inkubation der Membran im Sekundärantikörper fand bei Raumtemperatur für eine Stunde statt. Der Sekundärantikörper bindet den F_c-Teil des Primärantikörpers und muss dementsprechend die Ursprungsspezies des Primärantikörpers erkennen. An den F_c-Teil aller verwendeten Sekundärantikörper ist die Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, die als Reporterenzym dient. Nach der Inkubation folgte ein weiterer Waschschrift mit Waschpuffer für drei Mal 10 Minuten. Abschließend wurde die Membran mit 1x PBS gewaschen, um Waschpufferreste zu entfernen. Die Detektion der Banden wurde mithilfe des Amersham Imager 600 Gerätes und des Pierce™ ECL Western Blotting Substrate oder Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate durchgeführt. Pro Membran wurden 1 ml der ECL-Lösung verwendet. Sie enthält Luminol, das als Substrat für die HRP dient. Durch diese Oxidationsreaktion werden elektromagnetische Strahlen abgegeben, die vom Auslesegerät detektiert werden. Somit sollte an allen Stellen, an denen das Protein auf der Membran vom Primär- und dieser wiederum vom Sekundärantikörper gebunden wurde, eine solche Chemilumineszenz auslösen, die erfasst wird. An diesen Stellen wird das Bild schwarz gefärbt.

10x Waschpuffer

Zusammensetzung	Volumen
1M TrisHCl, pH 7,5	1530 ml
5M NaCl	3060 ml
Tween20	153 ml

Ad 5 l ddH₂O

Tabelle 34: Zusammensetzung des 10x Waschpuffers.

10x Laufpuffer

Zusammensetzung	Volumen
Glycin	720g
SDS	50g
Trizma Base	150 g

Ad 5 l ddH₂O

Tabelle 35: Zusammensetzung des 10x Laufpuffers.

2.14.2.1 Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller und Referenznummer	Verdünnung
------------	-------------------------------	------------

Anti-ITM2B antibody, rabbit	Sigma-Aldrich HPA029292	1:300
NPR-C Antibody, mouse	Santa Cruz Biotechnology Sc-515449	1:500
α -Actinin, mouse	Santa Cruz Biotechnology Sc-166524	1:500
β -Actin, mouse	Sigma-Aldrich A5441	1:5.000
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology 7074S	1:3.000
Anti-Mouse, polyclonal, goat, HRP-linked Antibody	Dako P0447	1:10.000

Tabelle 36: Liste der verwendeten Antikörper.

2.15 Karyotypisierung von Zellen

Am Vortag des Experimentes wurden die Zellen einer nahezu konfluent bewachsenen 10-cm-Schale in einem Verhältnis von 1:3 gesplittet.

Zunächst wurden 100 μ l KaryoMAX™ Colcemid™ Solution in PBS in das Zellkulturmedium jeder Schale pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 2-3 Stunden bei 32°C. Anschließend wurde das Medium mit einer Vakuumpumpe abgesogen, die Zellen mit PBS gewaschen und mithilfe von Trypsin abgelöst. Die Zellsuspension wurde für eine Zentrifugation bei 1200 G und Raumtemperatur für 5 Minuten in 15 ml Falcon Tubes überführt. Auch alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte wurden bei identischen Einstellungen durchgeführt. Der Überstand wurde bis auf ca. 500 μ l verworfen, in denen das Zellpellet resuspendiert wurde. Als nächstes wurden 5-7 ml 37°C warme, hypotone Lösung (Potassium chloride solution) auf die Suspension gegeben und gut durchmischt. Die Reaktion wurde bei 37°C für 10 Minuten inkubiert. Erneut folgte eine Zentrifugation mit nachfolgender Verwerfung des Überstandes bis auf 500 μ l. Das Zellpellet wurde ebenfalls in dem restlichen Überstand gelöst. Anschließend wurden 5 ml der kalten Fixationslösung tröpfchenweise hinzugeben. Dabei wurde nach jedem Milliliter das Falcon Tube zum Vermischen invertiert. Diese Reaktion wurde daraufhin für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde bei diesem Schritt vollends verworfen und es wurden 3-5 ml kalte Fixationslösung auf das Zellpellet pipettiert und anschließend resuspendiert. Die Schritte beginnend mit der Zentrifugation bis zur Resuspendierung mit der Fixationslösung wurden 2–3-mal wiederholt, bis die Lösung keine Verunreinigungen mehr zu enthalten schien. Nach dem abschließenden Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 300 μ l Fixationslösung resuspendiert und nun auf einen Objektträger aufgetragen. Dafür wurde der Objektträger zunächst mit 20-40 μ l Fixationslösung komplett benetzt und dann ca. 20 μ l der Zellsuspension auf den leicht feuchten Objektträger pipettiert. Abhängig vom anschließenden Mikroskopierergebnis wurde das Volumen der Zellsuspension entweder verringert oder auch die Zellsuspension mit Fixationslösung verdünnt. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur getrocknet. Für das anschließende Mikroskopieren wurde das Fluoreszenzmikroskop eclipse Ts2 von Nikon mit 40-facher Vergrößerung verwendet. (128,129)

Fixationslösung:

Methanol und Essigsäure (100% glacial) im Mischungsverhältnis von 3:1.

2.16 Quantitative PCR

Bei der qPCR handelt es sich um eine quantitative Echtzeit-PCR. Zusätzlich zu der Vervielfältigung von DNA-Material, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, wird eine Quantifizierung des DNA-Materials ermöglicht. Als Grundlage für die Vervielfältigung wurde die RNA aus den Zellen isoliert und anschließend mithilfe der reversen Transkription in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Hierfür wurde das ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet. Die Quantifizierung der cDNA erfolgt über Sonden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert worden sind. Die Fluoreszenz wird jedoch, solange die Sonde keine DNA gebunden hat, durch einen sogenannten Quencher stark reduziert. Bei Bindung der Sonde downstream des Primers wird diese durch die 5' Nuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase gespalten und somit der Fluoreszenzfarbstoff vom Quencher getrennt. Nun kommt es zu einer starken Erhöhung des Fluoreszenzsignals, welches mit jedem PCR-Zyklus verstärkt wird. Durch Messung dieses Signals kann auf die Menge der cDNA, bzw. der ursprünglichen RNA-Menge Rückschlüsse gezogen werden.

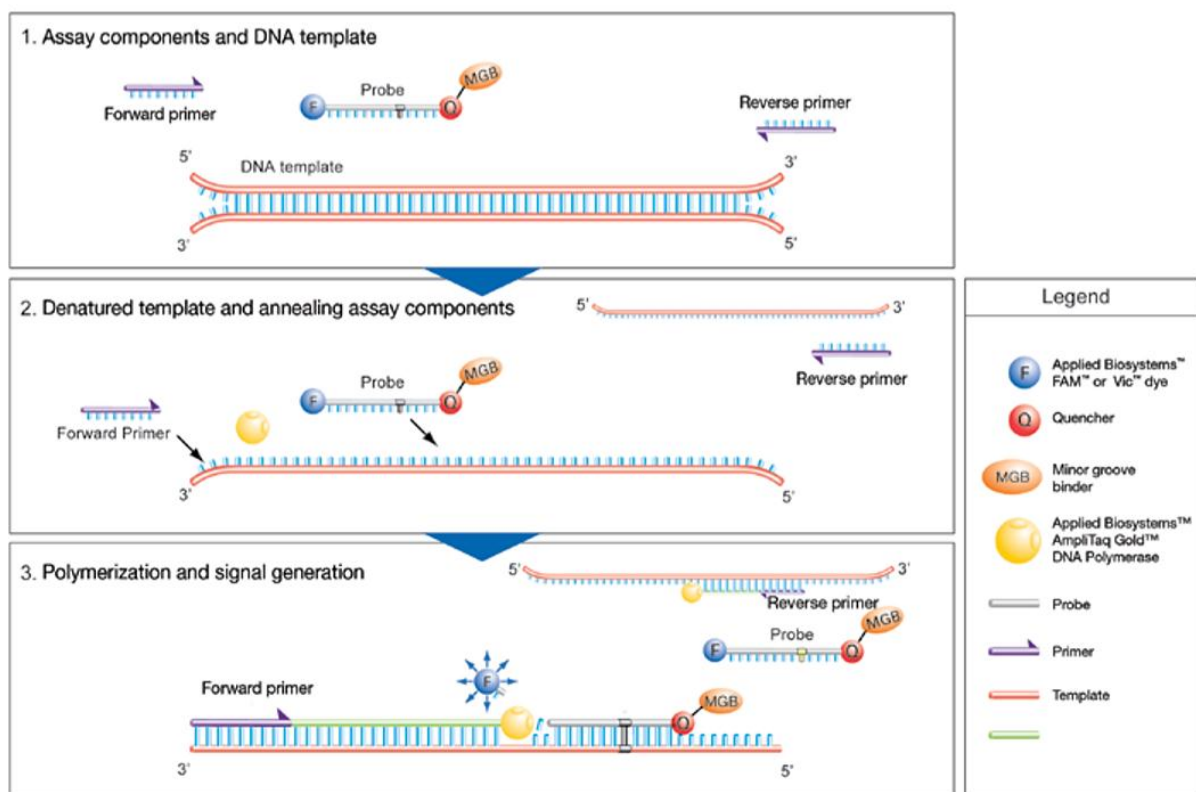


Abbildung 9: Reaktionsschritte des TaqMan assay. Nach Denaturierung des DNA-Stranges, Bindung der Primer und Verlängerung des neu synthetisierten Stranges kann die Sonde binden. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff durch die DNA-Polymerase abgespalten und es kommt zu einer Fluoreszenzsignalfreisetzung. (130)

2.16.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation ist eine Methode, die sehr gewissenhaftes und sauberes Arbeiten verlangt, um eine Kontamination der Probe zu verhindern. Alle verwendeten Materialien waren RNase-frei und steril. Für die Durchführung wurde das RNA-Isolationskit von Qiagen (# 74004) verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten zu 70-80% konfluente Zellen in 10cm Zellkulturschalen, die zunächst von ihrem alten Medium befreit, mit 1x PBS gereinigt und dann von diesem ebenfalls befreit wurden. Zusammen mit 5 ml 1x PBS wurden sie von der Oberfläche der Zellkulturschale gekratzt und in ein 15 ml Falcon überführt. Nach anschließender Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 Minuten wurde das überstehende PBS aspiriert und das Zellpellet in

350 µl RLT Puffer lysiert. Das Lysat wurde mehrfach durch eine Nadel mit einem Durchmesser von 0,9 mm geführt, um eine ausreichende Homogenisierung zu erreichen. 350 µl 70%iges Ethanol wurden zu dem Lysat hinzugegeben, durch Auf- und Abpipettieren vermischt und in ein RNeasy MinElute spin column, welches sich in ein 2ml Collection Tube befand, überführt. Eine Zentrifugation für 15 s bei 8000 G und Raumtemperatur schloss sich dem an, wobei der Flow-through anschließend verworfen werden konnte. Vor der nächsten Zentrifugation bei gleicher Einstellung wurden 350 µl des RW1 Puffers auf die Säule für den ersten Waschschrift gegeben. Im nächsten Schritt sollte die DNA verdaut werden. Hierfür wurden 80 µl eines DNase I Mix (10µl DNase I + 70 µl RDD Puffer) direkt auf die Säule pipettiert und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden erneut 350 µl des RW1 Puffers auf die Säule gegeben und die Tubes bei identischen Einstellungen zentrifugiert. Als nächstes verlangte das Protokoll ein Hinzufügen von 500 µl des RPE Puffers direkt auf die Säule mit einer erneuten Zentrifugation (identische Settings). Im nächsten Schritt wurden 500 µl 80%iges Ethanol auf die Säule pipettiert und erneut bei 8000 G jedoch für 2 Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde nun auf ein sauberes 1,5 ml Eppendorf Tube gesteckt und 14 µl RNase-freies Wasser wurden direkt auf die Säule gegeben. Die Elution der RNA fand bei einer Zentrifugation für 1 Minute bei der höchsten Drehzahl statt. Gelagert wurde die isolierte RNA bei -80°C. Eine Konzentrationsmessung erfolgte am Nanodrop.

2.16.2 Bildung von cDNA: Reverse Transkription

Im ersten Schritt der reversen Transkription wurde die RNA-Probe mit nicht spezifisch ausgewählten Primern in einem sterilen RNase-freiem Tube vermischt und mit sterilem, Nuklease-freiem Wasser auf 8 µl aufgefüllt.

Zusammensetzung	Volumen
RNA 1-6 µl (bis zu 1 µg)	6 µl
Random Primer	2 µl
GESAMTVOLUMEN	8 µl

Tabelle 37: Reaktionszusammensetzung I der reversen Transkription.

Eine anschließende Denaturierung wurde über eine Inkubation von 5 Minuten bei 65°C erreicht. Die Probe wurde danach wenige Sekunden zentrifugiert und sofort auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurden folgende Komponenten der Probe hinzugefügt:

Zusammensetzung	Volumen
Probe	8 µL
ProtoScript II Reaction Mix (2x)	10 µl
ProtoScript II Enzyme Mix (10x)	2 µl
GESAMTVOLUMEN	20 µl

Tabelle 38: Reaktionszusammensetzung II der reversen Transkription.

Die cDNA-Synthese-Reaktion wurde bei 25°C für 5 Minuten begonnen und dann bei 42°C für eine Stunde fortgesetzt. Die Inaktivierung des Enzyms wurde bei 80°C für 5 Minuten durchgeführt. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.16.3 TaqMan® Gene Expression Assay

Nachdem nun die cDNA synthetisiert worden war, wurde eine Quantifizierung des DNA-Materials mittels eines TaqMan® Gene Expression Assays durchgeführt.

Dieser Assay wurde mit folgendem Ansatz pro Probe durchgeführt:

Zusammensetzung	Volumen	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
TaqMan® Gene Expression Assay Mix (20X)	1 µl	50°C	2 min	1
cDNA template (10 to 100 ng of cDNA)	5 µl	95°C	10 min	1
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X)	10 µl	95°C	15 s	40
RNase-freies Wasser	4 µl	60°C	1 min	
GESAMTVOLUMEN	20 µl			

Tabelle 39: Reaktionszusammensetzung des TaqMan Gene Expression Assays.

Das Volumen des RNase-freien Wassers wurde so gewählt, dass ein Gesamtvolumen von 20 µl erreicht wurde. Zum Vermischen der Komponenten wurde das Tube invertiert und anschließend kurz zentrifugiert. 20 µl des Reaktionsgemisches wurde dann in die Wells einer Optical 96-Well Fast Plate transferiert, diese mit einer optisch adhäsiven Abdeckung verschlossen und für 2 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. An diese vorbereitenden Schritte schloss sich eine Real-Time PCR Reaktion an, die nach Möglichkeit direkt im Anschluss an die Vorbereitung stattfinden sollte. Das dafür genutzte Gerät ist die Applied Biosystems QuantStudio.3 Real-Time PCR Maschine. Dabei wurde das Standardprogramm genutzt (aus der Tabelle 39 zu entnehmen). Für die Berechnung der relativen RNA-Level wurde die delta Ct Methode verwendet. GAPDH wurde als Housekeeping Gene genutzt. Die Auswertung wurde mit Excel durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 NPR3

3.1.1 Design der gRNAs

Die Erstellung der gRNA als erster Schritt ist von hoher Relevanz, denn ihr Einfluss wirkt sich unter anderem auf die Effizienz der gesamten Methode aus. Ziel ist es, zwei funktionstüchtige, aber unterschiedliche gRNAs zu finden, mit denen jeweils sowohl Knockout- als auch Wildtyp-Klone generiert werden, die allesamt den vollständigen Prozess des Genome-Editings durchlaufen haben. Insgesamt wurden für NPR3 fünf gRNAs entwickelt, die sich alle auf dem Exon 1 befinden. Nach der computergestützten Generierung stellte sich heraus, dass gRNA 2 und 3 identisch sind, weshalb gRNA 2 in allen nachfolgenden Darstellungen und Experimenten eliminiert wurde.

Die folgende Tabelle zeigt die Sequenzen aller erstellten gRNAs.

<u>gRNA 1:</u>	CGAGTATGCTCTGCGCAGCGTGG
<u>gRNA 2:</u>	CCCGTGCGTACTACTCGGCTGGG
<u>gRNA 3:</u>	CCCGTGCGTACTACTCGGCTGGG
<u>gRNA 4:</u>	CGAGACCAAAGACTTGGATCTGG
<u>gRNA 5:</u>	ACTGCTACTTCACCCTCGAGGGG

Tabelle 40: Liste der verwendeten gRNAs.

3.1.2 Klonierung der gRNAs in den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector und Transformation von DH5 Competent Cells

Sobald die gRNAs vorlagen, wurden sie in den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector kloniert, um die jeweiligen gRNAs mit den anderen essenziellen Anteilen des CRISPR/Cas9 Systems zusammenzubringen. Als Qualitätskontrolle wurde die Methode der Sanger-Sequenzierung von jeweils vier Einzelkolonien pro gRNA verwendet. Von besonderer Bedeutung ist hierbei, ob die gRNA vollständig und lückenlos eingefügt worden ist. In dem Ergebnis sollte die Sequenz der gRNA ohne deren PAM-Sequenz ersichtlich werden. Abhängig von der Orientierung der gRNA während des Klonierungsprozesses, kann diese auch in der *reverse complement* Version zu finden sein. Für alle vier gRNAs konnte gezeigt werden, dass die Klonierung in den Vektor erfolgreich war. In der folgenden Abbildung sind für jede gRNA jeweils der relevante Ausschnitt des Klonierungsergebnisses mit der gelb markierten gRNA gezeigt, die im nachfolgenden Prozess für den Maxiprep verwendet worden ist.

gRNA 1

GGACGAAACACCGCGAGTATGCTCTGCGCAGCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC

gRNA 3

GACGAAACACCG **CCCGTGCGTACTACTCGGCT** GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA

gRNA 4

GACGAAACACCG **CGAGACCAAAGACTTGGATC** GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA

gRNA 5

ACGAAACACCG **ACTGCTACTTCACCCTCGAG** GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG

3.1.3 Transfektion humaner Podozyten

Die Transfektion der humanen Podozyten stellte eine große Herausforderung dar, die nach Austestung verschiedener Transfektionsmethoden und -protokolle doch schlussendlich zum Ziel geführt hat. Die dabei verwendete DNA wurde durch einen Maxiprep amplifiziert und aufgereinigt. Das dafür verwendete DNA-Material entstammte aus den Minipreps, deren DNA-Sequenzen analysiert worden waren. Die erste erfolgreiche Transfektion wurde stets für die Qualitätskontrolle der gRNA verwendet, um nicht-funktionierende gRNAs möglichst früh im Prozess ausschließen zu können. Zur Verdeutlichung der Transfektionsproblematik stelle ich drei verschiedene Transfektionsmethoden vor, die das Dilemma sehr gut veranschaulichen. Eine der ersten Transfektionstechniken, die wir einsetzten, verwendete Lipofectamine3000. Das verwendete Transfektionsreagenz schien für die Transfektion von Podozyten geeignet und war demnach erfolgsversprechend. Das Lipofectamine3000 wurde in einem Verhältnis von 3:1 bezogen auf die Menge der eingesetzten DNA verwendet. Nach 24 h konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Effizienz von 0% beobachtet werden, was das schwarze Bild der Abbildung 10, Teil B zeigt. In der lichtmikroskopischen Aufnahme auf der linken Seite (Teil A) zeigen sich alle Zellen vital mit unveränderter Morphologie im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Podozyten. Dies impliziert, dass die Transfektionsmethode zwar sehr schonend, jedoch zu wenig effektiv war.

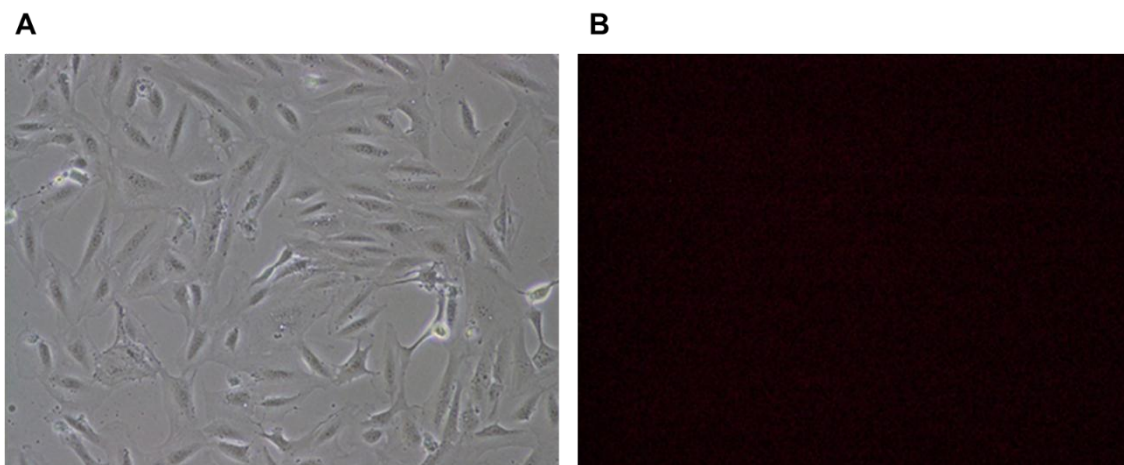


Abbildung 10: *Transfektionsversuch mit Lipofectamine3000. (A) Die lichtmikroskopische Aufnahme zeigt vitale Zellen. (B) Die Aufnahme der Fluoreszenzmikroskopie zeigt kein Lichtsignal und somit keine transfizierten Zellen.*

Die zweite Methode, die ich vorstellen möchte, ist die Transfektion mittels Elektroporation. Das hierfür verwendete System ist das NEON Transfection System, welches zuvor im Abschnitt der Transfektion von Maus-Podozyten genauer erläutert wurde. In diesem Fall wurde ein Programm mit folgenden Parametern verwendet: 1000 V, 40 ms und 2 Impulsen. Das Ergebnis zeigt genauso wenig eine gelungene Transfektion wie auch schon die Transfektion mit Lipofectamine3000 (siehe Abbildung 11). Im Gegensatz dazu erscheint jedoch ein hoher prozentualer Anteil an toten Zellen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann zwar ein Signal erfasst werden, dieses korreliert jedoch nur mit zirkulären abgestorbenen Zellen. Dadurch lässt sich vermuten, dass diese Transfektionsmethode das andere Ende des Spektrums beschreibt: die Konditionen sind anscheinend zu stark für diese Zelllinie. Aber auch anschließend veränderte Parameter konnten kein suffizientes Ergebnis liefern.

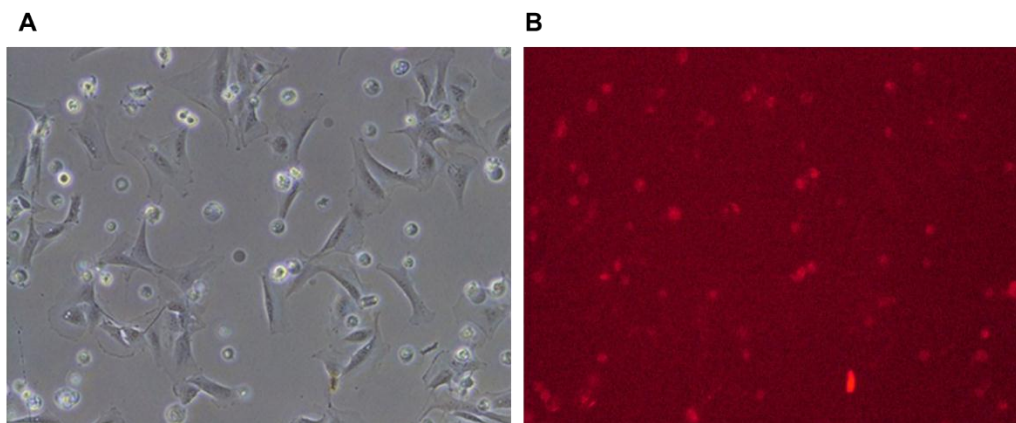


Abbildung 11: Transfektionsversuch mit dem NEON Transfection System. (A) In der lichtmikroskopischen Aufnahme sind neben einigen lebenden Zellen auch viele zirkuläre, tote Zellen sichtbar, die die Transfektion nicht überlebt haben. (B) Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt fast ausschließlich nur bei den abgestorbenen Zellen ein Signal.

Als drittes stelle ich nun die erfolgreiche Methode vor, die in allen nachfolgenden Versuchen für die Transfektion von humanen Podozyten verwendet wurde. Es handelt sich ebenfalls um eine Elektroporation, jedoch mit den Geräten von Lonza und dem dazugehörigen Amaxa System. Wie bereits im Protokoll erwähnt, werden die genauen Konditionen vom Hersteller nicht spezifiziert. Ausgetestet wurden folgende vier Programme, die alle zu einem Transfektionsergebnis führten: W017, S005, W001, T013. Das beste Ergebnis lieferte T013, das in den nachfolgenden Experimenten auch weiterhin verwendet wurde. Das Ergebnis zeigt ebenfalls eine Reihe abgestorbener Zellen, jedoch im Gegenzug zu der zuvor beschriebenen Elektroporation liegt auch ein akzeptabler Anteil an transfizierten Zellen vor (siehe Abbildung 12). Diese Transfektionseffizienz ist für eine DNA-Isolation mit anschließendem Restriktionsverdau ausreichend, ebenso für die anschließend geplanten FACS-Sortings.

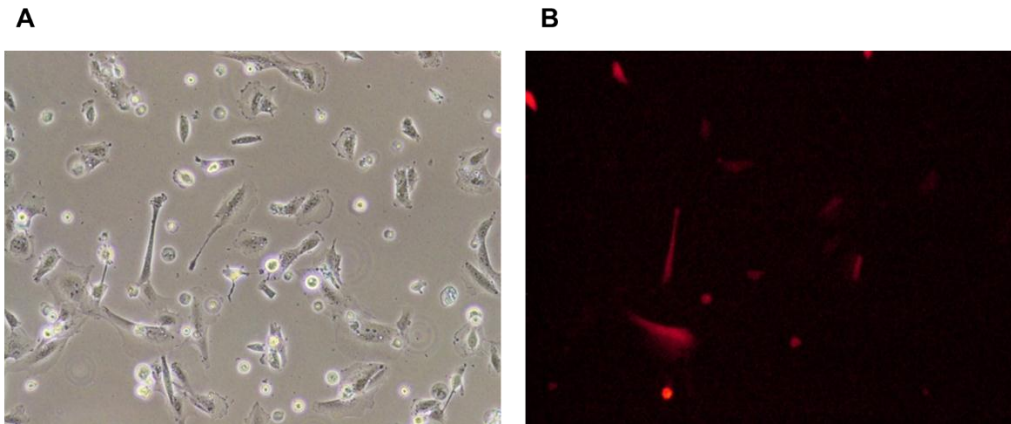


Abbildung 12: *Transfektionsversuch mit dem Amaxa System von Lonza. (A) Wie in der vorangegangenen Abbildung zeigt sich ein nicht unerheblicher Anteil an Zellen als abgelöste, zirkuläre Zellen. (B) Unter Fluoreszenzbestrahlung kann jedoch ein suffizienter Anteil an transfizierten Zellen sichtbar gemacht werden.*

Für einen Teil der Qualitätskontrollen der gRNAs wurde die Transfektion von HEK-Zellen als Grundlage verwendet. Da diese Zelllinie sich einfacher transfizieren lässt, konnte die Transfektion von Podozyten umgangen werden und so schneller vorangeschritten werden. Dies betrifft die gRNAs 4 und 5.

Eine weitere Optimierung der Qualitätskontrolle wurde durch einen FACS-Sort aller transfizierten Zellen in ein Eppendorf Tube erreicht, woraus dann die DNA isoliert wurde. Das DNA-Material für den Enzymverdau enthielt demnach nur die DNA transfizierter Zellen und das Ergebnis im Enzymverdau ließ sich genauer und eindeutiger interpretieren. Dies wurde im Falle von NPR3 für gRNA 4 auf diese Weise angewendet.

3.1.4 Auswahl funktionstüchtiger gRNAs mittels Restriktionsassay

Zunächst stellte die Amplifikation des DNA-Materials eine Schwierigkeit dar. Das PCR-Ergebnis lieferte stets ein Bild vieler unspezifischer Banden, welches nicht für einen Restriktionsassay verwendet werden konnte. Nach vielfacher Veränderung des Protokolls und Benutzung neuer Primer, konnten schließlich die optimalen Konditionen gefunden werden. Anschließend wurde das PCR-Produkt aufgereinigt und im Enzymverdau mit dem für die jeweilige gRNA entsprechenden Restriktionsenzym versetzt. Auf diese Weise konnten zwei der designten gRNAs als funktionstüchtig herausgefiltert werden und für anschließende Transfektionen mit FACS-Sortings verwendet werden.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen für jede gRNA die PCR und den dazugehörigen Enzymverdau.

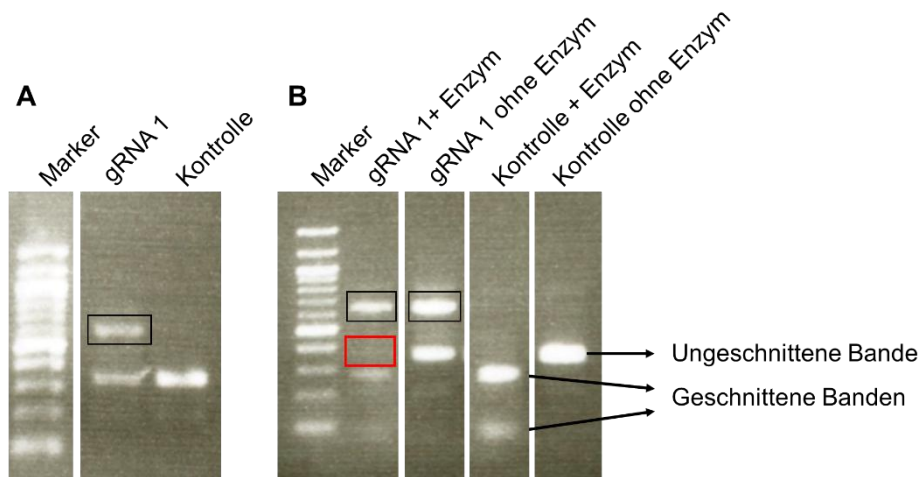


Abbildung 13: **PCR und Restriktionsverdau der gRNA 1 (NPR3).** (A) Das PCR-Ergebnis zeigt sowohl für die Kontroll-DNA als auch die zu untersuchende DNA die zu erwartende Bande. In schwarz markiert ist eine unspezifische Bande zu erkennen, die nicht in die Beurteilung eingeht. (B) Im Restriktionsverdau zeigt die Probe ein identisches Bandenmuster wie die Kontroll-DNA. Bei einer funktionstüchtigen gRNA hätte man eine Bande im roten Kasten erwartet.

gRNA 1 zeigt eine unspezifische Bande größerer Größe, die nicht in die Überlegung mit einfließen sollte (in der Abbildung 13 mit einem schwarzen Kasten markiert). Im Restriktionsassay zeigt sich die Kontroll-DNA wie erwartet im Ansatz ohne Enzym auf identischer Höhe wie in der PCR und im Ansatz mit Enzym als zwei geschnittene Banden geringerer Größe. Ein identisches Bild zeigt sich für die Probe der mit gRNA 1 transfizierten Zellen. Auch hier wurde die gesamte DNA bei Anwesenheit des Enzyms geschnitten. In der Abbildung 13 markiert der rote Kasten den Bereich, wo die ungeschnittene Bande hätte ersichtlich werden müssen. Aufgrund der Abwesenheit der ungeschnittenen Bande fällt diese gRNA für die weitere Verwendung heraus, da sie keine oder kaum Mutationen im gewünschten Bereich ausgelöst hat oder diese durch unsere gewählte Methode nicht ersichtlich werden.

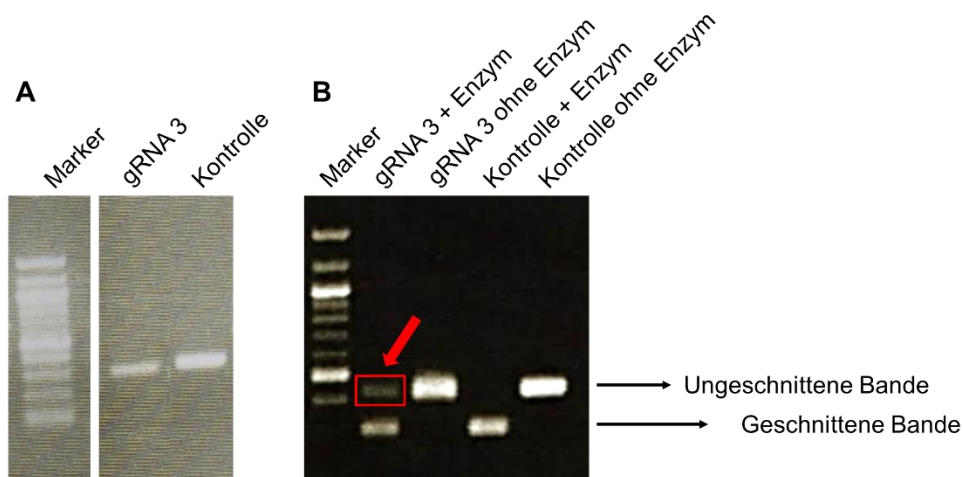


Abbildung 14: **PCR und Restriktionsverdau der gRNA 3 (NPR3).** (A) Die beiden sichtbaren Banden zeigen die amplifizierte DNA-Abschnitte. (B) In Rot markiert zeigt sich eine ungeschnittene Bande im Ansatz der Probe, die mit einem Restriktionsenzym versetzt wurde. Folglich könnte es sich hierbei um eine funktionstüchtige gRNA handeln.

Bei der zweiten gRNA sollte das PCR-Produkt auf Höhe von 595 Basenpaaren liegen, was dem Bild der PCR entspricht. Anders als bei gRNA 1 kann bei dieser gRNA ein Unterschied zwischen der Wildtyp-Kontrolle und der Probe festgestellt werden. Mit dem roten Pfeil in der Abbildung 14 markiert ist eine ungeschnittene Bande in der Kondition mit dem Restriktionsenzym zu erkennen. Dies zeigt, dass die gRNA bei diesem Anteil an Zellen für Mutationen im Bereich der Erkennungssequenz des Enzyms gesorgt hat. Somit kann die gRNA3 für weitere Transfektionen verwendet werden.

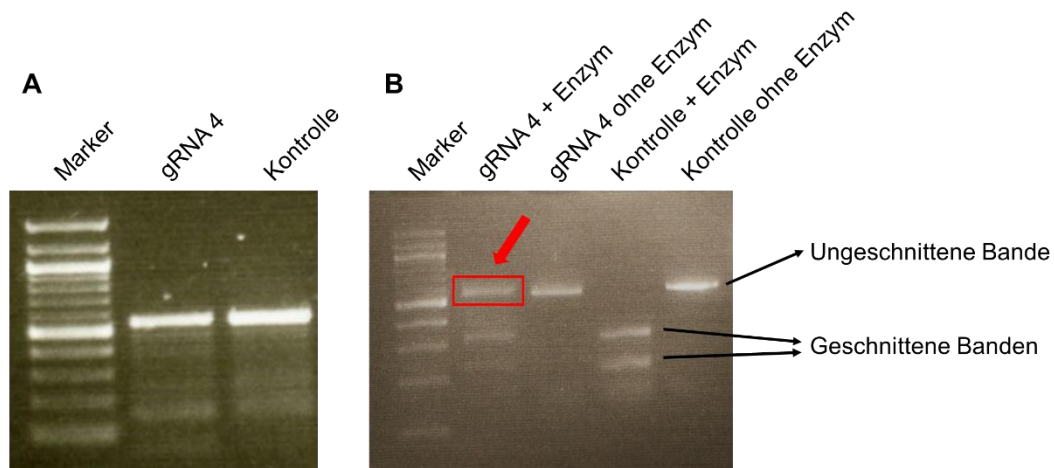


Abbildung 15: **PCR und Restriktionsverdau der gRNA 4 (NPR3).** (A) Das PCR-Ergebnis zeigt zwei deutliche Banden. Im Hintergrund sind schwache unspezifische Banden kleinerer Größe zu erkennen. (B) Im Enzymverdau konnte eine ungeschnittene Bande (rote Markierung) in der Kondition mit Restriktionsenzym detektiert werden.

Eine identische Beschreibung trifft auch auf die gRNA 4 zu. Wie in Abbildung 15 ersichtlich, konnte das Enzym nicht die gesamte DNA-Menge schneiden. Dieser Anteil erscheint als Bande in dem rot markierten Feld. Somit kann auch die gRNA 4 für den weiteren Prozess genutzt werden.

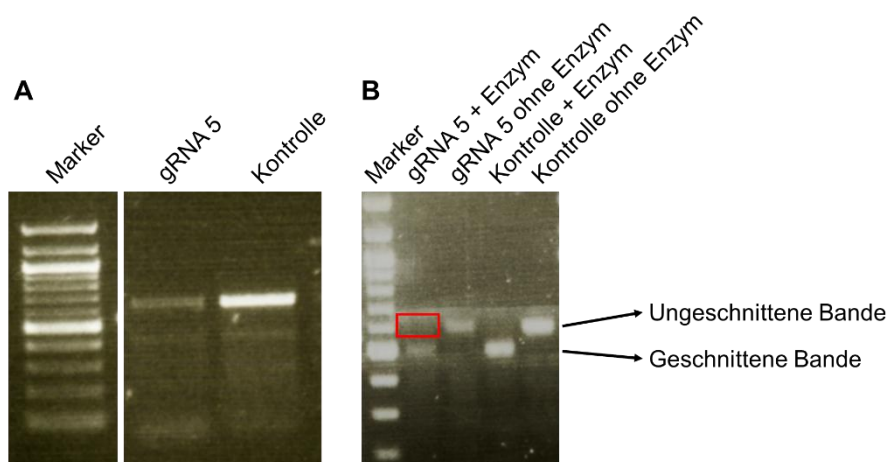


Abbildung 16: **PCR und Restriktionsverdau der gRNA 5 (NPR3).** (A) Es zeigen sich in der PCR eine stärkere Bande der Kontroll-DNA und eine schwächere Bande der Proben-DNA auf identischer Höhe. Im Hintergrund ist ein Schmier unspezifischer Banden zu erkennen. (B) Im Enzymverdau wurden in beiden Ansätzen, die mit dem Enzym versetzt worden waren, das gesamte DNA-Material geschnitten. Es ist keine ungeschnittene Bande in der Probe zu erkennen.

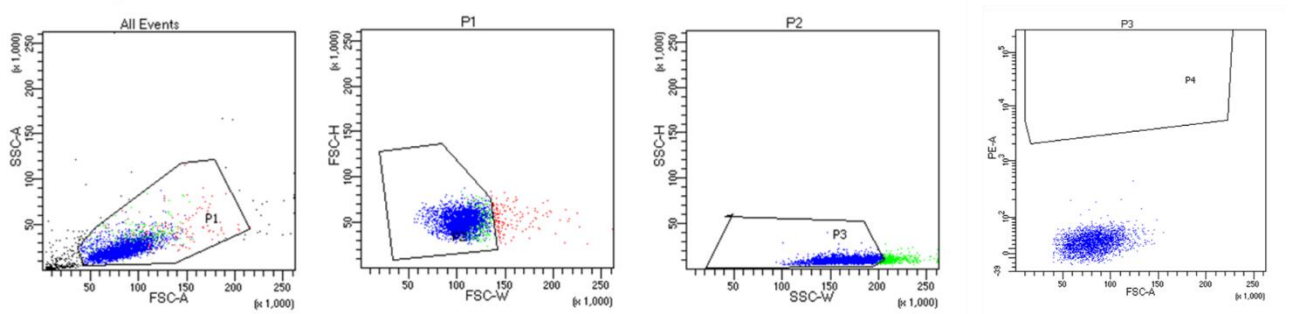
Als letztes wird hier gRNA 5 in Abbildung 16 gezeigt. Der Versuch konnte diese gRNA als eine der nicht funktionierenden gRNAs herausfiltern.

Es konnten insgesamt zwei gRNAs identifiziert werden, die für die nun nachfolgenden Experimente verwendet wurden. gRNA 3 und gRNA 4 zeigten sich beide als vielversprechend und wurden demnach ausgewählt.

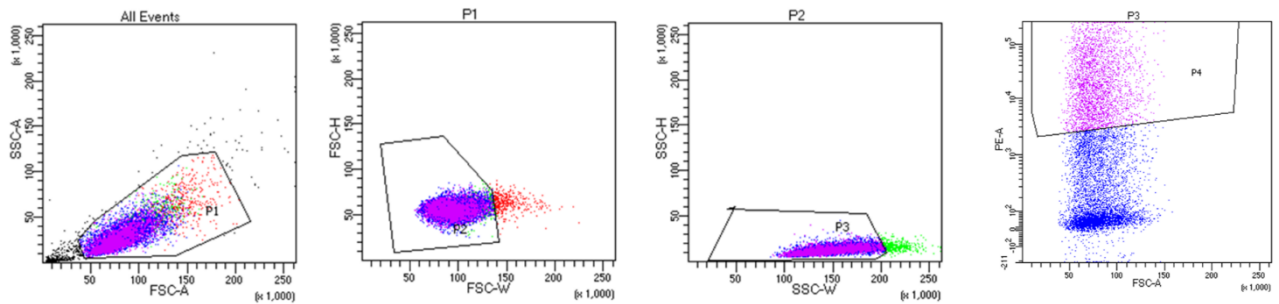
3.1.5 FACS-Sorting transfizierter Zellen

Mittels FACS können die transfizierten Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenzmarkierung isoliert und als Einzelzellen auf 96-well-Platten zur Generierung von Einzelzellkolonien platziert werden. Es wurde 3x mittels FACS sortiert. Die ersten zwei Durchläufe wurden mit der gRNA 3 durchgeführt. Die Transfektionseffizienz der ersten Transfektion hatte mit 34,2% einen sehr hohen Wert. Bei diesem Durchgang wurden fünf 96-well-Platten gesortet. Der zweite Durchgang zeigte eine Transfektionseffizienz von 30,4% und es wurden acht 96-well-Platten mit Zellen gefüllt. Die Transfektion von gRNA 4 ergab eine Transfektionseffizienz von 36,1% und die Zellen wurden in zehn 96-well-Platten verteilt. Das Prinzip der einzelnen Durchgänge war jeweils identisch. Beispielhaft stelle ich nun die FACS-Sort-Analyse der gRNA 3 vor. Zunächst wurden unbehandelte Wildtyp-Zellen analysiert, um eine Negativ-Kontrolle zu erhalten. Die Visualisierung dessen ist in Abbildung 17, Teil A nachzuvollziehen. Vitale Wildtyp-Zellen wurden mithilfe des forward und side scatters identifiziert. Der Dotplot der linken Seite zeigt die Gesamtheit aller Zellen der Wildtyp-Probe. Anschließend wurde durch sequenziellen Ausschluss bestimmter Zellpopulationen die Negativ-Kontrolle auf die gewünschte Population eingeeengt. Das Resultat ist auf der rechten Seite ersichtlich. Dies sind alle Zellen, die eine für vitale Zellen dieses Zelltyps typische Größe und Granularität aufweisen. Im Abbildungsteil (B) sieht man die Analyse der transfizierten Zellen. Es wurde das identische Einengungsverfahren wie für die Negativ-Kontrolle angewandt und so vitale Zellen identifiziert. Der Dotplot der rechten Seite zeigt die Fluoreszenzanalyse der Zellen. Der als P4 markierte Bereich zeigt hierbei den Anteil an vitalen Zellen, die eine Fluoreszenz aufweisen und somit transfiziert worden sind. Im Vergleich hierzu im äquivalenten Dotplot der Negativ-Kontrolle ist in diesem Bereich keine einzige Zelle enthalten.

A: Negativ-Kontrolle



B: NPR3, gRNA 3



C: Übersicht

Tube: Negative control			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	3.893	####	100.0
P1	3.458	88.8	88.8
P2	3.315	95.9	85.2
P3	2.920	88.1	75.0
P4	0	0.0	0.0

Tube: NPR3 gRNA3			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10.000	####	100.0
P1	9.310	93.1	93.1
P2	8.903	95.6	89.0
P3	8.518	95.7	85.2
P4	2.917	34.2	29.2

Abbildung 17: FACS-Sort der gRNA 3 (NPR3). (A) Die Negativ-Kontrolle umfasst die nicht-transfizierten Wildtyp-Podozyten. Mittels des forward und side scatters werden die vitalen Zellen identifiziert, die im P3-Feld gezeigt werden. (B) Auf identische Weise wie in (A) werden die transfizierten und gleichzeitig vitalen Zellen identifiziert. Im nachfolgenden Schritt wurden die fluoreszierenden Zellen herausgefiltert, die im P4-Feld dargestellt werden. Dieser erhebliche Teil an Zellen umfasst somit die transfizierten Zellen. (C) In der Übersicht werden die einzelnen prozentualen Anteile genau benannt.

3.1.6 Mikroskopisches Screeningverfahren

Zwei Wochen nach dem FACS-Sort wurden die 96-well-Platten unter einem Lichtmikroskop bei der kleinstmöglichen Vergrößerung von 10x zur Detektion der Kolonien gescreent und die betroffenen Wells markiert.



Abbildung 18: Markierte 96-well-Platte. In blau wurden die Wells markiert, in denen eine Kolonie unter dem Lichtmikroskop entdeckt wurde.

Anschließend wurden diese Informationen in Tabellen archiviert, um sowohl über die Anzahl der Klone sowie deren Nomenklatur einen Überblick zu behalten. Abbildung 19 kann als Musterbeispiel für alle 96-well-Platten gesehen werden.

gRNA 3 Platte 1 FACS-Sorting am 26.07.19

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				•					•	•	•	•
B	•			•				•	•	•		•
C	•	•	•	•				•	•	•	•	•
D	•	•		•	•	•			•			
E	•			•	•	•					•	
F			•				•		•			
G		•	•	•	•			•			•	
H	•				•			•		•	•	

Abbildung 19: Darstellung der identifizierten Klone auf der 96-Well-Platte 1 der gRNA 3.

Insgesamt konnten für die gRNA 3 von 768 möglichen Wells 412 Klone detektiert werden, was einer Effizienz von ca. 54% überlebenden Einzelzellen, die eine Kolonie bildeten, entspricht.

Für die gRNA 4 konnte ein ähnliches Bild festgestellt werden: von 960 gesorteten Zellen, überlebten 398 Klone, was einer Überlebensrate von 41% entspricht.

3.1.7 Genotypisierung der Klone mittels Restriktionsassay

Bei ausreichender Konfluenz wurde die DNA isoliert und die anschließende Genotypisierung mittels PCR und Enzymverdau durchgeführt. Es handelt sich hierbei um die identische Vorgehensweise, die auch bei der Qualitätskontrolle der gRNAs angewandt wurde. Zur Findung von möglichen Kandidaten für die gRNA 3 wurden 56 Klone der Platten Nr. 6 und 7 gescreent, von denen schlussendlich insgesamt zwei Kandidaten ausgewählt wurden. Dies umfasst den Knockout-Kandidaten 7B4, sowie den Wildtyp-Kandidaten 7G3. Von der gRNA 4 wurden insgesamt 48 Klone der Platten 1 und 10 untersucht, von denen zwei Klone als Knockout-Kandidaten (10D3, 10A5) sowie zwei Wildtyp-Kandidaten (1G3, 1E4) ausgewählt wurden.

Im Folgenden werden jeweils die PCR-Ergebnisse sowie die Restriktionsergebnisse der im Verlauf relevanten Klone dargestellt. Dabei ist die Darstellung der Banden identisch zu der Darstellung der Qualitätskontrolle der gRNAs. „+ E“ steht hierbei für den Zusatz des Restriktionsenzym und „– E“ für den Ansatz ohne Enzym. Für die Bewertung der Ergebnisse wird sowohl für die gRNA 3 als auch gRNA 4 die Wildtyp-Zell-DNA als Negativ-Kontrolle und somit als Referenz verwendet.

3.1.7.1 gRNA 3

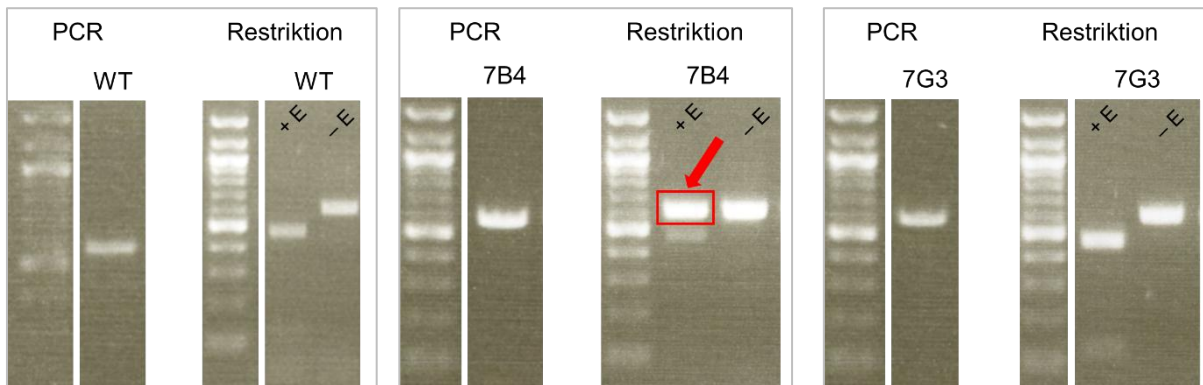


Abbildung 20: Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 3 Klone 7B4 (KO) und 7G3 (WT). Zur Beurteilung der Klone wird der Vergleich mit dem Wildtyp herangezogen. Für 7B4 zeigt sich eine ungeschnittene Bande (in Rot markiert). Es handelt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Knockout. Der Klon 7G3 zeigt keine ungeschnittene Bande und somit liegt hier ein Wildtyp vor.

Der Klon 7G3 zeigt im Enzymverdau ein identisches Bild wie die Wildtyp-Kontrolle. Dies lässt stark vermuten, dass es sich somit um Zellen ohne CRISPR/Cas9-Mutation handelt. Im Gegensatz dazu ist der Klon 7B4 zu zeigen. Dieser zeigt eine starke ungeschnittene Bande in der Kondition mit Enzym. Dadurch entsteht der starke Verdacht, dass es sich um einen möglichen Knockout-Klon handelt. Die identische Erklärung trifft auch für die Wildtyp- und Knockout-Kandidaten der gRNA 4 zu (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22).

3.1.7.2 gRNA 4

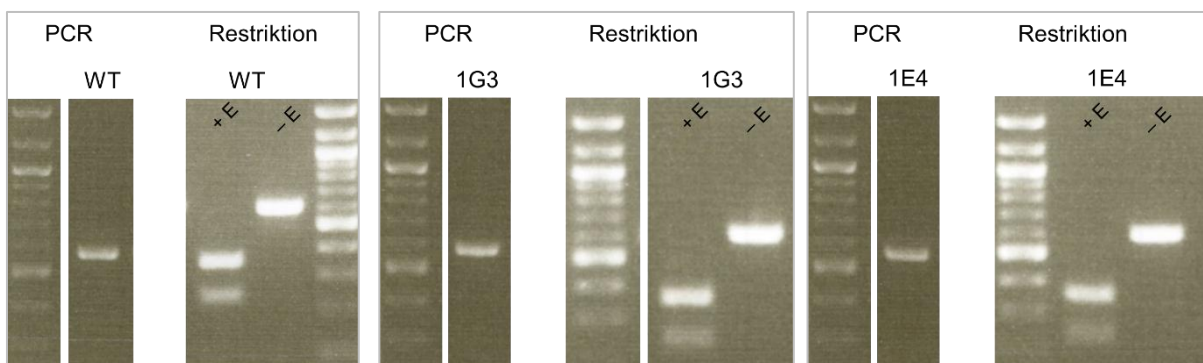


Abbildung 21: Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 4 Klone 1G3 (WT) und 1E4 (WT). Der Enzymverdau zeigt bei beiden Klone ein identisches Bild verglichen mit der Wildtyp-DNA. Dies weist darauf hin, dass es sich um zwei Wildtyp-Klone handelt.

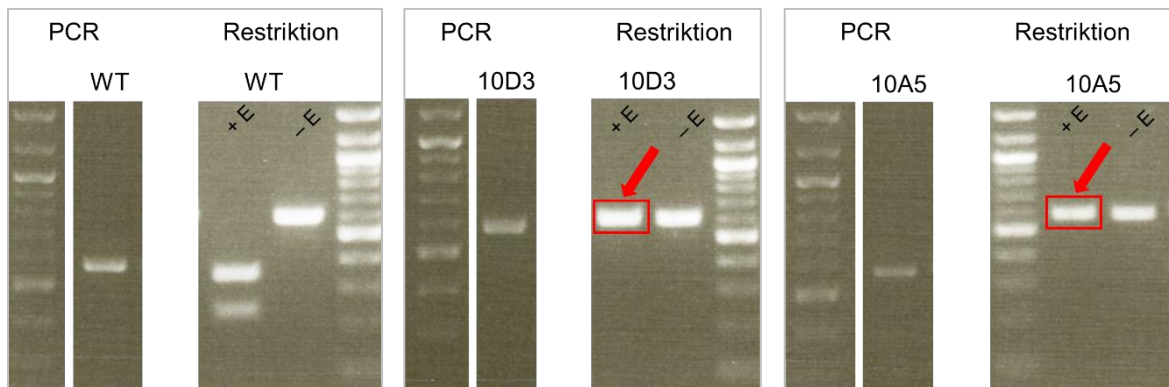


Abbildung 22: Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 4 Klone 10D3 (KO) und 10A5 (KO). Beide Kandidaten weisen in Rot markiert eine ungeschnittene Bande bei Enzymexposition auf. Es liegen demnach zwei weitere Knockout-Kandidaten vor.

3.1.8 Genotypisierung der Kandidaten mittels Sequenzierung

Mit dem Restriktionsassay konnte die Anzahl an Kandidaten auf wenige vielversprechende Klone reduziert werden. Eine anschließende Analyse der Sequenz des interessierenden Genabschnittes sollte den Verdacht bestätigen oder widerlegen. In den folgenden Darstellungen wird lediglich der Sequenzbereich dargestellt, der die gRNA enthält. Die gRNA ist jeweils gelb markiert. Dabei zeigt die untere Zeile grundsätzlich die Sequenz des Gens, die aus entsprechenden Datenbanken gewonnen wurde, und im oberen Abschnitt ist die Sequenz dargestellt, die mittels der Sequenzierung aus der DNA der Zellen gewonnen wurde. Pro Klon werden jeweils vier Sequenzanalysen gezeigt.

3.1.8.1 Wildtyp-Kandidaten

7G3 gRNA 3

Query	132	cccagccgagtagtagcgcACGGG	GAGAAAGTGAGCACCAGCAGAGACGGCATCGTGCCGC	191
Sbjct	497	CCCAGCCGAGTAGTACGCACGGG	GAGAAAGTGAGCACCAGCAGAGACGGCATCGTGCCGC	438
Query	431	GCACGATGCCGTCTCTGCTGGTGCTCACTTTCTC	CCCGTgcgtagtactactcggtggg	cgt 490
Sbjct	441	GCACGATGCCGTCTCTGCTGGTGCTCACTTTCTC	CCCGTGCGTACTACTCGGCTGGG	CGT 500
Query	61	ccgcgccaccgccgccgccgccaacgccaccgccaccggtgccgccgcccagcaacg	ccc	120
Sbjct	554	CCGCGCCACCGCCGCCGCCGCAACGCCACCGCCACCGGTGCCGCCGCCAGCAACG	CCC	495
Query	121	agccgagtagtagtagcgcACGGG	GAGAAAGTGAGCACCAGCAGAGACGGCATCGTGCCGCAAG	180
Sbjct	494	AGCCGAGTAGTACGCACGGG	GAGAAAGTGAGCACCAGCAGAGACGGCATCGTGCCGCAAG	435

Query	346	CAAGTCTTTGGTCTCGTCGAAACTGTAGATGGACGTGTGCAAACCCCTCCTCCTGGAAGAC	405
Sbjct	1171	CAAGTCTTTGGTCTCGTCGAAACTGTAGATGGACGTGTGCAAACCCCTCCTCCTGGAAGAC	1112
Query	181	GGAGGGTTTGACACAGTCCATCTACAGTTTCGACGAGACCAAAGACTTGGATCTGGAAGA	240
Sbjct	1123	GGAGGGTTTGACACAGTCCATCTACAGTTTCGACGAGACCAAAGACTTGGATCTGGAAGA	1182
Query	184	CTTCCAGGAGGAGGGTTTGACACAGTCCATCTACAGTTTCGACGAGACCAAAGACTTGGAA	243
Sbjct	1114	CTTCCAGGAGGAGGGTTTGACACAGTCCATCTACAGTTTCGACGAGACCAAAGACTTGGAA	1173
Query	244	TCTGGAAGACATCGTGCGCAATATCCAGGCCAGTGAGAGA--GGTGAGCAGGGGCGCG	299
Sbjct	1174	TCTGGAAGACATCGTGCGCAATATCCAGGCCAGTGAGAGAGTGGTGATCATGTGTGCG	1231
Query	181	ACACGTCCATCTACAGTTTCGACGAGACCAAAGACTTGGATCTGGAAGACATCGTGCGCA	240
Sbjct	1134	ACACGTCCATCTACAGTTTCGACGAGACCAAAGACTTGGATCTGGAAGACATCGTGCGCA	1193

Abbildung 23: Ergebnisse der Sequenzierung der Wildtyp-Kandidaten von NPR3. Die Sequenzierung aller Klone bestätigt, dass es sich um Wildtyp-Klone handelt.

Diese ersten drei Klone sind die Wildtyp-Kandidaten beider gRNAs und zeigen die intakte Sequenz der jeweiligen gRNA sowohl in der Information aus der Datenbank als auch in den analysierten Sequenzen unserer Zellen. Somit kann bestätigt werden, dass durch CRISPR/Cas9 zumindest im Bereich der gRNA keine Mutation vorliegt. Die Wahrscheinlichkeit, dass es somit auch zur Transkription des Proteins kommt, ist dementsprechend hoch.

3.1.8.2 Knockout-Kandidaten

7B4 gRNA 3

4 bp Deletion			
Query	61	cccgcgccaccgccgcccgcgccaacgccaccgccaccggtgccgcccggccagcaacgcc	120
Sbjct	555	CCCGCGCCACCGCCCGCCGCCAACGCCACCGCCACCGGTGCCGCCGGCCAGCAACGCC	496
Query	121	c-----gAGTAGNACGCACGGGGAGAAAGTGAGCACCNGNAGANACGGCATCGTGCCGNAA	176
Sbjct	495	CAGCCGAGTAGTACGCACGGGGAGAAAGTGAGCACCAGCAGAGACGGCATCGTGCCGCAA	436

4 bp Deletion

```
Query 421 TGCCGTCTCTGCTGGTGTCTCACTTTCTCCCCGTGCGTACTACTc-----gggcgttgctgg 476
          |||
Sbjct 447 TGCCGTCTCTGCTGGTGTCTCACTTTCTCCCCGTGCGTACTACTCGGCTGGGCGTTGCTGG 506
```

12 bp Deletion

```
Query 70 tgccccgcgccaccgcccgcgcccgccaacgccaccgcccaccggtgccgcccggccagcaac- 128
          |||
Sbjct 557 TGCCCGGCCACCGCCGCCGCCGCCAACGCCACCGCCACCGGTGCCGCCGGCCAGCAACG 498

Query 129 -----agtacgcACGGGGAGAAAAGTGAGCACCAGCAGAGACGGCATCGTGCCGC 177
          |||
Sbjct 497 CCCAGCCGAGTAGTACGCACGGGGAGAAAAGTGAGCACCAGCAGAGACGGCATCGTGCCGC 438
```

6 bp Deletion

```
Query 61 gccaccgcccaccggtgccgcccggccagcaacgcccGC-----GTACGCACGGGGAGAA 114
          |||
Sbjct 529 GCCACCGCCACCGGTGCCGCCGGCCAGCAACGCCCAGCCGAGTAGTACGCACGGGGAGAA 470
```

10D3 gRNA 4

1 bp Deletion

```
Query 193 CTTCCAGGAGGAGGGTTTGACACGTCCATCTACAGTTTCGACGAGACCAAAGACTT-GA 251
          |||
Sbjct 1114 CTTCCAGGAGGAGGGTTTGACACGTCCATCTACAGTTTCGACGAGACCAAAGACTTGGG 1173

Query 252 TCTGGAAGACATCGTGCCGAATATCCAGGCCAGTGAGAGA--GGTGAGCAGGGGCGCG 307
          |||
Sbjct 1174 TCTGGAAGACATCGTGCCGAATATCCAGGCCAGTGAGAGAGTGGTGATCATGTGTGCG 1231
```

2 bp Deletion

```
Query 186 CTTCCAGGAGGAGGGTTTGACACGTCCATCTACAGTTTCGACGAGACCAAAGACTT--A 243
          |||
Sbjct 1114 CTTCCAGGAGGAGGGTTTGACACGTCCATCTACAGTTTCGACGAGACCAAAGACTTGGG 1173

Query 244 TCTGGAAGACATCGTGCCGAATATCCAGGCCAGTGAGAGA--GGTGAGCAGGGGCGCG 299
          |||
Sbjct 1174 TCTGGAAGACATCGTGCCGAATATCCAGGCCAGTGAGAGAGTGGTGATCATGTGTGCG 1231
```

1 bp Deletion

Query 181 GAGGGTTTGCACACGTCCATCTACAGTTTCGACGAGACCAAAGACTT-GATCTGGAAGAC 239
|||||
Sbjct 1124 GAGGGTTTGCACACGTCCATCTACAGTTTCGA CGAGACCAAAGACTTGGATCTGGAAGAC 1183

7 bp Deletion

Query 192 CTTCCAGGAGGAGGGTTTGCACACGTCCATCTACAGTTTCGACGAGACCAAAGA----- 245
|||||
Sbjct 1114 CTTCCAGGAGGAGGGTTTGCACACGTCCATCTACAGTTTCGA CGAGACCAAAGACTTGGGA 1173

Query 246 -CTGGAAGACATCGTGCGCAATATCCAGGCCAGTGAGAGA--GGTGAGCAGGGGCGCG 300
|||||
Sbjct 1174 TCTGGAAGACATCGTGCGCAATATCCAGGCCAGTGAGAGAGTGGTGATCATGTGTGCG 1231

2 bp Deletion

Query 183 CTTCCAGGAGGAGGGTTTGCACACGTCCATCTACAGTTTCGACGAGACCAAAGACTT--A 240
|||||
Sbjct 1114 CTTCCAGGAGGAGGGTTTGCACACGTCCATCTACAGTTTCGA CGAGACCAAAGACTTGGGA 1173

Query 241 TCTGGAAGACATCGTGCGCAATATCCAGGCCAGTGAGAGA--GGTGAGCAGGGGCGCG 296
|||||
Sbjct 1174 TCTGGAAGACATCGTGCGCAATATCCAGGCCAGTGAGAGAGTGGTGATCATGTGTGCG 1231

10A5 gRNA 4

15 bp Deletion

Query 192 CTTCCAGGAGGAGGGTTTGCACACGTCCATCTACAGTTTCGACGAGACCA----- 241
|||||
Sbjct 1114 CTTCCAGGAGGAGGGTTTGCACACGTCCATCTACAGTTTCGA CGAGACCAAAGACTTGGGA 1173

Query 242 -----AAGACATCGTGCGCAATATCTAGGCCAGTGAGAGA--GGTGAGCAGGGGCGCG 292
|||||
Sbjct 1174 TCTGGAAGACATCGTGCGCAATATCCAGGCCAGTGAGAGAGTGGTGATCATGTGTGCG 1231

15 bp Deletion

Query 290 CGCGCCCCTGCTCACC--TCTCTCACTGGCCTGGATATTGCGCACGATGTCTT----- 340
||| | | | |||| |
Sbjct 1231 CGCACACATGATCACCCTCTCTCACTGGCCTGGATATTGCGCACGATGTCTT CCAGATC 1172

Query 341 -----TGGTCTCGTCGAAACTGTAGATGGACGTGTGCAAACCCTCCTCCTGGAAGAC 392
|||||
Sbjct 1171 CAAGTCTTTGGTCTCGTCGAAACTGTAGATGGACGTGTGCAAACCCTCCTCCTGGAAGAC 1112

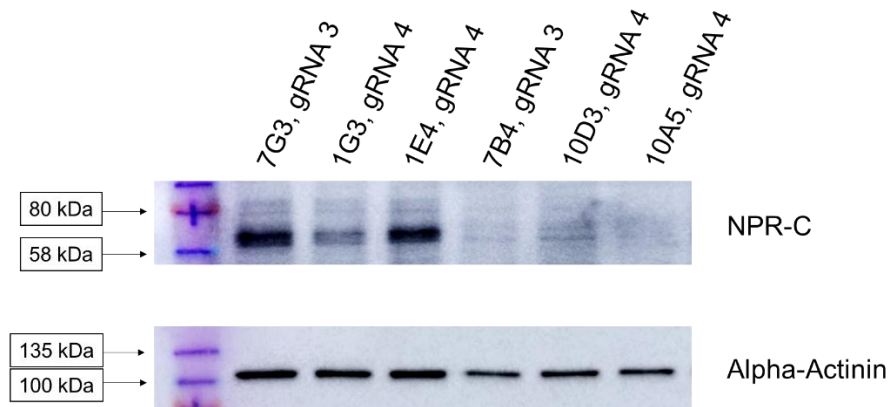


Abbildung 25: Western Blot der Knockout- und Wildtyp-Kandidaten für NPR3. Die ersten drei Klone sind die Wildtyp-Kandidaten und zeigen eine Doppelbande bei 60 kDa. Die letzten drei Klone zeigen hingegen keine Bande auf der Höhe und bestätigen den Knockout auch auf Proteinebene.

Der Western Blot (Abbildung 25) zeigt sehr eindeutig, dass bei den Klonen, die als Wildtyp genetisch identifiziert wurden, eine Doppelbande bei ca. 60 kDa erscheint, die bei den Knockout-Kandidaten fehlt. Dies ist der endgültige Beweis, dass durch die CRISPR/Cas9 Methode Klone generiert wurden, deren NPR-C-Expression durch Nullmutationen unterbunden wurde.

3.1.9.1 Karyotypisierung

Diese zusätzliche Methode wurde wie bereits beschrieben angewendet, um einen veränderten Chromosomensatz auszuschließen. Die folgenden Bilder wurden mithilfe einer 40x Vergrößerung eines Lichtmikroskopes aufgenommen. Es werden hier nur die drei fraglichen und relevanten Knockout-Klone gezeigt.

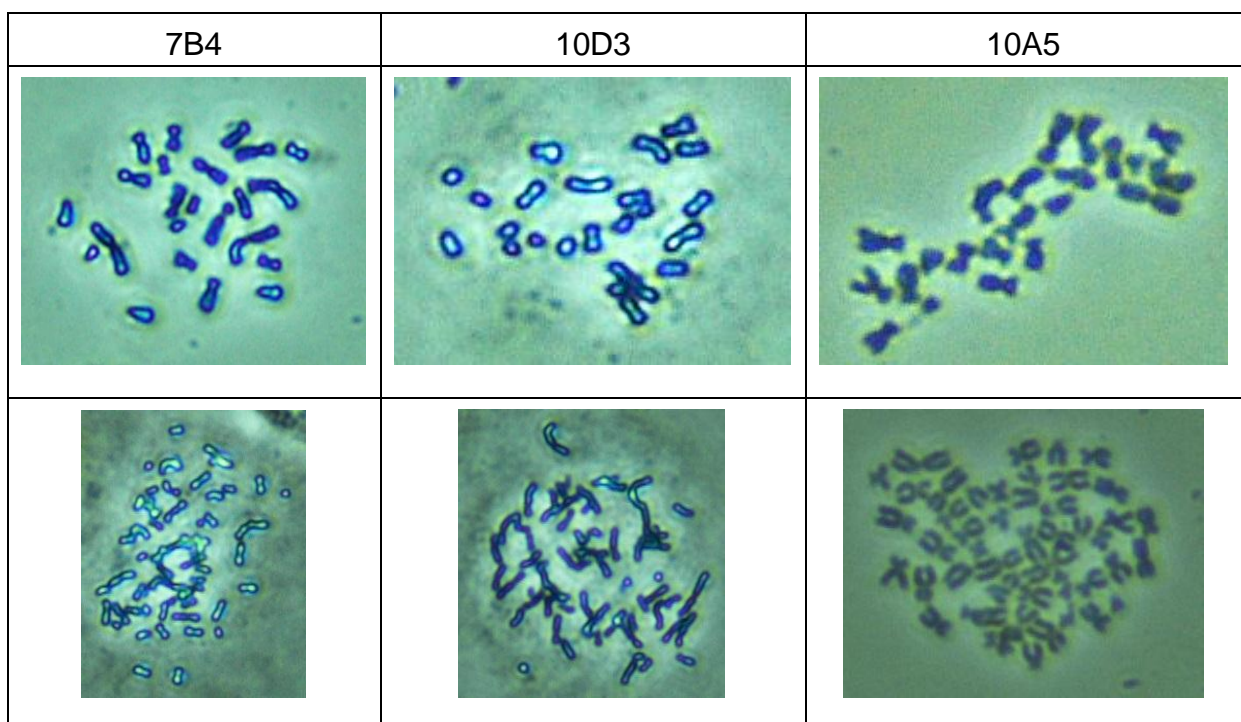


Abbildung 26: Lichtmikroskopische Aufnahme des Chromosomensatzes der ausgewählten Klone. Es sind jeweils 46 Chromosomen sichtbar.

Die dargestellten Ansammlungen stellen die Chromosomen einer einzelnen Zelle dar. Für jeden Klon konnte mindestens eine Ansammlung von Chromosomen der Anzahl 46 gefunden werden. Somit besitzen die Zellen einen normalen diploiden Chromosomensatz und das Sequenzierungsergebnis lässt sich am ehesten durch mehrere Zellklone in der untersuchten Probe erklären.

3.1.10 Zusammenfassendes Ergebnis

In der folgenden Tabelle (Tabelle 41) sind die Namen und die jeweiligen verwendeten gRNAs der Klone aufgelistet, die für die weitere Verwendung ausgewählt wurden. Ihr Wildtyp- oder Knockout-Phänotyp wurde sowohl auf genetischer Ebene als auch auf der Ebene der Proteinexpression nachgewiesen.

Wildtyp		Knockout	
7G3	gRNA 3	7B4	gRNA 3
1G3	gRNA 4	10D3	gRNA 4
1E4	gRNA 4	10A5	gRNA 4

Tabelle 41: Zusammenfassende Liste der identifizierten Wildtyp- und Knockout-Klone.

3.2 MERTK

3.2.1 Design der gRNAs

Zur Generierung eines Knockouts des MERTK-Gens wurden insgesamt sechs unterschiedliche gRNAs erstellt, die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind. Dabei wird von jeder gRNA ein anderes Exon fokussiert. Die gRNA 1 ist auf dem Exon 2 lokalisiert, gRNA 2 auf Exon 7, gRNA 3 auf Exon 8, gRNA 4 befindet sich auf Exon 11, gRNA5 auf Exon 4 sowie gRNA 6 auf Exon 3. Die nachfolgende Tabelle listet alle verwendeten gRNAs auf.

<u>gRNA 1:</u>	AGATGGAAAGGAATTGCTCGGGG
<u>gRNA 2:</u>	GATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGG
<u>gRNA 3:</u>	GCTACCGGATATCTCACGTGTGG
<u>gRNA 4:</u>	AGGTAAGCTCGATGGCTCGCCGG
<u>gRNA 5:</u>	TGTATCTGATCCCATATACGTGG
<u>gRNA 6:</u>	GTGTTAATGAAAAACCGGAAAGG

Tabelle 42: Liste der verwendeten gRNAs.

3.2.2 Klonierung der gRNAs in den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector und Transformation von DH5 Competent Cells

Wie bereits für NPR3 beschrieben, wurden auch für MERTK jeweils mehrere Einzelkolonien separat aufgereinigt und mithilfe der Sanger-Sequenzierung analysiert. Exemplarisch wird hier einmal pro gRNA jeweils der Abschnitt gezeigt, der die gRNA enthält. Für jede gRNA kann dabei eine korrekte Insertion in den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector gezeigt werden.

gRNA 1

AAaGGAcGAAACACCGAGATGGAAAGGAATTGCTCGGTTTTAGAGCTAGAAATA

gRNA 2

GAAACACCGGATCCaGCAGCTGCAAGCCC GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT

gRNA 3

GAAACaCCGGCTACCGgaTATCTCACGTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA

gRNA 4

GAAacaCCGAGGTAAGCTCGATGGCTCGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA

gRNA 5

GGACGAAACACCGTGTATCTGATCCCATATACGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA

gRNA 6

ACGAAACACCGGTGTTAATGAAAAACCGGAA GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG

3.2.3 Transfektion muriner Podozyten

Ähnlich der Transfektion der humanen Podozyten stellte die Transfektion der murinen Podozyten eine große Herausforderung dar. Die schlussendlich erfolgreiche Methode wurde mittels des NEON Transfektionssystems vorgenommen und lieferte eine vergleichsweise hohe Transfektionseffizienz. Dabei wurden folgende Parameter verwendet: 1000V für 40 ms mit zwei hintereinander folgenden Impulsen.

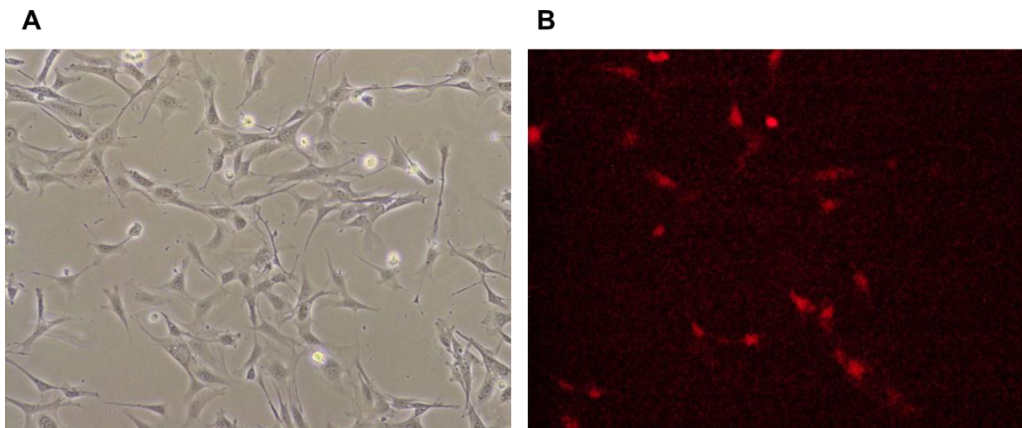


Abbildung 27: **Transfektion der Maus-Podozyten.** (A) Das lichtmikroskopische Bild zeigt größtenteils vitale Zellen in ihrer typischen morphologischen Erscheinung. (B) Unter Fluoreszenzbestrahlung kann ein erheblicher Anteil an transfizierten Zellen sichtbar gemacht werden.

Diese zwei Bilder zeigen das erfolgreiche Ergebnis der NEON Transfektion der Mauspodozyten (Abbildung 27). In der lichtmikroskopischen Aufnahme erscheinen nur vereinzelt tote Zellen, die überwiegende Mehrheit der Zellen ist vital. Somit wurde diese Methode mit den identischen Einstellungen für alle nachfolgenden Transfektionen verwendet.

3.2.4 Auswahl funktionstüchtiger gRNAs mittels Restriktionsassay

Entsprechend der Beschreibung der Experimente für den Knockout des NPR3-Gens wurden auch die gRNAs für den MERTK-Knockout nach identischem Schema getestet. Die Darstellung der Ergebnisse zeigt erneut die PCR des Probenmaterials und der Kontroll-DNA mit Primern, die den Bereich der gRNA amplifizieren. Das jeweils rechte Bild zeigt die Gelelektrophorese nach dem Enzymverdau mit dem jeweils spezifischen Restriktionsenzym.

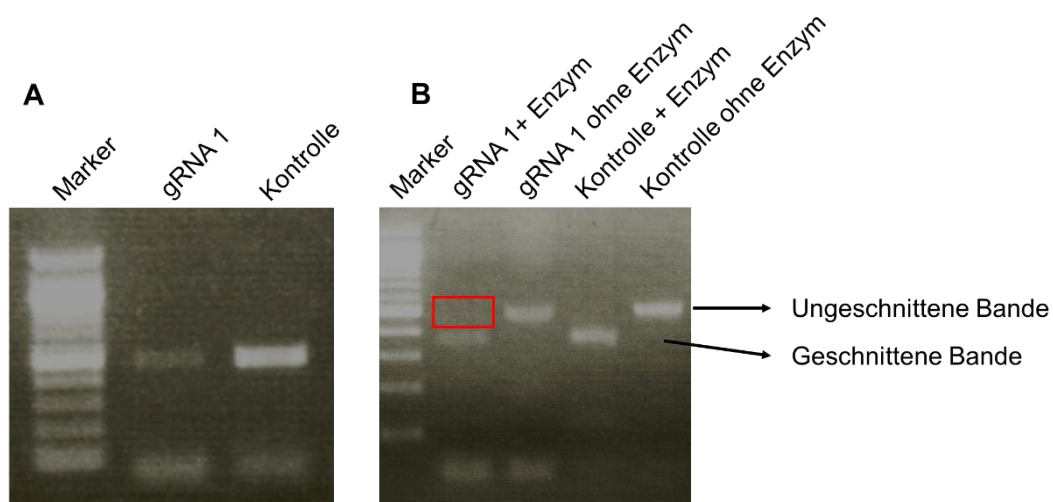


Abbildung 28: **PCR und Restriktionsverdau der gRNA 1 (MERTK).** (A) Das PCR-Ergebnis zeigt für die Proben- und Kontroll-DNA jeweils eine eindeutige Bande. (B) Die gRNA kann als nicht funktionstüchtig eingestuft werden, da im Reaktionsansatz mit dem Restriktionsenzym keine ungeschnittene Bande ersichtlich ist.

gRNA 1 zeigt im Enzymverdau keinen Anteil an ungeschnittenen Fragmenten, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese gRNA unzureichend funktionstüchtig ist (Abbildung 28). Demnach wurde sie nicht weiterverfolgt.

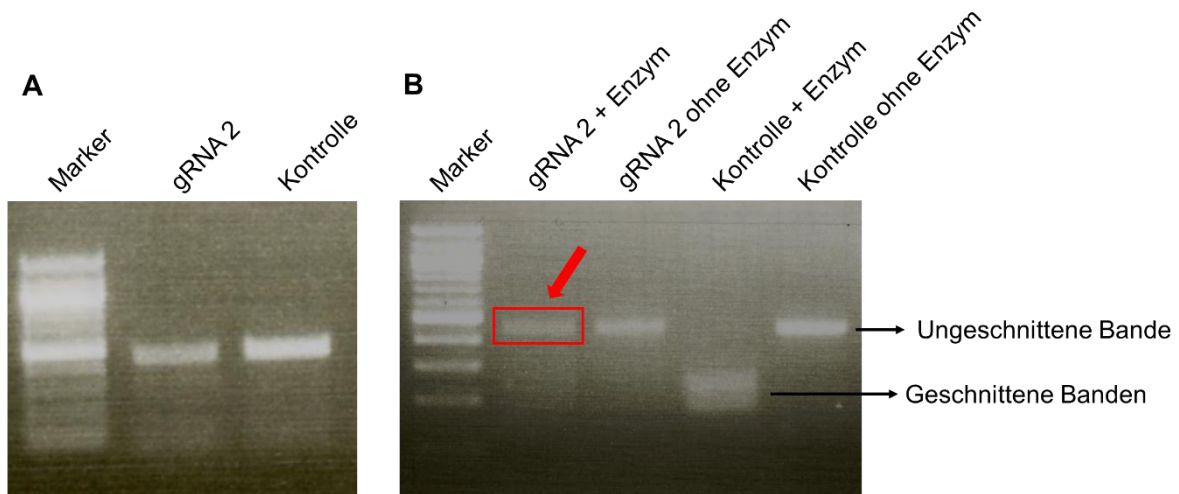


Abbildung 29: PCR und Restriktionsverdau der gRNA 2 (MERTK). (A) Das PCR-Ergebnis zeigt für die Proben- und Kontroll-DNA jeweils eine eindeutige Bande. (B) In Rot markiert sieht man eine ungeschnittene Bande in der Kondition mit Enzym. Dies weist darauf hin, dass diese gRNA funktionstüchtig ist.

Hingegen zeigt gRNA 2 eine deutliche Bande auf Höhe der Lauflänge der ungeschnittenen Banden (Abbildung 29). Aufgrund ihrer hohen Intensität im Vergleich zur Probe ohne Enzym kann davon ausgegangen werden, dass diese gRNA eine hohe Effizienz aufweist, mit der Mutationen ausgelöst werden.

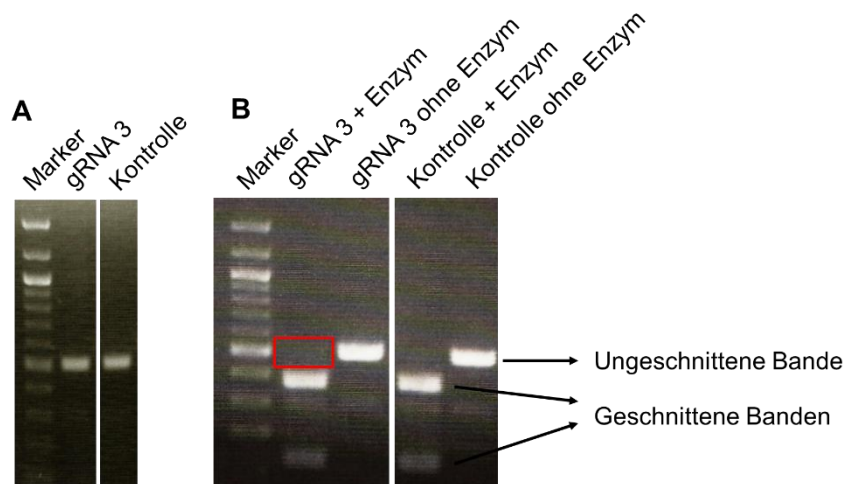


Abbildung 30: PCR und Restriktionsverdau der gRNA 3 (MERTK). (A) Das PCR-Ergebnis zeigt für die Proben- und Kontroll-DNA jeweils eine eindeutige Bande. (B) Aufgrund der fehlenden ungeschnittenen Bande im rot markierten Kasten, wird diese gRNA als funktionsuntüchtig deklariert.

gRNA 3 zeigt ein identisches Bandenmuster wie auch gRNA 1 gezeigt hat und demnach konnte diese gRNA ebenfalls von weiteren Experimenten ausgeschlossen werden (Abbildung 30).

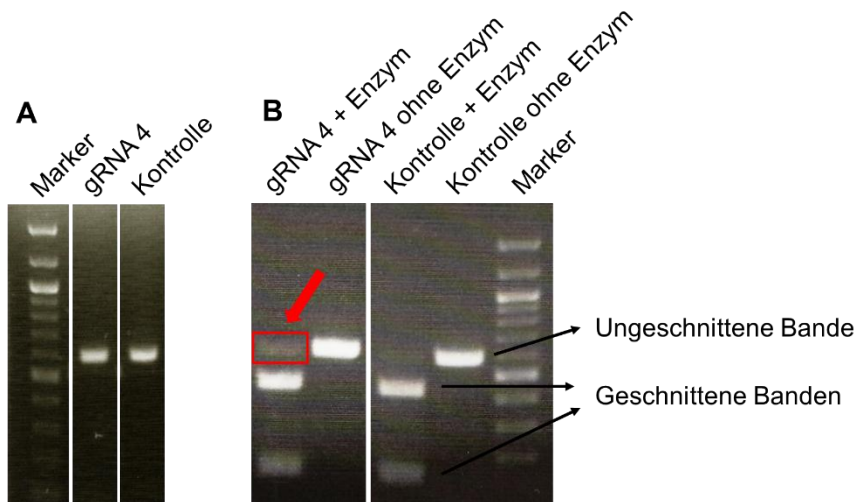


Abbildung 31: PCR und Restriktionsverdau der gRNA 4 (MERTK). (A) Das PCR-Ergebnis zeigt für die Proben- und Kontroll-DNA jeweils eine eindeutige Bande. (B) In rot markiert sieht man eine ungeschnittene Bande in der Kondition mit Enzym. Dies weist darauf hin, dass diese gRNA funktionstüchtig ist.

Als zweite funktionstüchtige gRNA wurde die gRNA 4 selektiert. Markiert mit dem roten Pfeil ist eine Bande auf Höhe der ungeschnittenen Banden zu erkennen (Abbildung 31). Die Bande und damit Effizienz waren in diesem Experiment zwar nachweisbar, aber schwächer als bei gRNA2.

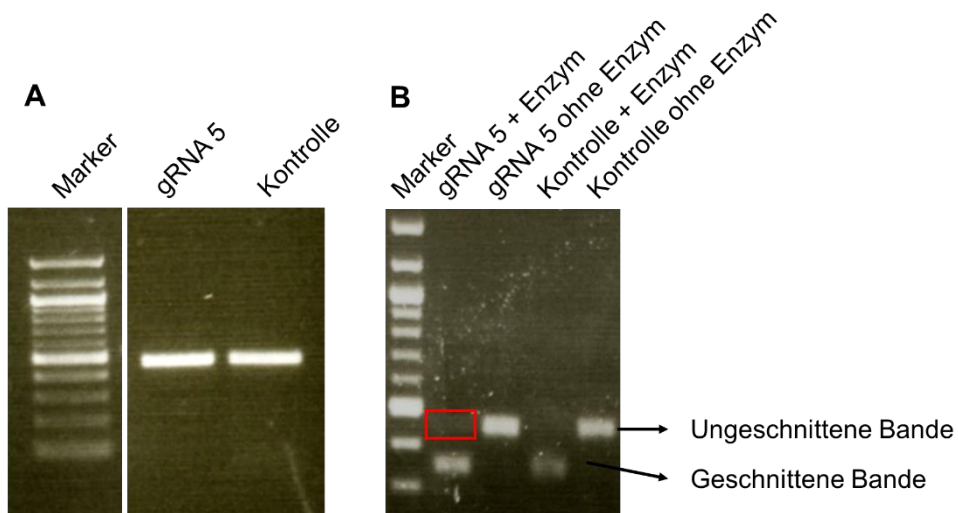


Abbildung 32: PCR und Restriktionsverdau der gRNA 5 (MERTK). (A) Das PCR-Ergebnis zeigt für die Proben- und Kontroll-DNA jeweils eine eindeutige stark leuchtende Bande. (B) Aufgrund der fehlenden ungeschnittenen Bande im rot markierten Kasten, wird diese gRNA als funktionsuntüchtig deklariert.

Die gRNA 5 konnte aufgrund fehlender Funktionstüchtigkeit aus weiteren Experimenten ausgeschlossen werden (Abbildung 32).

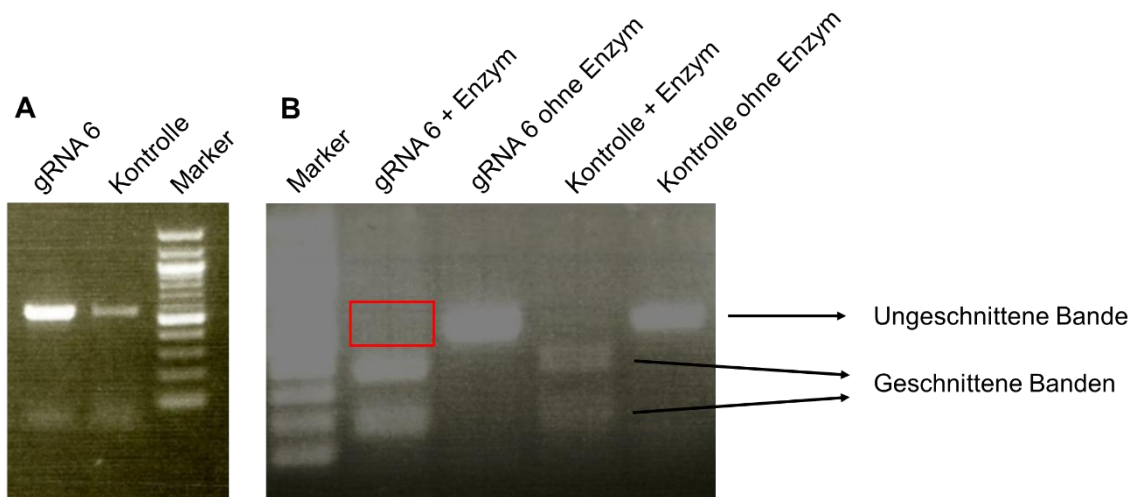


Abbildung 33: **PCR und Restriktionsverdau der gRNA 6 (MERTK).** (A) Das PCR-Ergebnis zeigt für die Proben- und Kontroll-DNA jeweils eine eindeutige Bande, die jedoch im Fall der Kontroll-DNA schwächer ist. (B) Aufgrund der fehlenden ungeschnittenen Bande im rot markierten Kasten, wird diese gRNA als funktionsuntüchtig deklariert.

Auch für gRNA 6 gilt der Ausschluss aus allen weiteren Experimenten aufgrund keiner ersichtlichen ungeschnittenen Bande (Abbildung 33).

Aus diesen Experimenten ließen sich zwei gRNAs identifizieren, die für die Transfektion von Zellen geeignet sind. Es handelt sich hierbei um die gRNA 2 und die gRNA 4.

3.2.5 FACS-Sorting transfizierter Zellen

Die Vereinzelung der mit den ausgewählten gRNAs transfizierten Zellen wurde wie bei den humanen Podozyten ebenfalls mit einem FACS-Sort vorgenommen. Für gRNA 2 wurden zwei separate Transfektions- und FACS-Durchläufe durchgeführt, wobei jeweils fünf 96-well-Platten mit Einzelzellen gefüllt wurden. Der erste Durchgang zeigte eine Transfektionseffizienz von 15,1% und der zweite eine etwas höhere von 18,4%. Die mit gRNA 4 transfizierten Zellen wurde einmalig in zehn 96-well-Platten gesortet und wiesen eine Transfektionseffizienz von 13,1% auf.

3.2.6 Mikroskopisches Screeningverfahren

Das Screening unter dem Mikroskop ergab für die ersten fünf 96-well-Platten der gRNA 2 insgesamt 244 überlebende und zu Kolonien herangewachsene Klone. Dies entspricht einer Überlebensrate von circa 51%. Die Transfektion mit der gRNA 4 brachte 70% überlebende Klone hervor (676 Klone verteilt auf zehn 96-well-Platten).

3.2.7 Genotypisierung der Klone mittels Restriktionsassay

Identisch zur beschriebenen Methode für NPR3 wurde die Analyse der transfizierten Zellen für den Knockout von MERTK ebenfalls mittels eines Enzymverdaus vorgenommen. Die Auswertung wurde identisch wie in Abschnitt 0 durchgeführt.

3.2.7.1 gRNA 2

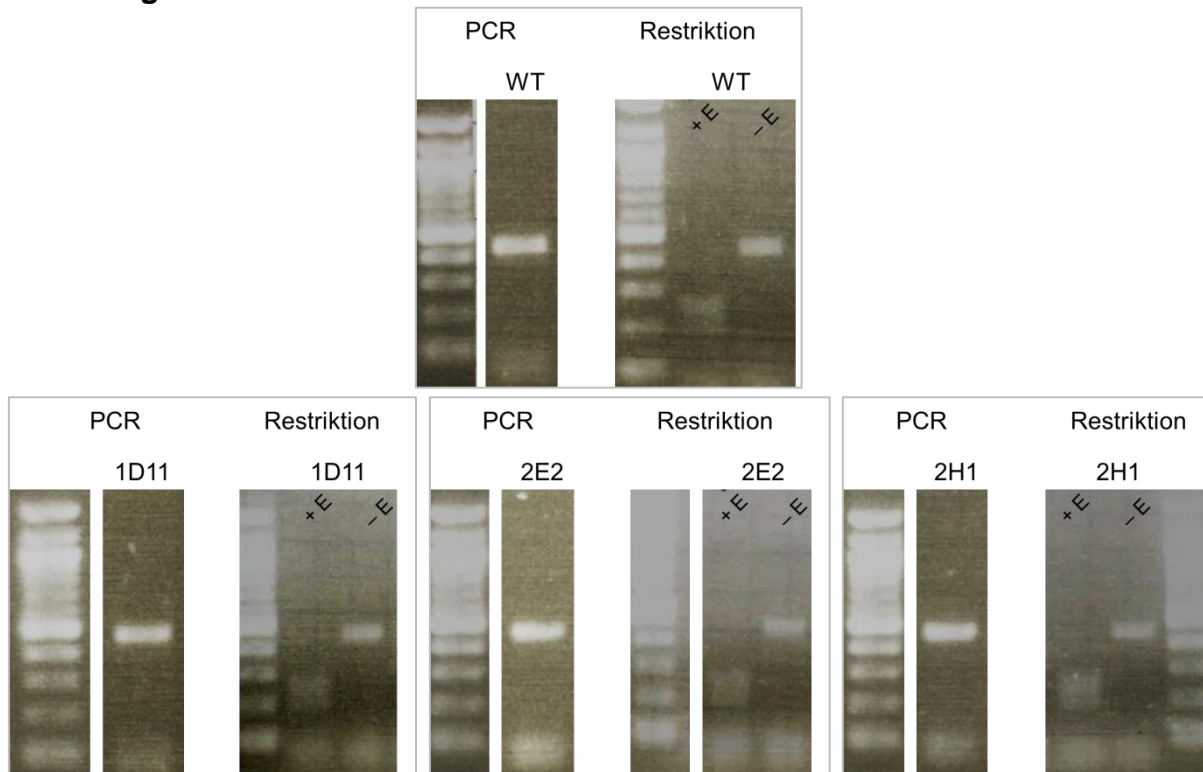


Abbildung 34: *Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 2 Klone 1D11 (WT), 2E2 (WT) und 2H1 (WT). Zur Beurteilung der Klone wird der Vergleich mit dem Wildtyp herangezogen. Bei Zusatz des Restriktionsenzym wird die gesamte hinzugefügte DNA-Probe geschnitten. Es handelt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um drei Wildtyp-Klone.*

Ein identisches Restriktionsmuster wie die Wildtyp-Kontrolle wiesen die Klone 2E2, 2H1 und 1D11 der gRNA 2 auf (Abbildung 34). Somit konnten diese als Wildtyp-Kandidaten identifiziert werden.

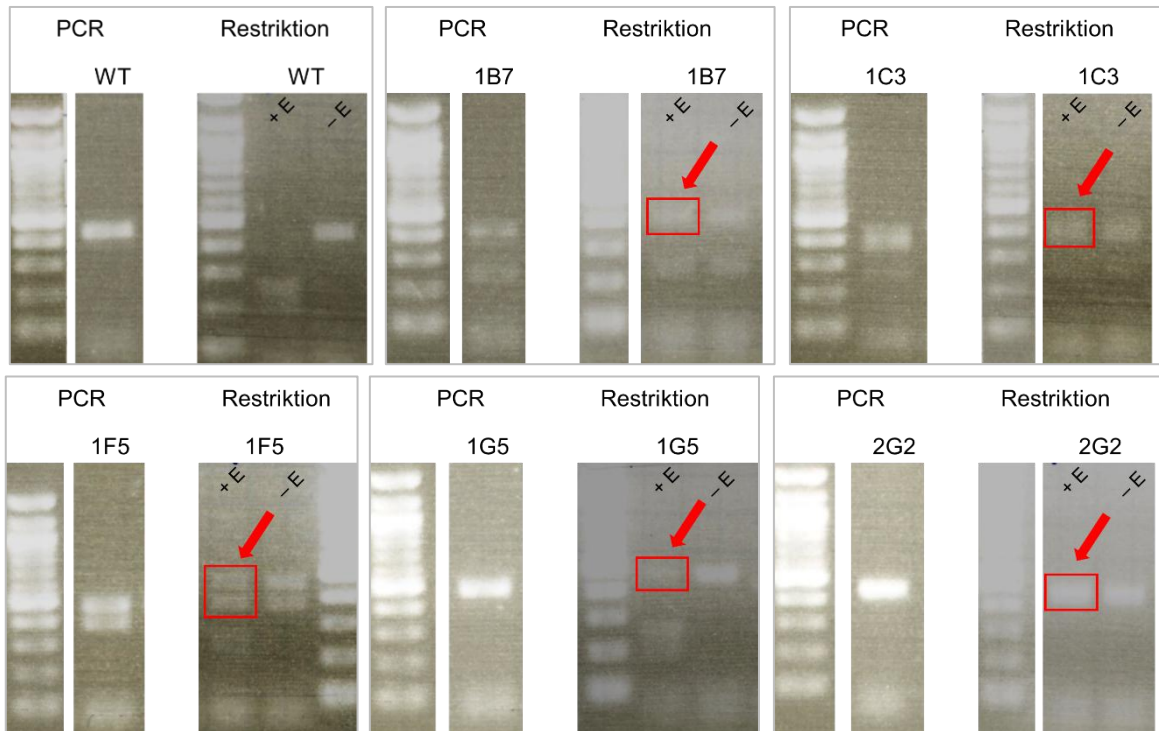


Abbildung 35: **Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 2 Klone 1B7 (KO), 1C3 (KO), 1F5 (KO), 1G5 (KO) und 2G2 (KO).** Zur Beurteilung der Klone wird der Vergleich mit dem Wildtyp herangezogen. Bei Zusatz des Restriktionsenzym ist bei jedem Klon eine mehr oder weniger deutliche ungeschnittene Bande ersichtlich. Es könnte sich demnach um Knockout-Klone handeln.

Im Kontrast dazu stehen die Klone 1B7, 1C3, 1F5, 1G5 und 2G2 der gRNA 2. Anders als die Wildtyp-Kandidaten, zeigen diese Klone nach Enzymverdau eine Bande auf Höhe der ungeschnittenen Bandengröße. Diese Bande ist nicht bei jedem dieser Klone gleich eindeutig (Abbildung 35). Diese Erkenntnis lässt jedoch vermuten, dass es sich um Knockouts handeln könnte.

3.2.7.2 gRNA 4

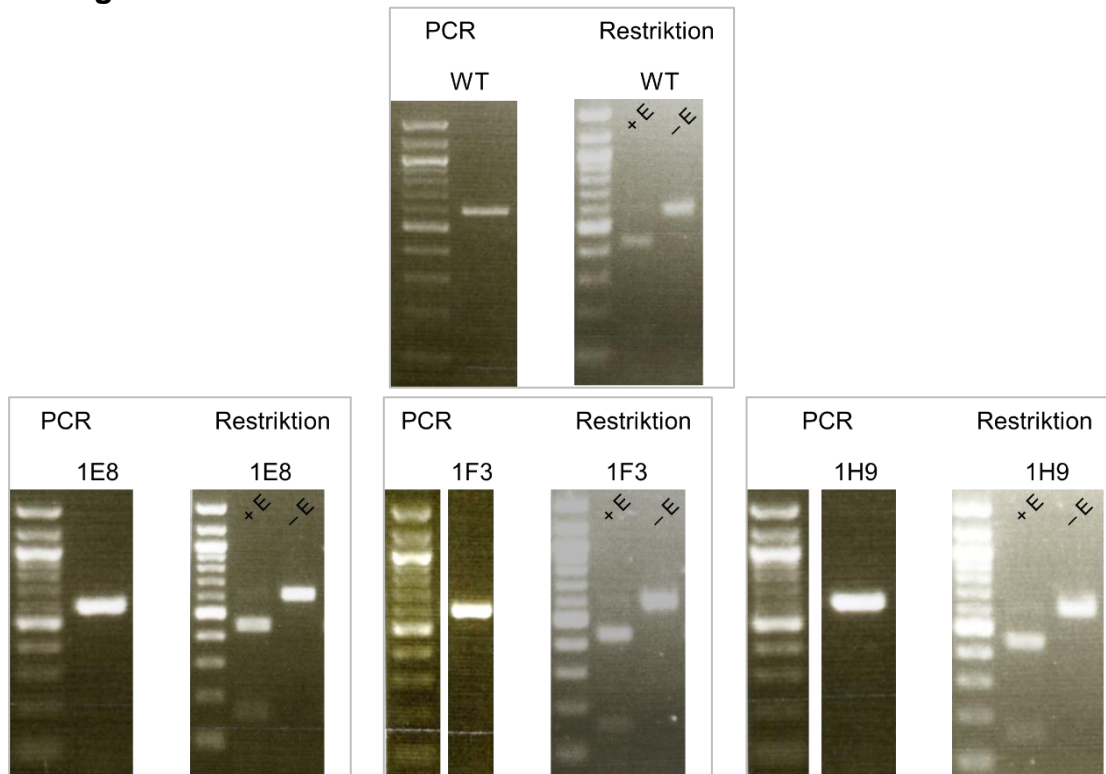


Abbildung 36: **Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 4 Klone 1E8 (WT), 1F3 (WT) und 1H9 (WT).** Zur Beurteilung der Klone wird der Vergleich mit dem Wildtyp herangezogen. Im Restriktionsverdau zeigt sich die geschnittene Bande jeweils sehr prominent. Es lässt das Vorliegen von Wildtyp-Klonen vermuten.

Aus den Klonen, die mit der gRNA 4 transfiziert worden sind, wurden drei Klone als Wildtyp-Kandidat ausgewählt: 1E8, 1F3 und 1H9. Ihre geschnittene Bande ist jeweils prominent und verspricht ein mutationsfreies Genom im Bereich der gRNA (Abbildung 36).

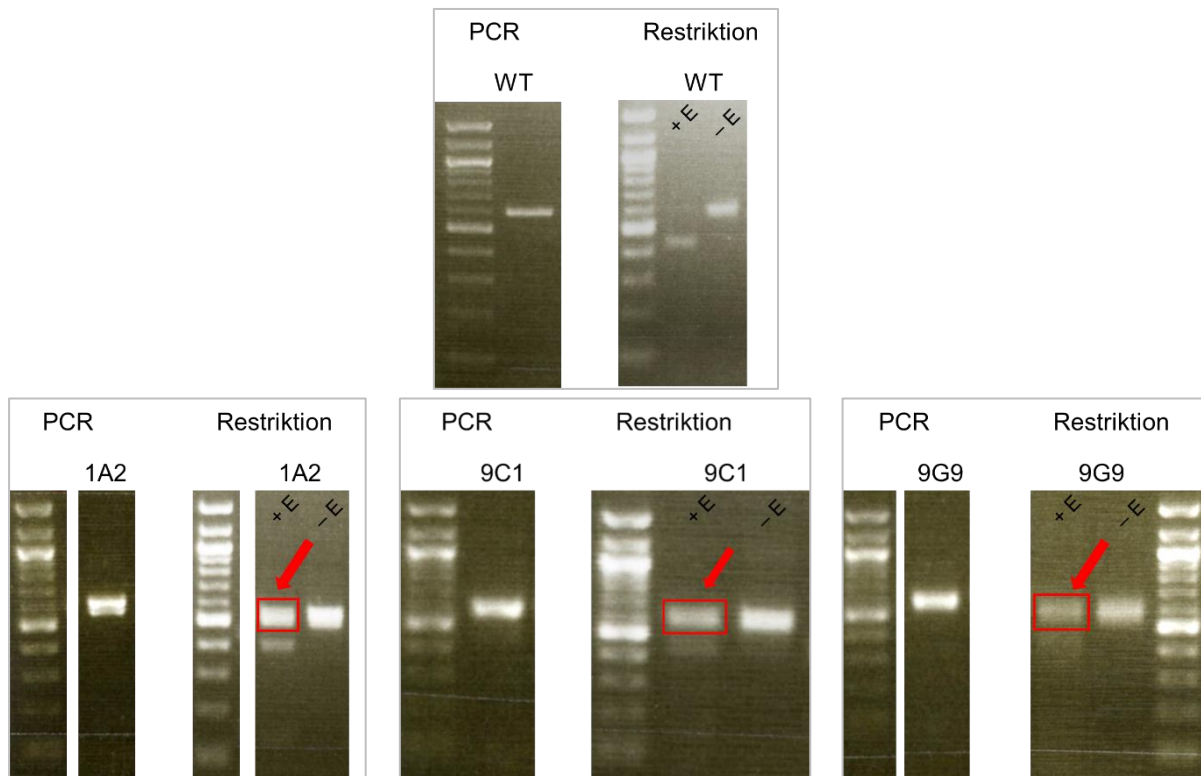


Abbildung 37: **Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 4 Klone 1A2 (KO), 9C1 (KO) und 9G9 (KO).** Zur Beurteilung der Klone wird der Vergleich mit dem Wildtyp herangezogen. Bei Zusatz des Restriktionsenzym ist bei jedem Klon eine ungeschnittene Bande ersichtlich. Es könnte sich demnach um Knockout-Klone handeln.

Im Gegensatz dazu konnten erneut Klone mit einer ungeschnittenen Bande trotz Enzymzugabe im Restriktionsassay entdeckt werden, die folglich als Knockout-Kandidaten weiterhin behandelt wurden (Abbildung 37).

3.2.8 Genotypisierung der Kandidaten mittels Sequenzierung

Die Genotypisierung mittels Sequenzierung wurde auf identische Weise wie auch die der NPR3-Klone vorgenommen und auch die Darstellung entspricht der vorangegangenen Darstellung. Der gelb markierte Bereich zeigt die gRNA, Deletionen sind rot markiert (Abbildung 38 und Abbildung 39).

3.2.8.1 Wildtyp-Kandidaten

2E2 gRNA 2

Query	222	TGCTTCGCCACATCTGTATGA	GATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGG	CTAATTACAGCATCGC	281
Sbjct	1130	TGCTTCGCCACATCTGTATGA	GATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGG	CTAATTACAGCATCGC	1189
Query	212	TGCTTCGCCACATCTGTATGA	GATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGG	CTAATTACAGCATCGC	271
Sbjct	1130	TGCTTCGCCACATCTGTATGA	GATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGG	CTAATTACAGCATCGC	1189

Query	222	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC	281
Sbjct	1130	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC	1189

Query	213	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC	272
Sbjct	1130	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC	1189

1D11 gRNA 2

Query	209	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC	268
Sbjct	1130	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC	1189

1 bp Deletion

Query	195	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCG	254
Sbjct	1130	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAA-GCCCTGGCTAATTACAGCATCG	1188

Query	200	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC	259
Sbjct	1130	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC	1189

Query	222	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACGGCATCGC	281
Sbjct	1130	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC	1189

2H1 gRNA 2

Query	216	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC	275
Sbjct	1130	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC	1189

Query	177	GACAGGACACAGCGATGCTGTAATTAGCCAGGGCTTGCAGCTGCTGGATCTCATAACAGAT	236
Sbjct	1200	GACAGGACACAGCGATGCTGTAATTAGCCAGGGCTTGCAGCTGCTGGATCTCATAACAGAT	1141

Query	223	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC	282
Sbjct	1130	TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC	1189

1F3 gRNA 4

Query	364	CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTA	423
Sbjct	128777553	CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTA	128777494
Query	424	AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	483
Sbjct	128777493	AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	128777434
Query	362	CTTGGGTCTCCACTATTTTAGCTTTTGCCAAAAGGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTA	421
Sbjct	128777553	CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTA	128777494
Query	422	AGCTCGATGGCTCGCCGGCANAAGGACTTCTTCNCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	481
Sbjct	128777493	AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	128777434
Query	361	AAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTAAGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAGGACTTCTT	420
Sbjct	128777521	AAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTAAGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAGGACTTCTT	128777462
Query	361	CCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTAAGCTCGATG	420
Sbjct	128777544	CCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTAAGCTCGATG	128777485
Query	421	GNTCGCCGGCAGAAGGACTTCTTCGNCTCTATAATTTACGACCAGNTGGGAATCCTCCTCA	480
Sbjct	128777484	GCTCGCCGGCAGAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAATCCTCCTCA	128777425
Query	436	CAGGTAAGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGT	495
Sbjct	128777499	CAGGTAAGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGT	128777440

1E8 gRNA 4

Query	134	AACTGGTCGTAAATTATAGAGCGAAGAAGTCCTTCTG CCGGCGAGCCATCGAGCTTACCT	193
Sbjct	128777439	AACTGGTCGTAAATTATAGAGCGAAGAAGTCCTTCTG CCGGCGAGCCATCGAGCTTACCT	128777498
Query	361	CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTA	420
Sbjct	128777553	CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTA	128777494
Query	421	AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	480

Sbjct	128777493	 AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAAGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	128777434
Query	121	CGTAAATTATAGAGCGAAGAAGTCCTTCTG CCGGCGAGCCATCGAGCTTACCTGTGAGTT	180
Sbjct	128777446	 CGTAAATTATAGAGCGAAGAAGTCCTTCTG CCGGCGAGCCATCGAGCTTACCTGTGAGTT	128777505
Query	373	CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGCGAACCGATGTTCAACTCAC AGGTA	432
Sbjct	128777553	 CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCAC AGGTA	128777494
Query	433	AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAAGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	492
Sbjct	128777493	 AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAAGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	128777434
Query	361	GTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCAC AGGTAAGCTC	420
Sbjct	128777548	 GTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCAC AGGTAAGCTC	128777489
Query	421	GATGGCTCGCCGGCAGAAAGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAATCCTC	480
Sbjct	128777488	 GATGGCTCGCCGGCAGAAAGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAATCCTC	128777429

1H9 gRNA 4

Query	361	CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCAC AGGTA	420
Sbjct	128777553	 CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCAC AGGTA	128777494
Query	421	AGCTCGATGGCTCGCCGGCANAAGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	480
Sbjct	128777493	 AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAAGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	128777434
Query	361	CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCAC AGGTA	420
Sbjct	128777553	 CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCAC AGGTA	128777494
Query	421	AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAAGACTTCTTCGCTCTATAATTTACNACCAGTTGGGAA	480
Sbjct	128777493	 AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAAGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	128777434

Abbildung 38: Ergebnisse der Sequenzierung der Wildtyp-Kandidaten von MERTK. Die Sequenzierung aller Klone bestätigt, dass es sich um Wildtyp-Klone handelt.

Die Abbildung 38 listet alle Sequenzierungsergebnisse der Wildtyp-Kandidaten beider gRNAs auf, die aus dem Restriktionsassay hervorgegangen sind. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle Klone bis auf 1D11 der gRNA 2 eine nicht veränderte gRNA-Sequenz aufweisen und somit als Wildtyp weiterhin gewertet werden können. 1D11 zeigt jedoch bei einer der vier Sequenzen eine Deletion einer einzigen Base. Dies könnte ein Hinweis sein, dass es sich bei 1D11 um einen heterozygoten Klon handelt.

3.2.8.2 Knockout-Kandidaten

2G2 gRNA 2

3 bp Deletion	
Query	215 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAG---TGGCTAATTACAGCATCGC 271
Sbjct	1130 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC 1189
2 bp Deletion	
Query	202 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAG--CTGGCTAATTACAGCATCGC 259
Sbjct	1130 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC 1189
9 bp Deletion	
Query	222 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAG---CTGGCTAATTACAGCATCGC 272
Sbjct	1130 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC 1189
2 bp Deletion	
Query	193 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAG--CTGGCTAATTACAGCATCGC 250
Sbjct	1130 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC 1189

1C3 gRNA 2

24 bp Deletion	
Query	211 TGCTTCGCCACATCTGTATG-----CTAATTACAGCATCGC 246
Sbjct	1130 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC 1189
24 bp Deletion	
Query	183 GACAGGACACAGCGATGCTGTAATTAG-----CATACAGAT 218
Sbjct	1200 GACAGGACACAGCGATGCTGTAATTAGCCAGGGCTTGCAGCTGCTGGATCTCATACAGAT 1141

24 bp Deletion

```
Query 183 GACAGGACACAGCGATGCTGTAATTAG-----CATACAGAT 218
          |||
Sbjct 1200 GACAGGACACAGCGATGCTGTAATTAGCCAGGGCTTGCAGCTGCTGGATCTCATAACAGAT 1141
```

77 bp Deletion

```
Query 106 CTCCTTCTGTTGTGCTGGCCAGAATCCAAGGGCTTACTGCAGACCAGCCAATCTCATTCC 165
          |||
Sbjct 1260 CTCCTTCTGTTGTGCTGGCCAGAATCCAAGGGCTTACTGCAGACCAGCCAATCTCATTCC 1201
```

```
Query 166 GACAGGACACAGCGA 180
```

```
          |||
Sbjct 1200 GACAGGACACAGCGA 1186
```

```
-----
Query 179 GAGCCATTACTCAGCCGGTCAGCTTCCTTGACCTGAATG 217
          |||
Sbjct 1108 GAGCCATTACTCAGCCGGTCAGCTTCCTTGACCTGAATG 1070
```

1G5 gRNA 2

1 bp Insertion

```
Query 212 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCG 271
          |||
Sbjct 1130 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAG--CCCTGGCTAATTACAGCATCG 1188
```

1 bp Insertion

```
Query 183 GACAGGACACAGCGATGCTGTAATTAGCCAGGGCTTGCAGCTGCTGGATCTCATAACAGA 242
          |||
Sbjct 1200 GACAGGACACAGCGATGCTGTAATTAGCCAGGG--CTTGCAGCTGCTGGATCTCATAACAGA 1142
```

2 bp Insertion

```
Query 222 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGGCCCTGGCTAATTACAGCATC 281
          |||
Sbjct 1130 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAG--GCCCTGGCTAATTACAGCATC 1187
```

2 bp Deletion

```
Query 221 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCA--CCCTGGCTAATTACAGCATCGC 278
          |||
Sbjct 1130 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC 1189
```

1F5 gRNA 2

96 bp Deletion

Query 162 CATTTCAGGTCAAGGAAGCTGACCGGCTGAGTAATGGCTCAGTCATGGTTTT 212

|||||

Sbjct 1070 CATTTCAGGTCAAGGAAGCTGACCGGCTGAGTAATGGCTCAGTCATGGTTTT 1120

Query 219 GTCTGCAGTAAGCCCTTGGATTCTGGCCAGCACAAACAGAAGGAG 262

|||||

Sbjct 1217 GTCTGCAGTAAGCCCTTGGATTCTGGCCAGCACAAACAGAAGGAG 1260

4 bp Deletion

Query 212 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGC --- CCTGGCTAATTACAGCATCGC 267

|||||

Sbjct 1130 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCAGCTGC GATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC 1189

4 bp Deletion

Query 174 GACAGGACACAGCGATGCTGTAATTAGCCAGGGC --- AGCTGGCTGGATCTCATAACAGAT 229

|||||

Sbjct 1200 GACAGGACACAGCGATGCTGTAATTAGCCAGGGC CCAGGGCTTGCAGCTGCTGGATCTCATAACAGAT 1141

96 bp Deletion

Query 162 CATTTCAGGTCAAGGAAGCTGACCGGCTGAGTAATGGCTCAGTCATGGTTTT 212

|||||

Sbjct 1070 CATTTCAGGTCAAGGAAGCTGACCGGCTGAGTAATGGCTCAGTCATGGTTTT 1120

Query 219 GTCTGCAGTAAGCCCTTGGATTCTGGCCAGCACAAACAGAAGGAG 262

|||||

Sbjct 1217 GTCTGCAGTAAGCCCTTGGATTCTGGCCAGCACAAACAGAAGGAG 1260

1B7 gRNA 2

28 bp Deletion

Query 221 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCA --- GC 252

|||||

Sbjct 1130 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCA GATCCAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATCGC 1189

28 bp Deletion

Query 177 GACAGGACACAGC --- TGCTGGATCTCATAACAGAT 208

|||||

Sbjct 1200 GACAGGACACAGCGATGCTGTAATTAGCCAGGGCTTGCAGCTGCTGGATCTCATAACAGAT 1141

28 bp Deletion

Query 209 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCA-----GC 240
|||||
Sbjct 1130 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCA-----GC 240
|||||

28 bp Deletion

Query 222 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCA-----GC 253
|||||
Sbjct 1130 TGCTTCGCCACATCTGTATGAGATCCAGCA-----GC 253
|||||

1A2 gRNA 4

52 bp deletion

Query 372 CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTC----- 424
|||||
Sbjct 128777553 CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCAGGTA 128777494
AGGTA
Query 425 -----ACGACCAGTTGGGAA 439
|||||
Sbjct 128777493 AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA 128777434

52 bp deletion

Query 367 CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTC----- 419
|||||
Sbjct 128777553 CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCAGGTA 128777494
AGGTA
Query 420 -----ACGACCAGTTGGGAA 434
|||||
Sbjct 128777493 AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA 128777434

52 bp deletion

Query 135 AACTGGCCGT----- 144
|||||
Sbjct 128777439 AACTGGTCGTAAATTATAGAGCGAAGAAGTCCCTCTG CCGGCGAGCCATCGAGCTTACCT 128777498
Query 145 --GAGTTGAACATCGGTTCACTTTTGGCAAAAGTTAAAATAGTGGAGACCCAAGATAAG 202
|||||
Sbjct 128777499 GTGAGTTGAACATCGGTTCACTTTTGGCAAAAGTTAAAATAGTGGAGACCCAAGATAAG 128777558

52 bp deletion

Query 374 CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTC----- 426
|||||

Sbjct	128777553	CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTA	128777494
Query	427	-----ACGACCAGTTGGGAA	441
Sbjct	128777493	AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	128777434
Query	361	GGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTAAGC	420
Sbjct	128777550	GGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTAAGC	128777491
Query	421	TCGATGGCTCGCCGGCAGAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACNACCAGTTGGGAATCC	480
Sbjct	128777490	TCGATGGCTCGCCGGCAGAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAATCC	128777431
Query	361	CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTA	420
Sbjct	128777553	CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTA	128777494
Query	421	AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	480
Sbjct	128777493	AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	128777434

9C1 gRNA 4

44 bp deletion			
Query	370	CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAA-----	419
Sbjct	128777553	CTTGGGTCTCCACTATTTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGGTA	128777494
Query	420	-----CTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	445
Sbjct	128777493	AGCTCGATGGCTCGCCGGCAGAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGGAA	128777434
8 bp deletion			
Query	121	CGAANAAGTCCTTCT-----GCCATCAGCTTACCTGTGAGTTGAACATC	165
Sbjct	128777460	CGAAGAAGTCCTTCTG CCGGCGAGCCATCGAGCTTACCTGTGAGTTGAACATC	128777512
32 bp deletion			
Query	136	AACTGGTCGTAAATTATAGAGCGAA-----CCT	163
Sbjct	128777439	AACTGGTCGTAAATTATAGAGCGAAGAAGTCCTTCTG CCGGCGAGCCATCGAGCTTACCT	128777498
8 bp deletion			
Query	220	AACTGGTCGTAAATTATAGAGCGAAGAAGTCCTTCNGCC-----ATCGAGCNNACCT	271

Sbjct	128777439	AACTGGTCGTAAATTATAGAGCGAAGAAGTCCTTCTG			CGGGCAGCCATCGAGCTTACCT	128777498
32 bp deletion						
Query	131	AACTGGTCGTAAATTATAGAGC	-----	TTACCT		158
Sbjct	128777439	AACTGGTCGTAAATTATAGAGCGAAGAAGTCCTTCTG			CGGGCAGCCATCGAGCTTACCT	128777498
32 bp deletion						
Query	434	CAGG	-----	TTCGCTCTATAATTTACGACCAGT		461
Sbjct	128777499	CAGGTAAGCTCGATGGCTCGCC				128777440

9G9 gRNA 4

52 bp Deletion						
Query	364	CTTGGGTCTCCACTATTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATG	-----			408
Sbjct	128777553	CTTGGGTCTCCACTATTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCAC		AGGTA		128777494
Query	409		-----	TATAATTTACGACCAGTTGGGAA		431
Sbjct	128777493	AGCTCGATGGCTCGCCGG				128777434
7 bp Deletion						
Query	368	ATCTTGGGTCTCCACTATTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCACAGG				427
Sbjct	128777555	ATCTTGGGTCTCCACTATTTAACTTTTGCCAAAAAGTGAACCGATGTTCAACTCAC		AGG		128777496
Query	428	TAAGCTCGATGGCT	-----	AGAAGGACTTCTTCGCTCTATAATTTACGACCAGTTGGG		480
Sbjct	128777495	TAAGCTCGATGGCTCGCCGG				128777436
7 bp Deletion						
Query	121	AATTATAGAGCGAAGAAGTCCTTCT	-----	AGCCATCGAGCTTACCTGTGAGTTGAAC		173
Sbjct	128777450	AATTATAGAGCGAAGAAGTCCTTCTG				128777509
52 bp Deletion						
Query	121	TATA	-----	CATC		128
Sbjct	128777453	TATAGAGCGAAGAAGTCCTTCTG				128777512

Abbildung 39: **Ergebnisse der Sequenzierung der Knockout-Kandidaten von MERTK.** In jeder analysierten Sequenz zeigen sich Deletionen unterschiedlicher Basenpaarlänge.

In der Abbildung 39 werden alle Sequenzierungsergebnisse der acht Knockout-Kandidaten sowohl der gRNA 2 als auch der gRNA 4 aufgelistet. Der Klon 2G2 wurde mit der gRNA 2 generiert und zeigt in dem Sequenzierungsergebnis drei unterschiedliche Deletionsvarianten auf, sodass der Verdacht einer Triploidie in Erwägung gezogen werden muss. Von insgesamt vier Sequenzen zeigen zwei eine Deletion von 2 Basenpaaren auf und jeweils ein Ergebnis zeigt eine Deletion von 9 beziehungsweise 3 Basenpaaren auf. Da sowohl 9 als auch 3 jeweils Vielfache von 3 sind, könnten diese Deletionen möglicherweise keinen vollständigen Knockout des Gens ausgelöst haben. Die Sequenz des Klons 1C3 (gRNA 2) zeigt ein eher ungewöhnliches Deletionsbild. Von vier Sequenzergebnissen weisen drei eine Deletion von 24 Basenpaaren auf und eine Sequenz von sogar 77 Basen. Die Deletion von 24 Basenpaaren beinhaltet den gesamten Bereich der gRNA, der 23 Basenpaare umfasst. In der Sequenzanalyse der letzten Probe ist der deletierte Bereich so groß, dass im Alignment ein Bruch entstanden ist und es somit zu keiner Darstellung der gRNA gekommen ist. Anhand der Basenpaar Nummerierung kann jedoch gezeigt werden, dass es zu einem Verlust desjenigen Bereiches gekommen ist, der die gRNA enthält. Die gRNA befindet sich von Basenpaar Nummer 1151 bis 1173. In der beschriebenen Sequenzanalyse fehlt der Bereich zwischen Basenpaar Nummer 1186 und 1108, in dem somit auch der Bereich der gRNA liegt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass durch die CRISPR/Cas9 Methode ein 77 Basenpaar großer Anteil der DNA im Bereich der gRNA deletiert worden ist. Die Sequenzierung des nächsten Klons (1G5, gRNA2) zeigt zwei unterschiedliche Deletionen von zweimal einer und zweimal zwei Basenpaaren im Bereich der PAM-Sequenz, die somit der Theorie zufolge zu einem Knockout des Proteins führen müssten. Auch der Klon 1F5 (gRNA 2) liefert das Ergebnis eines vielversprechenden Knockout-Kandidaten. Zweifach konnte eine Deletion von 4 Basenpaaren und zweifach eine Deletion von 96 Basenpaaren gezeigt werden. Dabei kann im Falle der 96-bp-Deletion eine ähnliche Erklärung herangezogen werden wie für den Klon 1C3. In diesem Falle fehlt der Bereich von Basenpaar 1120 bis 1217, der ebenfalls die gRNA enthält. Auch wenn eine Deletion von 96 Basenpaaren ein Vielfaches von 3 ist, könnte auch hier das Argument, dass diese Deletion einen sehr großen Anteil umfasst, Gültigkeit erfahren. Der Klon 1B7 (gRNA 2) zeigt in allen vier Sequenzierungsergebnissen eine Deletion von 28 Basenpaaren, was diesen Klon auch weiterhin als Knockout-Kandidaten wahrscheinlich macht. Ein wenig anderes Bild zeigt der 1A2 Klon der gRNA 4. Es wurden insgesamt sechs Proben zur Sequenzierung eingesendet, von denen vier eine ebenfalls große Deletion von 52 Basenpaaren aufweisen. Zusätzlich liegen aber auch zwei Sequenzierungsergebnisse vor, die eine Wildtyp-DNA aufweisen. Anhand dieser Ergebnisse kann von dem Vorliegen eines heterozygoten Klons ausgegangen werden. Ähnlich wie der Klon 2G2 der gRNA 2 zeigt auch der Klon 9C1 der gRNA 4 ein auffälliges Sequenzierungsergebnis. Von fünf Sequenzierungsergebnissen liegen eine Deletion von 44 Basenpaaren, sowie zwei Deletionen von 32 und zwei Deletion

von 8 Basenpaaren vor. Aus diesem Grund wurde dieser Klon aus den weiteren Experimenten ausgeschlossen. Der letzte Knockout-Kandidat 9G9 der gRNA 4 zeigt wieder ein Bild eines potenziellen Knockouts. Es liegen zwei Deletionen von 7 Basenpaaren vor und zwei Mal eine große Deletion von 52 Basenpaaren.

3.2.9 Validierung der Klone auf Proteinebene: Western Blot

Die nächste Methode der Wahl wäre der Western Blot mit denjenigen Klonen, die sowohl im Restriktionsassay als auch in der Sequenzierung das eindeutige Bild eines Knockouts bzw. Wildtyps präsentiert haben. Auf diese Weise würde der Knockout auf Ebene der Proteinbiosynthese bewiesen werden. Jedoch konnte im Falle von MERTK auch nach Austestung diverser Antikörper keine eindeutige und aussagekräftige Bande im Western Blot detektiert werden, sodass auf eine alternative Methode ausgewichen werden musste.

3.2.10 Quantitative PCR

Da der Nachweis auf Proteinebene nicht realisierbar war, wurde alternativ mRNA mithilfe der qPCR nachgewiesen. Dies ermöglicht ebenfalls eine Aussage über die Expression des Proteins zu treffen.

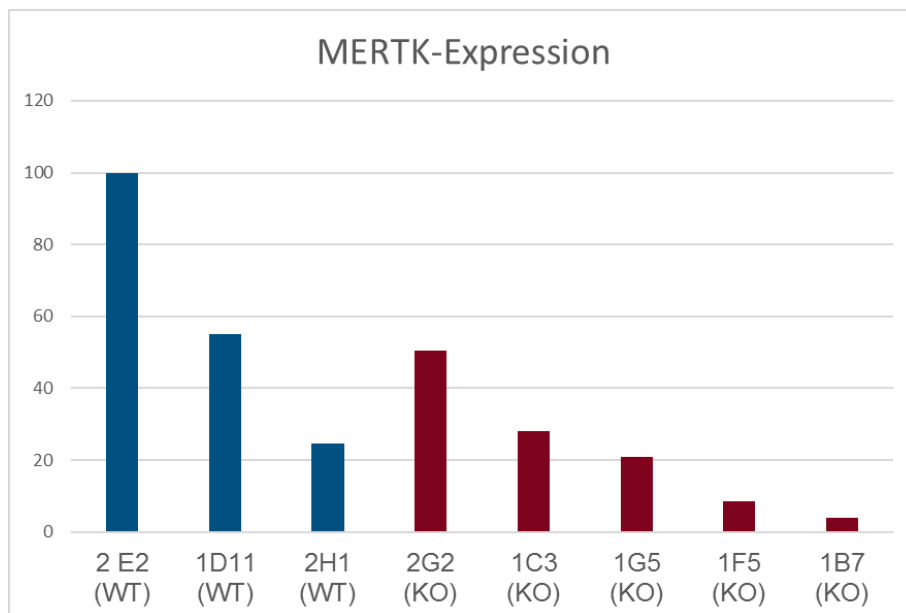


Abbildung 40: **qPCR-Ergebnis der MERTK-Expression.** Die ersten drei Expressionsdaten können den drei Wildtyp-Klonen der gRNA 2 zugeordnet werden und die letzten fünf Ergebnisse zeigen die Knockout-Kandidaten der gRNA 2.

Diese Darstellung zeigt die Expression von MERTK, die anhand der qPCR ermittelt worden ist. Die dargestellten Klone entstammen allesamt der Transfektion mit gRNA 2. Es ist zu entnehmen, dass es sich bei 2E2 eindeutig um einen Wildtyp handelt: sowohl Restriktion als auch Sequenzierung und nun auch die qPCR zeigen dies stringent. 1D11 ist anhand des Restriktionsassays als Wildtyp-Klon ausgewählt worden, zeigte in der Sequenzierung in einer von vier Ergebnissen jedoch eine

Deletion von einem Basenpaar, sodass hier von einem heterozygoten Klon ausgegangen werden kann. Das Ergebnis der qPCR korreliert mit dieser Erkenntnis, da dort eine nur 50%ige Expression detektiert worden ist. Für den Klon 2H1 kann das qPCR-Ergebnis jedoch nicht so einleuchtend erklärt werden. In allen drei vorliegenden Sequenzierungsergebnissen zeigt dieser eine intakte gRNA-Sequenz, wodurch die auf ein Viertel herabgesetzte MERTK-Expression in der qPCR nicht erklärt werden kann. 2G2 ist ein Knockout-Kandidat, zeigte jedoch in der Sequenzierung drei unterschiedliche Deletionen von 9, 3 und 2 Basenpaaren. Auch die qPCR zeigt lediglich eine 50%ige Reduktion der MERTK-Expression und somit sollte dieser Klon von weiteren Experimenten ausgeschlossen werden. In der Sequenz von 1C3 lagen zwei Deletionen von 24 und 72 Basenpaaren vor. Die MERTK-Expression liegt bei ca. 28%, was auf einen Knockout hinweist, jedoch nicht vollkommen überzeugend wirkt. Eine Erklärung könnte das Vorliegen einer hypomorphen Variante sein. Wahrscheinlich hat die Deletion von 24 Basenpaaren lediglich zu einer Deletion einiger Aminosäuren geführt, jedoch nicht die gesamte nachfolgende Aminosäuresequenz beeinflusst. Somit ist ein Teil der Funktion erhalten geblieben. Auch 1G5 zeigt in der qPCR kein eindeutiges Ergebnis mit ungefähr einer 20%igen Expression von MERTK. Sowohl im Restriktionsassay als auch in der Sequenzierung stellt sich dieser Klon jedoch als Knockout dar. In der Sequenzierung zeigen sich Deletionen von 1 und 2 Basenpaaren, was jeweils zu einer Leserasterverschiebung führen würde und demnach das qPCR-Ergebnis nicht überzeugend erklärt. Der Klon 1F5 wies in der Sequenzanalyse eine kleine Deletion von 4 und eine sehr große Deletion von 96 Basenpaaren auf. Obwohl 96 ein Vielfaches des Basenpaartriplets ist, konnte die Vermutung, dass es aufgrund der Größe der Deletion zu keiner Bildung des Proteins kommen wird, durch eine Expression von unter 10% in der qPCR bestätigt werden. Eine ähnliche Aussage lässt sich für den Klon 1B7 treffen. Im Sequenzierungsergebnis zeigte sich eine 28 Basenpaar-Deletion in allen vier Sequenzanalysen und auch die qPCR zeigt eine ganz klare Reduktion auf nur noch 4%. Somit kann ebenfalls 1B7 als Knockout angesehen werden.

3.2.11 Zusammenfassendes Ergebnis

Wildtyp		Knockout		Hypomorphe Klone	
2E2	gRNA 2	1B7	gRNA 2	1C3	gRNA 2
		1F5	gRNA 2	1G5	gRNA 2

Tabelle 43: Zusammenfassende Liste der identifizierten Wildtyp-, Knockout- und hypomorphen Klone.

Durch die vorliegenden Ergebnisse der durchgeführten Experimente konnte ein sicherer Wildtyp-Kandidat der gRNA 2 und zwei sichere Knockout-Kandidaten der gRNA 2 identifiziert werden. Die beiden hypomorphen Klone werden von der weiteren Analyse und Verwendung ausgeschlossen.

3.3 ITM2B

3.3.1 Design der gRNAs

Für den Knockout des ITM2B-Gens wurden insgesamt drei gRNAs erstellt, die sich auf unterschiedlichen Exonen befinden. gRNA 1 ist im Exon 1 lokalisiert, gRNA 2 im Exon 4 und gRNA 3 befindet sich auf Exon 2. Bei den zwei zuerst genannten gRNAs handelt es sich um eine Besonderheit, denn diese wurden generiert, um eine doppelte Transfektion durchzuführen. Dies bedeutet, dass die Podozyten gleichzeitig mit beiden gRNAs transfiziert werden und diese jeweils in ihrem Zielexon für einen Doppelstrangbruch der DNA sorgen. Da dies nun simultan an zwei verschiedenen Orten geschieht, wird es zu einem Zusammenfügen der DNA-Enden kommen, jedoch ohne den herausgeschnittenen Anteil. Dies führt zu einer sehr großen Deletion über mehrere Exons hinweg. In diesem Fall wird das erste Exon an die Schnittstelle im Exon Nummer 4 angefügt.

<u>gRNA 1:</u>	ACGTCACCTTCACCATGGCG <u>C</u> GG
<u>gRNA 2:</u>	TATGCCACCCAGAAACCTACT <u>G</u> G
<u>gRNA 3:</u>	GGACTAGCATTATGCTTGC <u>A</u> GG

Tabelle 44: Liste der verwendeten gRNAs.

3.3.2 Klonierung der gRNAs in den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector und Transformation von DH5 Competent Cells

Die Klonierung und Transformation erfolgten auf identischem Wege, wie die bereits beschriebenen. Im Folgenden sieht man jeweils eine einwandfrei eingefügte gRNA in den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector.

gRNA 1

gAaGGAcGAAacaCCGACGTCACCTTCACCATGGCGGTTTTAGAGCTAGAAATAG

gRNA 2

gAanGGAcGAAanaCCGTATGCCACCCAGAAACCTACGTTTTAGAGCTAGAAATAA

gRNA 3

GGAAAGGACGAAACACCGGGACTAGCATTATGCTTGC

3.3.3 Transfektion humaner Podozyten

Für die Transfektion wurden wie für NPR3 humane Podozyten verwendet, sodass das identische Protokoll nach dessen Etablierung verwendet werden konnte: Amaxa Elektroporation, Programm T013 (Vgl.: Kapitel 2.8.2). Um eine aussagekräftigere

Stellungnahme über das Ergebnis des ersten Restriktionsassays zur Kontrolle der Funktionstüchtigkeit der gRNAs vornehmen zu können, wurden auch in diesem Falle transfizierte Zellen in einem Eppendorf Tube gesammelt und aus diesen die DNA gewonnen.

3.3.4 Auswahl funktionstüchtiger gRNAs mittels Restriktionsassay

Aufgrund der bereits beschriebenen Besonderheit bezüglich der ersten beiden gRNAs, kann in diesem Abschnitt lediglich das Ergebnis für die gRNA 3 gezeigt werden. Da gRNA 1 und 2 gemeinsam für eine sehr große Deletion von mehreren Exons sorgen, kann die Methode des Restriktionsassays als Qualitätskontrolle nicht verwendet werden, da der in einer PCR zu amplifizierende DNA-Anteil zu viele Basenpaare umfasst.

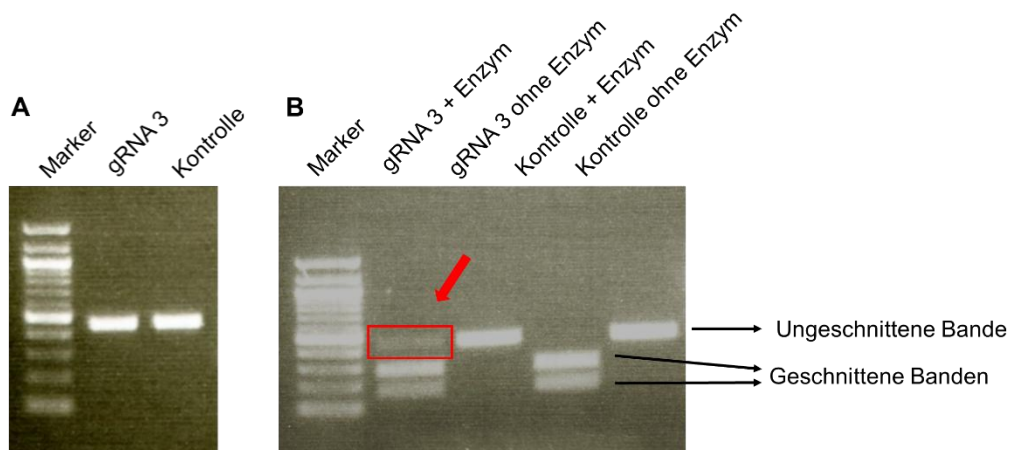


Abbildung 41: **PCR und Restriktionsverdau der gRNA 3 (ITM2B).** (A) Das PCR-Ergebnis zeigt für die Proben- und Kontroll-DNA jeweils eine eindeutige Bande. (B) In rot markiert sieht man eine ungeschnittene Bande in der Kondition mit Enzym. Dies weist darauf hin, dass diese gRNA funktionstüchtig ist.

Der Restriktionsassay der gRNA3 wurde auf identische Weise durchgeführt, wie auch bei den vorangegangenen Proteinen beschrieben. Markiert durch den Pfeil, ist eine ungeschnittene Bande in dem Ansatz mit Enzym ersichtlich, wodurch die Funktionstüchtigkeit bewiesen werden konnte (Abbildung 41).

3.3.5 FACS-Sorting transfizierter Zellen

Bei der Transfektion mit der gRNA 3 konnte eine Effizienz von 44,7% erreicht werden und die Zellen wurden im anschließenden FACS-Sorting in fünf 96-well-Platten vereinzelt.

3.3.6 Mikroskopisches Screeningverfahren

Die Überlebensrate dieses Durchganges ist im Vergleich zu allen bereits beschriebenen sehr gering mit 45 überlebenden Klone von insgesamt 480 ausgesäten Klonen. Dies entspricht einer Überlebensrate von nur ungefähr 9%, die auf einen defekten Inkubator zurückzuführen ist.

3.3.7 Genotypisierung der Klone mittels Restriktionsassay

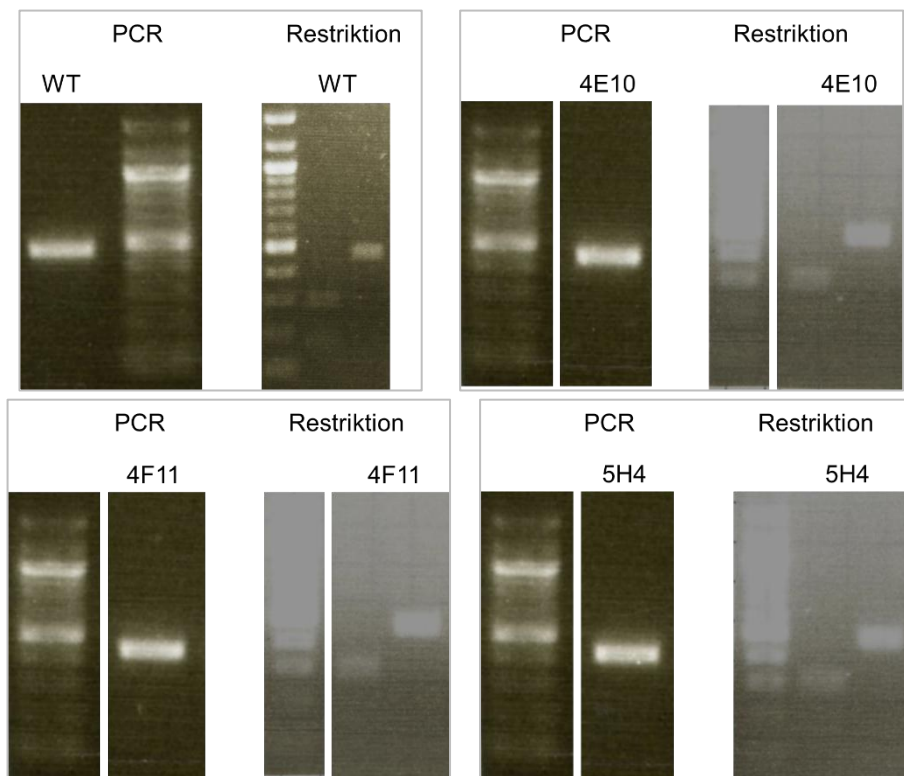


Abbildung 42: **Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 3 Klone 4E10 (WT), 4F11 (WT) und 5H4 (WT).** Zur Beurteilung der Klone wird der Vergleich mit dem Wildtyp herangezogen. Im Restriktionsverdau zeigt sich die geschnittene Bande jeweils sehr prominent und eine ungeschnittene Bande ist nicht zu erkennen. Es lässt das Vorliegen von Wildtyp-Klonen vermuten.

Die Genotypisierung der Klone stellte uns ebenfalls vor Herausforderungen. Aufgrund der Durchführung von Doppeltransfektionen mit zwei gRNAs und der daraus resultierenden großen Deletion im Genom, war es uns nicht möglich, diesen Bereich mittels PCR zu amplifizieren. Aus diesem Grund ist es nur möglich, die Wildtyp-Ergebnisse zu zeigen. Die Klone 4E10, 4F11 sowie 5H4 zeigen alle die typische Wildtyp-Bandenverteilung und konnten somit als Wildtyp-Kandidaten ausgewählt werden (Abbildung 42).

3.3.8 Genotypisierung der Kandidaten mittels Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde methodisch entsprechend der vorherigen Beschreibungen durchgeführt, konnte jedoch ebenfalls nur für die Wildtyp-Kandidaten ein Ergebnis liefern. Es kann gezeigt werden, dass alle ausgewählten Wildtyp-Kandidaten eine mutationsfreie gRNA besitzen.

3.3.8.1 Wildtyp-Kandidaten

4E10 gRNA 3

Query	127	TTGAAGTGCAAAATATTTGTACAAGTATGCTCCTCCTAGAATAACACCTGCAAGCATAAA	186
Sbjct	469	TTGAAGTGCAAAATATTTGTACAAGTATGCTCCTCCTAGAATAACACCTGCAAGCATAAA	410
Query	187	TGCTAGTCCAAAGCACATGCACCAACACCAGGCTCTTCTTTGGCCAACTGGTACCACATC	246
Sbjct	409	TGCTAGTCCAAAGCACATGCACCAACACCAGGCTCTTCTTTGGCCAACTGGTACCACATC	350
Query	111	TTGAAGTGCAAAATATTTGTACAAGTATGCTCCTCCTAGAATAACACCTGCAAGCATAAA	170
Sbjct	469	TTGAAGTGCAAAATATTTGTACAAGTATGCTCCTCCTAGAATAACACCTGCAAGCATAAA	410
Query	171	TGCTAGTCCAAAGCACATGCACCAACACCAGGCTCTTCTTTGGCCAACTGGTACCACATC	230
Sbjct	409	TGCTAGTCCAAAGCACATGCACCAACACCAGGCTCTTCTTTGGCCAACTGGTACCACATC	350
Query	133	TTGAAGTGCAAAATATTTGTACAAGTATGCTCCTCCTAGAATAACACCTGCAAGCATAAA	192
Sbjct	469	TTGAAGTGCAAAATATTTGTACAAGTATGCTCCTCCTAGAATAACACCTGCAAGCATAAA	410
Query	193	TGCTAGTCCAAAGCACATGCACCAACACCAGGCTCTTCTTTGGCCAACTGGTACCACATC	252
Sbjct	409	TGCTAGTCCAAAGCACATGCACCAACACCAGGCTCTTCTTTGGCCAACTGGTACCACATC	350
Query	123	TTGAAGTGCAAAATATTTGTACAAGTATGCTCCTCCTAGAATAACACCTGCAAGCATAAA	182
Sbjct	469	TTGAAGTGCAAAATATTTGTACAAGTATGCTCCTCCTAGAATAACACCTGCAAGCATAAA	410
Query	183	TGCTAGTCCAAAGCACATGCACCAACACCAGGCTCTTCTTTGGCCAACTGGTACCACATC	242
Sbjct	409	TGCTAGTCCAAAGCACATGCACCAACACCAGGCTCTTCTTTGGCCAACTGGTACCACATC	350

4F11 gRNA 3

Query	131	TTGAAGTGCAAAATATTTGTACAAGTATGCTCCTCCTAGAATAACACCTGCAAGCATAAA	190
Sbjct	469	TTGAAGTGCAAAATATTTGTACAAGTATGCTCCTCCTAGAATAACACCTGCAAGCATAAA	410
Query	191	TGCTAGTCCAAAGCACATGCACCAACACCAGGCTCTTCTTTGGCCAACTGGTACCACATC	250
Sbjct	409	TGCTAGTCCAAAGCACATGCACCAACACCAGGCTCTTCTTTGGCCAACTGGTACCACATC	350
Query	126	TTGAAGTGCAAAATATTTGTACAAGTATGCTCCTCCTAGAATAACACCTGCAAGCATAAA	185
Sbjct	469	TTGAAGTGCAAAATATTTGTACAAGTATGCTCCTCCTAGAATAACACCTGCAAGCATAAA	410

weshalb ein vollständiger Knockout bewiesen werden konnte. Im Gegenzug dazu zeigen die Wildtyp-Kandidaten alle drei die zu erwartende Doppelbande in der Färbung mit dem ITM2B-Antikörper. Aufgrund des so eindeutigen Western Blot Ergebnisses wurde das Fehlen der Restriktions- und Sequenzierungsergebnisse der Knockout-Kandidaten toleriert.

3.3.10 Zusammenfassendes Ergebnis

Die in der nachstehenden Tabelle aufgelisteten Klone gelten als die nachgewiesenen Wildtyp- und Knockout-Klone, die für weitere Experimente und Vorhaben genutzt werden können. Ihr Wildtyp- oder Knockout-Phänotyp wurde auf der Ebene der Proteinexpression bewiesen. Im Falle der Wildtyp-Klone wurde das intakte Genom auch auf genetischer Ebene überzeugend gezeigt.

Wildtyp		Knockout	
<i>4E10</i>	gRNA 3	<i>B11</i>	gRNA 1+2
<i>4F11</i>	gRNA 3	<i>C4</i>	gRNA 1+2
<i>5H4</i>	gRNA 3	<i>F12</i>	gRNA 1+2

Tabelle 45: Zusammenfassende Liste der identifizierten Wildtyp- und Knockout-Klone.

4. Diskussion

4.1 Einleitung

Nephrin, Podocin und Nephrin sind als Schlüsselproteine im Aufbau der interpodozytären Schlitzmembran seit zwei Jahrzehnten bekannt (29,32,33). Weitere Erkenntnis über den molekularen Aufbau dieses besonderen Zell-Zell-Kontaktes konnte durch die Analyse des Nephrin-, Nephrin- und Podocin-Interaktoms erlangt werden, welches interessante Kandidaten hervorbrachte. Um die Funktion eines Proteins zu identifizieren, können Beobachtungen des Effektes eines Knockouts des jeweiligen Proteins herangezogen werden. Zunächst in der Zellkultur und anschließend im Mausmodell sollen die Gene der vielversprechenden Schlitzmembraninteraktoren NPR3, MERTK und ITM2B ausgeknockt werden. Für dieses Vorhaben wurde die Genome Editing Methode CRISPR/Cas9 verwendet. Dabei verursacht eine Nuklease spezifische Doppelstrangbrüche im Genom und generiert auf diese Weise durch die Entstehung von Indel-Mutationen für jedes Gen erfolgreich Knockout- und Wildtyp-Klone.

4.2 Alternative genome editing Strategien

Neben der heute gefragtesten Methode des CRISPR/ Cas9 Genome Editing gibt es auch andere Möglichkeiten, die jedoch auf ähnlichen Mechanismen beruhen. Zunächst ist zu erwähnen, dass alle Technologien des genome editings, die Doppelstrangbrüche verursachen, darauf beruhen, dass die Zelle endogene Mechanismen der Reparatur besitzt und diese Mechanismen zu den Knockout-induzierenden Mutationen führen (131). Generell beinhalten die nachfolgend beschriebenen Methoden Nukleasen, die zusammen mit spezifisch hergestellten DNA-Bindungsdomänen gezielt diese Doppelstrangbrüche verursachen (132). Momentan gibt es vier Gruppen von Technologien, aufgelistet in der Reihenfolge ihrer Entdeckung: Zink-Finger Nukleasen, Transcription activator-like effector (TALE-) Nukleasen (TALENs), Meganukleasen und das CRISPR/Cas System (131).

4.2.1 Zink-Finger Nukleasen (ZFN)

Diese stellen den Beginn der Technologie dar (133). Sie bestehen aus der Schneide-Domäne der Restriktionsendonuklease FokI, die DNA-Bindung wird von der Zink-Finger-Domäne übernommen, welche im menschlichen Genom als Transkriptionsfaktor codiert ist. Die Erkennung der DNA-Sequenz erfolgt über nur drei Basen pro Zink-Finger-Domäne (131). Aus diesem Grund werden meist mehrere Domänen für eine spezifischere und effektivere Erkennung verwendet (132,133). Prinzipiell kann jedes Gen in jedem Organismus auf diese Weise verändert werden (133). Durch die Verwendung bereits existierender Zink-Finger-Domänen wird die Generierung ein wenig vereinfacht, die ansonsten sehr arbeits- und kostenintensiv wäre (132–134). Problematisch bei dieser Methode ist die Gefahr von off-target Mutationen (133).

4.2.2 TALENs

TALENs steht für Transcription activator-like effector (TALE-) Nukleasen, die ebenfalls aus der FokI-Nuklease und einem DNA-bindenden Anteil bestehen, der aus dem Pflanzenpathogen *Xanthomonas campestris* stammt und spezifisch designiert werden kann (132,133). Dabei wird durch die DNA-Erkennungsdomäne nur eine einzelne Base erkannt, deren Erkennung durch zwei hochspezifische hypervariable

Regionen bestimmt wird (131,133). Diese Weiterentwicklung des Genome editings ist spezifischer als ZFN und gleichzeitig weniger toxisch (133).

4.2.3 Meganukleasen

Zu der dritten Gruppe zählen die Meganukleasen, die natürlich vorkommende Homing Endonukleasen wie *I-CreI* und *I-SceI* verwenden (131). DNA-Doppelstrangbrüche werden an spezifischen Erkennungssequenzen von 14-40 bp induziert (133). Vorteil dieser Technologie sind die langen Erkennungssequenzen und die damit erhöhte Spezifität und die gleichzeitig geringe Größe des gesamten Tools, was mit einem vereinfachten Transfer in die Zelle einhergeht (133). Hinzu kommt, dass beim Doppelstrangbruch ein 3' Überhang generiert wird, der die potentielle Toxizität reduziert (133). Problematisch ist jedoch, dass sich die Nuklease- und Bindungsdomäne nur schwer separieren lassen und somit eine einfache Erstellung dieses Werkzeuges nicht möglich ist (131). Insgesamt ist auch diese Methode zeitaufwendig und teuer (133).

4.2.4 CRISPR/Cas9

Dieser zuletzt entwickelten Methode können viele positive Aspekte zugesprochen werden. Ein äußerst wichtiger Aspekt ist die Einfachheit der Generierung der einsetzbaren Cas-Nuklease. Einzig die Veränderung bzw. die Auswahl einer geeigneten gRNA ist notwendig, um Zielgene zu manipulieren (133). Von besonderer Relevanz ist die Toxizität der Methode. Auch wenn das Risiko von off-targets höher ist als bei TALENs, so können mögliche Lokalisationen von off-targets vergleichsweise gut vorherbestimmt werden (133). Der Grund hierfür liegt im Prinzip der Sequenzerkennung der gRNA. Anders als einige der genannten Alternativen wird die Identifizierung der Zielsequenz nicht über Erkennung durch Proteininformationen sondern über die Gesetze der Watson-Crick Basenpaarung ermöglicht (133). Wie bereits in vorherigen Abschnitten erwähnt gibt es Bestrebungen, die Rate von off-targets durch Nukleasen, die nur Einzelstränge brechen, zu reduzieren (133). Anhand der langen Liste, wo das CRISPR/Cas9 System bereits seine Verwendung gefunden hat, lässt sich die Effektivität der Methode besonders gut veranschaulichen. Bei zusammenhängender Betrachtung aller genannten Aspekte und der Zielsetzung dieser Arbeit, so kann der ausgewählte Prozess als sinnvoll angesehen werden.

4.3 Diskussion des Knockoutgenerierungsprozesses für NPR3

Als einer der natriuretischen Peptidrezeptoren wird NPR3 die Funktion eines Scavenger Rezeptors für atriale natriuretische Peptide zugeschrieben (55). Jedoch bleibt bislang unklar, ob auch dies die entscheidende Funktion an der Schlitzmembran ist. Es lässt sich jedoch vermuten, dass NPR3 aufgrund seiner starken Expression eine relevante Rolle zukommt. Zudem ist davon auszugehen, dass die bekannten potenziellen Liganden ANP, BNP und CNP aufgrund ihrer geringen Größe ungehindert die glomeruläre Filtrationsbarriere passieren können. Aus den genannten Gründen und der bisherigen Unwissenheit wächst das Interesse an der nephrologischen Rolle von NPR3.

Im Prozess der Knockoutgenerierung besonders herausfordernd stellte sich die Transfektion dar. Der erste Versuch wurde mit Lipofectamine3000 durchgeführt (vgl. Abbildung 10), ein Transfektionsreagenz, welches für schwierig transfizierbare Zellen empfohlen wird. Liu et al. publizierten 2017 ein experimentelles Setting, bei dem Podozyten mit Plasmid-DNA erfolgreich mit Lipofectamine3000 transfiziert worden

waren (135). Auch in anderen Review-Artikeln wird immer wieder auf Lipofectamine3000 verwiesen oder sogar als Transfektionsreagenz titulierte, welches die höchste Transfektionseffizienz und geringsten Optimierungsschritte benötigt (133,136). Angelehnt an diese Empfehlungen wurde auch in dieser Arbeit diese Methode verwendet, jedoch auch nach Veränderung der Konzentration, der Expositionsdauer und der Zellzahl als nicht erfolgreich verworfen. Auch die Verwendung anderer Transfektionsreagenzien führte nicht zum Ziel. Als zweiter Ansatz wurde die Transfektion mittels Elektroporation ausgewählt und dabei das NEON-System verwendet. Auch hier waren die Ergebnisse nicht zufriedenstellend (vgl. Abbildung 11). Schließlich führte die zweite verwendete Elektroporationstechnik von Amaxa zu den gewünschten Ergebnissen (vgl. Abbildung 12). Scheinbar waren die Konditionen der NEON-Transfektion für die humanen Podozyten zu hart, da viele tote Zellen aus der Elektroporation hervorgingen. Auch in der Publikation von Yasuda-Yamahara et al. von 2018 wurde die Transfektion humaner Podozyten im Rahmen der Anwendung von CRISPR/Cas9 mit der Elektroporation von Amaxa durchgeführt (137).

Bei der Auswahl der funktionierenden gRNAs wurden von vier designten schließlich zwei gRNAs ausgewählt. Auch in dem von Shumer et al. publiziertem Artikel wurde darauf hingewiesen, dass 3-5 gRNAs pro Zielgen aufgrund von variabler Effizienz designt wurden (136). Bei unserem angewandten Screeningverfahren sollte der Theorie zufolge die ungeschnittene Bande im Ansatz mit Enzym umso stärker sein, desto höher die Effizienz der gRNA ist. Bei der Testung der gRNA 4 erschien die ungeschnittene Bande deutlich prominenter als die der ebenfalls später verwendeten gRNA 3. Dies deckt sich mit den Beobachtungen aus der Analyse der Klone. Wichtig bei der Beurteilung ist zudem, die Stärke der ungeschnittenen Bande ins Verhältnis mit der Gesamtheit amplifizierter DNA zu setzen. Es ist deshalb verwunderlich, dass das beobachtete Bild aus den gescreenten Klonen nicht die Erwartungen aus dem Enzymverdau widerspiegelt. Insgesamt liegen die Effizienzen weit unter den zu erwartenden Wirksamkeiten. Die Effizienz der Transfektion, hingegen aus den FACS-Analysen zu entnehmen, bot ein sehr zufriedenstellendes Ergebnis mit über 30% transfizierten Zellen bei beiden gRNAs. Für das anschließende Screeningverfahren wurde methodisch eine Analyse mittels PCR und anschließendem Restriktionsassay verwendet. Da es sich um eine zweistufige Methode mit diversen Zwischenschritten handelt, war dieses Verfahren sehr zeitaufwändig. Wünschenswert wäre ein reines PCR-Screening gewesen, wie es in anderen Publikationen empfohlen wird (138). So wurden in der Publikation von Hofherr et al. mithilfe unterschiedlicher Primer eine Differenzierung zwischen Knockout- und Wildtyp-Kandidaten beschrieben. Zusätzlich problematisch in unserem Projekt war das Einfrieren von 96-well-Platten bei -80°C. Der ursprünglichen Planung zufolge sollte nach der ersten Teilung der Zellen die eine Hälfte für eine DNA-Isolation und das erste Screeningverfahren verwendet werden und die zweite Hälfte zur Konservierung eingefroren werden. Da dies nicht realisierbar war, mussten die Klone von 96-well-Platten bis auf 6-Well-Platten expandiert werden. Dies war sehr arbeits- und zeitintensiv. In der Publikation von Hofherr et al. wird dies bestätigt und von einem ineffektiven Handling gesprochen, übersteige die Anzahl der Klone 600 (138). Für die Knockoutgenerierung von NPR3 lagen genau 810 Klone vor, bei zusätzlicher Addition der Klone von MERTK und ITM2B wird die Marke von 600 Klonen bei Weitem überschritten. Im Falle der gRNA 3 wurden von zwei verschiedenen Platten insgesamt 56 Klone mittels Restriktionsassay gescreent. Von diesen wurde ein möglicher Knockout-Kandidat gefunden, was einer Effizienz von 1,8% entspricht. Die in dem gRNA Design Tool ChopChop versprochene Effizienz entsprach 54%. Auch wenn die Zahl n der

gescreenten Klone zu gering sein könnte, erklärt dies nicht die so niedrige Effizienz. In der Literatur sind ebenfalls unterschiedliche Angaben zu finden. Es wird von durchschnittlichen Mutationsraten von ca. 20% oder auch von 5% gesprochen (133,138). Dabei beziehe sich die 5% jedoch nur auf heterozygote Mutationen, während hingegen homozygote Mutation nur bei einer von 400 Zellen auftritt (138). Schauen wir uns gRNA 4 genauer an, so wurden von zwei verschiedenen Platten insgesamt 48 verschiedene Klone mittels Restriktion gescreent, von diesen wurden zwei mögliche Knockout-Kandidat identifiziert. Dies entspricht einer Effizienz von 4,2%, wobei die vorausgesagte Effizienz bei 49% lag. Zum einen lässt sich hieraus schlussfolgern, dass Epithelzellen eine äußerst schwer zu transfizierende Zellart sind. Zusätzlich könnte dies auch darauf hindeuten, dass das Screeningverfahren eine zu geringe Sensitivität aufwies und damit ebenfalls mutierte Klone unentdeckt ließ.

Die Interpretation der vorliegenden Mutationen ist nicht in jedem Fall trivial. Verschiedene Fragestellungen müssen dazu beantwortet werden und die Strategie der Knockoutgenerierung beachtet werden. Genome Editing ist ein Sammelbegriff für bewusst eingesetzte Veränderungen im Erbgut. Es können Nukleasen verwendet werden, die an spezifischen Stellen im Genom beide DNA-Stränge zerschneiden. Alle Technologien, bei denen Doppelstrangbrüche verursacht werden, beruhen auf den endogenen Reparaturmechanismen der Zelle, die für die mutagene Komponente verantwortlich sind. Somit können sie prinzipiell in allen Organismen verwendet werden, die diese Reparaturmechanismen aufweisen, so auch in humanen oder murinen Podozyten (131). Die Antwort der Zelle auf den Doppelstrangbruch (DSB) umfasst zwei Möglichkeiten: non-homologous end joining (NHEJ) und homology-dependent repair (HDR) (132). In der Molekularbiologie liegt der HDR Mechanismus den Knock-In Modellen zugrunde (132). Im Falle der hier vorgestellten Arbeit haben die Zellen die Schäden mit NHEJ behoben (134). Bei diesem fehleranfälligen Prozess kommt es gehäuft zu Deletionen oder Insertionen einzelner Basen (136). Umfassen diese Indels (Insertionen oder Deletionen) ein Vielfaches des Basenpaar-Triplets, so wird es zu einem Fehlen einzelner oder mehrerer Aminosäuren kommen. Dies bedingt aber nicht notwendigerweise eine Degradation des Proteins. Andererseits kann es auch zu einer Verschiebung des Leserasters kommen. Dies kann ein verfrühtes Stopcodon generieren und zu einem Abbau der mRNA führen, was mit einer fehlenden Expression des Genproduktes einhergeht. Der zweite wichtige und an dieser Stelle zu nennende Aspekt bezieht sich auf Grundlagen der Genetik und Zellbiologie. Die nun folgenden Aussagen beziehen sich auf den Menschen, wenn nicht anders deklariert. In jeder Zelle wird die Erbinformation in Form von Chromosomen gespeichert, dessen Anzahl zwischen somatischen und den Zellen der Keimbahn variiert. In allen Körperzellen, ausgenommen die Gameten, liegen insgesamt 46 Chromosomen vor, was dem diploiden Chromosomensatz entspricht. Somit ist davon auszugehen, dass jedes Allel in den humanen Podozyten in zweifacher Ausführung vorliegt. Dieses grundlegende Prinzip trifft auch bei der Maus zu. Dies wiederum bedingt, dass in einem homozygoten Knockout zwei unterschiedliche Mutation zu detektieren sind und heterozygote Klone ein Wildtyp- und ein Knockout-Allel besitzen. Unwahrscheinlich aber durchaus denkbar ist auch das Vorliegen von nur einer Ausprägung der Mutation, wenn auf beiden Allelen die identische Mutation stattgefunden hat. Liegen aber drei verschiedene Mutationen vor, können zwei Erklärungsansätze dem zugrunde liegen. Entweder enthält die Zelle nicht den normalen Chromosomensatz oder die Kolonie ist nicht aus einer einzigen Zelle entsprungen, sondern aufgrund einer zellulären Kontamination zu irgendeinem Zeitpunkt im Prozess verunreinigt worden. Während des FACS-Sortings könnten

Wells mit mehr als einer Zelle aufgrund einer unvollständigen Separation der Zellen belegt worden sein oder auch während der Inkubation der Platten, dem Mediumwechsel oder beim Splitten durch unsauberes Arbeiten kontaminiert worden sein. Aus dem Prozess der Klonegenerierung für NPR3 sind drei Wildtyp-Klone und drei Knockout-Klone hervorgegangen. Im Falle der Wildtyp-Klone konnten keine Hinweise für eine CRISPR/Cas9 assoziierte Mutation und genetische Veränderung festgestellt werden. Eine Kontamination mit einem weiteren Wildtyp-Klon hätte mit den angewendeten Methoden nicht entdeckt werden können.

Für die Beschreibung der Knockout-Klone werde ich die Ergebnisse aller drei Methoden zusammenhängend erläutern. Der Klon 7B4 erwies sich im Enzymverdau als ein sehr vielversprechender Knockout-Kandidat. Dies bestätigte sich in der anschließenden Sequenzanalyse, die jeweils Mutationen zeigte. Jedoch wurden drei unterschiedliche Deletionsmutationen festgestellt, die 4, 6 und 12 Basenpaare umfasste. Hinzu kommt, dass sowohl 12 als auch 6 jeweils Vielfache von 3 sind. Für den endgültigen Beweis eines Knockouts wurde die Goldstandardmethode des Western Blots herangezogen. Die Abwesenheit der Proteinbande im Vergleich zur anwesenden Wildtyp-Bande ist hierbei wegweisend (136). So konnte dies für 7B4 gezeigt werden. Zu beachten sind hierbei jedoch mögliche Fallen. Durch Prozesse wie alternatives Splicing oder weiter downstream initiierte Translationen können funktionsfähige Proteinfragmente entstehen. Abhängig vom verwendeten Antigen für die Generierung des Western Blot Antikörpers sind diese dann im Western Blot nicht detektierbar oder werden als solche nicht wahrgenommen (136). Gerade bei vielen unspezifischen Banden wird die Beurteilung erschwert. Trotz dessen konnte der NPR3 Knockout im 7B4 Klon auf allen nötigen Ebenen gezeigt werden. Noch ungeklärt an dieser Stelle bleibt das dreifache Vorliegen einer Mutation. Um eine hinreichende Aussage treffen zu können, wurde der Chromosomensatz analysiert. Dabei konnte für 7B4 ein diploider Chromosomensatz gefunden werden. Dies beweist, dass es sich nicht um eine generelle Triploidie handelt, sondern um eine Durchmischung der Kolonie. Dies gibt den Raum für die Möglichkeit einer erneuten Vereinzelung der Zellen in 96-well-Plates, um so reine Kolonien zu erhalten. Insgesamt ist jedoch zu beachten, dass eine Expansion einer einzelnen Zelle hin zu einer Kolonie generell evolutionsbiologische Problematiken beinhaltet. Zum einen handelt es sich dabei um einen relevanten genetischen Flaschenhalseffekt und spätere Schlussfolgerungen sollten immer in Anbetracht dessen gefasst werden, dass nur ein kleiner genetischer Ausschnitt der eigentlichen Gesamtpopulation betrachtet wird (136). Außerdem wird so ein enormer selektiver Druck künstlich ausgeübt, der auch zu unphysiologischen Veränderungen führen kann (136). Bei der Betrachtung des zweiten KO-Klons 10D3 konnte auch hier ein eindeutiges Restriktionsergebnis festgestellt werden. In der Sequenzierung kam auch hier die Möglichkeit der Triploidie auf, welches im Karyogramm widerlegt wurde. Die fehlende Proteinexpression konnte im Western Blot ebenfalls detektiert werden. Der dritte KO-Klon 10A5 lieferte überzeugende Ergebnisse in allen Disziplinen. In der Sequenzanalyse bot er die größte Deletion von jeweils 15 Basenpaaren, wobei es sich jedoch bei allen vier Ergebnissen um die identische Mutation handelt. Ob es sich hierbei um den unwahrscheinlichen Zufall, dass auf beiden Chromosomen das gleiche geschehen ist, handelt oder ob in der Analyse der Sequenzen vier Mal dasselbe Allel untersucht wurde, lässt sich nicht beantworten. Zumindest kann davon ausgegangen werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer Triploidie um den Faktor 3 gesunken ist. Sollte es sich tatsächlich um eine Triploidie handeln, so wäre die Wahrscheinlichkeit, dass man bei vier Sequenzanalysen jedes Mal das identische Allel bestimmt, bei 3,7 % ($0,333^4 \times 3 = 3,7\%$), während hingegen das Vorliegen eines

normalen Chromosomensatzes mehr als drei Mal so wahrscheinlich ist ($0,5^4 \times 2 = 12,5\%$). Eine Triploidie konnte dann in der Karyotypisierung sicher ausgeschlossen werden. Zudem ist zu erwähnen, dass 15 erneut ein Vielfaches von drei ist. Dass diese Deletion zu einer fehlenden Proteinexpression geführt hat, konnte in der Western Blot Analyse gezeigt werden. Zusammenfassend kann von einer erfolgreichen Generierung von drei Knockout und drei Wildtyp Klonen gesprochen werden, was sowohl auf genetischer Ebene als auch durch fehlende Proteinexpression bewiesen werden konnte.

4.4 Diskussion des Knockoutgenerierungsprozesses für MERTK

Die Präsenz der Tyrosinkinase MERTK als Teil der Schlitzmembran konnte bereits gezeigt werden, ebenso wie ihre Bedeutung in einigen pathologischen Vorgängen. So wird auch eine Verbindung zu nephrologischen Krankheitsbildern wie der Lupusnephritis gesehen (90). Die Tyrosinphosphorylierung ist ein wichtiger Vorgang, der die Integrität der Schlitzmembran nachhaltig beeinflusst, wie die Phosphorylierung Nephrins zeigt (19). Ein naheliegender Gedanke ist es, eine Verbindung zwischen diesem bereits bekannten Prozess und der Präsenz der Tyrosinkinase MERTK in der Schlitzmembran zu ziehen. Da diese Zusammenhänge und die übergeordnete Funktion und Relevanz noch nicht im Detail geklärt werden konnten, ist MERTK für uns ein interessantes Ziel für ein Knockout-Modell.

Wie auch beim Generierungsprozess für NPR3 stellte auch für MERTK die Transfektion eine entscheidende Hürde dar. Anders als bei den humanen Podozyten ließen sich die murinen Vertreter mit dem Elektroporationssystem von NEON transfizieren. Welcher Parameter den entscheidenden Unterschied gebracht hat, ist nicht zu ermitteln, da genaue Herstellerangaben zur Amaxa Elektroporation fehlen. Im Vergleich zur Transfektion der humanen Podozyten lag die Transfektionseffizienz bei ungefähr 15% unter dem Wert der Moin-Zellen. Ob die Ursache hierfür die veränderten Transfektionsparameter und -konditionen sind oder die Charakteristika des anderen Zelltyps verantwortlich sind, kann nicht abschließend geklärt werden. Wie bereits der Titel der folgenden Publikation verrät „Marker expression, behaviors, and responses vary in different lines of conditionally immortalized cultured podocytes“ bestehen bewiesene Unterschiede zwischen einzelnen Podozytenzelllinien, welche das unterschiedliche Transfektionsverhalten beeinflusst haben könnten (139). Bei der Auswahl der gRNAs konnten aus sechs designierten Varianten schließlich zwei für die nachfolgenden Experimente ausgewählt werden. Dabei wies gRNA 2 ein sehr vielversprechendes Ergebnis bei ihrer Validierung mit einer vergleichsweise starken ungeschnittenen Bande auf. gRNA 4 wurde ebenfalls ausgewählt, zeigte aber ein deutlich schwächeres Ergebnis in diesem Schritt. Trotz dessen konnten einige mögliche Wildtyp- und Knockout-Kandidaten identifiziert werden, wie die Sequenzanalysen (vgl. Abbildung 38 und Abbildung 39) demonstrieren. Die erste Auswahl der Knockout- und Wildtyp-Kandidaten für gRNA 2 war relativ schwierig. Im Restriktionsverdau ergab das Bandenbild häufig ein relativ gemischtes Bild. Eine klare und eindeutige Abgrenzung zwischen Knockout und Wildtyp war für die gRNA 2 Klone nicht möglich. Vielmehr zeigten eine große Anzahl von Klonen sowohl eine geschnittene als auch eine mehr oder weniger starke ungeschnittene Bande. Die Entscheidung wurde dann über die Stärke der Bande getroffen in Relation zur Stärke der Bande des Ansatzes ohne Enzym. Entstand die Vermutung, dass ein sehr großer Anteil geschnitten wurde und diese entsprechende Bande sehr prominent erschien, so wurde dieser Klon als Wildtyp-Kandidat deklariert. Konnte jedoch eine prominentere ungeschnittene Bande entdeckt werden und kaum oder fast gar keine geschnittenen Anteile, so legte dies nahe, dass es sich

um einen Knockout handeln könnte. Für die Klone der gRNA 4 lieferte der Restriktionsassay eindeutigere Ergebnisse, die eine erleichterte Interpretation zuließen. Bei einem Vergleich der PCR-Banden der gRNA 4 mit den PCR-Banden der gRNA 2 Klonen, so sind die der gRNA2 schwächer. Dies könnte mit einer geringeren Konfluenz der Zellen zum Zeitpunkt der DNA-Isolation aus den 96-Well-Platten zusammenhängen und der demzufolge geringeren eingesetzten DNA-Konzentration für die PCR.

Bei zusammenhängender Betrachtung der einzelnen Resultate der Screening- und Validierungsverfahren der Klone lassen sich einige Auffälligkeiten feststellen. Zudem muss eine Besonderheit genauer betrachtet werden. Nach erfolgter genomischer Validierung sollte die Expression von MERTK nach abgeschlossener Proteinbiosynthese untersucht werden. Es konnten jedoch keine Antikörper für die Western Blot Analyse gefunden werden, die eindeutige Ergebnisse lieferten. Somit wurde alternativ die qPCR als Expressionsnachweis herangezogen. In dem Paper „Efficient genome editing of differentiated renal epithelial cells.“ von Hofherr et al. wird die RT-PCR als Möglichkeit zur Kontrolle des Protein-Levels genannt (138). Mit dieser Methode wird zwar nicht das endgültige Proteinbiosyntheseprodukt analysiert, sondern dessen mRNA. Dadurch werden einige Zwischenschritte übersprungen und beispielsweise veränderte posttranslationale Modifikationen werden auf diese Weise nicht detektiert. Jedoch sagt die mRNA-Expression mehr als die reine Sequenz über das Vorliegen eines Knockouts aus. Und auch die Western Blot Analyse ist zwar ein sehr starker Hinweis, dass bei Fehlen der zu untersuchenden Bande ein Knockout vorliegt, doch auch dies gibt keine einhundertprozentige Sicherheit. Bei der Betrachtung aller Ergebnisse eines Klons kann als Beispiel für eine stringente ineinander schlüssige Analyse der Klon 2E2 genannt werden. In jedem Analyseschritt erscheint er als Wildtyp, sowohl auf genomischem Level als auch bei Betrachtung der Proteinexpression in der qPCR. Als zweites Beispiel möchte ich auf 1D11 eingehen, welcher ebenfalls ein Wildtyp-Kandidat gewesen war. In der Sequenzierung konnte jedoch in einem Ergebnis eine Deletion von 1 bp entdeckt werden. Dies wird anschließend perfekt in der qPCR wiedergespiegelt, die eine Expression von 50% zeigt. Anhand dieser Daten kann somit davon ausgegangen werden, dass es sich um einen heterozygoten Klon handelt. Auch verdeutlicht dieses Beispiel, dass die verwendete Methodik einen in sich logischen Aufbau aufweist. Obwohl das Ergebnis der Restriktion für einen Wildtyp-Klon gesprochen hatte, konnte dies in den anschließenden Analysen nachvollziehbar widerlegt werden. Ein ähnlicher Workflow der Methodik wurde auch in bereits publizierten Arbeiten erfolgreich und begründet angewendet (136,138). Auch bei weiteren Klonen konnte innerhalb des Prozesses die erste Vermutung widerlegt werden, so auch beim Klon 2G2. Dieser wurde zunächst für einen KO gehalten. Die Sequenzierungsergebnisse nährten jedoch erste Zweifel, denn zum einen lagen drei unterschiedliche Mutationen vor, die die Frage eines triploiden Chromosomensatzes aufwarfen, und zum anderen zeigte die Hälfte der Sequenzen eine Mutation mit einer durch drei teilbaren Anzahl an Basenpaaren. Die anschließende Expressionsanalyse zeigte, dass diese Deletionsmutationen von 3 und 9 bp beide zu keinem Knockout geführt haben. Durch den Verlust von einer oder 3 Aminosäuren wurde die Translation des Proteins nicht frühzeitig beendet. Ob das entstandene Protein in der ursprünglichen Weise gefaltet und modifiziert werden kann, lässt sich mithilfe der hier angewendeten Methoden jedoch nicht klären. Einen eindeutigen Knockout zeigt die Analyse von 1B7. Anhand des qPCR-Ergebnisses liegt ein eindeutiger KO-Klon vor. Rückblickend hatte das Ergebnis der Restriktion zwar keine Eindeutigkeit in dem Maße gezeigt aufgrund schwacher Banden und der damit erschwerten Beurteilung, jedoch zeigten sich in der

Sequenzierung vier identische Mutationen von jeweils 28 bp Deletionen. Da 28 kein Vielfaches von 3 ist, passt dies mit dem Ergebnis der qPCR schlüssig zusammen. Das zweitbeste Ergebnis in der qPCR lieferte 1F5. Auch dies ist ein überzeugender KO. Im Enzymverdau war eine prominente ungeschnittene Bande ersichtlich. An dieser Stelle erwähnenswert ist die Morphologie der PCR-Bande und zwar das Auftreten einer Doppelbande. Auch bei einigen anderen Klonen erschien ebenfalls eine Doppelbande. Eine Korrelation zwischen der Doppelbande und den Knockout-Klonen ist ersichtlich, jedoch kann eine Kausalität nicht bewiesen werden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass durch größere CRISPR/Cas9 Deletionen auf einem Allel die Polymerase-Kettenreaktion zwei Fragmente leicht unterschiedlicher Längen hervorbrachte. Deutlich schwieriger ist die Interpretation der Ergebnisse des Klons 1G5. Für sich allein betrachtet wirken die Ergebnisse schlüssig. Im Enzymverdau zeigte sich die ungeschnittene Bande als weniger prominent, aber vorhanden. Die Sequenzierung wies auf einen eindeutigen KO hin, jedoch mit fraglicher Triploidie. Es liegt eine Kombination von Deletionen und Insertionen von einer oder zwei Basenpaaren vor, was der Theorie zufolge zu einer Leserasterverschiebung führt. Es lässt sich kein Hinweis auf einen heterozygoten Klon ausmachen, doch zeigt sich in der qPCR eine Expression von 20%. In der Zusammenschau würde dies für einen hypomorphen Klon sprechen. Ob dieser Phänotyp jedoch zu den Knockout-Klonen gezählt werden kann, bleibt fraglich und wurde demnach von allen weiteren Experimenten ausgeschlossen.

Ein weiterer relevanter und zu diskutierender Aspekt ist die Anzahl deletierter Basen. Bei einigen Knockout-Kandidaten für MERTK wurden Deletionen von deutlich über 20 Basenpaaren beobachtet. Einige Klone wiesen sogar in der Sequenzierung fehlende Abschnitte auf, die bis zu 96 Basenpaare umfassten. In der Literatur wird die Anzahl deletierter Basen als deutlich geringer beschrieben, genauer gesagt auf eine oder wenige Basenpaare begrenzt (115). Die Beobachtung der großen Deletionen in der Sequenzanalyse korreliert zudem mit dem Vorhandensein von Doppelbanden in der zuvor durchgeführten PCR-Analyse, die auf deutlich größendifferente DNA-Fragmente hindeuten. Bei den Klonen 1C3, 1F5 und 1A2 treten in der Sequenzanalyse Deletionen von mehr als 50 Basenpaaren bei der Hälfte der Analysen auf. Diese sind genau diejenigen Klone, die eine Doppelbande aufwiesen. Diese Erkenntnis könnte potenziell ein vereinfachtes erstes Screening ermöglichen. Da diese Doppelbanden jedoch nur im Falle des MERTK-Knockouts aufgetreten sind, wäre es wahrscheinlich keine universell anwendbare Methode. Ein weiterer Aspekt ist, dass einige dieser großen Deletionen zusätzlich ein Vielfaches von drei sind. Somit konkurrieren zwei Argumente und es stellt sich die Frage, ob ab einer bestimmten Anzahl fehlender Aminosäuren die mRNA-Synthese frühzeitig sistiert und ob es womöglich zu einer Degradation der Sequenz führt. Es konnte in der Arbeit anhand des 1F5-Klons gezeigt werden, dass beispielsweise eine Deletion von 96 Basenpaaren zu einer Verhinderung der mRNA-Produktion geführt hat, obwohl es nicht zu einer Verschiebung des Leserasters gekommen ist. In Anbetracht dieser Erkenntnisse fällt die Interpretation des 1C3 Klons ebenfalls schwer. Die qPCR gibt eine Expression von 28% an. Das Ergebnis des Enzymverdau ist nur wenig aussagekräftig, da die Beurteilung der schwachen Banden nur eine vage Einschätzung ermöglichen. Die Sequenzierung ergibt zwei unterschiedliche Mutationen von 24 und 77 bp, die beide deutlich größer als die in der Literatur beschriebenen Deletionen sind. Die 77 bp Mutation wird sicherlich zu keiner Produktion des Proteins führen, da sie eine große Länge umfasst und gleichzeitig zu einer Leserasterverschiebung führt. 24 Basenpaare kodieren jedoch für genau 8 Aminosäuren. Ob auch der Verlust von 8 Aminosäuren zu einem Abbruch der

mRNA-Produktion führte, konnte mithilfe der qPCR nicht endgültig geklärt werden. Da die Expressionsanalyse ungefähr ein Viertel ergeben hat, könnte man die Vermutung aufstellen, dass es sich hierbei ebenfalls um ein hypomorphes Allel handelt. Somit hat die Mutation nur zu einem teilweisen Ausfall der Genfunktion geführt.

4.5 Diskussion des Knockoutgenerierungsprozesses für ITM2B

Die Rolle von ITM2B als Stabilisator makromolekularer Proteinkomplexe ist eine denkbare Theorie zur Funktion von ITM2B in der Schlitzmembran. Trotz krankheitsrelevanter Daten in der Neurologie gibt es keine Erkenntnisse eines nephrologischen Phänotyps. Kommt es jedoch zum renalen Podocyte effacement im Rahmen einer Proteinurie bei Fokal Segmentaler Glomerulosklerose, Minimal Change Nephritis oder auch beim Diabetes mellitus, könnte die mutmaßliche Funktion als Stabilisator von zentraler Bedeutung sein (15). Somit ist eine weitergehende Untersuchung von ITM2B im Kontext der Schlitzmembran hoch relevant.

Methodisch besonders bei diesem Protein war die Verwendung zweier gRNAs bei einer Transfektion. Dem Review Artikel von Maeder et al. zufolge kann dies dann sinnvoll sein, wenn man ein gesamtes genomisches Element entfernen will, denn solche Deletionen können bis zu mehreren Megabasen groß sein (131). Ursächlich dafür sind an zwei Positionen stattfindende Doppelstrangbrüche, die eine Deletion des gesamten dazwischenliegenden Abschnittes hervorrufen können. Somit wird die Wahrscheinlichkeit, das Zielgen auszuknocken, erhöht, denn einzelne Deletionen führen zum Teil nicht zu einem Knockout, wie auch bei den Ergebnissen von NPR3 und MERTK gezeigt werden konnte (136,140). Der Knockout durch zwei gRNAs liegt zwei grundsätzlichen Mechanismen zugrunde. Entweder werden die beiden Enden der DNA wieder zusammengefügt, sodass es zu einer großen Deletion kommt oder es werden an zwei Stellen kleinere Deletionen oder Insertionen verursacht, ohne, dass es eine große Deletion nach sich zieht (136). Zu beachten ist jedoch das dadurch erhöhte Risiko von off-target Mutationen (136). Als eine Lösungsmöglichkeit wurde die Verwendung paariger Cas9 Nickases vorgestellt (141). Nickases sind Nukleasen, die lediglich einen Einzelstrangbruch hervorrufen (141). Werden sie als Paar eingesetzt, so erhöht sich die Spezifität mit Senkung des off-target Risikos bei ebenfalls induzierten Doppelstrangbrüchen (141). Diese Alternative wurde hier jedoch nicht angewendet. Den Western Blot Ergebnissen zufolge scheint der Einsatz zweier gRNAs sehr erfolgreich zu sein, denn es konnte der komplette und saubere Verlust der ITM2B-Bande gezeigt werden. Somit ist der Beweis des Verlustes der ITM2B-Proteinexpression geglückt. Jedoch konnten keine Daten der vorausgehenden Schritte der Methodik für die KO-Klone erzielt werden. Weder ein Ergebnis im Restriktionsassay noch in der Sequenzierung konnte erlangt werden, da der DNA-Abschnitt der Knockout-Kandidaten mithilfe der Polymerasen-Kettenreaktion nicht amplifiziert werden konnten. Zwei Primer-Paare wurden für die PCR so designt, dass das erste Paar einen Teil des Exon 1 amplifizieren und das zweite Primer-Paar einen Teil des Exon 2 vervielfältigen sollte. Dies ist jedoch nur dann möglich, wenn keine große Deletion stattgefunden hat, da sonst jeweils ein Primer nicht binden könnte. Als dritter Ansatz wurde der forward Primer des ersten Exons und der reverse Primer des zweiten Exons verwendet. Dies sollte der Theorie zufolge nur dann ein PCR-Produkt ergeben, wenn es bei einem Knockout-Klon zu einem Verlust eines viele Basenpaare umfassenden Bereiches gekommen ist, denn andernfalls wäre dieser zu amplifizierende Teil zu groß für eine PCR. In diesen Experimenten auch nach etlichen Anpassungen der PCR-Konditionen und

Austausch der Enzyme und Primer war es uns nicht möglich, die Knockout-Kandidaten darzustellen, im Gegensatz zu Wildtyp-Kontrollen. Meiner Schlussfolgerung zufolge muss die CRISPR/Cas9 induzierte Mutation eine Veränderung im Genom hervorgerufen haben, die die Amplifizierung nicht ermöglicht hat. Dies ist ein entscheidender Nachteil dieser Methode, da so das trichterförmige Screeningverfahren nicht möglich war. Ohne eine Verringerung der Anzahl möglicher Kandidaten musste das Screening mit der aufwendigen Methode des Western Blots vorgenommen werden. In diversen Publikationen wird die Klonvalidierung immer auf der dreischrittigen Methode aus PCR, Sequenzierung und Western Blot aufgebaut (136,138). Demnach muss ein Knockout immer sowohl auf genetischer als auch auf Protein-Ebene bewiesen werden. Da jedoch der Western Blot das letzte Glied der Kette ist, kann man von der stärksten Aussagekraft ausgehen. Aus diesem Grund wurde in diesem Fall das Ergebnis als aussagekräftig genug bewertet und die entsprechenden Klone für ihre weitere Verwendung ausgewählt.

4.6 Ausblick

Der Generierung der Klone soll eine Charakterisierung der phänotypischen Veränderungen der modifizierten Zellen folgen. Dazu sollen verschiedene biochemische, zellproliferative und funktionelle Assays für weitere Informationen sorgen. Die Frage, welche Rolle den drei ausgewählten Proteinen in der Schlitzmembran zukommt, steht dabei im Zentrum der Nachforschungen. Für die Erforschung funktioneller Aspekte soll ein Flow-Through-Chamber etabliert werden, in der die physiologische Situation einer mit Blut durchströmten Niere imitiert wird. So kann das Verhalten der Wildtyp-Zellen im Vergleich zu den generierten Knockout-Zellen unter annähernd physiologischen Strömungs- und Druckverhältnissen untersucht werden. Darüber hinaus werden diese Beobachtungen durch in vivo Daten unterstützt werden, die mithilfe von NPR3-, MERTK- und ITM2B-KO-Mäusen geliefert werden.

5. Zusammenfassung

Die Expressionsprodukte der Gene NPR3, MERTK und ITM2B konnten bei einer Analyse des Interaktoms der wichtigsten Schlitzmembrankomponenten Nephrin, Nephrin1 und Podocin als interagierende Moleküle identifiziert werden. Die Schlitzmembran, als Bestandteil der Filtrationsbarriere liefert einen entscheidenden Beitrag zur Generierung des Primärharns. Zusätzlich können bei vielen nephrologischen Krankheitsbildern pathologische Veränderungen dieser Zell-Zellverbindung zwischen Blut und Urin beobachtet werden. Welche Rolle diesen neu in der Schlitzmembran identifizierten und aus anderem Kontext bereits bekannten Moleküle jedoch zuzuschreiben ist, bleibt weiterhin ungeklärt. Durch Identifizierung ihrer Funktion und Bedeutung für die Integrität und Funktionalität des hoch spezifischen und einzigartigen Zell-Zell-Kontaktes, der die einwandfreie Funktion der Filtrationsbarriere nachhaltig beeinflusst, könnten potenziell andere weitgreifende und auch in pathologischen Kontexten bestehende Fragestellungen beantwortet werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mithilfe der Genome Editing Methode CRISPR/Cas9 drei Podozyten-Zelllinien zu generieren, in denen jeweils eines der genannten Gene ausgeknockt wurde. Der Generierungsprozess dieser Zelllinien beinhaltete die Erstellung spezifischer gRNAs, die die Nuklease Cas9 an den gewünschten Genomlokus navigieren, sowie die Etablierung der Transfektion einer murinen und einer humanen Podozyten-Zelllinie. Transfizierte Zellen wurden dann mittels FACS zu Einzelzellen separiert, deren Expansion zu genetisch identischen Zellkolonien führen sollte. Die Validierung des Genomeditierungserfolges wurde in drei Schritten vorgenommen. Ein erstes PCR-Screening mit anschließendem Enzymverdau lieferte mögliche Kandidaten, die dann mittels der Sanger-Sequenzierung genetisch genauer charakterisiert wurden. Abschließend wurde die Proteinexpression im Western Blot oder die mRNA-Expression in der qPCR analysiert. Es konnten auf diese Weise für jedes Gen sowohl Knockout- als auch Wildtyp-Zellen entwickelt werden, die für nachfolgende Experimente zur Verfügung stehen.

Im Zentrum zukünftiger Untersuchungen steht die Identifikation ihrer Bedeutung als Schlitzmembrankomponenten. Dies soll durch den Vergleich der Knockout-Zellen mit der Wildtyp-Variante bei der Durchführung verschiedener Assays erlangt werden. Parallel soll die Einführung entsprechender Knockout-Mauslinien *in vivo* Ergebnisse liefern. Erst mithilfe dieses grundlegenden Wissens können potenziell krankheitsrelevante Aspekte abgeleitet werden und so neue Möglichkeiten für Therapieoptionen geschaffen werden.

Mit Daten aus dieser Doktorarbeit publizierter peer-review Artikel: „A slit-diaphragm-associated protein network for dynamic control of renal filtration.“

(Kocylowski MK, Aypek H, Bildl W, Helmstädter M, Trachte P, Dumoulin B, et al. A slit-diaphragm-associated protein network for dynamic control of renal filtration. Nat Commun. 2022;13(1):1–15)

Summary

The gene products of NPR3, MERTK and ITM2B were identified as molecules interacting with the most important components of the slit diaphragm Nephin, Neph 1 and Podocin by analyzing the interactome of these core proteins. The slit diaphragm, as a part of the filtration barrier, plays a key role in the production of primary urine. Additionally, it has been observed that many renal diseases show pathological changes of this special cell-cell-contact between blood and urine. The exact role these newly identified molecules play in this context is an unanswered question. It needs to be determined if and how these molecules modify the integrity and function of this unique cell-cell contact and whether they play a role in physiological or pathological processes.

The aim of this work was to generate three podocyte cell lines by using CRISPR/Cas9 to knockout each of these previously named genes. First specific gRNAs leading the nuclease Cas9 to the targeted genome locus were designed. Next transfection protocols for murine and human podocyte cell lines were established. Transfected cells were FACS-sorted to single cells to expand genetically identical cell clones. The effectiveness of the genome editing method was validated in three stages. An initial PCR-screening and consecutive enzymatic digestion identified possible candidates that were genetically characterized by Sanger sequencing. Finally, we analyzed the protein expression using the western blot method and the mRNA expression via qPCR. Thus, we were able to generate knockout and wildtype cells that can be used for further functional experiments. Next step will be the identification of their importance as components of the slit diaphragm. This will be achieved by comparing the results of different assays conducted with knockout and wildtype variants. In parallel generated knockout mice lines should give insight into *in vivo* function. Only with this basic knowledge we will be able to understand relevant aspects of physiology and pathology and to identify new options for possible therapies.

With the data from this thesis the peer reviewed article “A slit-diaphragm-associated protein network for dynamic control of renal filtration” was published.

(Kocylowski MK, Aypek H, Bildl W, Helmstädter M, Trachte P, Dumoulin B, et al. A slit-diaphragm-associated protein network for dynamic control of renal filtration. Nat Commun. 2022;13(1):1–15)

6. Referenzen

1. Stein JH, Fadem SZ. The Renal Circulation. JAMA J Am Med Assoc. 1978;
2. Munger KA, Kost CK, Brenner BM, Maddox DA. The Renal Circulations and Glomerular Ultrafiltration. In: Brenner and Rector's The Kidney. 2012.
3. Wallace MA. Anatomy and Physiology of the Kidney. AORN J [Internet]. 1998 Nov;68(5):799–820. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/S0001-2092%2806%2962377-6>
4. Scott RP, Quaggin SE. The cell biology of renal filtration. Journal of Cell Biology. 2015.
5. Martin CE, Jones N. Nephrin signaling in the podocyte: An updated view of signal regulation at the slit diaphragm and beyond. Frontiers in Endocrinology. 2018.
6. Patrakka J, Tryggvason K. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. Biochem Biophys Res Commun. 2010;
7. Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: A unifying view of glomerular diseases. Kidney International. 2007.
8. Chang RLS, Deen WM, Robertson CR, Brenner BM. Permselectivity of the glomerular capillary wall: III. Restricted transport of polyanions. Kidney Int. 1975;
9. Ohlson M, Sörensson J, Haraldsson B. Glomerular size and charge selectivity in the rat as revealed by FITC-Ficoll and albumin. Am J Physiol - Ren Physiol. 2000;
10. Kriz W, Kretzler M. Cell Biology of the Glomerular Podocyte. 2003;253–307.
11. Menon MC, Chuang PY, He CJ. The glomerular filtration barrier: Components and crosstalk. International Journal of Nephrology. 2012.
12. Rinschen MM, Gödel M, Grahammer F, Zschiedrich S, Helmstädter M, Kretz O, et al. A Multi-layered Quantitative In Vivo Expression Atlas of the Podocyte Unravels Kidney Disease Candidate Genes. Cell Rep. 2018;
13. Quaggin SE, Kreidberg JA. Development of the renal glomerulus: Good neighbors and good fences. Development. 2008.
14. Schell C, Huber TB. The evolving complexity of the podocyte cytoskeleton. Journal of the American Society of Nephrology. 2017.
15. Garg P. A Review of Podocyte Biology. American Journal of Nephrology. 2018.
16. Ichimura K, Kurihara H, Sakai T. Actin Filament Organization of Foot Processes in Rat Podocytes. J Histochem Cytochem. 2003;
17. Lennon R, Randles MJ, Humphries MJ. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. Frontiers in Endocrinology. 2014.
18. Kramer-Zucker AG, Wiessner S, Jensen AM, Drummond IA. Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes. Dev Biol. 2005;
19. Grahammer F, Schell C, Huber TB. The podocyte slit diaphragm - From a thin grey line to a complex signalling hub. Nature Reviews Nephrology. 2013.
20. Conti S, Perico L, Grahammer F, Huber TB. The long journey through renal filtration: New pieces in the puzzle of slit diaphragm architecture. Current Opinion in Nephrology and Hypertension. 2017.
21. Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. J Cell Biol. 1974;
22. Grahammer F, Wigge C, Schell C, Kretz O, Patrakka J, Schneider S, et al. A flexible, multilayered protein scaffold maintains the slit in between glomerular podocytes. JCI Insight. 2016;

23. Fukusumi Y, Zhang Y, Yamagishi R, Oda K, Watanabe T, Matsui K, et al. Nephrin-binding Ephrin-B1 at the slit diaphragm controls podocyte function through the JNK pathway. *J Am Soc Nephrol*. 2018;
24. Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol*. 1990;
25. Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol*. 2000;
26. Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, Shimizu F, Sakai T, Kobayashi T, et al. FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int*. 2001;
27. Yaoita E, Yao J, Yoshida Y, Morioka T, Nameta M, Takata T, et al. Up-regulation of connexin43 in glomerular podocytes in response to injury. *Am J Pathol*. 2002;
28. Rastaldi MP, Armelloni S, Berra S, Calvaresi N, Corbelli A, Giardino LA, et al. Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles. *FASEB J*. 2006;
29. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestila M, Jalanko H, et al. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;
30. Welsh GI, Saleem MA. Nephrin - Signature molecule of the glomerular podocyte? *Journal of Pathology*. 2010.
31. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein - Nephrin - Is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*. 1998;
32. Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, Barrish JP, et al. Proteinuria and Perinatal Lethality in Mice Lacking NEPH1, a Novel Protein with Homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol*. 2001;
33. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest*. 2001;
34. Solanki AK, Widmeier E, Arif E, Sharma S, Daga A, Srivastava P, et al. Mutations in KIRREL1, a slit diaphragm component, cause steroid-resistant nephrotic syndrome. *Kidney Int*. 2019;
35. Helmstädter M, Höhne M, Huber TB. A brief overview on IRM function across evolution. *Journal of Neurogenetics*. 2014.
36. Tskhovrebova L, Trinick J. Titin: Properties and family relationships. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003.
37. Nishibori Y, Liu L, Hosoyamada M, Endou H, Kudo A, Takenaka H, et al. Disease-causing missense mutations in NPHS2 gene alter normal nephrin trafficking to the plasma membrane. *Kidney Int*. 2004;
38. Schell C, Wanner N, Huber TB. Glomerular development - Shaping the multicellular filtration unit. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2014.
39. Huber TB, Benzing T. The slit diaphragm: A signaling platform to regulate podocyte function. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2005.
40. Endlich N, Endlich K. The Challenge and Response of Podocytes to Glomerular Hypertension. *Semin Nephrol*. 2012;
41. Huber TB, Simons M, Hartleben B, Sernetz L, Schmidts M, Gundlach E, et al. Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: Mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet*. 2003;
42. Sugimoto H, Hamanog Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, et

- al. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem.* 2003;
43. Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends in Cell Biology.* 2007.
 44. James Cooper C, Dutta NT, Martin CE, Piscione TD, Thorner PS, Jones N. Characterization of a novel disease-associated mutation within NPHS1 and its effects on nephrin phosphorylation and signaling. *PLoS One.* 2018;
 45. Ruotsalainen V, Patrakka J, Tissari P, Reponen P, Hess M, Kestila M, et al. Role of nephrin in cell junction formation in human nephrogenesis. *Am J Pathol.* 2000;
 46. Roselli S, Heidet L, Sich M, Henger A, Kretzler M, Gubler M-C, et al. Early Glomerular Filtration Defect and Severe Renal Disease in Podocin-Deficient Mice. *Mol Cell Biol.* 2004;
 47. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet.* 2000;
 48. Hall G, Gbadegesin RA. Translating genetic findings in hereditary nephrotic syndrome: The missing loops. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2015;
 49. Sever S, Altintas MM, Nankoe SR, Möller CC, Ko D, Wei C, et al. Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease. *J Clin Invest.* 2007;
 50. George B, Verma R, Soofi AA, Garg P, Zhang J, Park TJ, et al. Crk1/2-dependent signaling is necessary for podocyte foot process spreading in mouse models of glomerular disease. *J Clin Invest.* 2012;
 51. Verma R, Venkatareddy M, Kalinowski A, Patel SR, Salant DJ, Garg P. Shp2 Associates with and Enhances Nephrin Tyrosine Phosphorylation and Is Necessary for Foot Process Spreading in Mouse Models of Podocyte Injury. *Mol Cell Biol.* 2016;
 52. Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley K V. The podocyte's response to stress: The enigma of foot process effacement. *American Journal of Physiology - Renal Physiology.* 2013.
 53. Bildl W, Haupt A, Müller CS, Biniossek ML, Thumfart JO, Hüber B, et al. Extending the dynamic range of label-free mass spectrometric quantification of affinity purifications. *Mol Cell Proteomics.* 2012;
 54. Lowe DG, Klisak I, Sparkes RS, Mohandas T, Goeddel D V. Chromosomal distribution of three members of the human natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase gene family. *Genomics.* 1990;
 55. Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM. Natriuretic peptides: Their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handbook of Experimental Pharmacology.* 2009.
 56. Porter JG, Arfsten A, Fuller F, Miller JA, Gregory LC, Lewicki JA. Isolation and functional expression of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;
 57. Rose RA, Giles WR. Natriuretic peptide C receptor signalling in the heart and vasculature. *Journal of Physiology.* 2008.
 58. Moyes AJ, Hobbs AJ. C-type natriuretic peptide: A multifaceted paracrine regulator in the heart and vasculature. *Int J Mol Sci.* 2019;
 59. Bennett BD, Bennett GL, Vitangcol R V., Jewett JRS, Burnier J, Henzel W, et al. Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide

- receptors: Hormone pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera. *J Biol Chem.* 1991;
60. Moffatt P, Thomas G, Sellin K, Bessette MC, Lafrenière F, Akhouayri O, et al. Osteocrin is a specific ligand of the natriuretic peptide clearance receptor that modulates bone growth. *J Biol Chem.* 2007;
 61. Ochodnický P, Lattenist L, Ahdi M, Kers J, Uil M, Claessen N, et al. Increased Circulating and Urinary Levels of Soluble TAM Receptors in Diabetic Nephropathy. *Am J Pathol.* 2017;
 62. Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL, Snodgrass HR, Earp HS. Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ.* 1994;
 63. MERTK - Tyrosine-protein kinase Mer precursor - Homo sapiens (Human) - MERTK gene & protein [Internet]. [cited 2022 Mar 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q12866>
 64. Zhen Y, Finkelman FD, Shao WH. Mechanism of Mer receptor tyrosine kinase inhibition of glomerular endothelial cell inflammation. *J Leukoc Biol.* 2018;
 65. Shao WH, Zhen Y, Rosenbaum J, Eisenberg RA, McGaha TL, Birkenbach M, et al. A protective role of Mer receptor tyrosine kinase in nephrotoxic serum-induced nephritis. *Clin Immunol.* 2010;
 66. Heiring C, Dahlbäck B, Muller YA. Ligand recognition and homophilic interactions in Tyro3: Structural insights into the Axl/Tyro3 receptor tyrosine kinase family. *J Biol Chem.* 2004;
 67. Nyberg P, He X, Härdig Y, Dahlbäck B, García De Frutos P. Stimulation of Sy tyrosine phosphorylation by bovine protein s domains involved in the receptor-ligand interaction. *Eur J Biochem.* 1997;
 68. Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H, et al. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 1996;
 69. Stitt TN, Conn G, Goret M, Lai C, Bruno J, Radzilewski C, et al. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell.* 1995;
 70. Lemke G, Rothlin C V. Immunobiology of the TAM receptors. *Nature Reviews Immunology.* 2008.
 71. Lemke G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;
 72. Camenisch TD, Koller BH, Earp HS, Matsushima GK. A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF- α production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Immunol.* 1999;
 73. Lemke G, Burstyn-Cohen T. TAM receptors and the clearance of apoptotic cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;
 74. Wu Y, Tibrewal N, Birge RB. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends in Cell Biology.* 2006.
 75. Ostergaard E, Duno M, Batbayli M, Vilhelmsen K, Rosenberg T. A novel MERTK deletion is a common founder mutation in the faroe islands and is responsible for a high proportion of retinitis pigmentosa cases. *Mol Vis.* 2011;
 76. Gal A, Li Y, Thompson DA, Weir J, Orth U, Jacobson SG, et al. Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* 2000;
 77. Audo I, Mohand-Said S, Boulanger-Scemama E, Zanlonghi X, Condroyer C, Démontant V, et al. MERTK mutation update in inherited retinal diseases. *Hum Mutat.* 2018;
 78. Duncan JL, LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Yang H, Trautmann N, et al.

- An RCS-like retinal dystrophy phenotype in Mer knockout mice. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2003;
79. Elliott MR, Ravichandran KS. Clearance of apoptotic cells: Implications in health and disease. *Journal of Cell Biology*. 2010.
 80. Chung WS, Clarke LE, Wang GX, Stafford BK, Sher A, Chakraborty C, et al. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*. 2013;
 81. Furgeaud L, Traves PG, Tufail Y, Leal-Bailey H, Lew ED, Burrola PG, et al. TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology. *Nature*. 2016;
 82. Shao WH, Cohen PL. Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research and Therapy*. 2011.
 83. Lu Q, Gore M, Zhang Q, Camenisch T, Boast S, Casagrande F, et al. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature*. 1999;
 84. Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* (80-). 2001;
 85. Cohen PL, Caricchio R, Abraham V, Camenisch TD, Charles Jennette J, Roubey RAS, et al. Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *J Exp Med*. 2002;
 86. Zhen Y, Priest SO, Shao W-H. Opposing Roles of Tyrosine Kinase Receptors Mer and Axl Determine Clinical Outcomes in Experimental Immune-Mediated Nephritis. *J Immunol*. 2016;
 87. Gong S, Xu Z, Liu Y, Xing L, Ma J, Yu C, et al. Plasma sMer, sAxl and GAS6 levels correlate with disease activity and severity in lupus nephritis. *Eur J Clin Invest*. 2019;
 88. Wu J, Ekman C, Jönsen A, Sturfelt G, Bengtsson AA, Gottsäter A, et al. Increased plasma levels of the soluble Mer tyrosine kinase receptor in systemic lupus erythematosus relate to disease activity and nephritis. *Arthritis Res Ther*. 2011;
 89. Jia R, Hanafusa H. The proto-oncogene of v-eyk (v-ryk) is a novel receptor-type protein tyrosine kinase with extracellular Ig/FN-III domains. *J Biol Chem*. 1994;
 90. Li S, Guo Q, Zhu H, Li Z, Su Y, Dong B. Increased Mer and Axl receptor tyrosine kinase expression on glomeruli in lupus nephritis. *Clin Rheumatol*. 2017;
 91. Liu Y, Cousin JM, Hughes J, Van Damme J, Seckl JR, Haslett C, et al. Glucocorticoids promote nonphlogistic phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol*. 1999;
 92. McColl A, Bournazos S, Franz S, Perretti M, Morgan BP, Haslett C, et al. Glucocorticoids Induce Protein S-Dependent Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by Human Macrophages. *J Immunol*. 2009;
 93. Vidal R, Franglone B, Rostagno A, Mead S, Révész T, Plant G, et al. A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature*. 1999;
 94. Kim J, Miller VM, Levites Y, West KJ, Zwizinski CW, Moore BD, et al. BRI2 (ITM2b) inhibits A β deposition in vivo. *J Neurosci*. 2008;
 95. Fotinopoulou A, Tsachaki M, Vlavaki M, Pouloupoulos A, Rostagno A, Frangione B, et al. BRI2 interacts with amyloid precursor protein (APP) and regulates amyloid β (A β) production. *J Biol Chem*. 2005;

96. Schwenk J, Pérez-Garci E, Schneider A, Kollwe A, Gauthier-Kemper A, Fritzius T, et al. Modular composition and dynamics of native GABA B receptors identified by high-resolution proteomics. *Nat Neurosci.* 2016;
97. Martins F, Rebelo S, Santos M, Cotrim CZ, da Cruz e Silva EF, da Cruz e Silva OAB. BRI2 and BRI3 are functionally distinct phosphoproteins. *Cell Signal.* 2016;
98. Sánchez-Pulido L, Devos D, Valencia A. BRICHOS: A conserved domain in proteins associated with dementia, respiratory distress and cancer. *Trends in Biochemical Sciences.* 2002.
99. Martin L, Fluhrer R, Reiss K, Kremmer E, Saftig P, Haass C. Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b. *J Biol Chem.* 2008;
100. Martin L, Fluhrer R, Haass C. Substrate requirements for SPPL2b-dependent regulated intramembrane proteolysis. *J Biol Chem.* 2009;
101. Fluhrer R, Martin L, Klier B, Haug-Kröper M, Grammer G, Nuscher B, et al. The α -helical content of the transmembrane domain of the British dementia protein-2 (Bri2) determines its processing by signal peptide peptidase-like 2b (SPPL2b). *J Biol Chem.* 2012;
102. Dolfe L, Tambaro S, Tigro H, Del Campo M, Hoozemans JJM, Wiehager B, et al. The Bri2 and Bri3 BRICHOS Domains Interact Differently with A β 42 and Alzheimer Amyloid Plaques. *J Alzheimer's Dis Reports.* 2018;
103. Robakis NK, Ramakrishna N, Wolfe G, Wisniewski HM. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;
104. Wang X, Zhou X, Li G, Zhang Y, Wu Y, Song W. Modifications and trafficking of APP in the pathogenesis of alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 2017.
105. Matsuda S, Matsuda Y, Snapp EL, D'Adamio L. Maturation of BRI2 generates a specific inhibitor that reduces APP processing at the plasma membrane and in endocytic vesicles. *Neurobiol Aging.* 2011;
106. Marambaud P, Robakis NK. Genetic and molecular aspects of Alzheimer's disease shed light on new mechanisms of transcriptional regulation. *Genes, Brain and Behavior.* 2005.
107. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 2008;
108. Matsuda S, Senda T. BRI2 as an anti-Alzheimer gene. *Medical Molecular Morphology.* 2019.
109. Vidal R, Révész T, Rostagno A, Kim E, Holton JL, Bek T, et al. A decamer duplication in the 3' region of the BRI gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;
110. Caruana G, Cullen-McEwen L, Nelson AL, Kostoulas X, Woods K, Gardiner B, et al. Spatial gene expression in the T-stage mouse metanephros. *Gene Expr Patterns.* 2006;
111. Bello AK, Nwankwo E, El Nahas AM. Prevention of chronic kidney disease: A global challenge. *Kidney Int Suppl.* 2005;
112. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, et al. Global prevalence of chronic kidney disease - A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE.* 2016.
113. Redman M, King A, Watson C, King D. What is CRISPR/Cas9? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2016;101(4):213–5.

114. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakamura A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;
115. Bannikov A V., Lavrov A V. CRISPR/CAS9, the king of genome editing tools. *Molecular Biology.* 2017.
116. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics.* 2007;
117. Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet.* 2014;
118. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* (80-). 2007;
119. Schiwiek D, Endlich N, Holzman L, Holthöfer H, Kriz W, Endlich K. Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. *Kidney Int.* 2004;
120. Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, et al. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol.* 2002;
121. Bahari L, Bein A, Yashunsky V, Sirotinskaya V, Braslavsky I. Cryopreservation of adherent mammalian cells on substrate by slow freezing. *Cryobiology.* 2018;80:160.
122. CHOPCHOP [Internet]. [cited 2022 Mar 3]. Available from: <https://chopchop.cbu.uib.no/>
123. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2013 Sep [cited 2022 Mar 3];31(9):822–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23792628/>
124. Guide U. GeneArt® CRISPR Nuclease Vector Kit.
125. Microsynth Webshop [Internet]. [cited 2022 Mar 3]. Available from: <https://srvweb.microsynth.ch/home/seqlab>
126. Armbrecht M, Ag E. Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen. 2013;(279):1–6.
127. Neon® Transfection System. (25).
128. Chou C-H, Yang M-H. Karyotype Analysis. *Bio-protocol* [Internet]. 2014;4(10):e1129. Available from: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1129>
129. Chou CH, Yang NK, Liu TY, Tai SK, Hsu DSS, Chen YW, et al. Chromosome instability modulated by BMI1-AURKA signaling drives progression in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2013;
130. Thermo Fisher Scientific. TaqMan Gene Expression Assay solutions The leader in gene expression analysis. Manual [Internet]. 2019; Available from: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/taqman-gex-brochure.pdf>
131. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Molecular Therapy.* 2016.
132. Shim G, Kim D, Park GT, Jin H, Suh SK, Oh YK. Therapeutic gene editing: Delivery and regulatory perspectives. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2017.
133. Khalil AM. The genome editing revolution: review. *J Genet Eng Biotechnol.* 2020;18(1).
134. Tasca F, Wang Q, Gonçalves MAFV. Adenoviral Vectors Meet Gene Editing: A Rising Partnership for the Genomic Engineering of Human Stem Cells and

- Their Progeny. *Cells*. 2020.
135. Liu WJ, Li ZH, Chen XC, Zhao XL, Zhong Z, Yang C, et al. Blockage of the lysosome-dependent autophagic pathway contributes to complement membrane attack complex-induced podocyte injury in idiopathic membranous nephropathy. *Sci Rep*. 2017;
 136. Daniel E Shumer NJNNPS. Generating single cell-derived knockout clones in mammalian cells with CRISPR/Cas9. *Physiol Behav*. 2017;176(12):139–48.
 137. Yasuda-Yamahara M, Rogg M, Yamahara K, Maier JI, Huber TB, Schell C. AIF1L regulates actomyosin contractility and filopodial extensions in human podocytes. *PLoS One*. 2018;
 138. Hofherr A, Busch T, Huber N, Nold A, Bohn A, Viau A, et al. Efficient genome editing of differentiated renal epithelial cells. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2017;
 139. Chittiprol S, Chen P, Petrovic-Djergovic D, Eichler T, Ransom RF. Marker expression, behaviors, and responses vary in different lines of conditionally immortalized cultured podocytes. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2011;
 140. Xiao A, Wang Z, Hu Y, Wu Y, Luo Z, Yang Z, et al. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(14):1–11.
 141. Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*. 2014;24(1):132–41.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
3D	Dreidimensional
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ANPRC	Atrial natriuretic peptide receptor C
APP	Amyloid-Beta A4 Precursor Protein
BCA	Bicinchoninsäure
BNP	Brain Natriuretic Peptide
bp	Basenpaare
Cas9	CRISPR associated protein 9
cDNA	Complementary DNA
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CRISPR	Clustered regularly interspaced palindromic repeats
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	Et alii
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBD	Familial British Dementia
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
FDD	Familial Danish Dementia
g	Gramm
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-de- hydrogenase
Gas6	Growth-arrest-specific gene-6
gRNA	Guide RNA
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HDR	Homology-directed repair
HEK-Zellen	Human embryonic kidney Zellen
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin-G
ITM2B	Integral Membrane Protein 2B
kDa	Kilodalton
KDS	Kaliumdodecylsulfat

LB	Lysogeny broth
mBRI2	Mature BRI2
MERTK	Tyrosine-protein kinase Mer
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
Neph 1	Nephrin-like protein 1
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
NHEJ	Non-homologous end joining
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OFP	Orange fluorescence protein
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PBS	Phosphate-buffered saline
PtdSer	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	Quantitative PCR
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Runs per minute
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SFB	Sonderforschungsbereich
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
SPPL2B	Signal peptide peptidase-like 2B
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TALEN	Transcription activator-like effector Nuklease
TNF	Tumornekrosefaktor
VE	Vollentsalzt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vgl.	Vergleich
ZFN	Zink-Finger Nukleasen

8. Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung aller verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	25
Tabelle 2: Auflistung aller verwendeten Geräte.....	27
Tabelle 3: Zusammensetzung des Maus-Podozyten Mediums für den undifferenzierten Status.....	27
Tabelle 4: Zusammensetzung des Maus-Podozyten Mediums für den differenzierten Status.....	27
Tabelle 5: Zusammensetzung des Mediums humaner Podozyten.....	28
Tabelle 6: Zusammensetzung des Moin Supplements.....	28
Tabelle 7: Zusammensetzung des Mediums für HEK-293 Zellen.....	28
Tabelle 8: Reaktionszusammensetzung der Annealing Reaktion.....	31
Tabelle 9: Reaktionszusammensetzung für den ersten Verdünnungsschritt.....	32
Tabelle 10: Reaktionszusammensetzung für den zweiten Verdünnungsschritt.....	32
Tabelle 11: Reaktionszusammensetzung der Ligationsreaktion.....	33
Tabelle 12: Zusammensetzung des LB-Mediums.....	34
Tabelle 13: Pipettierschema für die Transfektion von HEK-Zellen.....	39
Tabelle 14: Zusammensetzung des Lysepuffers für die DNA-Isolation.....	40
Tabelle 15: Thermocycler-Programm der DNA-Isolation.....	40
Tabelle 16: Zusammensetzung des Lysepuffers für die DNA-Isolation großer Zellpellets.....	41
Tabelle 17: Zusammensetzung der PCR-Reaktion und Programm im Thermocycler. Diese Auflistung gilt für folgende Protein und gRNAs: MERTK, gRNA 1 + 2 + 4 + 5 + 6, ITM2B, gRNA 3 und NPR3, gRNA 4 + 5.....	43
Tabelle 18: Zusammensetzung der PCR-Reaktion und Programm im Thermocycler. Diese Auflistung gilt für folgende Protein und gRNAs: MERTK, gRNA 3 + 4 + 5 und NPR3, gRNA 1 + 2.....	43
Tabelle 19: Liste aller verwendeten Primer.....	44
Tabelle 20: Zusammensetzung der Reaktion des Enzymverdaus für NPR3, gRNA 1+2.....	46
Tabelle 21: Zusammensetzung der Reaktion des Enzymverdaus für MERTK, gRNA 1.....	46
Tabelle 22: Zusammensetzung der Reaktion des Enzymverdaus für MERTK, gRNA 2 + 3 + 4 + 5, ITM2B, gRNA 3 + 4 und NPR3, gRNA 4.....	47
Tabelle 23: Zusammensetzung der Reaktion des Enzymverdaus für MERTK, gRNA 6.....	47
Tabelle 24: Zusammensetzung der Reaktion des Enzymverdaus für NPR3, gRNA 5.....	47
Tabelle 25: Liste der verwendeten Restriktionsenzyme.....	48
Tabelle 26: Zusammensetzung des Lysepuffers für die DNA-Isolation.....	49
Tabelle 27: Liste der verwendeten Primer für die Klonvalidierung.....	50
Tabelle 28: Zusammensetzung der PCR-Reaktion und Programm im Thermocycler. Diese Auflistung gilt für folgende Protein und gRNAs: NPR3, gRNA 3.....	50
Tabelle 29: Zusammensetzung der PCR-Reaktion und Programm im Thermocycler. Diese Auflistung gilt für folgende Protein und gRNAs: NPR3, gRNA 4, MERTK, gRNA 2 + 4 und ITM2B, gRNA 3.....	51
Tabelle 30: Zusammensetzung der Ligationsreaktion.....	52
Tabelle 31: Zusammensetzung des RIPA-Puffers.....	53
Tabelle 32: Zusammensetzung des Lyse-Puffers.....	53
Tabelle 33: Zusammensetzung des 2x Laemmli.....	54
Tabelle 34: Zusammensetzung des 10x Waschpuffers.....	56
Tabelle 35: Zusammensetzung des 10x Laufpuffers.....	56
Tabelle 36: Liste der verwendeten Antikörper.....	57
Tabelle 37: Reaktionszusammensetzung I der reversen Transkription.....	59
Tabelle 38: Reaktionszusammensetzung II der reversen Transkription.....	59
Tabelle 39: Reaktionszusammensetzung des TaqMan Gene Expression Assays.....	60
Tabelle 40: Liste der verwendeten gRNAs.....	61
Tabelle 41: Zusammenfassende Liste der identifizierten Wildtyp- und Knockout-Klone.....	78
Tabelle 42: Liste der verwendeten gRNAs.....	78
Tabelle 43: Zusammenfassende Liste der identifizierten Wildtyp-, Knockout- und hypomorphen Klone.....	99
Tabelle 44: Liste der verwendeten gRNAs.....	100
Tabelle 45: Zusammenfassende Liste der identifizierten Wildtyp- und Knockout-Klone.....	106

Abbildung 1: Die Schlitzmembran.	10
Abbildung 2: CRISPR/Cas9 System.	20
Abbildung 3: Design einer geeigneten gRNA.	31
Abbildung 4: GeneArt® CRISPR Nuclease Vector.	32
Abbildung 5: Maxiprep.	35
Abbildung 6: Das Neon™ Transfection System.	38
Abbildung 7: Mögliche Ergebnisse des Restriktionsassays.	46
Abbildung 8: pCR™4-TOPO® Vektor.	53
Abbildung 9: Reaktionsschritte des TaqMan assay.	58
Abbildung 10: Transfektionsversuch mit Lipofectamine3000.	62
Abbildung 11: Transfektionsversuch mit dem NEON Transfection System.	63
Abbildung 12: Transfektionsversuch mit dem Amaxa System von Lonza. n.	64
Abbildung 13: PCR und Restriktionsverdau der gRNA 1 (NPR3).	65
Abbildung 14: PCR und Restriktionsverdau der gRNA 3 (NPR3).	65
Abbildung 15: PCR und Restriktionsverdau der gRNA 4 (NPR3).	66
Abbildung 16: PCR und Restriktionsverdau der gRNA 5 (NPR3).	66
Abbildung 17: FACS-Sort der gRNA 3 (NPR3).	68
Abbildung 18: Markierte 96-well-Platte.	68
Abbildung 19: Darstellung der identifizierten Klone auf der 96-Well-Platte 1 der gRNA 3.	69
Abbildung 20: Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 3 Klone 7B4 (KO) und 7G3 (WT).	70
Abbildung 21: Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 4 Klone 1G3 (WT) und 1E4 (WT).	70
Abbildung 22: Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 4 Klone 10D3 (KO) und 10A5 (KO).	71
Abbildung 23: Ergebnisse der Sequenzierung der Wildtyp-Kandidaten von NPR3.	73
Abbildung 24: Ergebnisse der Sequenzierung der Knockout-Kandidaten von NPR3.	76
Abbildung 25: Western Blot der Knockout- und Wildtyp-Kandidaten für NPR3.	77
Abbildung 26: Lichtmikroskopische Aufnahme des Chromosomensatzes der ausgewählten Klone.	77
Abbildung 27: Transfektion der Maus-Podozyten.	80
Abbildung 28: PCR und Restriktionsverdau der gRNA 1 (MERTK).	80
Abbildung 29: PCR und Restriktionsverdau der gRNA 2 (MERTK).	81
Abbildung 30: PCR und Restriktionsverdau der gRNA 3 (MERTK).	81
Abbildung 31: PCR und Restriktionsverdau der gRNA 4 (MERTK).	82
Abbildung 32: PCR und Restriktionsverdau der gRNA 5 (MERTK).	82
Abbildung 33: PCR und Restriktionsverdau der gRNA 6 (MERTK).	83
Abbildung 34: Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 2 Klone 1D11 (WT), 2E2 (WT) und 2H1 (WT).	84
Abbildung 35: Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 2 Klone 1B7 (KO), 1C3 (KO), 1F5 (KO), 1G5 (KO) und 2G2 (KO).	85
Abbildung 36: Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 4 Klone 1E8 (WT), 1F3 (WT) und 1H9 (WT).	86
Abbildung 37: Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 4 Klone 1A2 (KO), 9C1 (KO) und 9G9 (KO).	87
Abbildung 38: Ergebnisse der Sequenzierung der Wildtyp-Kandidaten von MERTK.	90
Abbildung 39: Ergebnisse der Sequenzierung der Knockout-Kandidaten von MERTK.	97
Abbildung 40: qPCR-Ergebnis der MERTK-Expression.	98
Abbildung 41: PCR und Restriktionsverdau der gRNA 3 (ITM2B).	101
Abbildung 42: Ergebnis der Genotypisierung der gRNA 3 Klone 4E10 (WT), 4F11 (WT) und 5H4 (WT).	102
Abbildung 43: Ergebnisse der Sequenzierung der Wildtyp-Kandidaten von ITM2B.	105
Abbildung 44: Western Blot der Knockout- und Wildtyp-Kandidaten für ITM2B.	105

9. Lebenslauf

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meine tiefe Dankbarkeit all jenen Personen aussprechen, die mich auf meinem Weg bis zum Erhalt des medizinischen Doktorgrades begleitet, unterstützt und motiviert haben.

Zuallererst möchte ich einen besonderen Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. Florian Grahammer aussprechen, der meine wissenschaftliche Arbeit sowohl durch sein fundiertes Wissen, aber auch durch seine wertschätzende und motivierende Arbeitsweise vorangetrieben hat. Für die Zeit der Zusammenarbeit bin ich sehr dankbar, da sie mich sowohl fachlich als auch menschlich geprägt und weiterentwickeln lassen hat.

Darüber hinaus gilt mein Dank PD Dr. med. Oliver Kretz, der als Zweitgutachter für meine Dissertation ebenfalls viel Zeit und Energie investiert hat.

Ich danke herzlich auch dem gesamten Team der Forschungsgruppe um Prof. Dr. med. T. B. Huber, ohne deren tägliche Unterstützung im Labor ich die Experimente nicht erfolgreich hätte abschließen können. Die gemeinsame Fehlersuche und die fachlichen Diskussionen haben mich stets ermutigt, auch in schwierigen Phasen keinesfalls aufzugeben.

Ich freue mich sehr darüber als Autorin in der Publikation „A slit-diaphragm-associated protein network for dynamic control of renal filtration“, die im Journal Nature Communications publiziert worden ist, aufgeführt zu sein und einen Teil zu dieser Arbeit beigetragen zu haben.

Meine Dissertation wurde durch das iPRIME Promotionskollegium der Else Kröner-Fresenius-Stiftung finanziell und auch im Rahmen der wissenschaftlichen Ausbildung zwölf Monate lang unterstützt, wofür ich ebenfalls sehr dankbar bin. Dies hat mir die Möglichkeit gegeben, meine volle Aufmerksamkeit der Forschung und Promotion zu widmen und ist ebenfalls ein wichtiger Teil des erfolgreichen Abschlusses.

Schließlich möchte ich mich auch von Herzen bei meinen wundervollen Eltern bedanken, die auch während dieses Lebensabschnittes stets an mich glaubten und bedingungslos hinter mir standen und mir so die nötige Kraft und Energie sowie das Durchhaltevermögen gaben. Ich hätte mir keine bessere familiäre Unterstützung hätte erträumen können.

Ebenso danke ich meinen Freunden und Kommilitonen für die interessanten Gespräche und aufbauenden Worte.

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: