

**Optimierung und Charakterisierung einer TALE-Nuklease zur  
Herstellung HIV-resistenter T-Zellen für die klinische Anwendung**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktors der Naturwissenschaften des Fachbereichs  
Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Lea Isabell Schwarze  
aus Berlin

Hamburg 2020

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in der Forschungsabteilung für Zell- und Gentherapie am Institut für Stammzelltransplantation, Zentrum für Onkologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in Hamburg (Deutschland) unter der Betreuung von Prof. Dr. Boris Fehse zwischen März 2016 und Dezember 2020 durchgeführt.

Gutachter der Dissertation:

Prof. Dr. Boris Fehse

Prof. Dr. Thomas Dobner

Die vorliegende Doktorarbeit wurde am 23. April 2021 in Anwesenheit der folgenden Prüfungskommissionsmitglieder erfolgreich verteidigt:

Prof. Dr. Julia Kehr

Prof. Dr. Boris Fehse

Prof. Dr. Sigrun Reumann

PD Dr. Kerstin Cornils

Teile der hier präsentierten Ergebnisse wurden in folgender Fachzeitschrift publiziert:

Schwarze, L.I., Głów, D., Sonntag, T., Uhde, A., Fehse, B. **Optimisation of a TALE nuclease targeting the HIV co-receptor CCR5 for clinical application.** *Gene Therapy* (2021). <https://doi.org/10.1038/s41434-021-00271-9>

Schwarze, L.I., Sonntag, T., Wild, S., Schmitz, S., Uhde, A., Fehse, B. **Automated production of CCR5-negative CD4<sup>+</sup>-T cells in a GMP-compatible, clinical scale for treatment of HIV-positive patients.** *Gene Therapy* (2021). <https://doi.org/10.1038/s41434-021-00259-5>

## Zusammenfassung

Bei einer HIV-Infektion handelt es sich um eine behandelbare, aber chronische Erkrankung, die in der Regel eine lebenslange Therapie mit antiretroviralen Medikamenten erfordert. Das Auftreten von Resistenzen, Medikamentenwechselwirkungen und Komorbiditäten machen alternative Ansätze zur Behandlung von HIV-positiven Patienten dennoch notwendig. Aus Beobachtungen ist bekannt, dass ein Fehlen des HIV-Korezeptors CCR5 (C-C Chemokinrezeptor 5) auf humanen Zellen zu einer Resistenz gegenüber den häufigsten HIV-Stämmen führt. Der CCR5-Knockout in autologen Zellen gilt in der Gentherapie als wichtiger Ansatz bei der Entwicklung alternativer Therapiestrategien für HIV-positive Patienten.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation bestand in der Optimierung der zuvor entwickelten Designernuklease CCR5-Uco-TALEN. Die optimierte TALEN sollte darüber hinaus mit dem Ziel der Translation in die klinische Anwendung umfassend charakterisiert werden. Zudem sollte ein GMP-kompatibles Protokoll zur Herstellung CCR5-edierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen entwickelt werden.

Die Untersuchungen im ersten Teil dieser Dissertation zur CCR5-Uco-TALEN Aktivität in humanen T-Zellen, bestätigten eine dosisabhängige Geneditierung am On-Target CCR5 und am Off-Target CCR2. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die CCR5-Uco-TALEN Aktivität in den meisten editierten Zellen (72 %) zu einer biallelischen Geneditierung im CCR5-Lokus führt. Die Analyse weiterer Off-Targets der CCR5-Uco-TALEN identifizierte mehrheitlich homodimere TALEN-Paare als Ursache für die CCR5-Uco-TALEN Aktivität an jenen Loci. Um diese Off-Targets zu eliminieren, wurde die bisher verwendete homodimere Fok1-Schneidedomäne in der CCR5-Uco-TALEN gegen eine obligat heterodimere Variante ausgetauscht. Die neue CCR5-Uco-hetTALEN erlaubt ebenfalls eine sehr effiziente Editierung des CCR5-Lokus und gleichzeitig eine höhere Spezifität, da außer CCR2 keine weiteren Off-Targets detektiert wurden. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die optimierte CCR5-Uco-hetTALEN in Hinblick auf ihre klinische Anwendung charakterisiert. Untersuchungen zur Kinetik am CCR5- und CCR2-Lokus wiesen auf eine Aktivität der CCR5-Uco-hetTALEN nur innerhalb der ersten 72 h nach Elektroporation hin. Gleichzeitige Schnitte an den benachbarten Loci CCR5 und CCR2 können in seltenen Fällen zu Aberrationen des dazwischen liegenden 15-kb-Fragments führen. Im finalen Zellprodukt wurden kleinste Mengen (<1 Kopie/2000 Zellen) der CCR5-Uco-hetTALEN mRNA gefunden. Im dritten Teil der Arbeit konnte mit Hilfe des CliniMACS Prodigy die erfolgreiche GMP-kompatible Produktion von bis zu 5x10<sup>9</sup> humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit bis zu 40 % biallelisch CCR5-edierten Zellen gezeigt werden. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit, die bereits in Vorarbeiten entwickelte CCR5-Uco-TALEN zur Herstellung HIV-resistenter T-Zellen für eine klinische Anwendung optimiert und ein GMP-kompatibles Protokoll zur automatisierten Produktion von autologen CCR5-edierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im großen Maßstab etabliert.

## Abstract

HIV infections are a treatable but chronic disease that almost always requires lifelong therapy with antiretroviral drugs. The appearance of drug resistance, drug interactions and comorbidities necessitate nevertheless alternative approaches for treating HIV-positive patients. Observations have revealed that knockout of the HIV coreceptor CCR5 (C-C chemokine receptor 5) in HIV target cells leads to resistance to the most abundant HIV strains. The knockout of *CCR5* in patients' own (autologous) cells has therefore been considered a promising gene-therapy approach for HIV-positive patients.

The aim of this work was to improve the previously developed designer nuclease CCR5-Uco-TALEN. In the next step, the new, optimized TALEN had to be thoroughly characterized for translation towards clinical application. The final task was the development of a GMP-compatible protocol for large-scale production of *CCR5*-edited CD4<sup>+</sup> T cells.

The experiments in the first part of this work on CCR5-Uco-TALEN activity in human T cells confirmed dose-dependent gene editing at the on-target *CCR5* and the off-target *CCR2*. It was also shown that the CCR5-Uco-TALEN activity in most edited cells (76 %) lead to biallelic gene editing in the *CCR5* locus. Characterization of other than *CCR2* off-targets identified homodimeric TALEN pairs as the main cause for CCR5-Uco-TALEN off-target activity. To eliminate those potential off-targets, the previously used homodimeric *Fok1* cleavage domain in the CCR5-Uco-TALEN was exchanged for an obligatory heterodimeric variant. For the novel and highly active CCR5-Uco-hetTALEN no off-targets (except *CCR2*) could be empirically detected anymore. In the second part of this work, the optimized CCR5-Uco-hetTALEN was characterized in accord with future clinical application. Kinetics studies at the *CCR5* and *CCR2* locus indicated nuclease activity of CCR5-Uco-hetTALEN only within the first 72 h after electroporation. Simultaneous activity of the CCR5-Uco-hetTALEN at both neighboring loci *CCR5* and *CCR2* could lead to chromosomal rearrangements of the interjacent 15-kb-fragment. In the final cell product very small residual amounts of CCR5-Uco-hetTALEN mRNA (<1 copy per 2000 cells) were detectable. In the third part of this work, a protocol for the GMP-compatible production of up to 5x10<sup>9</sup> human CD4<sup>+</sup> T cells with up to 40 % biallelic *CCR5*-edited cells was successfully established at the CliniMACS Prodigy.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	i
Abstract.....	ii
Inhaltsverzeichnis .....	iii
Abkürzungen .....	vi
Abbildungsverzeichnis.....	x
Tabellenverzeichnis.....	xiii
1 Einleitung.....	- 1 -
1.1 HIV – Epidemie.....	- 1 -
1.1.1 Verlauf einer HIV-Infektion .....	- 1 -
1.1.2 HIV-Stämme .....	- 2 -
1.1.3 Aufbau und Biologie von HIV.....	- 3 -
1.1.4 Der Replikationszyklus von HIV .....	- 5 -
1.2 T-Zellen und CCR5 in HIV-Infektionen.....	- 6 -
1.2.1 Der HIV-Korezeptor CCR5 .....	- 8 -
1.2.2 Das <i>CCR5</i> -Gen und seine Genvarianten .....	- 9 -
1.2.3 Behandlung von HIV-Infektionen.....	- 10 -
1.3 Neue Therapieansätze für HIV-Infektionen .....	- 13 -
1.3.1 Geneditierung mittels Designernukleasen.....	- 14 -
1.3.2 TALE Nukleasen.....	- 16 -
1.3.3 Zelluläre Reparaturmechanismen zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen.....	- 18 -
1.3.4 TALEN-vermittelte Geneditierung von T-Zellen durch die CCR5-Uco-TALEN .....	- 20 -
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit .....	- 21 -
2 Material .....	- 22 -
2.1 Geräte.....	- 22 -
2.2 Verbrauchsmaterial .....	- 23 -
2.3 Kommerzielle Kits .....	- 25 -
2.4 Chemikalien und Reagenzien.....	- 25 -
2.5 Puffer und Medien .....	- 26 -
2.6 Enzyme und verwendete Puffer .....	- 27 -
2.7 Antikörper .....	- 27 -
2.8 Humane Zellen und Bakterien .....	- 28 -
2.9 Plasmide .....	- 28 -
2.10 mRNA .....	- 28 -
2.11 Synthetisierte Genfragmente.....	- 29 -
2.12 Software.....	- 29 -
2.13 Oligonukleotide.....	- 29 -
2.13.1 Primer für die digitale PCR und scHRMCA .....	- 29 -
2.13.2 Primer für Sequenzierungen, Klonierung und qPCR.....	- 30 -

2.13.3	Sonden .....	- 30 -
2.14	Angesetzte Puffer und Medien .....	- 31 -
3	Methoden.....	- 35 -
3.1	Isolation von genomischer DNA .....	- 35 -
3.2	Isolation von RNA aus Zellen .....	- 35 -
3.3	cDNA-Synthese für die RT-qPCR .....	- 36 -
3.4	Sanger-Sequenzierung von DNA .....	- 36 -
3.5	Amplikon-basiertes <i>Next-Generation Sequencing</i> .....	- 37 -
3.6	Ligation von DNA-Fragmenten .....	- 38 -
3.7	Transformation von chemisch kompetenten Bakterien .....	- 38 -
3.8	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	- 39 -
3.9	Restriktion von DNA .....	- 40 -
3.10	Agarosegelelektrophorese.....	- 40 -
3.11	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	- 41 -
3.12	Anlagerung von Oligonukleotiden für die Klonierung .....	- 41 -
3.13	Polymerase-Kettenreaktion .....	- 41 -
3.13.1	Amplifikation von Plasmid-DNA zur anschließenden Klonierung.....	- 42 -
3.13.2	PCR-basierte Mutagenese zur Einführung neuer Restriktionsschnittstellen.....	- 42 -
3.13.3	<i>Droplet digital PCR</i> .....	- 42 -
3.13.4	ddPCR zur Bestimmung der Geneditierungsrate .....	- 43 -
3.13.5	ddPCR zur Identifikation von chromosomalen Aberrationen .....	- 44 -
3.13.6	ddPCR zur Bestimmung der relativen Kopienzahl .....	- 44 -
3.13.7	Quantitative Echtzeit-PCR.....	- 44 -
3.13.8	RT-qPCR zum Nachweis von CCR5-Uco-hetTALEN Kopien in cDNA Proben .....	- 46 -
3.13.9	RT-qPCR zum Nachweis von CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmiden .....	- 46 -
3.14	Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse auf Einzelzellen .....	- 46 -
3.15	Einzelzellablage für die schRMCA.....	- 48 -
3.16	Design von codonoptimierten <i>Fok1</i> -Varianten .....	- 49 -
3.17	Klonierung codonoptimierten <i>Fok1</i> -Varianten in die CCR5-Uco-TALEN .....	- 49 -
3.18	Klonierung von pCCR5-Uco-hetTALENpoly(A)-KanR.....	- 50 -
3.19	Isolation von primären, humanen mononukleären Zellen .....	- 50 -
3.20	Isolation von primären, humanen CD4 <sup>+</sup> - Zellen aus PBMCs .....	- 52 -
3.21	Kryokonservierung von humanen Zellen.....	- 52 -
3.22	Auftauen von kryokonservierten humanen Zellen .....	- 52 -
3.23	Aktivierung und Kultivierung von primären, humanen Zellen .....	- 53 -
3.24	Kultivierung von T-Zelllinien .....	- 53 -
3.25	Zellzahlbestimmung mittels Neubauerzählkammer.....	- 53 -
3.26	In vitro Transkription von mRNA.....	- 50 -
3.27	Elektroporation von T-Zellen mit mRNA.....	- 54 -
3.28	Durchflusszytometrie am BD FACS Canto II.....	- 55 -
3.29	Färbung von Zellen für die Messung am MACSQuant.....	- 55 -

3.30	Durchflusszytometrie am MACSQuant.....	- 55 -
3.31	Vorbereitungen für den Prozess am CliniMACS Prodigy.....	- 56 -
3.32	Installation des Tubing Sets für den TCE am CliniMACS Prodigy.....	- 57 -
3.33	TCE Prozess am CliniMACS Prodigy.....	- 57 -
4	Ergebnisse.....	- 59 -
4.1	Charakterisierung der CCR5-Uco-TALEN Aktivität.....	- 59 -
4.1.1	CCR5-Uco-TALEN zeigte einen starken Dosiseffekt am Off-Target <i>CCR2</i> .....	- 59 -
4.1.2	Biallelische <i>CCR5</i> -Editierung bei TALEN-behandelten T-Zellen.....	- 60 -
4.1.3	Die CCR5-Uco-TALEN weist Off-Target Aktivität an mindestens 3 Genloci auf.....	- 61 -
4.2	Optimierung der CCR5-Uco-TALEN für klinische Anwendungen.....	- 63 -
4.2.1	Heterodimere CCR5-Uco-TALEN verringert die Anzahl potenzieller Off-Targets.....	- 63 -
4.2.2	Plasmid-integrierte Poly(A)-Sequenz erlaubte eine effiziente mRNA-Produktion.....	- 66 -
4.2.3	CCR5-Uco-hetTALEN mRNA vermittelt hohe <i>CCR5</i> - und niedrige <i>CCR2</i> - Indelraten.....	- 67 -
4.3	Charakterisierung der CCR5-Uco-hetTALEN-Aktivität.....	- 68 -
4.3.1	CCR5-Uco-hetTALEN-Aktivität zeigte eine Spenderabhängigkeit.....	- 69 -
4.3.2	Die Off-Target-Aktivität der CCR5-Uco-hetTALEN führt zu Aberrationen.....	- 70 -
4.3.3	Die TALEN-Aktivität führt vorwiegend zu Deletionen in primären T-Zellen.....	- 72 -
4.3.4	Nur <i>CCR2</i> stellt ein Off-Target der CCR5-Uco-hetTALEN dar.....	- 74 -
4.3.5	Anzahl der CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien sank im analysierten Zeitraum stark.....	- 75 -
4.3.6	144 h nach Elektroporation ist kein CCR5-Uco-hetTALEN Plasmid nachweisbar.....	- 77 -
4.4	GMP-kompatible Produktion von TALEN modifizierten CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen.....	- 78 -
4.4.1	Etablierung eines GMP-kompatiblen Prozesses am CliniMACS Prodigy.....	- 78 -
4.4.2	Effiziente Anreicherung der CD4 <sup>+</sup> -Zellen am CliniMACS Prodigy.....	- 79 -
4.4.3	Die Zellexpansion am CliniMACS Prodigy generierte bis zu 5x10 <sup>9</sup> lebende Zellen..	- 81 -
4.4.4	Expandierte Zellen (~ 53 % - 73 %) waren meist Effektor-Gedächtnis-T-Zellen.....	- 82 -
4.4.5	Die <i>CCR5</i> -Editierung war in allen TCE-Läufen hoch (> 59 %)......	- 83 -
4.4.6	Geringe Frequenz lokaler chromosomaler Aberrationen.....	- 84 -
4.4.7	TCE-produzierte Zelle zeigten biallelisch <i>CCR5</i> -Editierungen (> 60 %)......	- 84 -
4.4.8	Finale Produkte der TCE-Läufe wiesen CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien auf.....	- 85 -
4.4.9	Keine CCR5-Uco-hetTALEN-Aktivität in 9 der 10 untersuchten Off-Targets.....	- 86 -
5	Diskussion.....	- 88 -
5.1	Charakterisierung der CCR5-Uco-TALEN On- und Off-Target Aktivitäten.....	- 88 -
5.2	Optimierung der CCR5-Uco-TALEN für klinische Anwendungen.....	- 90 -
5.3	Charakterisierung der CCR5-Uco-hetTALEN für klinische Anwendungen.....	- 91 -
5.4	Etablierung eines GMP-kompatiblen Prozesses für die Produktion <i>CCR5</i> -editierter CD4 <sup>+</sup> - Zellen.....	- 95 -
6	Literaturverzeichnis.....	- 98 -
	Anhang.....	I
	Danksagung.....	XIX
	Eidesstattliche Versicherung.....	XXI

## Abkürzungen

°C – Grad Celsius

µg – Mikrogramm

µL – Mikroliter

AIDS – Erworbenes Immunschwächesyndrom (engl. *acquired immune deficiency syndrome*)

BHQ – *Dark Quencher (Black hole quencher)*

bp – Basenpaar/Basenpaare

Cas – CRISPR-assoziiertes Protein

CAR – Chimärer Antigenrezeptor (engl. *chimeric antigen receptor*)

cART – antiretrovirale Kombinationstherapie (engl. *combined antiretroviral therapy*)

CCL – CC-Chemokinligand

CCR2 – CC-Motiv-Chemokinrezeptor 2

CCR5 – CC-Motiv-Chemokinrezeptor 5

CCR5Δ32 – Deletion von 32 Basenpaaren im *CCR5*-Gen

CD – *cluster of differentiation*

cDNA – komplementäre DNA (Produkt beim Umschreiben von RNA in DNA)

CRISPR – *Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats*

C-Terminus – Carboxyterminus

C<sub>p</sub> – Schwellenwertzyklus (engl. *crossing point cycle*)

CXCR4 – CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4

dATP – Desoxyadenosintriphosphat

DBS – Doppelstrangbruch

dCTP – Desoxycytidintriphosphat

ddPCR – *droplet digital PCR*

Delta (Δ) – Deletierter Bereich im Gen oder Protein

dGTP – Desoxyguanosintriphosphat

dKO – doppelter Knockout der Gene *CCR5* und *CCR2*

DNA – Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*)

dNTP – Desoxyribonukleosidtriphosphat

DMSO – Dimethylsulfoxid

DPBS – Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

dsDNA – doppelsträngige DNA

dTTP – Desoxyribonukleosidtriphosphat

dUTP – Desoxyuriditriphosphat

ECL – extrazelluläre Schlaufen (engl. *extracellular loop*)

EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure

Elpo – Elektroporation

Env – Hüllproteine von HIV

EPOR – humaner Erythropoietinrezeptor

FAM – Carboxyfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff – Absorption: 495 nm, Emission: 517 nm)

FBS – Fetales Rinderserum

*Fok1* – *Flavobacterium okeanoikoites* Restriktionsenzym

FSC – Vorwärtsstreuung (engl. *forward scatter*)

g – Gramm

*g* – Erdbeschleunigung

Gag – Gruppen-spezifische Antigen von HIV (Proteine: p17, p24 und p7)

gDNA – genomische DNA

GEF-dPCR – *gene editing frequency digital* PCR

GMP – Gute Herstellerpraxis (engl. *good manufacturing praxis*)

GPCR – G-Protein gekoppelter Rezeptor

h – Stunde

HDR – Homologie-vermittelte Reparatur (engl. *homologie-directed repair*)

HEX – Hexachlorfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff – Absorption: 535 nm, Emission: 556 nm)

HIV – humanes Immundefizienz Virus (engl. *human immunodeficiency virus*)

ICL – intrazelluläre Schlaufe (engl. *intracellular loop*)

Indels – Insertionen und Deletionen

Ins – Insertion

Inv – Inversion

IL-2 – Interleukin-2

IL-7 – Interleukin-7

IL-15 – Interleukin-15

IU – Internationale Einheit für Stoffmengen

IVT – in vitro Transkription

kb – Kilobase

kDA – Kilodalton (Einheit für Proteingrößen)

KO – Knockout

l – Liter

LeGO – lentivirale Genontologie Vektoren (engl. *lentiviral gene ontology vector*)

LTR – terminale, repetitive DNA-Sequenzen (engl. *long terminal repeat*)

LRA – *latency reversing agent*

n – Anzahl

Nef – *negative effector*

n.d. – nicht detektierbar

ng – Nanogramm

ns – nicht signifikant

NHEJ – nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung (engl. *non-homologous end-joining*)

NNRTIS – Nicht-nukleosidalen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

NRTIS – Nukleotid- und Nukleosidanalogue-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

MCP-2 – *Monocyte chemotactic protein two* (CCR5 Ligand)

min – Minute

Mio – Millionen

MIP-1 $\alpha$  – *Macrophage inflammatory protein one alpha* (CCR5 Ligand)

MIP-1 $\beta$  – *Macrophage inflammatory protein one beta* (CCR5 Ligand)

MMEJ – Mikrohomologie-basierte End-zu-End-Verknüpfung (engl. *microhomologie-mediated end joining*)

mRNA – *messenger RNA*

ORF – offener Leserahmen (engl. *open reading frame*)

PAM – *protospacer adjacent motif* (Erkennungssequenz für das CRIPRS/Cas-System)

PCR – Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*)

PMBCs – Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells*)

Poly(A) – Polyadenylierung

QC – Qualitätskontrolle (engl. *quality control*)

qPCR – quantitative PCR

RANTES – *Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted* (CCR5 Ligand)

RCN – relative Kopienzahl (engl. *relative copy number*)

Rev – Regulator für Virus-Proteinexpression

RNA – Ribonukleinsäure

rpm – Umdrehungen pro Minute (engl. *rounds per minute*)  
RT – Raumtemperatur  
RT-qPCR – quantitative Echtzeit-PCR  
RVD – variable Aminosäuren in TALE- Monomeren (engl. *repeat variable diresidue*)  
s – Sekunde  
SD – Standardabweichung  
schRMCA – hochauflösende Schmelzkurven Analyse auf Einzelzellen  
SSC – Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*)  
TAE – Tris/Acetat/EDTA Puffer  
TALE – transkriptionsaktivatorartige Effektor (engl. *transcription activator-like effector*)  
TALEN – transkriptionsaktivatorartige Effektornuklease  
Tat – *trans*-Aktivator der Transkription  
Taq – *Thermus aquaticus* Polymerase  
TCE – *T Cell Engineering Process* (Definierter Prozess am CliniMACS Prodigy)  
Th<sub>1</sub> – T-Helferzellen Typ 1  
Th<sub>2</sub> – T-Helferzellen Typ 2  
T<sub>m</sub> – Schmelztemperatur  
TM – Transmembrandomäne  
Tris – Tris(hydroxymethyl)aminomethane  
U – Weiss (Einheit für die Enzymaktivität)  
USV – Unterbrechungsfreie Stromversorgung  
UNAIDS – Programm der Vereinten Nationen zur Bekämpfung von HIV/AIDS  
USD – amerikanische Dollar  
UTR – untranslatierte Region eines Gens  
V – Volt  
Vol.-% – Volumenprozent  
Vif – *viral infectivity factor*  
Vpr – virales Protein R  
Vpu – virales Protein U  
WHO – Weltgesundheitsorganisation (engl. *world health organisation*)  
ZFN – Zinkfinger nukleasen

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: R5- und X4-HIV-Stämme.. .. .	- 3 -
Abbildung 2: Struktureller und genomischer Aufbau von HIV.. .. .	- 4 -
Abbildung 3: Replikationszyklus von HIV. ....	- 6 -
Abbildung 4: Darstellung des C-C-Motiv-Chemokinrezeptor 5 (CCR5) .....	- 8 -
Abbildung 5: Klassen von antiretroviralen Medikamenten und ihr Wirkungsort im HIV- Replikationszyklus .....	- 11 -
Abbildung 6: Schematische Darstellung häufig verwendeter Designernukleasen.....	- 16 -
Abbildung 7: Schematische Darstellung einer TALE-Nuklease gebunden an ihre Zielsequenz. ....	- 17 -
Abbildung 8: Bildung von TALEN-Paaren mit Wildtyp beziehungsweise heterodimerer <i>Fok1</i> .....	- 18 -
Abbildung 9: Zelluläre Reparaturmechanismen von Doppelstrangbrüchen.....	- 19 -
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Amplikon <i>Next Generation Sequencing</i> .....	- 37 -
Abbildung 11: Ablauf einer <i>droplet digital PCR</i> (ddPCR). ....	- 43 -
Abbildung 12: Darstellung der quantitativen Echtzeit-PCR.....	- 45 -
Abbildung 13: Darstellung der hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse auf Einzelzellen.....	- 48 -
Abbildung 14: CCR5-Uco-TALEN mRNA zeigte deutliche Dosiseffekte für die <i>CCR5</i> - und <i>CCR2</i> -Loci.. .....	- 59 -
Abbildung 15: Die Mehrheit der modifizierten Zellen wies eine biallelische Geneditierung am <i>CCR5</i> - Lokus auf .....	- 60 -
Abbildung 16: ampNGS-Daten zeigten keine CCR5-Uco-TALEN-Aktivität in 5 der 10 analysierten Off- Targets.....	- 62 -
Abbildung 17: Nachweis einer CCR5-Uco-TALEN-Aktivität für die Loci <i>CCR5</i> , <i>CCR2</i> , <i>GPC5</i> und <i>RAPGEF2</i> per ampNGS.....	- 62 -
Abbildung 18: ampNGS-Daten zeigten unterschiedliche Indellängen für <i>CCR2</i> , <i>GPC5</i> , <i>RAPGEF2</i> , <i>LDOC1</i> und <i>VWA8</i> in den einzelnen Proben auf. ....	- 63 -
Abbildung 19: Schematische Darstellung der codonoptimierten <i>Fok1</i> -Varianten.....	- 64 -
Abbildung 20: On- und Off-Target Aktivität der heterodimeren CCR5-Uco-TALEN-Varianten.....	- 65 -
Abbildung 21: Die Einführung einer Poly(A)-Sequenz in das IVT-Plasmid der CCR5-Uco-hetTALEN erlaubt die Produktion funktionaler mRNA ohne eine enzymatische Polyadenylierung. ....	- 67 -
Abbildung 22: Die optimale Konzentration der GMP-ähnlich produzierten CCR5-Uco-hetTALEN mRNA lag zwischen 2,5 µg bis 7,5 µg. ....	- 68 -

Abbildung 23: CCR5-Uco-hetTALEN-Aktivität an On-Target <i>CCR5</i> und Off-Target <i>CCR2</i> war nur innerhalb der ersten 72 h detektierbar. ....	- 69 -
Abbildung 24: Die relative Kopienzahl ( <i>relative copy number</i> , RCN) von <i>CCR5</i> versus <i>EPOR</i> ist zu allen Analysezeitpunkten nach TALEN-Behandlung reduziert.....	- 70 -
Abbildung 25: Größere Deletionen in der TALEN-Bindestelle können zum Signalverlust der Referenzsonde führen. ....	- 71 -
Abbildung 26: Mögliche chromosomale Aberrationen induziert durch die gleichzeitige Bildung von Doppelstrangbrüchen (DSB) in den benachbarten Genen <i>CCR5</i> und <i>CCR2</i> .....	- 71 -
Abbildung 27: Aktivität der CCR5-Uco-hetTALEN führt zu chromosomalen Aberrationen zwischen <i>CCR2</i> und <i>CCR5</i> .....	- 72 -
Abbildung 28: Die hohe Aktivität der CCR5-Uco-hetTALEN am <i>CCR5</i> -Lokus führt hauptsächlich zu Deletionen.....	- 73 -
Abbildung 29: ampNGS-Daten bestätigen Aktivität der CCR5-Uco-hetTALEN am <i>CCR2</i> -Lokus.....	- 74 -
Abbildung 30: Im <i>CCR2</i> -Lokus wurden am häufigsten Indels mit einer Länge von 1 bp, 10 bp und 9 bp gefunden.....	- 75 -
Abbildung 31: CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien sanken deutlich innerhalb von 216 h nach Elektroporation .....	- 76 -
Abbildung 32: CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmidkopien sind 144 h nach Elektroporation nicht mehr nachweisbar .....	- 77 -
Abbildung 33: Übersicht des automatisierten <i>T Cell Engineering</i> (TCE)-Prozesses am CliniMACS Prodigy.....	- 79 -
Abbildung 34: Der automatisierte TCE-Prozess ermöglichte eine effiziente Trennung lebender CD4 <sup>+</sup> -Zellen in Lauf 1 - 4.....	- 80 -
Abbildung 35: Bilder der T-Zellkultur wiesen auf eine Aktivierung der T-Zellen hin.....	- 81 -
Abbildung 36: Der automatisierte TCE-Prozess ermöglichte eine effiziente Expansion der T-Zellen.....	- 82 -
Abbildung 37: Die phänotypische Charakterisierung expandierter Zellen im TCE-Lauf (2 - 4) zeigte eine hohe Rate an Effektor-Gedächtnis-T-Zellen.....	- 83 -
Abbildung 38: Geneditierungen im <i>CCR5</i> - und <i>CCR2</i> -Lokus in TALEN-behandelten Zellen aus den TCE-Läufen 1 - 4. ....	- 83 -
Abbildung 39: Das finale Produkt aus dem TCE Prozess wies Translokationen auf.....	- 84 -
Abbildung 40: Die Mehrheit der modifizierten Zellen wies eine biallelische Geneditierung am <i>CCR5</i> -Lokus auf.....	- 85 -
Abbildung 41: Das finale Zellprodukt enthielt nur wenige CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien.....	- 86 -
Abbildung 42: Auch für die TCE-Läufe wurde per ampNGS nur <i>CCR2</i> als definitives CCR5-Uco-hetTALEN Off-Target identifiziert. ....	- 87 -

Abbildung 43: ampNGS-Daten zeigten ähnliche <i>CCR2</i> Off-Target und <i>CCR5</i> On-Target Aktivität der <i>CCR5</i> -Uco-heTALEN in den TCE-Läufen (1 - 4) wie in den Experimenten im Labormaßstab... ..	- 87 -
Abbildung S1: Auswertung der Proben aus der GEF-dPCR anhand von zwei Beispielplots.. .....	V
Abbildung S2: Beispielplot für die Auswertung der Proben aus der ddPCR für den Nachweis von chromosomalen Aberrationen.. .....	V
Abbildung S3: Beispielplot für die Auswertung der Proben aus der ddPCR für den Nachweis der relativen Kopienzahlen (RCN).. .....	V
Abbildung S4: Standardkurven der <i>CCR5</i> -Uco-hetTALEN Plasmid-Verdünnungsreihen zum Nachweis von <i>CCR5</i> -Uco-hetTALEN mRNA und Plasmid.. .....	VI
Abbildung S5: Schematische Darstellung der <i>CCR5</i> -Uco-TALEN im Vektor. ....	VI
Abbildung S6: Darstellung der Klonierung einer <i>XhoI</i> -Schnittstelle in die TALEN-Plasmide zur nachfolgenden Einführung einer codonoptimierten <i>Fok1</i> -Variante.....	VIII
Abbildung S7: Darstellung der Klonierung für die Einführung der <i>Fok1</i> -Varianten in die <i>CCR5</i> -Uco-TALEN. ....	IX
Abbildung S8: Austausch der Ampicillinresistenz in den <i>CCR5</i> -Uco-hetTALEN Plasmiden (p <i>CCR5</i> -Uco-TALEN- <i>Fok1</i> (ELD) L und p <i>CCR5</i> -Uco-TALEN- <i>Fok1</i> (KKR) R) gegen ein Kanamycinresistenzgen. ....	X
Abbildung S9: Einführung einer Poly(A)-Sequenz in die <i>CCR5</i> -Uco-hetTALEN Plasmide (p <i>CCR5</i> -Uco-TALEN- <i>Fok1</i> (ELD)_KanR L und p <i>CCR5</i> -Uco-TALEN- <i>Fok1</i> (KKR)_KanR R).....	XI
Abbildung S10: Gatingstrategie zum durchflusszytometrischen Nachweis der GFP-Expression nach einer Elektroporation mit GFP-mRNA. ....	XII
Abbildung S11: Abbildung des CliniMACS Prodigy und dem CliniMACS Electroporator mit installiertem Tubing Set TS 520 und EP2.....	XII
Abbildung S12: Anzahl der <i>Reads</i> aus den Daten der ampNGS für die <i>CCR5</i> -Uco-TALEN. ....	XIV
Abbildung S13: Anzahl der <i>Reads</i> aus den Daten der ampNGS für die <i>CCR5</i> -Uco-hetTALEN. ....	XV
Abbildung S14: Indelraten aus den Daten der ampNGS für die <i>CCR5</i> -Uco-hetTALEN.....	XVI
Abbildung S15: Keine nachgewiesene Integration des Produktionsplasmids in den geschnittenen <i>CCR5</i> -Lokus im Bereich der <i>CCR5</i> -Uco-hetTALEN-Bindestelle.....	XVII
Abbildung S16: Anzahl der <i>Reads</i> aus den Daten der ampNGS für die <i>CCR5</i> -Uco-hetTALEN-behandelten Zellen aus den TCE-Prozessen.....	XVIII

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Probenmengen und Konzentrationen für die Sanger-Sequenzierung .....	- 36 -
Tabelle 2: Restriktionsansätze für unterschiedliche Anwendungen.....	- 40 -
Tabelle 3: RT-qPCR-Programm .....	- 45 -
Tabelle 4: PCR-Programm der 2. PCR für die schRMCA .....	- 47 -
Tabelle S1: Parameter für die <i>in silico</i> Berechnung von Off-Targets mittels dem Paired Target Finder. I	I
Tabelle S2: Parameter für die <i>in silico</i> Berechnung von Off-Targets mittels dem PROGNOSE.....	I
Tabelle S3: Ergebnisse der <i>in silico</i> Berechnung von Off-Targets mittels dem Paired Target Finder und PROGNOSE für die homodimere CCR5-Uco-TALEN innerhalb der ersten 10 Ränge.....	I
Tabelle S4: Ergebnisse der <i>in silico</i> Berechnung von Off-Targets mittels dem Paired Target Finder und PROGNOSE für die heterodimere CCR5-Uco-TALEN innerhalb der ersten 15 Ränge.....	II
Tabelle S5: Ausgewählte Off-Targets der homodimeren CCR5-Uco-TALEN für die ampNGS.....	II
Tabelle S6: Ausgewählte Off-Targets der homodimeren CCR5-Uco-TALEN für die ampNGS.....	III
Tabelle S7: Für ampNGS verwendeten Proben aus den Experimenten im Labormaßstab. ....	III
Tabelle S8: Angaben zum Lokustyp und Position im humanen Genom für die untersuchten On- und Off-Targets der CCR5-Uco-TALEN.....	IV
Tabelle S9: Angaben zum Lokustyp und Position im humanen Genom für die untersuchten On- und Off-Targets der heterodimeren CCR5-Uco-hetTALEN.. ....	IV
Tabelle S10: Parameter für das webbasierte Programm CRIPRESSO 2.0.....	IV
Tabelle S11: Sequenzen der eingefügten DNA-Fragmente mit den condonoptimierten <i>Fok1</i> -Varianten .....	VII
Tabelle S12: Angaben zu den Proben bezüglich der verwendeten GFP-mRNA-Menge und dem Medium.....	XII
Tabelle S13: Aktivitätsmatrix für den TCE-Prozess .....	XIII
Tabelle S14: Zellzahlen und mRNA-Mengen für die TCE-Prozesse .....	XIII
Tabelle S15: Elektroporationsparameter für den TCE-Prozess am CliniMACS Prodigy .....	XIII

# 1 Einleitung

## 1.1 HIV – Epidemie

Vor etwa 40 Jahren häuften sich die Meldungen über eine bis dahin unbekannte erworbene Immunschwäche (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS). Die betroffenen Patienten entwickelten opportunistische Erkrankungen, wie durch Mykose hervorgerufenen Lungenentzündungen oder seltene Krebserkrankungen wie das Kasposi-Sarkom.<sup>1-4</sup> Wenige Jahre später wurde das humane Immundefizienz Virus (HIV) als der ursächliche Erreger für AIDS identifiziert.<sup>5-8</sup> Seit seiner Entdeckung hat sich HIV weltweit ausgebreitet und laut Schätzung von UNAIDS starben in dieser Zeit knapp 33 Millionen (Mio.) Menschen an den Folgen. 2019 waren schätzungsweise 38 Mio. Menschen weltweit mit HIV infiziert, davon circa 1,8 Mio. Kinder unter 14 Jahren und etwa 690 000 Menschen starben an den Folgen von AIDS.<sup>9</sup> Mehr als zwei Drittel aller Menschen mit einer HIV-Infektion leben in Afrika. In Europa und Zentralasien (WHO Region Europa) liegt die Anzahl an HIV-positiven Menschen bei etwa 2,3 Mio. Mit der Entdeckung von HIV begann auch die Forschungen zu antiretroviralen Medikamenten. Enorme Fortschritte in diesem Feld resultierten in der Entwicklung der antiretroviralen Kombinationstherapie (*combined antiretroviral therapy*, cART), die aus den zuvor lebensbedrohlichen HIV-Infektionen eine behandelbare, chronische Erkrankung machten. Im Jahr 2013 führte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die 90-90-90 Initiative ein. Demnach sollten bis zum Jahr 2020 jeweils mindestens 90 % aller Infizierten ihren HIV-Status kennen, 90 % dieser HIV-positiven Menschen sollten unter cART stehen und von denen sollten ebenfalls 90 % viral supprimiert sein. Dieses Ziel wurde bisher leider nicht erreicht. Schätzungen zu Folge wissen nur etwa 81 % der HIV-infizierten Menschen von ihrer Infektion, davon sind nur rund 67 % in Behandlung und bei etwa 59 % ist die Virämie unter Kontrolle.<sup>10</sup> Es existieren zwei Arten von HIV, HIV-1 und -2, wobei HIV-1 Auslöser der Pandemie ist und etwa 98 % aller HIV-Infektionen ausmacht. HIV-2 hat eine geringere Übertragungsrate und eine längere chronische Phase.<sup>11</sup> Die folgende Arbeit bezieht sich ausschließlich auf HIV-1.

### 1.1.1 Verlauf einer HIV-Infektion

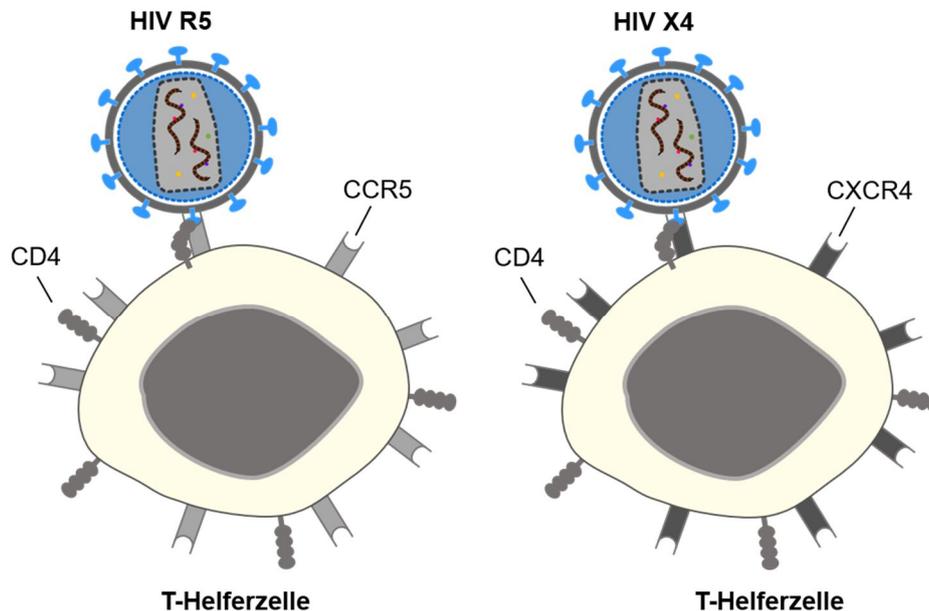
Nach einer Infektion mit HIV steigt die Plasmakonzentration an HI-Virus innerhalb weniger Wochen stark an. HIV infiziert hauptsächlich CD4<sup>+</sup>-Zellen vor allem T-Helferzellen, deren Anzahl anfangs durch die Infektion kurzzeitig stark absinkt und anschließend wieder auf das Vorniveau ansteigt.<sup>12-14</sup> Neben den peripheren T-Helferzellen werden ebenfalls die gewebespezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von HIV infiziert. Eines der ersten betroffenen Gewebe ist der gastrointestinale Trakt. Dort werden die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen schnell und vermutlich dauerhaft von HIV zerstört.<sup>15-17</sup> In dieser als akute Phase bezeichneten Zeitraum, disseminiert das

HI-Virus in das lymphatische Gewebe und etabliert dort ein Reservoir.<sup>18,19</sup> Dabei handelt es sich um langlebige Zellen, die replikationskompetente, aber inaktive HI-Viren enthalten. Neben T-Helferzellen infiziert HIV auch andere CD4<sup>+</sup>-Zellen wie Makrophagen und unreife dendritische Zellen. Diese Zelltypen können, neben ruhenden T-Helferzellen ebenfalls Teil des Reservoirs sein. Das virale Reservoir stellt für die Eradikation von HIV ein zentrales Problem dar, da diese Zellen weder durch das Immunsystem noch durch eine antiretrovirale Therapie eliminiert werden können. Im Anschluss an die akute Phase folgt die chronische Phase, mit niedrigen bis nicht-detektierbaren HIV-Plasmakonzentrationen und wieder, diesmal langsam fallenden T-Helfer-Zellzahlen. Diese Phase ist meist symptomlos und kann mehrere Jahre dauern.<sup>20</sup> Neben der Abnahme CD4<sup>+</sup>-T-Zellen weist das Immunsystem HIV-positiver Individuen häufig Anzeichen einer chronischen Entzündung und Ermüdungserscheinungen (engl. *Exhaustion*) der T-Zellen auf.<sup>21–23</sup> Bei unbehandelten Patienten folgt darauf meist die 3. Phase der HIV-Infektion, AIDS, mit wieder ansteigenden HI-Virus Plasmakonzentrationen und niedrigen T-Helferzellzahlen unter einen kritischen Wert von 200 Zellen pro Mikroliter Blutplasma. Auf Grund des geschwächten Immunsystems entwickeln Patienten vermehrt opportunistische Infektionen und maligne Erkrankungen. Ohne eine entsprechende Therapie sterben die meisten AIDS-Patienten an den Folgeerkrankungen innerhalb von zwei bis vier Jahren.<sup>24</sup> Nur ein kleiner Anteil HIV-positiven Menschen ist in der Lage, eine HIV-Infektion ohne Behandlung und ohne Progression zu AIDS selbständig zu kontrollieren (< 10 %). Die Mechanismen für diese Kontrolle sind divers und bis heute nicht vollständig geklärt.<sup>25–29</sup>

### 1.1.2 HIV-Stämme

HIV benötigt für die Infektion einer Zelle neben dem CD4-Rezeptor noch einen weiteren Rezeptor, Korezeptor genannt. Zwar konnten in Zellkulturexperimenten mehrere mögliche Korezeptoren von HIV identifiziert werden, allerdings sind in vivo nur zwei Rezeptoren von Bedeutung, der C-C-Motiv-Chemokinrezeptor 5 (CCR5) und der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4).<sup>30–32</sup> HIV-Stämme, die den CXCR4-Rezeptor verwenden werden als X4-Stämme bezeichnet. Am häufigsten allerdings sind die R5-Stämme (Abbildung 1), die CCR5 als Korezeptor verwenden und neben den T-Helferzellen auch in der Lage sind dendritische Zellen und Makrophagen zu infizieren. Während der initialen Infektion werden meist nur R5-Stämme detektiert. Selbst bei Übertragungen beider Stämme von einem HIV positiven Individuum dominieren (95 %) die R5-Varianten am Anfang der Infektion, möglicherweise deshalb, weil Makrophagen die besten Zellen für eine initiale Etablierung des Virus darstellen.<sup>33–36</sup> Beobachtungen in HIV-Hochrisikogruppen zeigten, dass eine verminderte oder fehlende Expression von CCR5 auf Zielzellen zu einer fast vollständigen Resistenz gegenüber R5-HIV-Stämmen führt.<sup>37–40</sup> Im Verlauf der HIV-Infektion wird bei 40 - 50 % der Menschen ein Wechsel von R5- zur X4-Stämmen beobachtet. X4-Stämme infizieren vor allem

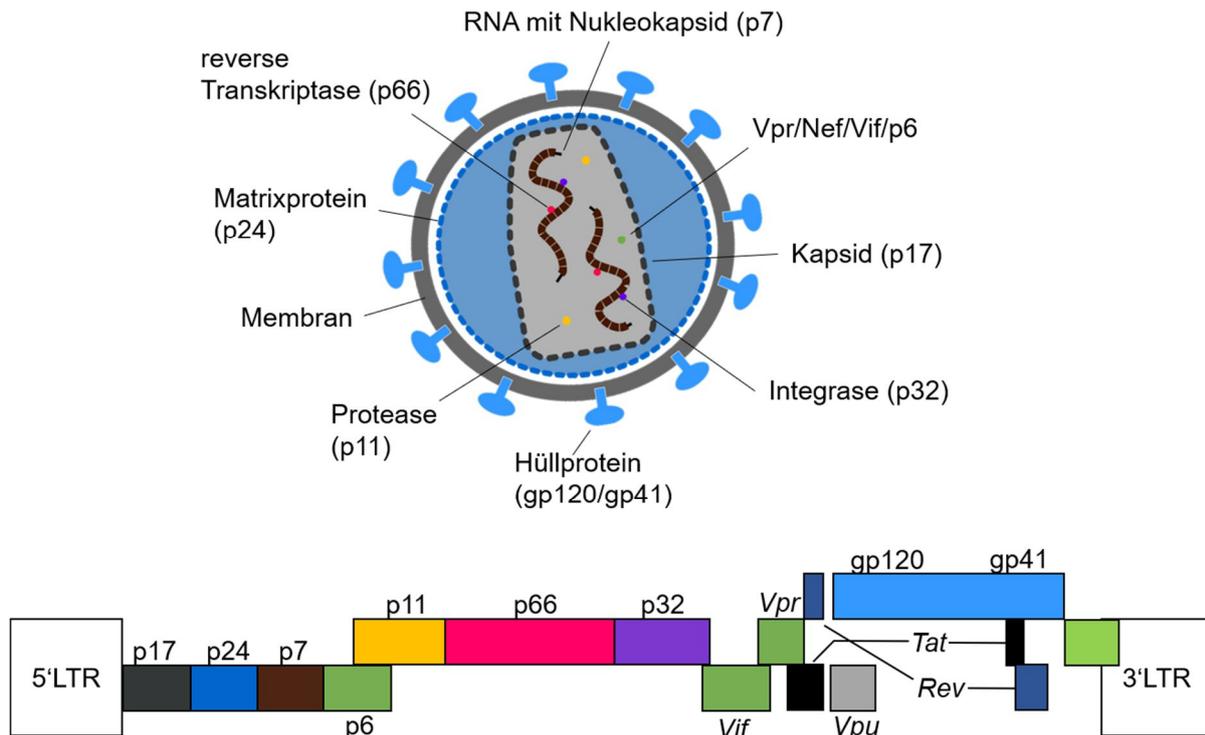
naïve und ruhende T-Zellen, replizieren schneller und werden als pathogener angesehen.<sup>35,41</sup> Der Wechsel führt häufig zu einem beschleunigten Verlust von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und einer schnelleren Krankheitsprogression.<sup>41-44</sup>



**Abbildung 1: R5- und X4-HIV-Stämme.** Schematische Darstellung der Bindung eines HI-Virus an eine T-Helferzelle. HIV verwendet für die Infektion der Zelle den CD4-Rezeptor und einen Korezeptor. Bei letzterem handelt es sich entweder um den CC-Motiv-Chemokinrezeptor 5 (CCR5) oder den CXC-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4). HIV-Stämme, die CCR5 als Korezeptor verwenden werden als R5 bezeichnet. X4-Stämme verwenden den CXCR4 Rezeptor.

### 1.1.3 Aufbau und Biologie von HIV

HIV gehört zu den sogenannten Retroviren und besitzt ein diploides, einzelsträngiges RNA-Genom mit einer Länge von etwa 9.700 Basen. Neben den zwei Kopien des RNA-Genoms enthält ein reifer HI-Viruspartikel ebenfalls die essenziellen Enzyme reverse Transkriptase, Protease, Ribonuklease und Integrase. Diese sind eingeschlossen in dem sogenannten Kapsid (p24). Das Kapsid ist umhüllt von einer Matrix (p17) und einer Membran mit dem zusammengesetzten Hüllprotein gp120/gp41, wie schematisch dargestellt in Abbildung 2.<sup>45</sup> Das HIV-1 Genom besteht aus 9 Genen, die für insgesamt 15 Proteine codieren und von den sogenannten *long terminal repeats* (LTR's), welche den viralen Promotor, die Polyadenylierungssequenz und regulatorische Sequenzen enthalten, flankiert werden. Das Genom unterteilt sich in die drei essenziellen Gene *Gag* (*group antigen*), *Pol* (*polymerase*) und *Env* (*envelope*), sowie die akzessorischen *Vif* (*viral infectivity factor*, p23), *Vpr* (*viral protein R*, p15), *Vpu* (*viral protein U*), *Nef* (*negative effector*, p24) und regulatorischen Gene, *Tat* (*transcriptional activator*, p14) und *Rev* (*regulator of viral gene expression*, p19) (Abbildung 2). Während die essenziellen Gene in allen Retroviren vorhanden sind, kommen die akzessorischen und regulatorischen Gene nur bei HIV vor. Die akzessorischen Gene sind unter anderem für die Inaktivierung zellulärer und antiviraler Mechanismen notwendig.<sup>46</sup>

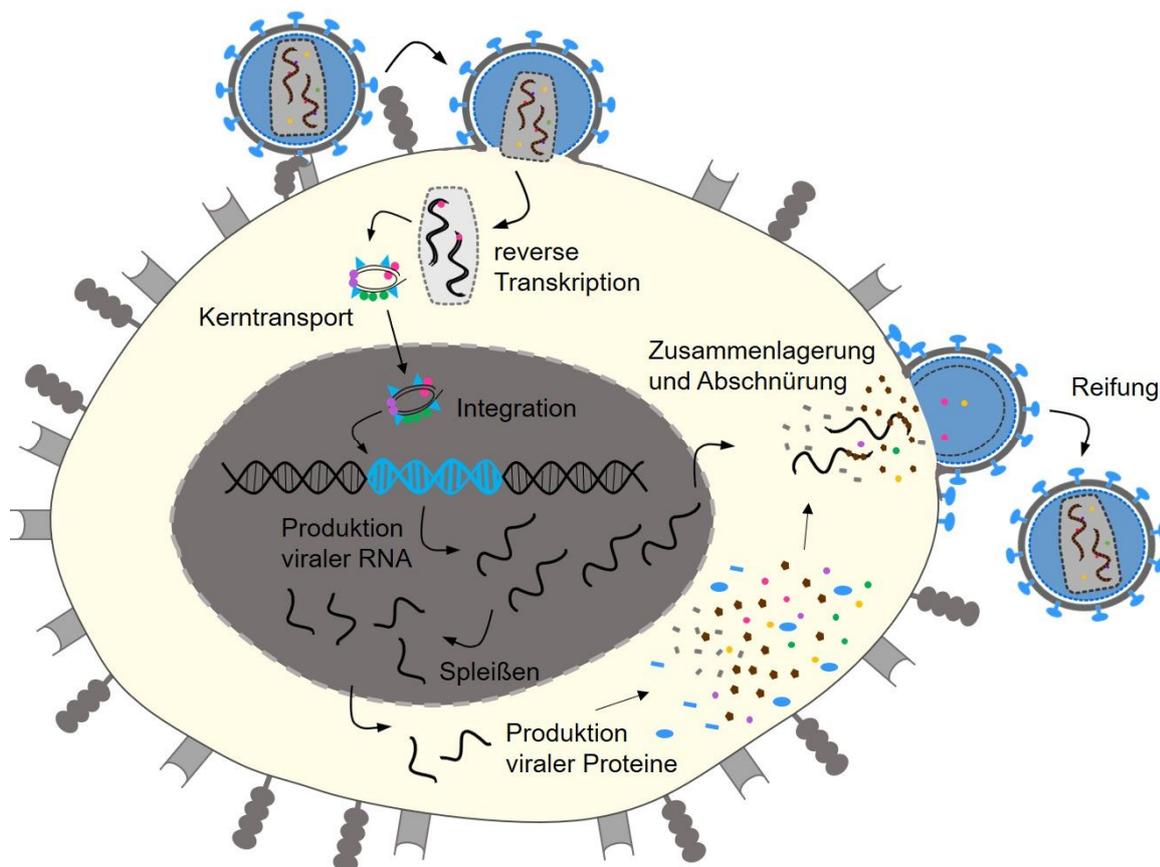


**Abbildung 2: Struktureller und genomischer Aufbau von HIV.** Darstellung eines reifen HI-Viruspartikels und des integrierten Provirus. Die äußere Hülle des HI-Viruspartikels besteht aus einer Lipidmembran mit dem Hüllproteinkomplex gp120/gp41, der die Bindung des Partikels an den CD4- und einen Korezeptor vermittelt. Die Matrixproteine (p24) umschließen ein Kapsid (p17). Dieses enthält das virale RNA-Genom, das aus zwei Einzelsträngen besteht, die vom Nukleokapsid (p7) umgeben sind. Der Viruspartikel enthält außerdem die reverse-Transkriptase, Integrase, Protease, das Strukturprotein p6, sowie die akzessorischen Proteine Vpr, Nef und Vif. Nach Integration in das Wirtsgenom wird das virale Genom als Provirus bezeichnet. Dieses enthält 9 Gene (*Gag*, *Pol*, *Env*, *Vif*, *Vpr*, *Vpu*, *Nef*, *Tat* und *Rev*), die für insgesamt 15 Proteine kodieren. Flankiert werden die Gene von einer 5'LTR (*long terminal repeats*) und einer 3'LTR. Die 5'LTR enthält regulatorische Elemente, sowie den viralen Promotor.

Vif blockiert das zelluläre Protein APOBEC3G, das in der Zelle für die Abwehr von Retroviren verantwortlich ist.<sup>47</sup> Das Protein Rev wird für den Transport der viralen RNA ins Zytoplasma benötigt.<sup>48</sup> Nef hingegen senkt die Expression zellulärer Oberflächenmoleküle wie CD4 und beeinflusst zelluläre Signalkaskaden.<sup>49–51</sup> Das regulatorische Protein Tat steigert durch die Bindung an einen Bereich in der 5'LTR des Provirusgenoms die Transkription vollständiger HIV-Transkripte und somit die Produktion neuer Viruspartikeln.<sup>52,53</sup> Die Gene *Gag* und *Env* kodieren für die Strukturproteine p17, p24, p7, p6 beziehungsweise die Hüllproteine gp120 sowie gp41. Diese Proteine dienen der Formierung des Viruskapsids und der Bindung an die Wirtszelle. Das *Pol* Gen enthält die Information für die viralen Enzyme p11 (Protease), p66 (reverse Transkriptase), p32 (Integrase) sowie das p7 (Nukleokapsid).<sup>54</sup> Die meisten viralen Proteine entstehen durch alternatives Spleißen und posttranslationale Prozessierung mit Hilfe der Protease p11.<sup>55–57</sup>

#### 1.1.4 Der Replikationszyklus von HIV

HIV infiziert vordergründig T-Helferzellen über die Bindung an den CD4-Rezeptor sowie einen Korezeptor aus der Familie der G-gekoppelten Chemokinrezeptoren.<sup>58-60</sup> Das Hüllprotein gp120 bindet dabei als Trimer an den CD4-Rezeptor auf der Zelloberfläche, wodurch sich seine Konformation ändert und die Bindung an einen Chemokinrezeptor möglich macht. Nach der Bindung des Korezeptors fusioniert das Virus mit der Zellmembran durch Interaktion mit dem Hüllprotein gp41 und schleust so das Kapsid in die Zelle ein (Abbildung 3). Danach folgt die Umschreibung des viralen RNA-Genoms durch die reverse Transkriptase (p66) in ein doppelsträngiges DNA-Genom und die Öffnung des Kapsids (engl. *uncoating*). Der genaue Ablauf der Kapsidöffnung ist bisher nicht vollständig aufgeklärt worden. Neben der Öffnung des Kapsids im Zytoplasma, wird ebenfalls eine mögliche Freisetzung des viralen Genoms an einer Kernpore diskutiert.<sup>61-64</sup> Die virale doppelsträngige DNA bildet zusammen mit der reversen Transkriptase, Integrase, Vpr, Matrixproteinen und DNA-bindenden Proteinen den Pre-Integrationskomplex.<sup>65-67</sup> Dieser vermittelt den Eintritt der viralen DNA in den Kern über die Kernporen und wird ebenfalls für eine erfolgreiche Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom benötigt. Nach der Integration wird die virale DNA als Provirus bezeichnet. Das Provirus kann je nach Ort der Integration transkriptionell aktiv oder latent sein.<sup>68</sup> In transkriptionell aktiven Zellen dient das Provirus als Vorlage für die Transkription von viraler *messenger* RNA (mRNA) und des viralen RNA-Genoms. Die Transkription wird vom viralen Promotor in der 5'LTR gestartet und ist abhängig von zellulären Transkriptionsfaktoren und der humanen Pol II Polymerase.<sup>69</sup> Durch alternatives Spleißen werden aus einem viralen Transkript zahlreiche unterschiedliche mRNAs hergestellt. Aus den viralen mRNAs werden von der zellulären Maschinerie die viralen Proteine synthetisiert.<sup>70,71</sup> Das vollständige virale RNA-Transkript (Genom) wird in neue Viruspartikel verpackt. Darüber hinaus werden aus diesem Transkript die Vorläuferproteine Gag und GagPol synthetisiert, die ebenfalls für die Herstellung neuer Viruspartikel benötigt werden. Aus einfach gespleißten viralen Transkripten entstehen die Proteine Vif, Vpr, Vpu und Env.<sup>72,73</sup> Vollständig gespleißte mRNA kodiert für Tat, Rev und Nef.<sup>74</sup> Bei der Bildung neuer Viruspartikel sammeln sich die Gag-Proteine und GagPol-Vorläuferproteine in sogenannten *Lipid Rafts*, dies sind Bereiche in der Zellmembran mit einer speziellen Zusammensetzung von Lipiden und Proteinen. Die viralen Env-Proteine werden durch die Interaktion mit den Matrixproteinen (p17) ebenfalls im *Lipid Rafts* gesammelt. Anschließend erfolgt die Rekrutierung des viralen RNA-Genoms und weiterer viraler Proteine, die sich zu einem neuen Viruspartikel zusammensetzen und abschnüren. An der Abschnürung neuer Viruspartikel ist neben dem viralen Protein p6 das zelluläre Protein Tsg101 beteiligt. Direkt nach der Abschnürung ist der Viruspartikel noch nicht infektiös. Erst nach der Reifung ist der neue HI-Viruspartikel in der Lage weitere Zellen zu infizieren.<sup>75-77</sup>



**Abbildung 3: Replikationszyklus von HIV.** Das HI-Virus bindet über die Hüllprotein gp120 und gp41 den CD4- und einen Korezeptor, wodurch der Viruspartikel mit der Zellmembran fusioniert und das Kapsid in die Zelle entlässt. Anschließend folgt die reverse Transkription des viralen Genoms in doppelsträngige DNA und die Öffnung des Kapsids. Mit Hilfe des Pre-Integrationskomplex wird die virale DNA durch die Kernpore in den Kern transportiert und dort in das Wirtsgenom integriert. Durch zelluläre Transkriptionsfaktoren und die Pol II Polymerase werden virale RNA-Transkripte hergestellt, die als mRNA zur Synthese viraler Proteine dienen oder als RNA-Genom für neue Viruspartikel verwendet werden. Die verschiedenen mRNA, die für die unterschiedlichen viralen Proteine kodieren, werden durch alternatives Spleißen hergestellt. Die Synthese viraler Proteine erfolgt im Zytoplasma der Zelle ähnlich zu einer zellulären mRNA. Nach der Produktion der Viruspartikelkomponenten sammeln sich die Gag- und GagPol-Vorläuferproteinen an *Lipid Rafts* und bilden einen neuen HI-Viruspartikel aus. Nach der Reifung ist der Viruspartikel in der Lage weitere Zellen zu infizieren.

## 1.2 T-Zellen und CCR5 in HIV-Infektionen

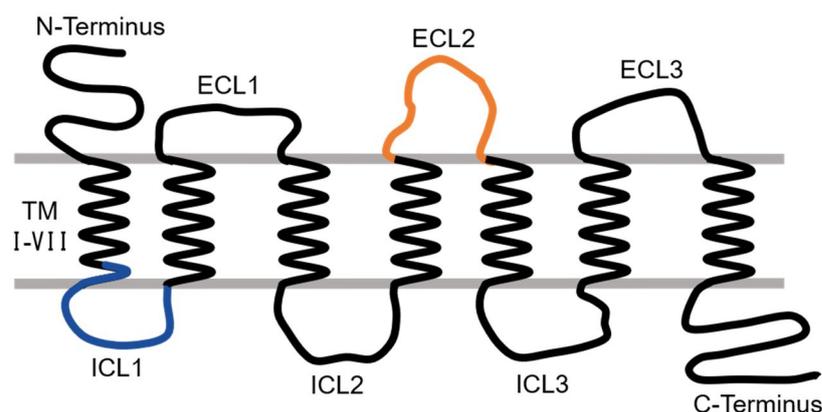
Obwohl HIV ebenfalls in Makrophagen oder dendritische Zellen eindringt, sind es vor allem die CD4-positiven T-Helferzellen, die vom Virus infiziert werden und deren Depletion im Verlauf der Infektion zu AIDS führt. T-Zellen sind neben den B-Zellen eine Untergruppe der Lymphozyten, die das adaptive Immunsystem darstellen. Anhand der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, Marker genannt, werden T-Zellen in verschiedene Populationen und Subgruppen unterteilt. Die zwei Hauptpopulationen sind die T-Helferzellen, die den Rezeptor CD4 exprimieren, und die zytotoxischen T-Zellen, die den Rezeptor CD8 exprimieren. T-Helferzellen regulieren die Immunantwort und aktivieren weitere Zellen des Immunsystems zur Abwehr von Pathogenen, während zytotoxische T-Zellen infizierte oder kanzerogene Zellen eliminieren. Naïve T-Zellen proliferieren und differenzieren nach dem Kontakt mit ihrem

Antigen auf Antigen-repräsentierenden Zellen durch die Aktivierung zweier Signalkaskaden. Das erste dieser Signale wird durch die Bindung des T-Zell-Rezeptor zusammen mit einem CD3-Komplex aus Transmembranproteinen und dem CD4- oder CD8-Rezeptor an ein Antigen-gebundenes Haupthistokompatibilitäts-Protein (*major histocompatibility*, MHC) vermittelt. Das zweite Signal zur Aktivierung erfolgt über den CD28-Rezeptor auf der T-Zelle durch die Bindung an ein kostimulatorisches Protein, wie CD80.<sup>78</sup> Die weitere Differenzierung und Proliferation ist abhängig von Zytokinen, wie Interleukin-2, -7 oder -15.<sup>79</sup>

Nach der Aktivierung können CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu Gedächtnis-T-Zellen differenzieren, die sich in weitere funktionelle Subgruppen unterteilen lassen: stammzellähnliche Gedächtnis-T-Zellen, zentrale Gedächtnis-T-Zellen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen. Studien zu den unterschiedlichen T-Zelltypen zeigten, dass naive T-Zellen und stammzellähnliche Gedächtnis-T-Zellen, im Gegensatz zu Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, in der Lage sind die ganze Bandbreite an Gedächtnis-T-Zellen zu rekonstituieren. Effektor-Gedächtnis-T-Zellen haben hingegen meist eine kürzere Überlebensdauer und Proliferationskapazität als stammzellähnliche Gedächtnis-T-Zellen.<sup>80-82</sup> Obwohl die Subgruppen der Gedächtnis-T-Zellen in der Regel in einer Hierarchie mit steigender Spezialisierung der Zellen von naive T-Zellen bis zu den Effektor-Gedächtnis-T-Zellen eingeteilt werden, ist das System nicht starr. Gedächtnis-T-Zellen besitzen eine gewisse Plastizität und sind teilweise fähig zu einem früheren Zustand zurückzukehren.<sup>83</sup> Wie zuvor beschrieben spielen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eine zentrale Rolle bei der Infektion mit HIV, da CD4 der Hauptrezeptor des Virus ist. T-Helferzellen werden, in Abhängigkeit davon, welche Zytokine sie nach Antigenstimulation sekretieren, in zwei weitere Subgruppen unterteilt, T-Helferzellen Typ 1 (Th<sub>1</sub>) und 2 (Th<sub>2</sub>).<sup>84,85</sup> Vor allem Th<sub>1</sub> exprimieren CCR5, wobei dies vom Aktivierungsstatus der Zelle beeinflusst wird.<sup>86,87</sup> So ist die Expression von CCR5 abhängig vom Zytokin Interleukin-2 (IL-2). Der Entzug von IL-2 führt zu einem Verlust der CCR5-Expression in Th<sub>1</sub>-Zellen. Die Aktivierung von Th<sub>1</sub>-Zellen über die Rezeptoren CD3 und CD28 hat ebenfalls eine Runterregulation von CCR5 zur Folge. Darüber hinaus ist die Expressionshöhe und Dichte von CCR5 auf Th<sub>1</sub>-Zellen spenderabhängig und variiert stark.<sup>88</sup> CCR5 ist an einer Reihe wichtiger Prozesse in T-Zellen beteiligt.<sup>89-93</sup> CCR5 erhöht zum Beispiel die Kostimulation und die Ausschüttung von Zytokinen. Außerdem vermittelt CCR5 durch Chemotaxis die Rekrutierung von Zellen an Entzündungsherde und beeinflusst den Metabolismus der T-Zelle durch Signalkaskaden, die zu einer erhöhten Glukoseaufnahme und Adenosintriphosphat-Produktion führen. CCR5 spielt ebenfalls für das sogenannte *Priming*, die Aktivierung von T-Zellen nach Interaktion mit ihrem Antigen, von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen eine wichtige Rolle. CD8<sup>+</sup>-Zellen exprimieren vor allem während einer Entzündungsreaktion CCR5.

### 1.2.1 Der HIV-Korezeptor CCR5

Vor allem während der initialen Infektion verwenden die meisten HIV-Stämme den Korezeptor CCR5. Dieser gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, kurz GPCR. Diese Rezeptoren bestehen aus einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus, sowie 7 hydrophoben Transmembrandomänen (TM) verbunden über je drei extrazelluläre (*extracellular loop*, ECL) und intrazelluläre Schlingen (*intracellular loop*, ICL) (Abbildung 4).<sup>94</sup> GPCR bilden je nach Klasse Dimere oder Oligomere aus. Nach Bindung ihres Liganden lösen diese Rezeptoren über G-Proteine Signalkaskaden im Inneren der Zelle aus. Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, unreife dendritische Zellen und eine Reihe weiterer Zellen exprimieren CCR5. Dieser Rezeptor besteht aus 352 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von etwa 40,6 kDa.<sup>95,96</sup> Der N-terminale Bereich von CCR5 ist reich an Tyrosin und spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung an seine Liganden und die Interaktion mit HIV.<sup>97,98</sup> Der intrazelluläre C-Terminus von CCR5 unterliegt einer Reihe unterschiedlicher Modifikationen und enthält Aminosäuren, die die Expression and Funktion des Rezeptors beeinflussen.<sup>99–101</sup> Natürliche Liganden von CCR5 sind die Chemokine CCL3



**Abbildung 4: Darstellung des C-C-Motiv-Chemokinrezeptor 5 (CCR5).** Der Rezeptor CCR5 gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und besteht aus 7 Transmembrandomänen (TM), 3 extrazellulären (ECL) und 3 intrazellulären Schlingen (ICL). Die ECL2 vermittelt die Bindung zu den CCR5-Liganden.

(MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL8 (MCP-2), CCL5 (RANTES) und CCL7 (MCP-3).<sup>30,102,103</sup> Allerdings, handelt es sich bei CCL7 um einen Antagonisten.<sup>104</sup> Die Aktivierung von CCR5 löst verschiedene zelluläre Prozesse aus, die unter anderem an der Zellentwicklung, Angiogenese und der Immunantwort beteiligt sind. Ohne Bindung eines Liganden liegt CCR5 als symmetrisches Dimer vor. Diese Konformation ist vermutlich auch für den Transport des Rezeptors vom endoplasmatischen Retikulum zur Zelloberfläche wichtig.<sup>105</sup> Die Bindung der Liganden wird über die ECL 2 vermittelt, wobei TM 2 und 3 eine wichtige Rolle bei der Rezeptoraktivierung spielen.<sup>106</sup> Nach der Bindung eines Agonisten und Auslösung der G-Protein-vermittelten Signalkaskade, wird CCR5 phosphoryliert und internalisiert. Im Zytoplasma wird CCR5 zu endosomalen Vesikeln transportiert, dort dephosphoryliert und wieder zur Zellmembran befördert.<sup>107</sup> Das HIV-Medikament Maraviroc bindet an CCR5 über

eine Tasche aus den TM I, II, III, V, VI, VII und stabilisiert so eine inaktive Konformation, was die Interaktion zwischen CCR5 und dem HIV-Hüllproteinen verhindert.<sup>94</sup> Dadurch wird der Zugang von HIV in die Wirtszelle blockiert. Allerdings konnte auch für Maraviroc, wie bei vielen anderen antiretroviralen Medikamenten, in Studien die Bildung von resistenten HIV-Mutanten detektiert werden.<sup>108</sup>

### 1.2.2 Das CCR5-Gen und seine Genvarianten

Das humane *CCR5*-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 auf Position 21 (3p21) in einem Cluster zusammen mit anderen Genen von Chemokinrezeptoren wie *CCR1*, *CCR2* und *CCR3*.<sup>109</sup> Die Gene von *CCR5* und *CCR2* weisen eine hohe Sequenzhomologie von etwa 84 % im kodierenden Bereich auf und liegen knapp 15 kb auseinander. Der *CCR5*-Lokus umfasst zwei Promotoren, zwei Introns, sowie drei Exons. Der gesamte offene Leserahmen (ORF), der für das CCR5-Protein codiert, befindet sich in Exon 4.<sup>96,110</sup> Durch mehrere Transkriptionsstarts im Exon 3 können CCR5-Transkripte mit unterschiedlicher 5' untranslatierter Region (UTR) hergestellt werden, die neben den regulatorischen Elementen in den Promotoren ebenfalls eine Regulation der CCR5 Expression ermöglichen. Darüber hinaus beeinflussen die Introns, sowie Sequenzbereiche in der 3' UTR die CCR5 Expression. Mutationen in *CCR5* wurden vor allem im Hinblick auf HIV-Infektionen und das Fortschreiten zu AIDS sehr gut untersucht. Es sind mittlerweile eine große Anzahl an Mutationen im codierenden Bereich, sowie in Promotorregionen beschrieben worden, die die Expression von CCR5 verringern oder ganz verhindern.<sup>111-114</sup> Bei eine der ersten entdeckten Mutationen handelt es sich um die Deletion von 32 Basenpaaren (Basenpaare 794-825) im offenen Leserahmen von *CCR5* (*CCR5Δ32*), welche zu einem verfrühten Stopcodon und fehlendem Transport des verkürzten Proteins zur Zelloberfläche führt. Entdeckt wurde diese Mutation bei Individuen, die trotz hoher HIV-Exposition keine Infektion aufwiesen.<sup>37</sup> Eine homozygote Mutationen führt bei den Träger zu einer hohen Resistenz gegenüber R5-HIV-Stämmen. Heterozygote *CCR5Δ32* Träger sind zwar anfällig gegenüber R5-HIV-Stämmen, haben allerdings eine höhere Überlebensrate und manchmal eine langsamere Progression zu AIDS, als Menschen ohne diese Mutation.<sup>41,115</sup> Die Häufigkeit des *CCR5Δ32* Allels in der menschlichen Population schwankt geographisch stark. Der Ursprung der *CCR5Δ32* Mutation liegt in Nordeuropa, wo der Anteil des *CCR5Δ32* Allels in der Bevölkerung bei circa 16 % liegt. Der Anteil an Menschen mit einer homozygote *CCR5Δ32* Mutation in Europa und den USA liegt schätzungsweise bei etwa 1 %. Im Allgemeinen nimmt die Häufigkeit des *CCR5Δ32* Allels von Norden nach Süden stark ab und ist in vielen Regionen der Welten selten bis gar nicht vorhanden.<sup>114,116,117</sup> Auf Grund seiner wichtigen Rolle in zellulären Prozessen wurde CCR5 immer wieder im Zusammenhang mit unterschiedlichen Erkrankungen, auch außerhalb von HIV-Infektionen, untersucht. So wurde eine Beteiligung von CCR5 in einer Reihe von

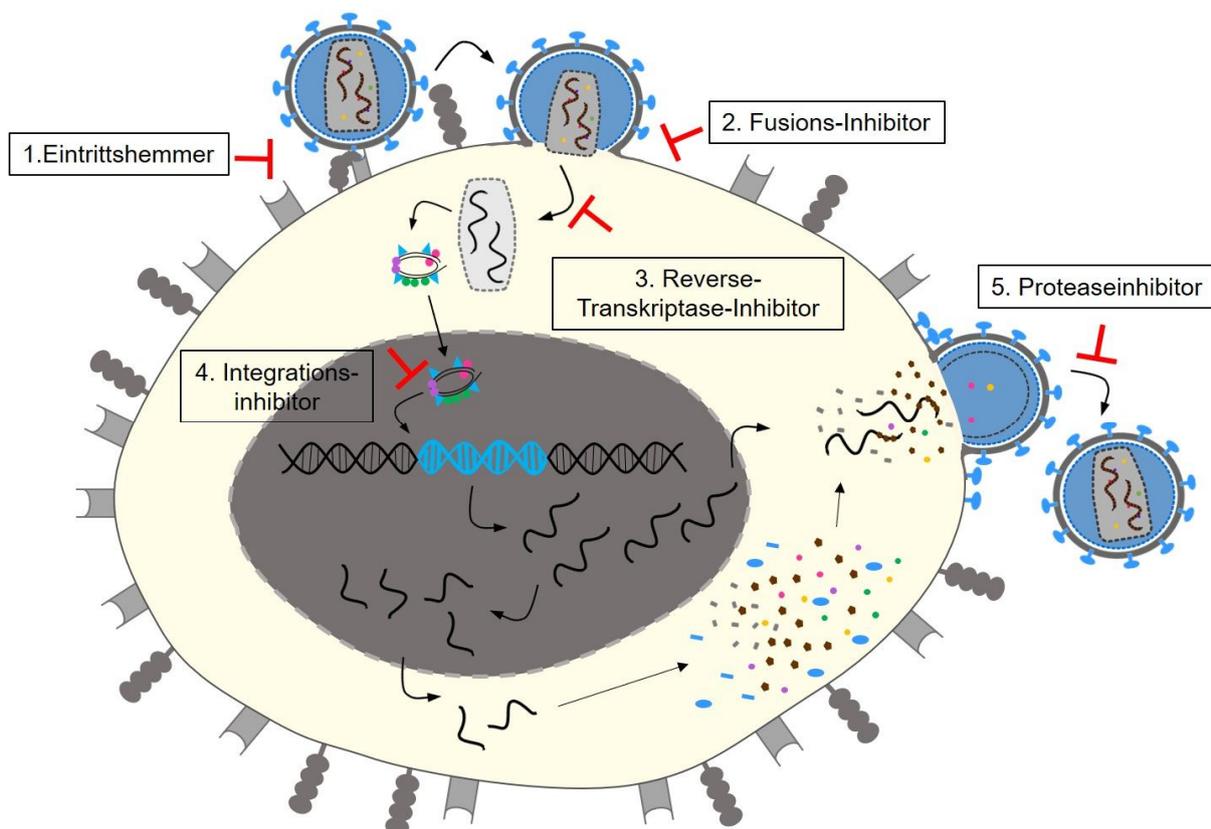
Erkrankungen prognostiziert. Bei Untersuchungen zum Zusammenhang des *CCR5Δ32* Allels mit verschiedenen Erkrankungen wie Atherosklerose, Bluthochdruck, Herzinfarkt, Alzheimer, Krebs und Multiple Sklerose oder auch viralen Infektionskrankheiten im Menschen waren die Ergebnisse allerdings oft kontrovers. Studien zu diesen Krankheiten berichteten meist sowohl protektive als auch negative Effekte einer fehlenden beziehungsweise geringen CCR5-Expression (homozygotes und heterozygotes *CCR5Δ32* Allel).<sup>118</sup> Im Allgemeinen sind Menschen mit einer homozygoten *CCR5Δ32* Mutation gesund und haben die gleiche Lebenserwartung wie Menschen ohne diese Allel-Variante. Dies verdeutlicht, dass bei einem Ausfall von CCR5 anderen Chemokinrezeptoren den Verlust ausgleichen können.

Ebenfalls großes Aufsehen erlangte das *CCR5Δ32*-Allel nachdem 2009 ein HIV-Patient („Berlin-Patient“) zur Behandlung seiner akuten myeloischen Leukämie eine Stammzelltransplantation von einem homozygoten *CCR5Δ32*-Spender erhielt und anschließend auch ohne antiretrovirale Therapie keine aktive HIV-Infektion mehr aufwies.<sup>119</sup> Der „Berlin-Patient“ galt offiziell als der erste von HIV-geheilte Mensch weltweit. Trotz weiterer Versuche, gelang erst 2019 eine Reproduktion dieses Erfolges. Der „London-Patient“ bekam zur Behandlung seines Hodgkin Lymphoms ebenfalls eine allogene Stammzelltransplantation eines homozygoten *CCR5Δ32*-Spender und blieb seither ebenfalls ohne cART frei von detektierbaren HI-Viren.<sup>120,121</sup>

### 1.2.3 Behandlung von HIV-Infektionen

Mit der Entwicklung antiretroviraler Medikamente wurden die HIV-Infektion zu einer chronischen, aber behandelbaren Erkrankung. Mit Hilfe dieser Medikamente gelingt es bei den meisten Patienten, die HIV-RNA Plasmakonzentration unter die Detektionsgrenze von 50 HIV-Kopien/ml zu drücken. Darüber hinaus kann vor allem bei einem raschen Therapiebeginn die Anzahl CD4<sup>+</sup>-T-Zellen auf ein normales Level zurückgebracht werden. Die Behandlung mit antiretroviralen Mitteln unterbindet nicht nur die Entstehung von AIDS in behandelten Patienten, sondern verhindert durch die Unterdrückung der Virämie auch weitere Ansteckungen.<sup>122–124</sup> Das erste antiretrovirale Medikament, Zidovudine (Azidothymidin) wurde 1987 zugelassen. Seine antiretrovirale Wirkung hatte zuerst der deutsche Virologe Wolfram Ostertag beschrieben.<sup>125</sup> Obwohl die ersten Studien zu dem Medikament vielversprechende Ergebnisse lieferten, traten bei einer Langzeitnutzung Resistenzen und starke Nebenwirkungen auf.<sup>126,127</sup> Die Einführung der antiretroviralen Kombinationstherapie (cART) im Jahr 1996 verbesserte die HIV-Behandlung stark.<sup>128,129</sup> Aufgrund der hohen Fehlerrate von RNA-Polymerase und reverser Transkriptase handelt es sich bei Retroviren um Quasispezies, das heißt praktisch jede Viruskopie enthält mindestens eine Mutation. Dadurch können sich sehr schnell Resistenzen gegenüber Monopräparaten entwickeln. Die antiretrovirale Kombinationstherapie besteht daher aus mehreren unterschiedlichen HIV-Medikamenten,

was die Bildung von (multi-) resistenter Varianten deutlich erschwert. Die Behandlung mit cART erhöhte die Überlebensrate HIV-positiver Patienten deutlich, allerdings haben besonders Patienten mit niedrigeren CD4<sup>+</sup>-T-Zellwerten dennoch eine geringere Lebenserwartung als die allgemeine Bevölkerung.<sup>130,131</sup> Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es fünf Klassen zugelassener HIV-Medikamente: Eintrittshemmer, Fusionsinhibitoren, reverse Transkriptase-Inhibitoren, Integrationsinhibitoren und Proteaseinhibitoren (Abbildung 5).<sup>132,133</sup> Eintrittshemmer blockieren den HI-Virus Eintritt über die Hüllproteine durch unterschiedliche Mechanismen. Der CCR5-Antagonist Maraviroc bindet an CCR5 und verhindert die Interaktion des Korezeptors mit gp120.<sup>134,135</sup> Das Medikament Ibalizumab bindet hingegen an den CD4-Rezeptor und blockiert darüber die Bindung des viralen gp120-Moleküls mit dem Korezeptor CCR5 oder CXCR4. Mitte 2020 erfolgte in Europa die Zulassungen für eine neue Art der Eintrittshemmer, den ersten *Attachment*-Inhibitor Fostemsavir, der direkt an das Glykoprotein gp120 auf der HIV-Hülle bindet und das Andocken des Virus an die Wirtszelle verhindert.<sup>136,137</sup> Der Fusionsinhibitor Enfuvirtide bindet an gp41 und verhindert die Verschmelzung des Virus mit der Wirtszellmembran.<sup>138,139</sup> Bei den Reverse-Transkriptase-Inhibitoren werden die



**Abbildung 5: Klassen von antiretroviralen Medikamenten und ihr Wirkungsort im HIV-Replikationszyklus.** Eintrittshemmer, wie Maraviroc verhindern die Bindung zwischen den viralen Hüllproteinen gp120/gp41 und den Zielrezeptoren. Fusions-Inhibitoren hemmen die Verschmelzung des Virus mit der zellulären Membran und verhindern das Eindringen des Kapsids. Die Klasse der Reverse-Transkriptase-Inhibitoren besteht aus Nukleotid- und Nukleosidanaloge-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs) und Nicht-nukleosidalen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs). Diese Stoffe hemmen entweder durch Einbau in die virale DNA (NRTIs) oder durch direkte Interaktion mit der reversen Transkriptase (NNRTIs), die Herstellung der viralen DNA. Integrationshemmer verhindern das Einbringen der viralen DNA in das Wirtsgenom, während Proteaseinhibitoren die Reifung zu infektiösen Viruspartikeln blockieren.

Nukleotid- und Nukleosidanaloge-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs) und die Nicht-nukleosidalen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs) unterschieden. NRTIs sind funktionsuntüchtige Bausteine, die bei der reversen Transkription in die virale DNA eingebaut werden und den Prozess unterbrechen.<sup>140</sup> NNRTIs hingegen binden direkt an die reverse Transkriptase und blockieren deren Funktion.<sup>141,142</sup> Integrationsinhibitoren interagieren meist direkt mit dem aktiven Zentrum der Integrase und verhindern den Einbau der viralen DNA.<sup>143</sup> Proteaseinhibitoren hingegen verhindern den für das HI-Virus wichtigen Schritt der Proteinspaltung von Gag- und GagPol-Vorläuferproteinen indem sie mit den viralen Proteinen konkurrieren, wodurch keine Reifung des HIV-Partikels stattfindet.<sup>144</sup> Neben den genannten antiretroviralen Medikamentenklassen gibt es seit 2000 pharmakogenetische Booster, die den Abbau retroviraler Substanzen verzögern. Um das Risiko einer Resistenzbildung gering zu halten, werden in der Regel drei, mittlerweile aber auch zwei HIV-Medikamente aus mindestens zwei unterschiedlichen Klassen kombiniert (2 NRTI + 1 NNRTI, Integrase- oder Proteaseinhibitoren).<sup>145,146</sup> Während in den ersten Jahren die antiretrovirale Therapie erst bei niedrigen CD4<sup>+</sup>-T-Zellwerten (< 350 Zellen/ml) begonnen wurde, wird heute ein früher Therapiebeginn direkt nach Diagnose unabhängig vom Status der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen empfohlen.<sup>146</sup>

Die Kosten von cART variieren abhängig von der Region und den enthaltenen Medikamenten stark. In den USA belaufen sich die Kosten von einer antiretroviralen Behandlung pro Monat auf bis zu \$48.000 (USD).<sup>147</sup> Hingegen liegen die cART-Kosten in ressourcenknappen Ländern bei \$27 - 889 (USD, 2018) pro Monat.<sup>148</sup> In Europa unterscheiden sich die Preise für eine antiretrovirale Therapie ebenfalls stark und lagen 2016 durchschnittlich zwischen 1.000 € und > 20.000 € pro Jahr für einen HIV-Patienten. In Deutschland beliefen sich die Kosten für cART 2016 auf durchschnittlich 20.075 € pro Jahr und HIV-Patient.<sup>149</sup> Neben der Nutzung von cART als direkte Behandlung von HIV-Erkrankten, werden bestimmte antiretrovirale Medikamente auch als Prophylaxe für Menschen mit einem hohen Risiko einer HIV-Infektion eingesetzt.<sup>146</sup> Da cART keinen direkten Einfluss auf das etablierte virale Reservoir hat, müssen die Medikamente lebenslang eingenommen werden. Allerdings ist cART mit diversen Nebenwirkungen und Toxizität verbunden, wie Hautausschlag, Anämie, Lipodystrophie, Neuropathie und gastrointestinale Symptome. Zwar hat sich die Schwere der Nebenwirkungen mit der Entwicklung neuer antiretroviraler Medikamente deutlich verringert, dennoch beeinträchtigen die Nebenwirkungen weiterhin die Lebensqualität der Patienten.<sup>150-156</sup> Darüber hinaus sind viele antiretrovirale Medikamente erst vor weniger als 15 Jahren zugelassen worden, weswegen mögliche Langzeittoxizitäten noch nicht ausgeschlossen sind. Hinzukommt, dass mit dem Alter der HIV-positiven Menschen ebenfalls der Anteil an Begleiterkrankungen steigt und somit auch das Risiko von Arzneimittelinteraktionen.<sup>157-159</sup>

### 1.3 Neue Therapieansätze für HIV-Infektionen

Eine Behandlung mit cART führt auch bei einer lebenslangen Einnahme nicht zu einer Heilung, stattdessen führt das Absetzen von cART bei den meisten HIV-infizierten Menschen zu einem Wiederkehren der Virämie.<sup>160</sup> Die lebenslange Einnahme von antiretroviralen Medikamenten ist darüber hinaus mit Nebenwirkungen verbunden, die nicht nur die Lebensqualität der Patienten verringern, sondern durch Therapieunterbrechung auch den Krankheitsverlauf verschlimmern und zu Resistenzbildungen führen können.<sup>161</sup> Weltweit nimmt der Anteil cART-resistenter HIV-Stämme zu.<sup>162,163</sup> Aus diesen Gründen bleibt es weiterhin wichtig, neue Therapieansätze zu entwickeln, die zu einer Langzeitremission (funktionale Heilung) oder gar einer sterilen Heilung (vollständige Elimination des HI-Virus) führen.

Bei der therapeutischen Vakzinierung soll die wiederkehrende Virämie durch eine Stimulierung des Immunsystems verhindert oder unterdrückt werden. Ein Vakzin gegen mehrere HIV-Proteine in Kombination mit einer Stimulation von T-Zellen mit IL-2, führte in klinischen Studien bereits zu einer Verzögerung des *Rebounds* (Wiederkehren der Virämie).<sup>164,165</sup> Mit Hilfe einer Immunisierung gegen das virale Protein Tat konnten in einer anderen Studie das virale Reservoir verkleinert und Teile des Immunsystems wiederhergestellt werden.<sup>166</sup> Dennoch gelang es bisher mit keiner therapeutischen Vakzinierung, eine dauerhafte HIV-Remission zu erreichen.

Weitere neue Ansätze für eine HIV-Therapie umfassen die Eliminierung des viralen Reservoirs. Auf Grund der ständigen Immunaktivierung in HIV-infizierten Menschen, zeigt ein Teil der T-Helferzellen meist einen Erschöpfungszustand (engl. *Exhaustion*), der durch die Expression bestimmter Marker wie PD-1 und CTLA-4, gekennzeichnet ist. Besonders diese T-Helferzellen beinhalten latente HI-Proviren. Sowohl in vitro als auch in vivo konnte bereits gezeigt werden, dass Medikamente gegen PD-1 und CTLA-4 zu einer Reaktivierung der Translation viraler Bestandteile in diesen Zellen führen. Die Reaktivierung führte zu einer verstärkten HIV-gerichteten Immunreaktion und konnte so die Anzahl latenter T-Helferzellen reduzieren.<sup>167–171</sup> Eine weitere Strategie, die das virale Reservoir betrifft ist die „*Shock and Kill*“ Methode. Dabei sollen latente HI-Proviren durch spezifische Medikamente reaktiviert werden (*latency reversing agents*, LRAs) und die betroffenen Zellen anschließend durch verschiedene Mechanismen eliminiert werden.<sup>172</sup> Bisherige klinische Studien zu LRAs zeigten zwar eine Reaktivierung des viralen Reservoirs, allerdings konnten die infizierten Zellen nicht effektiv genug entfernt werden.<sup>173–175</sup> Ein dazu gegenteiliger Ansatz, die „*Block and Lock*“-Strategie hingegen verfolgt eine dauerhafte Inaktivierung des viralen Reservoirs, um eine Reaktivierung selbst nach Absetzen von cART zu verhindern.<sup>176</sup>

Basierend auf den Erfolgen von CAR-T-Zellen in der Krebstherapie, wurden ebenfalls CAR-T-Zellen (Chimäre Antigenrezeptoren, CAR) entwickelt, die bei der Behandlung von HIV eingesetzt werden könnten. CAR-T-Zellen sind in der Regel autologe, gentechnisch

veränderte T-Zellen, die mit einem synthetischen antigenspezifischen Rezeptor ausgestattet werden, welcher die Bindung an die Zielzellen vermittelt. Durch die T-Zell-Effektorfunktion können die Zielzellen im nächsten Schritt spezifisch eliminiert werden. In in vitro Experimenten konnte eine erfolgreiche Eliminierung infizierter Zellen mittels HIV-CAR-T-Zellen bereits gezeigt werden.<sup>177–180</sup>

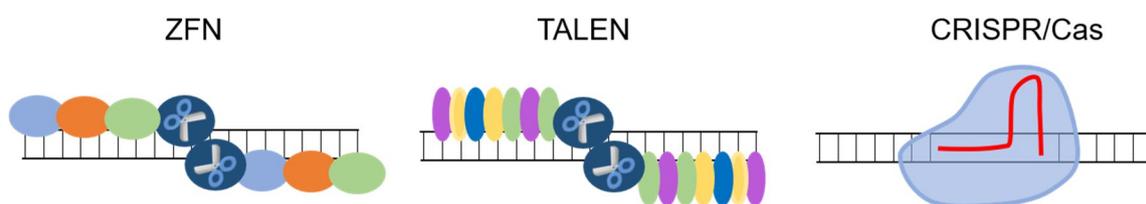
Durch die Fortschritte im Bereich der Genomeditierung wurden darüber hinaus verschiedene Therapieansätze für die HIV-Infektion entwickelt, die auf Designernukleasen basieren. Einer dieser Behandlungsansätze zielt auf das Provirus an sich ab. Mit Hilfe von Designernukleasen kann das Provirus aus dem Wirtsgenom entfernt oder durch Einführung von Mutationen in der Funktion stark beeinträchtigt werden.<sup>181–187</sup> Ein weiterer Ansatz liegt in der Geneditierung der HIV Korezeptoren CCR5 und/oder CXCR4, um die Expression dieser Rezeptoren zu verhindern. Wie bereits beschrieben sind Menschen, die kein CCR5 auf ihren Zellen exprimieren, gegenüber den häufigsten HIV-Stämmen immun. Darüber hinaus verdeutlichten die Berichte des Berlin- und London-Patienten, dass eine Heilung der HIV-Infektion mit Zellen eines homozygoten *CCR5Δ32* Spenders möglich ist. Die Anzahl homologer Spender ist jedoch sehr gering, weswegen bei vielen dieser Ansätze Designernukleasen eingesetzt werden, die zu Mutationen im *CCR5*- oder *CXCR4*-Gen führen und somit die Herstellung autologer HIV-resistenter Stammzellen oder T-Zellen erlauben.<sup>188–196</sup> Die Ergebnisse einer klinischen Studien mit *CCR5*-editierten autologen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zeigten die Verträglichkeit der geneditierten Zellen und einen möglichen positiven Effekt in heterozygoten *CCR5Δ32* HIV-infizierten Menschen.<sup>197</sup> Weitere klinische Studien mit *CCR5*-editierten Zellen werden zur Zeit durchgeführt.<sup>198,199</sup> Analog zu cART gibt es Therapieansätze, die versuchen mehrerer der genannten Strategien zu kombinieren, um eine sterile oder funktionale Heilung von Infektionen mit HIV zu erzielen.

### 1.3.1 Geneditierung mittels Designernukleasen

Einige der zuvor beschriebenen HIV-Therapieansätze verwenden Designernukleasen, mit deren Hilfe Gene punktuell verändert beziehungsweise zerstört oder neu Gene an ausgewählten Bereichen im Genom eingefügt werden können. Erst deren Entwicklung machte den enormen Fortschritt in der Genomeditierung möglich. Zwar waren bereits in den 1990er Jahren die Typ II Restriktionsenzyme bekannt, die gezielt Doppelstrangbrüche an definierten Stellen der genomischen DNA induzieren konnten. Allerdings erkennen diese Nukleasen nur kurze DNA-Sequenzen mit einer Länge von 4 - 8 Basenpaaren, die häufig im Genom vorkommen und daher nicht für eine gezielte Geneditierung an einem einzelnen Locus geeignet sind.<sup>200</sup> Andere Enzyme wie zum Beispiel Meganukleasen hingegen erkennen längere DNA-Sequenzen, sind jedoch langwierig und schwierig in der Herstellung, da die DNA-Erkennungsdomäne und die enzymatische Schneidedomäne strukturell nicht voneinander

getrennt sind.<sup>201</sup> Erst die Entwicklung von Fusionsproteinen aus DNA-Bindedomänen und Schneidedomänen der Restriktionsenzyme, später als sogenannte Designernukleasen bezeichnet, revolutionierte dieses Feld. Die Forschergruppe von Srinivasan Chandrasegaran entwickelte die Zinkfingernukleasen (ZFN), ein Fusionsprotein aus mehreren Zinkfingern und der Schneidedomäne der *Fok1*, ein Restriktionsenzym Typ IIS aus dem *Flavobacterium okeanoikoites*.<sup>202</sup> Bei Typ IIS Endonukleasen erfolgen DNA-Bindung und -Schnitt über zwei getrennte Proteindomänen. Wie bei den meisten dieser Endonukleasen muss die Nukleasedomäne von *Fok1* dimerisieren, um den DNA-Doppelstrangbruch zu induzieren.<sup>203,204</sup> Folglich funktionieren Designernukleasen mit dieser Schneidedomäne ebenfalls nur als Dimer.<sup>205</sup> Zinkfinger sind DNA-Bindedomänen, die aus etwa 30 Aminosäuren bestehen und zwei antiparallele  $\beta$ -Faltblättern, sowie eine  $\alpha$ -Helix bilden. Jeder Zinkfinger erkennt spezifisch drei Nukleotide in der DNA-Sequenz.<sup>206</sup> Durch das Zusammenfügen mehrerer Zinkfinger hintereinander kann eine längere Erkennungssequenz erzeugt werden, die nur einmal im Zielgenom vorkommt. Allerdings ist die Entwicklung von ZFN nicht für jede DNA-Sequenz möglich, da es nicht für jede Dreierkombination an Nukleotiden einen Zinkfinger gibt. Zudem sind in der Regel nur Monomere mit 3 - 4 Zinkfingern stabil. Die Entdeckung weiterer DNA-Bindedomänen, sogenannter Transkriptionsaktivatorartiger Effektorproteine (*transcription activator-like effector*, TALE), in Pflanzenpathogenen führte zur Entwicklung einer weiteren Klasse Designernukleasen, den TALEN (siehe Abschnitt 1.3.2).<sup>207</sup> Die Eigenschaft der TALE-DNA-Bindedomäne mit jedem Monomer ein Nukleotid zu binden, verbesserte die Herstellung von Designernukleasen gegenüber den ZFN. Sowohl ZFN als auch TALEN funktionieren als Dimer und induzieren in der Regel einen Doppelstrangbruch zwischen den beiden Bindestellen am anvisierten Genlokus.<sup>208</sup> Ein solcher Doppelstrangbruch führt häufig zu zufälligen Mutationen in diesem Bereich und kann die Expression von Genen verändern. Seit 2012 gibt es eine neue Art von Designernukleasen die RNA-geführten Endonukleasen, zu dem das bekannte CRISPR/Cas9-System (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) gehört. Ursprünglich handelte es sich bei dem CRISPR/Cas-System um ein Abwehrsystem von Bakterien zur Erkennung und Zerstörung viraler Genome. Die Cas-Proteine sind Endonukleasen, die in der gentechnischen Anwendung zusammen mit einer sogenannten guideRNA einen Komplex bilden, der die komplementäre Sequenz der RNA innerhalb einer DNA-Sequenz erkennen und schneiden kann. Die Vorteile dieser Methode liegen in der leichten Herstellung, da nur die guideRNA für eine neue Zielsequenz entwickelt und synthetisiert werden muss und in den niedrigen Produktionskosten für die guideRNA. Darüber hinaus schneiden Cas-Proteine, anders als die meisten TALEN<sup>209,210</sup>, auch cystein-methylierte Genombereiche. Sehr schnell konnte gezeigt werden, dass sich die Nukleasefunktion von Cas9 leicht inaktivieren und mit anderen Effektormolekülen kombinieren lässt. Darauf aufbauend gibt es mittlerweile eine Reihe weiterer CRISPR/Cas-Systeme, die für die

unterschiedlichsten Geneditierungen wie z.B. den Austausch einzelner Nukleotide (*Base-Editing*) oder das Überschreiben ganzer Abschnitte (*PRIME-Editing*) verwendet werden (Abbildung 6).<sup>211</sup> Obwohl Cas-Proteine schnell und einfach anzupassen sind, bieten TALEN und Zinkfinger-nukleasen durch ihre Bindung als Dimer den Vorteil einer langen Erkennungssequenz mit weniger potenziellen unerwünschter Bindestellen im Genom. Darüber hinaus kann die guideRNA eines Cas-Proteins nicht für jede beliebige Sequenz entworfen werden, da die ersten drei Nukleotide der guideRNA abhängig vom jeweiligen Cas-Protein eine spezifische Basenabfolge enthalten muss (PAM-Sequenz). Bei TALEN hingegen muss die Erkennungssequenz lediglich mit einem Thymin beginnen und sind daher theoretisch für jede Sequenz herstellbar. Außerdem stehen Cas-Proteine noch nicht lange als Werkzeug der Genomeditierung zur Verfügung, weswegen viele der verwendeten Designernukleasen in vorklinischen und klinischen Studien weiterhin ZFN oder TALEN sind.<sup>211,212</sup>



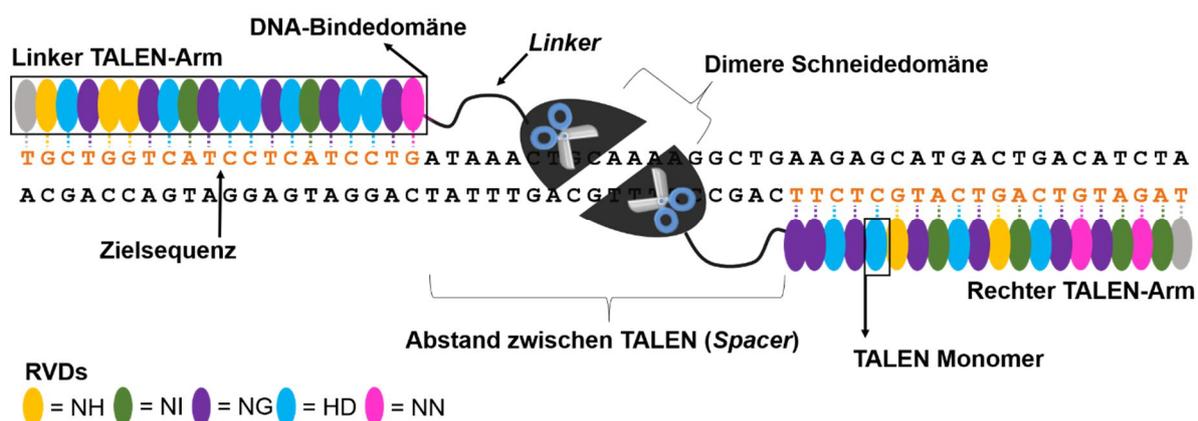
**Abbildung 6: Schematische Darstellung häufig verwendeter Designernukleaseklassen.** Zinkfinger-nukleasen (ZFN) enthalten mehrere Zinkfinger DNA-Bindedomänen, die jeweils drei Nukleotide binden. Fusioniert sind diese Zinkfinger über einen *Linker* mit der Schneidedomäne des Restriktionsenzym *Fok1*, welches als Dimer eine Endonuklease bildet. Transkriptionsaktivatorartige Effektor-nukleasen (TALEN) bestehen aus den monomeren DNA-Bindedomänen der TALE Proteinen. Jedes Monomer bindet genau ein Nukleotid. Über einen *Linker* sind die Monomere häufig ebenfalls mit der Schneidedomäne der *Fok1* verbunden. CRISPR/Cas-Systeme stammen aus Bakterien und dienen dort als Immunsystem zum Schutz vor Phagen. Das Cas-Protein bindet eine guideRNA, die bei einer komplementären Sequenz an die DNA bindet. Das Cas-Protein schneidet die DNA an dieser Stelle durch.

### 1.3.2 TALE Nukleasen

TALEN stellen trotz der Entwicklung eines neuen Typen von Designernukleasen weiterhin ein wichtiges Werkzeug zur Genomeditierung dar, weil sie für fast jede Zielsequenz angepasst werden können und durch die Funktion als Dimer eine höhere Sicherheit bieten können.

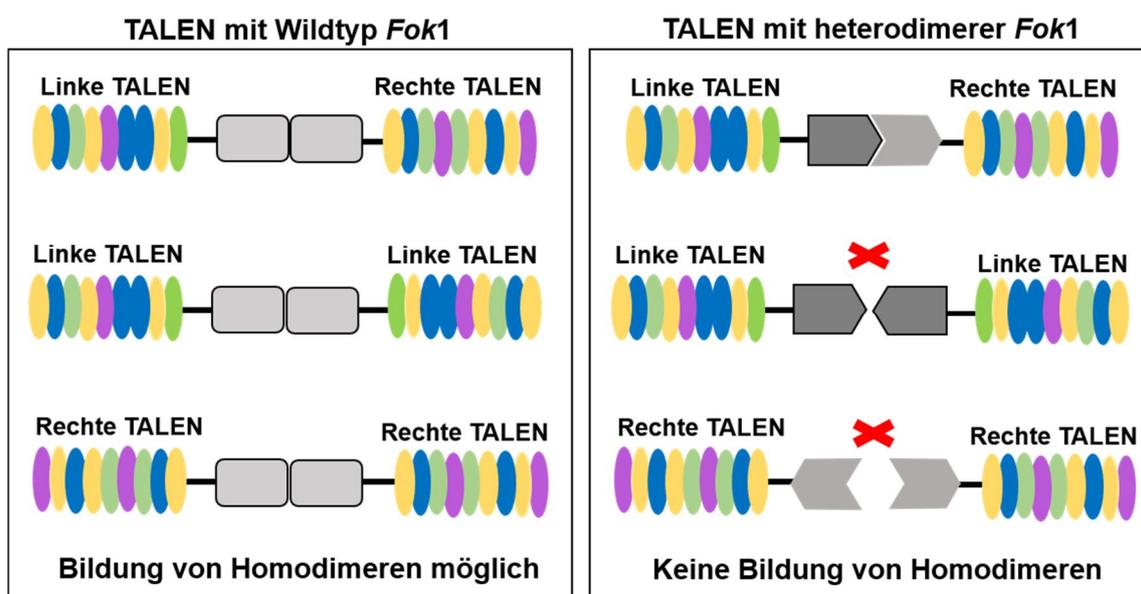
TALE-Proteine stammen aus bakteriellen Pflanzenpathogenen der Gattung *Xanthomonas*. Sie werden über ein Typ III Sekretionssystem in die pflanzlichen Wirtszellen injiziert, binden an die Wirts-DNA und erhöhen dort die Expression bestimmter Wirtsgene, die dem Bakterium von Nutzen sind.<sup>213,214</sup> Die erste Entdeckung der TALE Proteinfamilie erfolgte 1989 von Bonas et al. in *Xanthomonas euvesicatoria* (früher *campestris* pv. *vesicatoria*) einem Bakterium, das Tomaten- und Paprikapflanzen befällt.<sup>215,216</sup> TALE-Proteine bestehen aus einer N-terminalen-, einer C-terminalen- und einer DNA-Bindedomäne. Die DNA-Bindedomäne besteht aus mehreren Monomeren, die jeweils 33 - 35, meist 34 Aminosäuren besitzen.<sup>215</sup> Strukturanalysen von TALE-Proteinen zeigten, dass jedes Monomer zwei Helices mit einem Winkel von etwa 60° zueinander bildet.<sup>217</sup> Jedes Monomer bindet genau an ein Nukleotid in

der DNA-Sequenz. Die Aminosäuren an Position 12 und 13 im Monomer sind für diese Bindung verantwortlich und werden als *repeat variable di-residue*, kurz RVD, bezeichnet. Während die Aminosäure an Position 13 direkt für die Erkennung des jeweiligen Nukleotids in der DNA verantwortlich ist, stabilisiert die Aminosäure an Position 12 die Konfirmation der TALEN-Schleufe. Unterschiedliche RVDs sind in der Lage verschiedene Nukleotide mit einer spezifischen Affinität zu binden. Die häufigsten und am besten beschriebenen RVDs sind Asparagin und Isoleucin (NI), Histidin und Asparaginsäure (HD), Asparagin und Asparagin (NN), Asparagin und Glycin (NG), Asparagin und Histidin (NH). Die Bindung dieser RVDs erfolgt nach den angegebenen Präferenzen: NG = Thymin; HD = Cytosin; NI = Adenin; NN = Guanin oder Adenin, NH = Guanin.<sup>218–220</sup> Natürlich vorkommende TALE-Proteine haben häufig 17,5 Monomere, wobei sich das erste Monomer im N-terminalen Bereich des Proteins befindet und fast ausschließlich Thymin bindet.<sup>221</sup> Die Klonierung einer TALE-Bindedomäne für eine spezifische Sequenz erfolgte ähnlich wie bei den ZFN durch zusammenfügen mehrerer (meist zwischen 17 - 20 bp) Monomere nach der Golden Gate Methode.<sup>222,223</sup> Anschließend wird die TALE-Bindedomäne mit der Schneidedomäne einer Nuklease über einen *Linker* verbunden. Häufige Anwendung findet hierbei, wie auch in den ZFN, die dimere Schneidedomäne der *Fok1*-Endonuklease. TALEN mit einer solchen Schneidedomäne funktionieren nur als Paar und bestehen daher immer aus zwei Armen (linker und rechter Arm), die nach der Bindung an ihre jeweilige Zielsequenz ein Dimer bilden. Da beide Arme in der Regel unterschiedliche DNA-Bindedomänen enthalten, werden die linke und rechte TALEN zusammen auch als Heterodimer bezeichnet (Abbildung 7). Allerdings unterscheidet die Wildtypvariante der *Fok1*-Schneidedomäne nicht zwischen den beiden Armen und es kann bei einer möglichen



**Abbildung 7: Schematische Darstellung einer TALE-Nuklease gebunden an ihre Zielsequenz.** TALEN bestehen aus einer DNA-Bindedomäne und einer durch einen *Linker* verbundenen Schneidedomäne, wie der dimeren *Fok1*. Der Abstand zwischen den beiden TALEN-Armen, indem der Doppelstrangbruch induziert wird, wird als *Spacer* bezeichnet. Die DNA-Bindedomäne besteht aus einzelnen Monomeren, die sich an zwei Aminosäuren unterscheiden. Diese, als *repeat variable di-residues* (RVDs) bezeichneten, zwei Aminosäuren vermitteln die spezifische Bindung des Monomers zu einem Nukleotid in der DNA-Sequenz. Die dargestellten RVDs bestehen aus Asparagin und Histidin (NH), Asparagin und Isoleucin (NI), Asparagin und Glycin (NG), Histidin und Asparaginsäure (HD), Asparagin und Asparagin (NN). Die Bindung dieser RVDs erfolgt nach den angegebenen Präferenzen: NG = Thymin; HD = Cytosin; NI = Adenin; NN = Guanin oder Adenin, NH = Guanin. Dargestellt ist die in dieser Arbeit verwendete CCR5-Uco-TALEN gebunden an den CCR5-Lokus.

Bindung auch zur Bildung von Homodimeren aus zwei gleichen TALEN-Armen kommen, die ebenfalls einen Doppelstrangbruch (DSB) induzieren können (Abbildung 8). Die Bildung von heterodimeren sowie homodimeren TALEN-Paaren kann die Anzahl potenzieller Off-Targets deutlich erhöhen. Bei Off-Targets handelt es sich um Sequenzen, die auf Grund ihrer hohen Homologie zur Zielsequenz der Nuklease oder dem Aufbau der Nuklease selbst (zum Beispiel wegen Monomeren, die mehr als ein Nukleotid binden) ebenfalls gebunden und geschnitten werden. Off-Targets können einen potenziell negativen Effekt auf die editierten Zellen haben. Neben den direkten Effekten auf den editierten Genbereich des Off-Targets können durch zusätzliche DSB im Genom chromosomale Aberrationen entstehen. Vor allem für Designernukleasen in der klinischen Anwendung ist eine geringe Anzahl Off-Targets optimalerweise eine gänzlich fehlende Off-Target-Aktivität erstrebenswert. Aus diesem Grund wurden obligat heterodimere *Fok1*-Schneidedomänen entwickelt, die die Induktion von Doppelstrangbrüchen durch zwei gleiche TALEN-Arme verhindern und somit die Zelltoxizität verringern.<sup>224–227</sup>

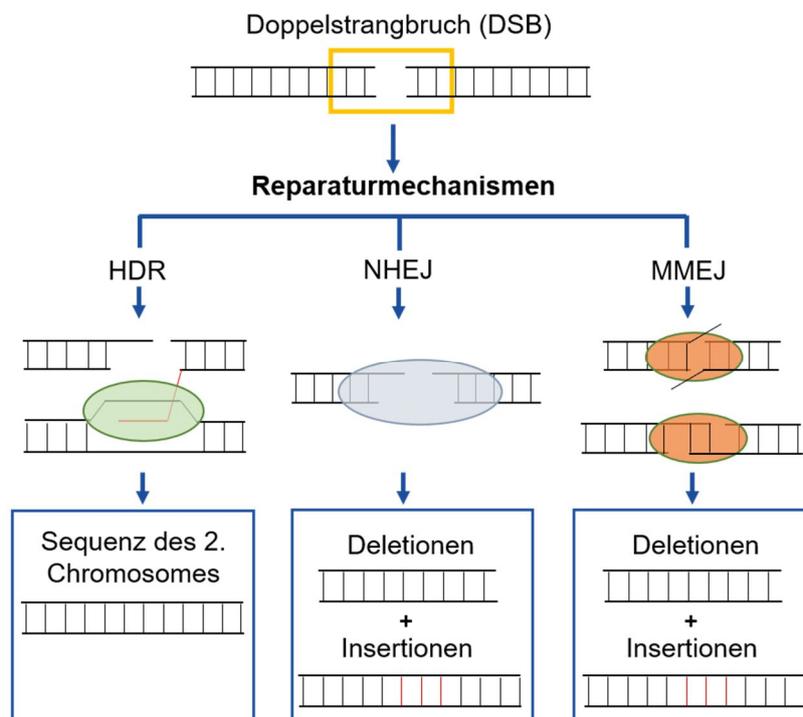


**Abbildung 8: Bildung von TALEN-Paaren mit Wildtyp beziehungsweise obligat heterodimerer *Fok1*.** Die Wildtyp *Fok1*-Schneidedomäne erlaubt die Bildung von homodimeren und heterodimeren TALEN-Paaren, während die obligat heterodimere *Fok1* in der TALEN eine Bildung von funktionsfähigen Homodimeren verhindert.

### 1.3.3 Zelluläre Reparaturmechanismen zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Die meisten Designernukleasen sind dafür konzipiert DSB an den angestrebten Genloci zu induzieren. Die DSB führen in der Regel zu Mutationen im Genom, die wiederum die Expression von Genen beeinflussen können. Diese Mutationen entstehen durch zelleigene Reparaturmechanismen. Da die genomische DNA in Zellen täglich den unterschiedlichsten Einflüssen, wie Hitze, Strahlen oder Substanzen ausgesetzt ist, die zu Mutationen führen können, besitzen Zellen eine Reihe verschiedener Reparaturmechanismen, um diese Schäden zu korrigieren. Ein für die Zelle sehr gefährlicher DNA-Schaden stellt ein DSB dar,

da dieser zur Fragmentierung des Chromosoms führen würde. Es existieren daher mehrere DNA-Reparaturmechanismen, die Doppelstrangbrüche korrigieren können (Abbildung 9). Die beiden primären Reparaturmechanismen sind (i) die „nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung“ (NHEJ, engl. *nonhomologous-end-joining*) und (ii) die „homologe Rekombination“ (HR, engl. *homologous recombination*), die heute auch als homologievermittelte Reparatur (HDR, engl. *homology directed repair*) bezeichnet wird.<sup>228,229</sup> Beim NHEJ werden die Enden der Doppelstrangbrüche durch bestimmte Enzyme wieder zusammengefügt und durch Ligasen verbunden. Sind die DNA-Enden dabei nicht kompatibel für die Ligation werden die Enden entsprechend abgeschnitten oder aufgefüllt. Dadurch entstehen kleinere Deletionen oder Insertionen (Indels) an der reparierten Bruchstelle. Obwohl bei diesem Vorgang vermehrt Mutationen entstehen, ist NHEJ in Säugetierzellen der häufigste Reparaturmechanismus bei DSB.<sup>230–232</sup> Im Gegensatz dazu stellt das HDR einen präziseren Reparaturmechanismus dar. Da diploide Zellen zwei Kopien jedes Chromosoms (der Autosome) besitzen, kann das 2. Chromosom als Matrize verwendet werden. Dabei wird die DNA-Information des intakten Chromosoms auf das gebrochene Chromosom übertragen und so wiederhergestellt. Darüber hinaus kann auch das Schwesterchromatid nach DNA-Replikation und Sequenzduplikation auf demselben oder andere Chromosomen als Matrize dienen. Auch exogene DNA-Fragmente können von der Zelle als Vorlage bei der Reparatur



**Abbildung 9: Zelluläre Reparaturmechanismen von Doppelstrangbrüchen.** Nach einem Doppelstrangbruch kommen unterschiedliche Reparaturmechanismen zum Einsatz. Bei der homologievermittelten Reparatur (HDR) verwendet die Zelle das zweite Chromosom oder das Schwesterchromatid als Vorlage um die Sequenz des kaputten Stranges wiederherzustellen. Beim nicht-homologen Verbinden von Enden (NHEJ) werden überstehende Nukleotide abgeschnitten oder aufgefüllt. Dadurch entstehen Deletionen oder Insertionen. Die auf Mikrohomologien-basierende Endverknüpfung (MMEJ) fügt die Enden an Stellen kurzer Homologien von 4 - 25 Basenpaaren zusammen, wodurch Insertionen oder Deletionen unterschiedlichster Größe entstehen können.

verwendet werden, was von Wissenschaftlern für einen gezielten Austausch von Sequenzinformation genutzt wird. Ein weiterer Reparaturmechanismus, der zu den alternativen NHEJ gezählt wird, ist die mikrohomologiebasierte End-zu-End-Verknüpfung (*microhomologie-mediated end joining*, MMEJ). Dabei werden die einzelsträngigen Enden des Doppelstrangbruchs an Sequenzbereichen mit kleinsten Homologien (2 - 25 Basenpaare) gepaart und an dieser Stelle ligiert, wodurch hauptsächlich Deletionen der dazwischen liegenden Bereiche, aber auch Insertionen entstehen.<sup>233–236</sup> Neben kleineren und größeren Deletionen sowie Insertionen können beide Reparaturmechanismen NHEJ und MMEJ, zu weitreichenden chromosomalen Veränderungen wie Translokationen, Inversionen oder ähnlichem führen, insbesondere wenn gleichzeitig mehrere DSB vorliegen.<sup>237–239</sup>

#### 1.3.4 TALEN-vermittelte Geneditierung von T-Zellen durch die CCR5-Uco-TALEN

Der Knockout des *CCR5*-Gens in T-Zellen und hämatopoetischen Stammzellen führt, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweislich zu einer hohen Resistenz gegenüber R5-HIV-Stämmen und stellt daher in einigen neuen Konzepten der HIV-Behandlung, wie einer kombinierten „*Shock and Kill*“-Methode einen wichtigen Teilaspekt dar. Ferner wird der Schutz von T-Zellen vor einem Eindringen von HIV durch einen *CCR5*-Knockout mittelweile auch für andere, kürzlich entwickelte Gentherapien, wie der CAR-T-Zelltherapie, für HIV-positive Patienten interessant. Aus diesem Grund entwickelte unsere Arbeitsgruppe eine TALE-Nuklease, namentlich CCR5-Uco-TALEN, die zu einem effizienten Knockout von *CCR5* auch in primären T-Zellen führt und die editierten Zellen *in vitro* resistent gegenüber HIV-basierten lentiviralen Vektoren und Wildtyp R5 HIV-1<sub>BaL</sub> machten.<sup>193</sup> Die CCR5-Uco-TALEN erkennt eine DNA-Sequenz von jeweils 20 Nukleotiden pro Arm im *CCR5*-Gen, die für die ICL1 kodiert (Abbildung 4 und Abbildung 7). In T-Zelllinie, wie den PM1 erreicht die CCR5-Uco-TALEN eine *CCR5*-Editierungsrate von > 90 % und in primären, humanen T-Zellen eine Geneditierungsrate von > 50 % am *CCR5*-Lokus. Erste Off-Target Analysen am Genlokus *CCR2*, wiesen eine, wenn auch niedrige Aktivität, an diesem Locus auf. Die Untersuchung eines weiteren sehr wahrscheinlichen Off-Targets im Gen des Proteins *Mucin-16* (*MUC16*) hingegen zeigte keinerlei CCR5-Uco-TALEN Aktivität auf. Eine Schwierigkeit bei allen Designernukleasen ist der Transport zur und in die Zielzelle. Bei T-Zellen und hämatopoetischen Stammzellen ist es auch im Menschen möglich durch eine einfache Blutentnahme oder Leukapherese diese Zellen zu entnehmen und zu behandeln (*ex vivo* Therapie). Das Einbringen der Designernuklease oder die entsprechende genetische Information kann anschließend durch virale Vektoren, chemische Trägerstoffe, physikalische Methoden wie der Elektroporation.<sup>240–242</sup> Bei der Elektroporation werden Zellen einem elektrischen Feld ausgesetzt, wodurch es zur Bildung von Poren in der Zellmembran kommt durch die Moleküle, wie DNA, mRNA oder Protein gelangen können.<sup>243</sup> Im Hinblick auf den

Transfer von Designernukleasen in T-Zellen und hämatopoetischen Stammzellen stellt die Elektroporation eine gut umsetzbare und transiente Methode dar. Aus diesem Grund wurde für die CCR5-Uco-TALEN ein Protokoll zur mRNA-Elektroporation von menschlichen Zelllinien, primären T-Zellen und primären hämatopoetischen Stammzellen entwickelt.<sup>193</sup> Die CCR5-Uco-TALEN soll in einer autologen *ex vivo* Gentherapie zur Herstellung CCR5-negativer CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zur Behandlung von HIV-infizierten Patienten eingesetzt werden. Der Einsatz dieser Zellen soll in Kombination mit anderen Konzepten, wie der „*Shock and Kill*“-Methode oder CAR-T-Zellen zur Behandlung einer HIV-Infektion oder HIV-infizierten Patienten erfolgen. Für die Translation dieses Konzeptes und der CCR5-Uco-TALEN in die Klinik bedarf es weiterer vorklinischer Untersuchungen und der Entwicklung eines Herstellungsprozesses, der der „Guten Herstellerpraxis“ (*good manufacturing praxis*, GMP) unterliegt.

#### 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

HIV-Infektionen stellen trotz der Entwicklung effizienter antiretroviraler Therapien (cART) weiterhin ein globales Gesundheitsproblem dar. Da keines der derzeitigen antiretroviralen Medikamente zu einer Eradikation des HI-Virus führt, bleibt eine Infektion mit HIV eine chronische Erkrankung und erfordert in der Regel eine lebenslange Therapie. Die Langzeitbehandlung mit cART kann allerdings zu teilweise schweren Nebenwirkungen, Toxizität oder Medikamentenwechselwirkungen führen. Zudem lässt sich ein Anstieg des Anteils resistenter HIV-Stämme, selbst unter cART-naiven Patienten, beobachten. Daher besteht weiterhin ein dringender Bedarf, neue Therapieansätze zur HIV-Eradikation zu entwickeln. Viele darauf gerichtete Gentherapiekonzepte beinhalten unter anderem den Knockout des HIV-Korezeptors *CCR5* in HIV-Zielzellen. Das Potential dieses Ansatzes wurde durch die Heilung zweier HIV-positiver Krebspatienten von ihrer HIV-Infektion nach Stammzelltransplantation von einem CCR5-negativen Spender unterstrichen.

Für die Translation neuer Therapieverfahren in die klinische Anwendung müssen mögliche Risiken und negative Effekte in vorklinischen Untersuchungen umfassend überprüft werden. Im Zuge dieser Arbeit sollte daher die Aktivität der zuvor entwickelten CCR5-Uco-TALEN am *CCR5*-Lokus und an potenziellen Off-Targets analysiert werden. Darauf aufbauend sollte die CCR5-Uco-TALEN für die spätere klinische Anwendung optimiert und ihre Anwendung in T-Zellen umfassend molekular charakterisiert werden. Im finalen Schritt sollte ein GMP-kompatibles Protokoll zur Produktion großer Mengen *CCR5*-editierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen für die klinische Anwendung entwickelt werden. Die Hauptziele dieser Arbeit waren somit die präklinische Prüfung der im Labor entwickelten und optimierten Designernuklease sowie die Entwicklung eines validierten Herstellungsprozesses zur Produktion humaner HIV-resistenter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen für die klinische Anwendung zur Behandlung HIV-positiver Patienten.

## 2 Material

Im Folgenden sind alle in der vorliegenden Arbeit verwendete Geräte und Arbeitsmaterialien aufgelistet. Die Entsorgung erfolgte nach den entsprechenden Richtlinien.

### 2.1 Geräte

Gerätetyp	Gerätename	Firma
ddPCR-System	QX100™ Droplet Digital™ PCR System (Generator und Reader)	Bio-Rad Laboratories GmbH (85622 Feldkirchen, Deutschland)
Durchflusszytometer	BD FACS Aria™ III (Laser: 407 nm, 488 nm, 561 nm, 633 nm)	BD (07417 Franklin Lakes NJ, USA)
Durchflusszytometer	BD FACS Canto™ II (Laser: 407 nm, 488 nm, 633 nm)	BD
Durchflusszytometer	MACSQuant® Analyzer 10 (Laser: 405 nm, 488 nm, 640 nm)	Miltenyi Biotec (51429 Bergisch Gladbach, Deutschland)
Elektroporator	GenePulser Xcell Total System	Bio-Rad Laboratories GmbH
Elektrophoresesystem	peqlab PerfectBlue Gelsystem Mini L	VWR International (64295 Darmstadt, Deutschland)
Elektrophoresesystem	peqlab PerfectBlue Gelsystem Mini S	VWR International
Inkubator	Heraeus Heracell 150i CO <sub>2</sub>	ThermoFisher Scientific (02451 Waltham, USA)
Inkubator	Heraeus function line	ThermoFisher Scientific
Inkubations-Schüttelschrank	Certomat BS-1 und IS	B.Braun GmbH & Co. KG (34212 Melsungen, Deutschland)
Lichtmikroskop	CKX41	Olympus Europa SE & Co.KG (20097 Hamburg, Deutschland)
Magnetrührer	IKAMAG REO	IKA®-Werke GmbH (79219 Staufen, Deutschland)
PCR-Gerät	LightCycler® 480 Instrument II	F.Hoffmann-La Roche AG (CH-4070 Basel, Schweiz)
PCR-Gerät	Tprofessional Standard Blocktyp 96 well (gradient)	Biometra, Analytik Jena AG (07745 Jena, Deutschland)
PCR-Werkbank	peqlabPCR Workstation Pro	VWR International
Pipettierhilfe	Multipette Xstream	Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences AG (CH-7205 Zizers, Schweiz)
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG (74246 Eberstadt, Deutschland)
Pipettierhilfen	Eppendorf Research/Plus (0,5-1000 µl, Ein- und Mehrkanalpipetten)	Eppendorf AG
pH-Meter	WTW inoLab pH 720	Xylem Inc. (10573 Rye Book NY, USA)
pH-Elektroden mit Temperaturfühler	WTW SenTix® 81	Xylem Inc.
Plattenschüttler	Biometra WT16 mini rocking platform	Analytik Jena AG (07745 Jena, Deutschland)
Plattenschweißgerät	PX1 PCR Plate Sealer	Bio-Rad Laboratories GmbH
Plattenzentrifuge	Perfect Spin peqlab	VWR International

Reinstwasseranlage	PURELAB flex 2	ELGA LabWater (HP14 3BY High Wycombe, England)
Schweißgerät	TSCD-II®	Terumo (1510072 Shibuya, Japan)
Sicherheitswerkbank	Heraeus HERAsafe HS12/HS18	Kendro Laboratory jetzt ThermoFisher Scientific
Spektralphotometer	Nanodrop™ ND-1000	ThermoFisher Scientific
Spektralphotometer	Qubit® 2.0	Invitrogen (58239 Schwerte, Deutschland)
Thermomixer	comfort 1.5 ml	Eppendorf AG
QIAGEN-Pumpenadapter	QIAvac 24 Plus	Qiagen GmbH (40724 Hilden, Deutschland)
USV	KR2000	Kehua Group (Xiamen Fujian, China)
UV-Gerät mit Kamera	Gel-Dokumentation (312 nM UV-Lampe & Foculus IEEE 1394 digitale)	PHASE GmbH (23564 Lübeck, Deutschland)
Vakuum-Pumpe	Membranpumpe MZ 2C	Vaccubrand GmbH Co. (97877 Wertheim, Deutschland)
Vortexer	VF2	IKA®-Werke GmbH (79219 Staufen, Deutschland)
Waage	KB 2400 – 2N	KERN & SOHN GmbH (72336 Balingen-Fromme, Deutschland)
Wasserbad	TYP 1008	GFL Gesellschaft für Labordiagnostik GmbH
Zentrifuge	MC 6 für Mikrogefäße und Achterketten	SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)
Zentrifuge	Rotanta 460 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG (78532 Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge	Sorvall RC5CPlus mit Rotor Sorvall SLA 1500 Super-LITE	ThermoFisher Scientific
Zentrifuge	Zentrifuge 5417R und 5424	Eppendorf AG
Zentrifuge	Eppendorf centrifuge 5415 C	Eppendorf AG
Zellmanufaktur-Plattform	CliniMACS Prodigy®	Miltenyi Biotec
Zellmanufaktur-Plattform	CliniMACS® Electroporator	Miltenyi Biotec

## 2.2 Verbrauchsmaterial

Material	Artikelnr.	Firma
0,2 ml Reaktionsgefäße, 8er Streifen	72.991.002	SARSTEDT AG & Co. KG
0,2 ml Reaktionsgefäße	72.737.002	SARSTEDT AG & Co. KG
0,5 ml Reaktionsgefäße	72.699	SARSTEDT AG & Co. KG
1,5 ml Reaktionsgefäße	72.690.001	SARSTEDT AG & Co. KG
2 ml Reaktionsgefäße	0030120.094	Eppendorf AG
13 ml Röhre mit Belüftungsstopfen	62.515.006	SARSTEDT AG & Co. KG
15 ml Falcon Reaktionsgefäße	188271	Greiner Bio-One International GmbH (A-4550 Kremsmünster, Österreich)
10-cm Schalen für die Molekularbiologie	632181	Greiner Bio-One International GmbH
12-Well Platten für die Zellkultur	M8687	Greiner Bio-One International GmbH
24-Well Platten für Suspensionszellen	M9312	Greiner Bio-One International GmbH
30 ml Reaktionsgefäße	201170	Greiner Bio-One International GmbH

5 ml Röhrchen	55.1597	SARSTEDT AG & Co. KG
50 ml Falcon Reaktionsgefäße	227264	Greiner Bio-One International GmbH
6-Well Platten für Suspensionszellen	83.3920.500	Greiner Bio-One International GmbH
96-Well Lightcycler Platten	72.1982.202	SARSTEDT AG & Co. KG
96-Well PCR-Platten	72.1978.202	SARSTEDT AG & Co. KG
96-Well PCR-Platten, twin.tec™ semi-skirted	951020389	Eppendorf AG
Adhäsive qPCR Folie	95.1999	SARSTEDT AG & Co. KG
Adhäsive PCR Folie, stark klebend	95.1993	SARSTEDT AG & Co. KG
CliniMACS® Prodigy EP-2	170-076-623	Miltenyi Biotec
CliniMACS® Prodigy TS 520	170-076-600	Miltenyi Biotec
Combitips® advanced 0,5 ml	30089421	Eppendorf AG
Deckgläschen	0351000	Paul Marienfeld GmbH (97922 Lauda Königshofen, Deutschland)
D8 Gaskets	1863009	Bio-Rad Laboratories GmbH
D8 Cartridges	1864008	Bio-Rad Laboratories GmbH
Filter Falcon, Einzelzellsuspensionen (70 µm)	542070	ThermoFisher Scientific
Filterspitzen Biosphere 0,1-20 µL	701116215	SARSTEDT AG & Co. KG
Filterspitzen Biosphere 20 µL	70.760.213	SARSTEDT AG & Co. KG
Filterspitzen Biosphere 100 µL	70.760.212	SARSTEDT AG & Co. KG
Filterspitzen Biosphere 200 µL	70.760.211	SARSTEDT AG & Co. KG
Filterspitzen Biosphere 1000 µL	70.762.211	SARSTEDT AG & Co. KG
Elektroporationsküvetten Plus, BTX 4 mm	450126	VWR International
Kryoröhrchen	377224	ThermoFisher Scientific
LS MACS Separation Columns	130-042-401	Miltenyi Biotec
Nalgene™ Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	5100-0001	ThermoFisher Scientific
Neuerbauerzählkammer (improved)	0640010	Paul Marienfeld GmbH
QIAshredder	79654	Qiagen GmbH
Qubit™ Assay Tube	Q32856	ThermoFisher Scientific
Parafilm M	P7793	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)
PCR Plate Heat Seal Foil	1814040	Bio-Rad Laboratories GmbH
Pipettenspitzen 0,1 - 10 µl	22492004	Eppendorf AG
Pipettenspitzen 200 µl	70.760.002	SARSTEDT AG & Co. KG
Pipettenspitzen 1000 µl	70.762	SARSTEDT AG & Co. KG
Serologische Pipetten 2 ml	86.1252.001	SARSTEDT AG & Co. KG
Serologische Pipetten 5 ml	86.1253.001	SARSTEDT AG & Co. KG
Serologische Pipetten 10 ml	86.1254.001	SARSTEDT AG & Co. KG
Serologische Pipetten 50 ml	86.1256.001	SARSTEDT AG & Co. KG
Sicherheitskanüle, Blunt Fill 18Gx	303129	BD
Single Sampling Adapter	170-076-608	Miltenyi Biotec
Skalpell (Chirurgisches Einmal-Skalpell)	5518059	B.Braun GmbH & Co. KG (34212 Melsungen, Deutschland)
Spritzen, 2 ml	4606701V	B.Braun GmbH & Co. KG
Spritzen, 10 ml	309110	BD
Spritzen, 30 ml	301229	BD
Spritzen, 50 ml	300865	BD
Transfer Bag 1000	130-018-001	Miltenyi Biotec
Triple sampling adapter	170-076-609	Miltenyi Biotec
Zellkulturflasche T25 (Suspensionszellen)	690195	Greiner Bio-One International GmbH
Zellkulturflasche T75 (Suspensionszellen)	658195	Greiner Bio-One International GmbH

## 2.3 Kommerzielle Kits

Die nachfolgenden Kits wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach dem Protokoll des Herstellers angewendet.

Bezeichnung	Artikelnummer	Firma
CloneJET™ PCR Cloning Kit	K1231	ThermoFisher Scientific
iScript™ Advanved cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	1725038	Bio-Rad Laboratories GmbH
Light Cycler® 480 High Resolution Melting Master	4909631001	F.Hoffmann-La Roche AG (CH-4070 Basel, Schweiz)
MACS® Comp Bead Kit anti-REA	130-104-693	Miltenyi Biotec
Maxima™ SYBR™ Green/Rox 2x qPCR Master Mix	K0221	Thermo Scientific
RNeasy Mini Kit	74104	Qiagen GmbH
TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)	RR820A	TaKaRa (525-0058 Shiga, JP)
T7 mScript™ Standard mRNA Production System	C-MS100625	CELLSCRIPT (53713 Madison WI, USA)
QIAquick Gel Extraction Kit	28706	Qiagen GmbH
QIAquick PCR Purification Kit	28106	Qiagen GmbH
QIAamp DNA Blood Mini Kit	51106	Qiagen GmbH
QIAprep Spin Miniprep Kit	27106	Qiagen GmbH
Qiagen Plasmid Plus Maxi Kit	12965	Qiagen GmbH
Qubit™ RNA HS Assay Kit	Q32852	Invitrogen, ThermoFisher Scientific
Qubit™ dsDNA BR Assay Kit	Q32850	Invitrogen, ThermoFisher Scientific
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	210518	Agilent Technologies (95051 Santa Clara, USA)

## 2.4 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Artikelnummer	Firma
2-Propanol	59304-1L-F	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol [50 mM]	31350-010	Gibco, Fisher Scientific (58239 Schwerte, Deutschland)
6X DNA Loading Dye	R0611	ThermoFisher Scientific
7-AAD	130-111-568	Miltenyi Biotec
Agar-Agar Kobe I	5210.3	Carl Roth (76185 Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	1.01145.1000	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)
Ampicillin Natriumsalz	K029.1	Carl Roth
Antifect N liquid	113940	Schülke & Mayr (22851 Norderstedt, Deutschland)
CD4 MicroBeads, 2 ml	130-045-101	Miltenyi Biotec
CliniMACS® CD4 Reagent	200-070-132	Miltenyi Biotec
Biocoll Separating Solution	L6115	Biochrom AG (12247 Berlin, Deutschland)
dATP [je 100 mM]	R0141	ThermoFisher Scientific
dCTP [je 100 mM]	R0151	ThermoFisher Scientific
dGTP [je 100 mM]	R0161	ThermoFisher Scientific
dTTP [je 100 mM]	R0171	ThermoFisher Scientific
ddPCR Supermix for Probes (no dUTP)	1863024	Bio-Rad Laboratories GmbH
ddPCR Droplet Reader Oil	1863004	Bio-Rad Laboratories GmbH
Droplet Gen Oil for Probes	1863005	Bio-Rad Laboratories GmbH

Dimethylsulfoxid (DMSO)	D4540	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	E5134	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure Magnesium-di-Kaliumsalz (Mg-Titriplex*2H <sub>2</sub> O)	1.08409.0100	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)
Ethanol [80%] vergällt mit MEK, Bitrex, IPA	2203	Th. Geyer GmbH (37671 Hötter-Stahle, Deutschland)
Ethanol absolut	1.00983	Merck
Fast Media Amp Agar	fas-am-b500	InvivoGen Europe (31400 Toulouse, Frankreich)
Fetales Rinderserum (FBS)	F7524	Sigma-Aldrich
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	SM0311	ThermoFisher Scientific
Humanes Serum Typ AB, Vollblut geronnen	H6914	Sigma-Aldrich
Humanalbumin 200 g/l Infusionslösung	34102	Kedrion Biopharma (55051 Lucca, Italien)
Interleukin-7 (IL-7), research grade	130-093-937	Miltenyi Biotec
Interleukin-15 (IL-15), research grade	130-095-760	Miltenyi Biotec
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	104854	Merck
Kaliumhydroxid, J.T.Baker® (KOH)	0385	VWR International
Kanamycinsulfat	T832.1	Carl Roth
LB Agar Amp	fas-am-s	InvivoGen Europe
LB Medium Lennox	X964.2	Carl Roth
L-Glutamine [200mM]	25030-024	Gibco, Fisher Scientific
RNase AWAY™ Dekontaminationsmittel	7002	ThermoFisher Scientific
MACS® GMP T Cell TransAct	170-076-156	Miltenyi Biotec
MACS® GMP Recombinant Human IL-7	170-076-111	Miltenyi Biotec
MACS® GMP Recombinant Human IL-15	170-076-114	Miltenyi Biotec
MACSQuant® Calibration Beads	130-093-607	Miltenyi Biotec
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	AM9530G	Invitrogen
Natrium Pyruvate [100mM]	11360-039	Gibco, Fisher Scientific
Natriumchlorid (NaCl)	9265.2	Carl Roth
Natronlauge 5 N (NaOH)	119913	Merck
Nuklease-freies Wasser	AM9937	Invitrogen
Penicillin- Streptomycin [10.000 U/ml]	15140-122	Gibco, Fisher Scientific
peqGREEN, DNA/RNA-Farbstoff	732-2960	VWR International
Rinderserum Albumin Lösung [7.5% in DPBS]	A8412	Sigma-Aldrich
T Cell TransAct™, human	130-111-160	Miltenyi Biotec
TBS, <i>Tris buffered saline</i>	T-5030	Sigma-Aldrich
Trypanblau-Lösung (0,4%)	15250061	Gibco, Fisher Scientific
UltraPure™ DNA Typing Grade 50x TAE Puffer	24710030	Invitrogen
UltraPure™ Agarose	16500500	Invitrogen

## 2.5 Puffer und Medien

Bezeichnung	Artikelnummer	Firma
CliniMACS® PBS/EDTA Buffer	200-070-029	Miltenyi Biotec
CliniMACS® Electroporation Buffer	170-076-625	Miltenyi Biotec
DPBS (1x) ohne Kalzium, ohne Magnesium	14190-094	Gibco, Fisher Scientific
DPBS ohne Kalzium, ohne Magnesium	BDL-001-10L	Serana (Pessin, Deutschland)
MACSQuant® Running Buffer	130-092-747	Miltenyi Biotec
MACSQuant® Washing Solution	130-092-749	Miltenyi Biotec
Opti-MEM I Medium, reduziertes Serum	31985062	Gibco, Fisher Scientific
RPMI 1640 Medium	61870044	Gibco, Fisher Scientific
TexMACS™ Medium	130-097-196	Miltenyi Biotec
TexMACS™ GMP Medium	170-076-306	Miltenyi Biotec
NaCl Isotonische Lösung 0,9 %	169927	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (61346 Bad Homburg, Deutschland)

## 2.6 Enzyme und verwendete Puffer

Bezeichnung	Artikelnummer	Firma
DreamTaq DNA-Polymerase und 10X DreamTaq Buffer	EP0702	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Bst</i> 1107I und Puffer	FD0704	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Bam</i> HI und Puffer	FD0054	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Bsm</i> BI und Puffer	FD0454	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Bpu</i> 10I und Puffer	FD1184	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Eam</i> 1104I und Puffer	FD0234	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Eco</i> 31I und Puffer	FD0294	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Eco</i> 105I und Puffer	FD0404	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Eco</i> RI und Puffer	FD0274	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Hpa</i> I und Puffer	FD1034	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Hind</i> III und Puffer	FD0504	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Lgu</i> I und Puffer	FD1934	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Mau</i> BI und Puffer	FD2084	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Not</i> I und Puffer	FD0596	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Pvu</i> I und Puffer	FD0624	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Pvu</i> II und Puffer	FD0634	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Sac</i> I und Puffer	FD1133	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Sal</i> I und Puffer	FD0644	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Scal</i> und Puffer	FD0434	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Stu</i> I und Puffer	FD0424	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Xba</i> I und Puffer	FD0684	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Xho</i> I und Puffer	FD0694	ThermoFisher Scientific
FastDigest <i>Xma</i> JI und Puffer	FD1564	ThermoFisher Scientific
Proteinase K	19131	Qiagen GmbH
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase und Q5® Reaction Buffer Pack	M0491L	New England Biolabs (D-65926 Frankfurt am Main)
T4 Polynukleotid-Kinase	EK0031	ThermoFisher Scientific
T4 DNA Ligase [5 U/μL] und Puffer	EL0011	ThermoFisher Scientific

## 2.7 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper stammen von der Firma Miltenyi Biotec (51429 Bergisch Gladbach, Deutschland).

Bezeichnung	Artikelnummer
CD45 – Vioblue, human (Klon: REA747)	130-110-637
CD62L – APC, human (Klon: 145/15)	130-113-617
CD3 – FITC, human (Klon: REA613)	130-113-138
CD4 – Viogreen, human (Klon: REA623)	130-113-230
CD45RO – PE-Vio770, human (Klon: UCHL1)	130-114-077
CD197 (CCR7) – APC, human (Klon: REA546)	130-120-466
CD95 (Fas) – FITC, human (Klon: REA738)	130-113-003
CD16 – PE, human (Klon: REA423)	130-113-955
CD19 – PEVio770, human (Klon: REA675)	130-114-173
CD56 – PE, human (Klon: REA196)	130-113-874
CD14 – APC, human (Klon: REA599)	130-110-578
CD8 – APCVio770, human (Klon: REA734)	130-110-681

## 2.8 Humane Zellen und Bakterien

### Bakterienstamm

*E.coli* Top10 F'

### Herkunft/Referenz

Invitrogen

### Zelllinien

Jurkat (J76)

Sommermeyer et al<sup>244</sup>

PM1

Lusso et al<sup>245</sup>

### Primäre Zellen

*Buffy Coat* gesunder Spender (nach Einwilligung)

Transfusionsmedizin UKE

## 2.9 Plasmide

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft/Referenz</b>
pCCR5-Uco-TALEN L	Mock et al <sup>193</sup>
pCCR5-Uco-TALEN R	Mock et al <sup>193</sup>
pMA-Fok1-WT(opt)	ThermoFisher Scientific
pMA-Fok1-KKR	ThermoFisher Scientific
pMA-Fok1-RVR	ThermoFisher Scientific
E977	BioNtech IMS
pJetGFP	Mock et al <sup>193</sup>

## 2.10 mRNA

Die CCR5-Uco-TALEN L und CCR5-Uco-TALEN R mRNA, die in einigen Experimenten dieser Arbeit verwendet wurde, wurde von der Firma TriLink Biotechnologies (10770 San Diego CA, USA) durch in vitro Transkription (IVT) produziert. Die mRNA Synthese erfolgte mit den Plasmiden pCCR5-Uco-TALEN L und pCCR5-Uco-TALEN R. Die Plasmide wurden von der Firma mit dem Enzym *Xma*II linearisiert. Die mRNA war nicht modifiziert und wurde mit einer *Cap*1-Struktur sowie einer enzymatisch angehangener Poly(A)-Sequenz versehen. Nach der IVT erfolgte eine DNase- und Phosphatase-Behandlung. Die Aufreinigung erfolgte über eine Silika-Membran. Die für einige Versuche verwendete mRNA der CCR5-Uco-hetTALEN L und CCR5-Uco-hetTALEN R wurde durch die Firma BioNtech IMS (Idar-Oberstein, Deutschland) durch IVT synthetisiert. Grundlage der Synthese waren die Plasmide pCCR5-Uco-hetTALEN\_poly(A)-Kan L und Plasmide pCCR5-Uco-hetTALEN\_poly(A)-Kan R. Die Plasmide wurden über die Restriktionsschnittstelle *Lgul* linearisiert. Nach der Transkription erfolgte das 5' *Capping* mit einem ARCA *cap*. Die mRNA wurde über Silika-Kugeln (*silica beads*) aufgereinigt, filtriert (0,2 µm) und abgefüllt. Die Elution erfolgte in RNase-freiem Wasser. Die Konzentrationsbestimmung der mRNA erfolgte mittels UV-Spektrometrie (nach Ph. Eur. 2.2.25).

## 2.11 Synthetisierte Genfragmente

Die Synthese der genannten Genfragmente erfolgte durch ThermoFisher Scientific mit der angegebenen Syntheseart. Die Rekonstitution der erhaltenen DNA erfolgte in Nuklease-freiem Wasser direkt nach Erhalt der Produkte.

Bezeichnung	Syntheseart
Fok1-RVR	GeneArt Strings
Fok1-DAD	GeneArt Strings
Fok1-ELD	GeneArt Strings
Fok1-KKR	GeneArt Strings
Fok1-WT(opt)	GeneArt Strings
pMA-Fok1-WT(opt)	GeneArt Gene Synthesis
pMA-Fok1-KKR	GeneArt Gene Synthesis
pMA-Fok1-RVR	GeneArt Gene Synthesis

## 2.12 Software

Bezeichnung	Firma/Referenz
CRISPResso 2.0 ( <a href="https://crispresso.pinellolab.partners.org/submission">https://crispresso.pinellolab.partners.org/submission</a> )	<sup>246</sup>
CliniMACS Prodigy Version, 1.4.10 no.66	Miltenyi Biotec
DNA Copy Number and Dilution Calculator	ThermoFisher Scientific
GraphPad Prism, Version 8.4.3	GraphPad Software Inc.
Ensemble ( <a href="https://www.ensembl.org/index.html">https://www.ensembl.org/index.html</a> )	<sup>247,248</sup>
FACSDiva, Version v4.2.2	BD Biosciences
FlowJo, Version v.10.6.2	BD Biosciences
MACSQuantify, Version v. 2.11.1907.19925	Miltenyi Biotec
Nanodrop ND-1000, Version v3.7.1	Thermo Fisher Scientific
Nucleotide BLAST ( <a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov</a> )	National Center for Biotechnology Information <sup>249</sup>
LC480 Software (Version 1.5.0 SP3)	Roche
SnapGene Viewer, Version 5.1.5.1	GLS Biotec LLC
T Cell Engineering Process (beta-Version V0.6.2 & V0.7.0.1)	Miltenyi Biotec
Primer-BLAST ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast</a> )	National Center for Biotechnology Information <sup>250</sup>
PROGNOS	Eli Fine <sup>251</sup>
Paired Target Finder - TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0	Cornell Universität <sup>252</sup>
QuantaSoft, Version 1.7.4.0917	Bio-Rad
Qubit, Version v.3.10	Thermo Fisher Scientific

## 2.13 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden über Eurofins MWG im lyophilisierten Zustand bestellt. Die Rekonstitution erfolgte für die Primer mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/µl. Die Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) wurde mit Primer-BLAST berechnet.

### 2.13.1 Primer für die digitale PCR und scHRMCA

Die nachfolgenden Primer wurden mit einer höheren Reinheit „High Purity Salt Free“ (HPSF) bestellt. Dabei werden die Primer über einen Größenausschluss von Nebenprodukten und Salzen befreit.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub>
CCR5_1	CTGCCTCCGCTCTACTCACT	61,0 °C
CCR5_2	CCCAGAAGGGGACAGTAAGA	58,1 °C
CCR2_1	CAAATTGGGGCCCAACTC	56,2 °C
CCR2_2	GCCCACAATGGGAGAGTAATA	57,1 °C
GPC5_1	GTGTGGTGGTCATGTATCAC	56,2 °C
GPC5_2	GATTGTCTGAGGCCACCC	63,2 °C
EPOR_1	GCTGCCAGCTTTGAGTACACTA	60,6 °C
EPOR_2	GAGATGCCAGAGTCAGATACCACAA	62,1 °C
Inv1	GAAGCAAATCGCAGCCC	58,8 °C
Ins1	TATGCACAGGGTGAACAAG	57,8 °C
nesPCR1	CATTCATGGAGGGCAACTAAATAC	58,0 °C
nesPCR2	CGATTGTCAGGAGGATGATG	55,7 °C
HRM1	GGTTTTGTGGGCAACATGCTGG	54,6 °C
HRM2	GGTCAGAGATGGCCAGGTTG	60,0 °C

### 2.13.2 Primer für Sequenzierungen, Klonierung und qPCR

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub>
hetTALEN1	CAAGCACCTCGGAGGATCAC	60,5 °C
hetTALEN2	ATAGGCAGATTGTAGCCGCC	60,0 °C
IPO8_1	GACCGTTCCTCCTGAGACTC	59,2 °C
IPO8_2	TCCTGGGCTTCCATATCGTTC	59,6 °C
Plasmid1	GAGCTGATACCGCTCGCC	60,4 °C
Plasmid2	CATCCGTCAGGGGCCTTC	59,8 °C
Int1	CTGGCAACTAGAAGGCACTC	58,3 °C
Int2	CCCAGAAGGGGACAGTAAGA	58,1 °C
pKlon1	TCTGTATACGAACCCAGAG	55,8 °C
pKlon2	TACGCGCGGGTAAATTAATC	59,8 °C
pKlon3	AGCTTGATGCGGCCGCATGCAATCTTAGTCAGGATCCTAGT	/
pKlon4	CTAGACTAGGATCCTGACTAAGATTGCATGCGGCCGCATCA	/
pSeq1	AGTTATGCTAGCGACTGTGCCTTCTAGTTG	/
pSeq2	GGGCATTTCAAAGGCAACTA	/
pSeq3	TTCCCGCTTTGATCATTTC	/
pSeq4	GTAGGATCCTCACTATAGGGGCC	/
pSeq5	GATGGATCCGTGGATACCGACCTT	/
pSeq6	CTGGGCCACGATTGACTCCAAGTGC	/
pSeq7	ACAGCACCCAGGACAGAATC	/
pSeq8	CTCGAGTAGGTGGCCATTGT	/
pSeq9	GGGCCAGTTGCTGAAGATCGC	/
pSeq10	TCTGTATACGAACCCAGAG	/
pSeq11	TACGCGCGGGTAAATTAATC	/
pSeq12	CCTAACTGACACACATTCCA	/
Fok1mut1	CAAACTCAACCCTATCTCGAGCTATTCTTTTGATTTATAAGGG	/
Fok1mut2	CCTTATAAATCAAAGAATAGCTCGAGATAGGGTTGAGTGTTG	/

### 2.13.3 Sonden

Die Sonden wurden im mitgelieferten Puffer in einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Modifikation
CCR5ref	CTTTGGTTTTGTGGGCAACATGCT	5' HEX 3'-BHQ1
CCR5mut	CTGCAAAAAGGCTGAAGAGCATGACT	5' FAM 3'-BHQ1
CCR2mut	CTGCAAAAAGCTGAAGTGCTTACTG	5' FAM 3'-BHQ1
GPC5ref	TTGGCTAGTTTCTGGTCCCCAGATGT	5' HEX 3'-BHQ1
GPC5mut	TAGATCTTGCTTTGAAGGTATGTTTTGGACATGATT	5' FAM 3'-BHQ1
EPORref	TTCTGAGGCGCCACTTTTGCAAGACC	5' FAM 3'-BHQ1

## 2.14 Angesetzte Puffer und Medien

Die Lagerung von Puffern und Medien erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C.

### Lysepuffer für die scHRMCA

Reagenzien	Firma
50 mM TBS pH 8.0	Sigma-Aldrich
10 mM EDTA	Sigma-Aldrich
100 mM NaCl	Carl Roth
ad 50 ml Reinstwasser	
Proteinase K (1:100)	QIAGEN

Nach dem Ansetzen wurde der pH-Wert des Lyse-Puffers mit 1 M NaOH auf 8,0 eingestellt, mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert und bei RT gelagert. Vor dem Gebrauch wurde der benötigten Menge an Lyse-Puffer Proteinase K in einem Verhältnis von 1:100 zugefügt.

### Erylysepuffer (pH 7,4)

Reagenzien	Firma
8,3 g NH <sub>4</sub> Cl	Merck
1,0 g KHCO <sub>3</sub>	Merck
0,0372 g Mg-Titriplex*2H <sub>2</sub> O	Merck
ad 1 l Reinstwasser	

Nach dem Ansetzen wurde der pH-Wert des Erylysepuffers mit 5 M KOH auf 7,4 eingestellt und mit einem pH-Meter (WTW inoLab pH 720 und WTW SenTix® 81) überprüft. Anschließend wurde der Puffer mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert.

### Kanamycin-LB-Agar

Reagenzien	Firma
7,5 g Agar-Agar, Kobe I	Roth
10 g LB-Medium Lennox	Roth
ad 500 ml Reinstwasser	
50 mg/ml Kanamycin	Roth

Die benötigten Mengen an Agar-Agar und LB-Medium wurden abgewogen, mit 500 ml Reinstwasser aufgefüllt und autoklaviert. Anschließend wurde dem noch flüssigem, aber abgekühlten LB-Agar 50 mg/ml Kanamycin zugesetzt und je 10 ml des fertigen Kanamycin-LB-Agar in 10-cm Schalen für die Molekularbiologie gefüllt.

**LB-Medium**

<b>Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
10 g LB-Medium Lennox ad 500 ml Reinstwasser	Roth

Die benötigte Menge an LB-Medium wurde abgewogen, mit 500 ml Reinstwasser aufgefüllt und autoklaviert. Falls notwendig wurde dem kalten LB-Medium anschließend entweder 500 µl Kanamycin in einer Konzentration von 50 mg/ml oder 500 µl Ampicillin mit einer Konzentration von 100 mg/ml zugesetzt.

**Ampicillin-Agar**

<b>Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
Fast Media Amp Agar ad 500 ml autoklaviertes Reinstwasser	InvivoGen

Ein Päckchen des Fast Media Amp Agar wurde mit 500 ml autoklaviertem Reinstwasser versetzt und in der Mikrowelle erhitzt. Der flüssige Ampicillin-Agar wurde in 10-cm Schalen für die Molekularbiologie gefüllt.

**Ampicillin-LB-Medium**

<b>Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
10 g LB-Medium Lennox ad 500 ml autoklaviertes Reinstwasser	Roth
500 µl Ampicillin [100 mg/ml]	Roth

Die benötigte Menge an LB-Medium wurde abgewogen, mit 500 ml Reinstwasser aufgefüllt und autoklaviert. Anschließend wurde dem kalten LB-Medium 500 µl Ampicillin mit einer Konzentration von 100 mg/ml zugesetzt.

**MACS-Puffer**

<b>Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
DPBS	Gibco, Thermo Fisher Scientific
0,5 % Rinderserum Albumin Lösung [Vol.-%]	Sigma-Aldrich
2 mM EDTA	Sigma-Aldrich

Der MACS-Puffer wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank angesetzt.

**Supplementierter CliniMACS PBS/EDTA Puffer**

<b>Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	Miltenyi Biotec
75 ml 20 % humanes Albumin	Sigma-Aldrich

Die Lagerung des supplementierten CliniMACS PBS/EDTA Puffers erfolgte bei RT.

**T-Zell Medium I**

<b>Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
RPMI 1640 Medium	Gibco, Fisher Scientific
10 % FBS [Vol.-%]	Sigma-Aldrich
1 % L-Glutamin [Vol.-%]	Gibco, Fisher Scientific
1 % Penicillin-Streptomycin [Vol.-%]	Gibco, Fisher Scientific
1 % Natrium Pyruvat [Vol.-%]	Gibco, Fisher Scientific

Das T-Zell Medium I wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank angesetzt.

**T-Zell Medium II**

<b>Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
TexMACS	Miltenyi Biotec
8 % autologes Plasma [Vol.-%]	
0,1 % 2-Mercapthoethanol [Vol.-%]	Gibco, Thermo Scientific
1 % Natrium Pyruvat [Vol.-%]	Gibco, Thermo Scientific
200 U/ml Interleukin-2	

Das T-Zell Medium II wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank angesetzt. Das Interleukin-2 wurde erst direkt vor dem Gebrauch dem Medium zugefügt.

**T-Zell Medium III**

<b>Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
TexMACS	Miltenyi Biotec
8 % autologes Plasma [Vol.-%]	Sigma-Aldrich
155 U/ml Interleukin-7	Miltenyi Biotec
290 U/ml Interleukin-15	Miltenyi Biotec

Das T-Zell Medium III wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank angesetzt. Die Interleukine wurden erst direkt vor dem Gebrauch zugefügt.

**T-Zell Medium IV****Reagenzien**

TexMACS  
 3 % humanes Serum [Vol.-%]  
 155 U/ml Interleukin-7  
 290 U/ml Interleukin-15

**Firma**

Miltenyi Biotec  
  
 Miltenyi Biotec  
 Miltenyi Biotec

Das T-Zell Medium IV wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank angesetzt. Die Interleukine wurden erst direkt vor dem Gebrauch zugefügt.

**Supplementiertes TexMACS GMP Medium****Reagenzien**

2 l TexMACS GMP Medium  
 60 ml humanes Serum  
 25 µg Interleukin-7  
 25 µg Interleukin-15

**Firma**

Miltenyi Biotec  
 Sigma-Aldrich  
 Miltenyi Biotec  
 Miltenyi Biotec

Das supplementierte TexMACS GMP Medium wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank angesetzt.

**Einfriermedium I****Reagenzien**

40 % T-Zell Medium I [Vol.-%]  
 50 % FBS [Vol.-%]  
 10 % DMSO

Das Einfriermedium wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank vor jeder Anwendung frisch angesetzt.

**Einfriermedium II****Reagenzien**

40 % TexMACS [Vol.-%]  
 50 % humanes Serum oder autologes Plasma [Vol.-%]  
 10 % DMSO

Das Einfriermedium wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank vor jeder Anwendung frisch angesetzt.

### 3 Methoden

Alle Arbeiten im Rahmen dieser Doktorarbeit erfolgten in Laboren der Sicherheitsstufe 2 nach den aktuellen Sicherheitsrichtlinien. Die Entsorgung von Laborabfällen erfolgte nach den aktuellen Richtlinien. Die Reinigung der Arbeitsplätze erfolgte mit 80 % Ethanol (vergällt), Antifect N liquid oder RNase AWAY.

#### 3.1 Isolation von genomischer DNA

Vor der Isolation der genomischen DNA wurden die Zellen geerntet, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, pelletiert (Zentrifuge 5415 C, 5 min bei 1000x g), das Medium restlos entfernt und bei -20 °C eingefroren. Für die anschließende Isolation wurde das QIAmp DNA Mini Blood Kit (Ausgabe Mai 2016) nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurde die Zentrifuge 5417R verwendet. Die Elution erfolgte in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 40 µl - 100 µl AE-Puffer (aus Kit) oder Nuklease-freiem Wasser, wenn die Probe anschließend sequenziert wurde. Die Messung der Konzentration von genomischer DNA erfolgte mit dem Qubit 2.0 Fluorometer mit dem dsDNA BR Assay Kit in Qubit Assay Tubes nach Angaben des Herstellers in den Qubit Assay Tubes. Pro Messung wurden 2 µl der genomischen DNA eingesetzt. Vor jeder Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte die Messung des Standards #1 und #2 aus dem Kit.

#### 3.2 Isolation von RNA aus Zellen

Zur Isolation der RNA wurden die humanen Zellen geerntet, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, pelletiert (Zentrifuge 5415 C, 5 min bei 1000x g), das Medium restlos entfernt und bei -80 °C eingefroren. Die Isolation der gesamten RNA aus Zellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit gemäß dem Spin-Protokoll des Herstellers für tierische Zellen (Ausgabe Juni 2012) durchgeführt. Vor den Arbeiten wurden der Arbeitsplatz sowie alle Pipetten mit RNase AWAY dekontaminiert. Alle Pipettierschritte fanden mit Filterspitzen unter einer Sicherheitswerkbank statt. Die pelletierten, eingefrorenen Zellen wurden bei RT aufgetaut und in 350 µl RLT-Puffer (ohne β-Mercaptoethanol) suspendiert. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte mit QIAshredder-Spin-Säulen. Es erfolgte keine Restriktion der genomischen DNA mit DNase. Es wurde die Zentrifuge 5424 verwendet. Nach jedem Waschschrift wurde das 2 ml Auffanggefäß gegen ein sauberes ausgetauscht. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Säule in einem sauberen Auffanggefäß erneut zentrifugiert, um letzte Pufferreste zu entfernen. Die RNA wurde in 30 µl Nuklease-freiem Wasser in ein steriles 1,5 ml RNase-freie Reaktionsgefäß (aus dem Kit) eluiert. Bis zur cDNA-Synthese (Abschnitt 3.3) wurde die RNA bei -80 °C gelagert. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde 1 µl des Eluats pro Ansatz abgenommen und in 9 µl RNase-freiem Wasser in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß verdünnt. Die Messung erfolgte

mit dem Qubit RNA HS Assay Kit nach Herstellerprotokoll am Qubit 2.0 Fluorometer in Qubit Assay Tubes mit 2 µl der verdünnten RNA. Vor der Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte die Messung der mitgelieferten Standards (#1 und #2).

### 3.3 cDNA-Synthese für die RT-qPCR

Um die aus den Zellen isolierte RNA durch eine RT-qPCR quantifizieren zu können, muss diese mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Für die cDNA-Synthese wurde das iScript Advanced cDNA Synthesis Kit verwendet, da damit bis zu 7,5 µg RNA in einem Ansatz umgeschrieben werden konnten. Alle Proben und Reagenzien wurden auf Eis gehalten und auch der Syntheseansatz wurde auf Eis pipettiert. Im Vorfeld wurde der die Sicherheitswerkbank sowie alle Pipetten mit RNase AWAY dekontaminiert. Es wurden nur Filterspitzen verwendet. Für die cDNA-Synthese wurde ein Mastermix mit je 4 µl 5x iScript advanced reaction mix und 1 µl iScript advanced reverse transcriptase pro Probe plus 10 % Überhang hergestellt. 5 µl des Reaktionsansatzes wurden pro cDNA-Synthese in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Zu jedem Ansatz wurden 15 µl der isolierten RNA hinzugegeben, außer die Konzentration der RNA überstieg 500 ng/µl, dann wurde die Höchstmenge von 7,5 µg für einen Ansatz (Angaben des Kits) verwendet und mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die cDNA-Synthese erfolgte für 30 min bei 42 °C mit anschließender Inaktivierung der Transkriptase für 5 min bei 85 °C im PCR-Gerät Tprofessional Standart Blocktyp 96 well. Bis zur RT-qPCR (Abschnitt 3.13.8 und 3.13.9) wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

### 3.4 Sanger-Sequenzierung von DNA

Zur Überprüfung der korrekten Basenabfolge von Plasmiden nach Klonierung oder Analyse von PCR-Produkten auf das korrekte Amplikon erfolgte die Sequenzierung durch die Firma Eurofins nach der Sanger-Methode. Hierfür wurden folgende Konzentrationen und Volumen eingeschickt (siehe Tabelle 1). Pro Ansatz wurden 2 µl des entsprechenden 10 µM Primers zugegeben.

**Tabelle 1: Probenmengen und Konzentrationen für die Sanger-Sequenzierung**

Probenart	Produktlänge	Konzentration	Volumen
Plasmid-DNA	< 30 kb	50-100 ng/µl	15 µl
Gereinigtes PCR-Produkt	150 - 300 bp	1 ng/µl	15 µl
	300 - 1000 bp	5 ng/µl	15 µl
Ungereinigtes PCR-Produkt	150 - 300 bp	4 ng/µl	15 µl
	300 - 1000 bp	10 ng/µl	15 µl

Die von Eurofins übermittelten Ergebnisse der Sequenzierungen umfassten das Chromatogramm mit Angaben zur Qualität der Sequenzierung und die Sequenz-Dateien. Für jede Sequenzierung wurde das Chromatogramm in Bezug auf die Qualität und das Vorhandensein zusätzlicher Sequenzen (Überlagerungen im Chromatogramm) überprüft.

Anschließend wurde die vollständige Sequenz aus der Sequenzierung unter Verwendung des webbasierten Programmes *Nucleotide BLAST* (Einstellung: *Align two or more sequences*, Optimierung: *megablast*) mit der Basenabfolge der Vektorkarte verglichen.

### 3.5 Amplikon-basiertes *Next-Generation Sequencing*

Bei der Amplikon-basierten *Next Generation Sequencing* (ampNGS) werden nur gezielte DNA-Abschnitte im Genom durch eine vorherige PCR vervielfältigt und sequenziert werden. In dieser Arbeit basiert die ampNGS auf der Illumina MiSeq/NextSeq Plattform unter Verwendung des *Nextara-2-Schritt-Protokolls* (*Nextara-two-step-protocol*). Der allgemeine Ablauf der durchgeführten ampNGS gliedert sich in folgende Abschnitte (Abbildung 10): I) *Nextara-2-Schritt-Protokoll*. Zwei-stufige Amplifikation der DNA-Abschnitte zuerst mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern, die eine Adaptorsequenz enthalten und anschließend mit adaptorspezifischen Primern, die eine weitere Adaptersequenz und einen Barcode enthalten. II) Bindung der DNA-Fragmente über die 2. Adaptersequenz an ein festes Reaktionsmedium (Chip) und anschließender Brücken-PCR. III) Sequenzierung der amplifizierten DNA-Abschnitte in Echtzeit über fluoreszierende dNTPs. Durch den Barcode können Proben und Zielsequenzen unterschiedlich markiert und somit zusammen sequenziert werden.

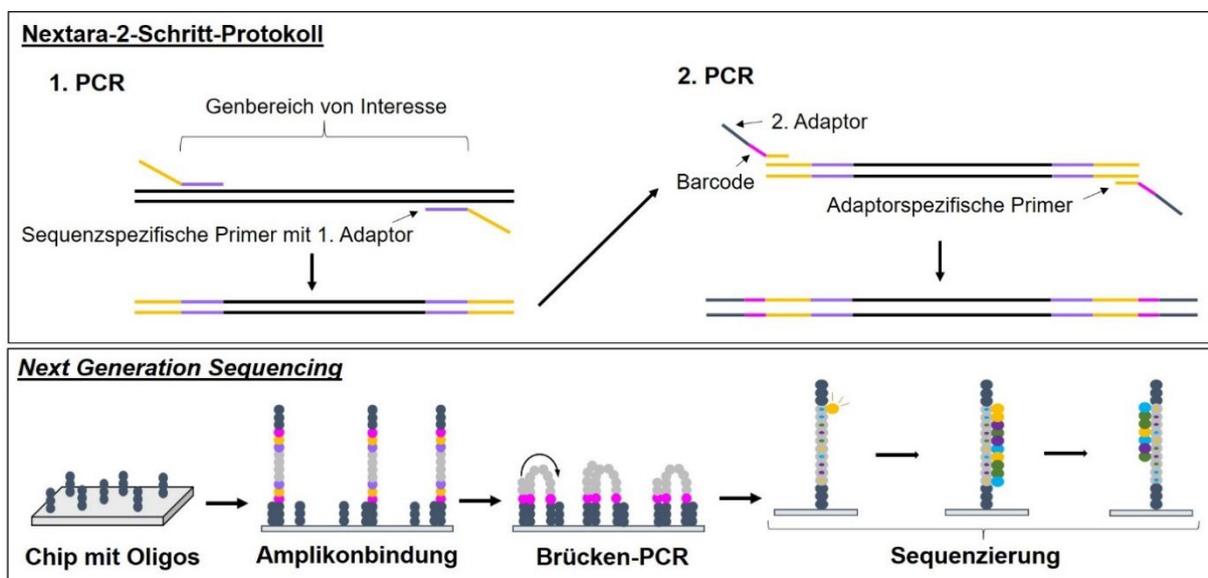


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Amplikon *Next Generation Sequencing*.

Potenzielle Off-Targets wurden *in silico* mit den webbasierten Bioinformatikprogrammen PROGNOSE<sup>251</sup> und Paired Target Finder von TAL Effector Nukleotide Targeter 2.0<sup>252</sup> nach den in Tabelle S1 und Tabelle S2 beschriebenen Kriterien für eine homodimere und heterodimere CCR5-Uco-TALEN identifiziert (Tabelle S3 und Tabelle S4). Aus allen erhaltenen Off-Target-Listen wurden die 10 häufigsten potenziellen Off-Targets innerhalb der ersten 15 Ränge ausgewählt (Tabelle S5 und Tabelle S6) und per ampNGS an unterschiedlichen Proben untersucht (Tabelle S7). Neben den identifizierten potenziellen Off-Targets wurde ebenfalls

das On-Target *CCR5* per ampNGS analysiert. Alle Schritte, wie die Sequenzierung und bioinformatischer Analyse, inklusive der für die ampNGS notwendigen Vorbereitungen (Primerdesign, Primertestung, Amplifikation) wurden von der Firma Microsynth AG (Balgach, Schweiz) durchgeführt. Die Firma Microsynth erhielt die Liste der zu sequenzierenden Sequenzen (Tabelle S8 und Tabelle S9), sowie genomischen DNA-Proben zur ampNGS (650 ng gDNA mit einer Konzentration 10 ng/µl in Nuklease-freiem Wasser). Alle generierten Sequenzinformationen (*Reads*) wurden nach ihrem Barcode sortiert (engl. *demultiplexing*), die Adaptorsequenzen entfernt (engl. *trimming*), passende *Reads* in vorwärts und rückwärts Orientierung gepaart und mit einem Referenzgenom verglichen (engl. *alignment*). Alle *Reads* wurden auf das Vorkommen von Insertionen und Deletionen (Indels) im Vergleich zum Referenzgenom hin von Microsynth untersucht. Anschließend erfolgte die weitere Analyse manuell. Alle *Reads*, die Indels an und/oder zwischen den jeweiligen potenziellen TALEN-Bindungsstellen enthielten wurden als TALEN-editiert gezählt. Die *Reads* ohne Indels an der potenziellen TALEN-Bindestelle wurden als Wildtyp (WT) gezählt. Die statistische Analyse des Indelverhältnisses wurde mit einem einseitigen, ungepaarten Welch's *t*-Test mit Welch's-Korrektur in einem Konfidenzniveau von 95 % in GraphPad Prism durchgeführt. Die P-Werte sind wie folgt definiert: Nicht signifikant (ns) = 0,1234; \* = 0,0332; \*\* = 0,0021; \*\*\* = < 0,0002. Daten, die die Indelverteilungen für *CCR5* und *CCR2* zeigen, wurden mit dem webbasierten Programm CRISPRESSO 2<sup>246</sup> auf Grundlage der ampNGS-Daten berechnet. Die Parameter für die Berechnung sind in Tabelle S10 zusammengefasst.

### 3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten zur Herstellung neuer Vektoren erfolgte mit 5 U der T4 DNA-Ligase im entsprechenden T4-Ligase Puffer in einem 20 µl Ansatz mit den benötigten DNA-Fragmenten für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C. Pro Ligationsansatz wurden 100 ng des geschnittenen Vektorbackbones und die dreifache Menge des Inserts eingesetzt. Die Insert-Menge berechnete sich wie in Formel 1 beschrieben:

**Formel 1: Berechnung der Insertmenge in der Ligation**

$$\text{Insertmenge [ng]} = 100 \text{ ng} \div \left( \frac{\text{Basenpaare des Vektorbackbones}}{\text{Basenpaare des Inserts}} \times 3 \right)$$

### 3.7 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente Top10 F' *E.coli* (die Herstellung erfolgte mittels der Calciumchlorid-Methode nach dem Experimentator Molekularbiologie/Genomics<sup>253</sup>) mittels Hitzeschockmethode transformiert. Die chemisch kompetenten Top10 F' *E.coli* wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 µl des Ligationsansatzes (Abschnitt 3.6), 2 µl des Ansatzes aus der Mutagenese (Abschnitt 3.13.2) oder 20 ng eines

Plasmids versetzt, durch mehrmaliges Pipettieren gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock im Thermomixer (comfort 1.5 ml) bei 42 °C für 60 s. Anschließend wurden die transformierten Top10 F' *E.coli* sofort für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz wurden die transformierten Top10 F' *E.coli* mit 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikazusatz versetzt und, wenn nicht anders angegeben, 1 h bei 37 °C und 300 rpm auf einem Thermomixer (comfort 1.5 ml) geschüttelt. Danach wurden die transformierten Top10 F' *E.coli* bei 300 g zentrifugiert (Zentrifuge 5417R), das Medium bis auf 50 µl abgenommen und die transformierten Top10 F' *E.coli* auf einer Agarplatte mit der entsprechenden Antibiotikaresistenz (Ampicillin oder Kanamycin) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C für mindestens 16 h im Inkubator (Heraeus function line). Bei der Transformation von Top10 F' *E.coli* mit Plasmiden, die einen Poly(A)-Anhang enthielten, erfolgten die Inkubation der Agar-Platte und die Ausbildung der Antibiotikaresistenz bei 32 °C zur Erhaltung des Poly(A)-Anhangs. Zur Vervielfältigung der Plasmide wurden einzelne Klone von der Agarplatte mit einer 200 µl Pipettenspitze gepickt und damit entweder eine kleine Bakterienkultur mit 4 ml LB-Medium plus des entsprechenden Antibiotikums in einer 13 ml Röhre mit Belüftungsstopfen oder 100 ml - 120 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum in einem 500 ml Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einem Inkubationsschüttelschrank (Certomat BS-1 oder IS) bei 180 rpm und 37 °C beziehungsweise 32 °C.

### **3.8 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Die Isolation von Plasmid-DNA aus kleinen Bakterienkulturen mit bis zu 4 ml Volumen erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit nach Angaben des Herstellerprotokolls (Ausgabe Februar 2015) unter Verwendung der QIAvac 24 Plus. Die Elution der Plasmid-DNA aus bis zu 4 ml Bakterienkultur erfolgte in 30 µl - 50 µl des mitgelieferten Puffers EB oder Nuklease-freiem Wasser, wenn das Plasmid anschließend für eine in vitro Transkription von RNA (Abschnitt 3.19) verwendet wurde. Für Bakterienkulturen von 100 ml - 120 ml wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellerprotokolls (Ausgabe Oktober 2015) unter Verwendung der QIAvac 24 Plus benutzt. Die Zentrifugation der großen Bakteriensuspension erfolgte in der Zentrifuge Sorvall bei 4 °C. Die Elution der Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen mit bis zu 120 ml erfolgte in 200 µl - 400 µl je nach benötigter Plasmidkonzentration mit dem mitgelieferten Puffer EB oder Nuklease-freiem Wasser, wenn das Plasmid anschließend für eine in vitro Transkription von RNA verwendet wurde. Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte photometrisch am Nanodrop ND-100 für Nukleinsäuren mit der Einstellung DNA-50 gemäß den Herstellerangaben mit 1 µl - 1,5 µl des Ansatzes. Als Leerprobe (*Blank*) diente der während der Elution verwendete Puffer EB oder das Nuklease-freie Wasser. Nach der Isolation wurde die Plasmid-DNA bei -20 °C gelagert.

### 3.9 Restriktion von DNA

Die Hydrolyse von DNA, wie Plasmiden oder PCR-Fragmenten, erfolgte für die Klonierung oder Analyse von Plasmiden. Für alle Restriktionen wurden FastDigest-Enzyme von ThermoFisher Scientific verwendet. Bei Restriktionsansätzen, die im Anschluss auf ein Agarosegel aufgetragen wurden, wurde der Puffer FastDigest Green benutzt. Dieser enthielt bereits einen DNA *Loading Dye*. Wenn die Restriktionsansätze über das QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt werden sollten (zum Beispiel bei Restriktionen von PCR-Produkten oder linearisierten Plasmiden), wurde der FastDigest Puffer ohne *Loading Dye* verwendet. Die Restriktionen erfolgten je nach Anwendung mit 0,5 µg - 10 µg DNA, 1 µl des jeweiligen Enzyms und 2 µl des angegebenen Puffers in einem 20 µl Ansatz bei 37 °C für 1 h - 2 h. Die unterschiedlichen Restriktionsansätze für die einzelnen Anwendungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2: Restriktionsansätze für unterschiedliche Anwendungen**

Anwendung	DNA-Menge	Puffer	Auftrennung
Analyse von Plasmiden	0,5 µg	FastDigest Green	Agarosegel
PCR-Produkt für Klonierung	10 µl	FastDigest farblos	PCR Purification Kit
Linearisierte Plasmide	10 µg	FastDigest farblos	PCR Purification Kit
Plasmid für Klonierungen	2 - 10 µg	FastDigest Green	Agarosegel

### 3.10 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach einer Restriktion erfolgte mittels einer Agarosegelelektrophorese in 1,0%igen (Fragmentgröße: 300 - 10.000 Basenpaare) oder 2,0%igen (Fragmentgröße: 100 - 10.000 Basenpaare) Agarosegelen. Abhängig von der Probenanzahl wurden Gele der Größe L und Kämmen mit 16 oder 20 Taschen oder Gele der Größe S und Kämmen mit 6 oder 12 Taschen verwendet. Die entsprechende abgewogene Menge an UltraPure Agarose wurde in 100 ml (Gel L) beziehungsweise 50 ml (Gel S) 1x TAE-Puffer (mit Reinstwasser verdünnter UltraPure DNA Typing Grade 50x TAE Puffer) durch Erhitzung in der Mikrowelle aufgelöst. Zur Färbung der DNA wurde der flüssigen Agarose der Farbstoff peqGREEN (Gel L: 5,0 µl und Gel S: 2,5 µl) zugesetzt. Nach der abgeschlossenen Polymerisation wurde das Gel mit dem Schlitten in ein peqlab PerfectBlue Gelsystem Mini L oder S, gefüllt mit 1xTAE-Puffer, überführt. Der Marker GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder wurde 1:2 mit dem mitgelieferten 6x TriTrack DNA Loading Dye versetzt und anschließend 1:3 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Für jedes Agarosegel wurde in eine der Taschen 10 µl des angesetzten Markers GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder zur Identifikation der DNA-Fragmentgrößen gegeben. Bei Restriktionsansätzen von Plasmid-DNA zur Identifikation passender Klone oder zur Qualitätskontrolle nach Isolation aus Bakterienkulturen wurden 15 µl des Ansatzes in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Bei Proben, bei denen die DNA-Fragmente für eine anschließende Klonierung aus dem Agarosegel ausgeschnitten wurden,

wurde der gesamte Probenansatz auf das Agarosegel aufgetragen. Die Agarosegelelektrophorese erfolgte bei 100 V - 120 V für bis zu 60 min je nach Gel- und Fragmentgröße. Nach der Auftrennung wurden die DNA-Fragmente in einem UV-Gerät mit Kamera (312 nm UV-Lampe und Foculus IEEE 1394 digitale Kamera) sichtbar gemacht und dokumentiert. Bei Gelen mit DNA-Fragmenten, die für eine anschließende Klonierung aus dem Agarosegel ausgeschnitten wurden, erfolgte die Exposition mit dem UV-Licht so kurz wie möglich, um die Entstehung von Mutationen zu vermeiden. Die Gelstücke mit den passenden DNA-Fragmenten für eine Klonierung wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA-Fragmente aus dem Gelstück wurde wie in (Abschnitt 3.11) beschrieben durchgeführt.

### **3.11 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach dem Protokoll des Herstellers (Ausgabe Juli 2015). Die Elution erfolgte mit 30 µl des im Kit enthaltenen Puffers EB. Es wurde die Zentrifuge 5417R verwendet. Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Fragmente wurde photometrisch am Nanodrop ND-100 für Nucleinsäuren mit der Einstellung DNA-50 gemäß den Herstellerangaben mit 1 µl - 1,5 µl des Ansatzes durchgeführt. Als Leerprobe (Blank) diente der verwendete Puffer.

### **3.12 Anlagerung von Oligonukleotiden für die Klonierung**

Für das Einfügen von Restriktionsschnittstellen in ein Plasmid wurden kurze Oligonukleotide mit der benötigten Sequenz, sowie Oligonukleotide mit der komplementären Sequenz bestellt. Die beiden Oligonukleotide wurden so konstruiert, dass nach Anlagerung an beiden Seiten ein Überhang entstand, der den Überhängen der zu verwendenden Restriktionsenzyme (*HindIII* und *XbaI*) entsprach. Dadurch konnte das doppelsträngige Fragment direkt in die geschnittenen Plasmide ligiert werden. Folgender Ansatz wurde für die Anlagerung verwendet: 1 µl T4-Ligasepuffer, jeweils 1 µl der 100 µM Oligonukleotide pKlon3 und pKlon4, 0,5 µl T4 Polynukleotid-Kinase und 6,5 µl Nuklease-freies Wasser. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 30 min bei 37 °C und 5 min bei 95 °C in einem Thermomixer (comfort 1,5 ml). Anschließend wurde der Ansatz bei RT langsam abgekühlt und in einer Ligation (Abschnitt 3.6) verwendet.

### **3.13 Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase-chain-reaction*, PCR) dient der Amplifikation von DNA-Abschnitten mit Hilfe von sequenz-spezifischen Oligonukleotiden. Im folgende sind spezifische PCRs beschrieben, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Bei allen PCR-Ansätzen wurde ein Mastermix angesetzt und eine Wasserkontrolle ohne DNA-Zugabe

mitgeführt. Falls möglich wurde ein Plasmid oder DNA-Fragment als Positivkontrolle verwendet. Alle PCRs wurden mit Filterspitzen pipettiert.

### 3.13.1 Amplifikation von Plasmid-DNA zur anschließenden Klonierung

Die Amplifikation von Plasmiden oder Plasmidabschnitten erfolgte mit der Q5 High-Fidelity DNA Polymerase in einem 25 µl Ansatz mit folgenden Reagenzien: 5,0 µl 5X Q5 Reaktionspuffer, jeweils 1,25 µl der beiden 10 µM Primer, 0,5 µl dNTP-Mix (10 µM je 25 % dATP, dGTP, dCTP und dTTP), 0,25 µl Q5 Polymerase, DNA und Nuklease-freies Wasser. Als Ausgangsmaterial wurden weniger als 100 ng DNA eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem PCR-Programm: 98 °C für 30 s, 36x [98 °C für 10 s, 50 – 65 °C für 20 s, 72 °C für 30 s pro 1 kb Amplikonlänge], 72 °C für 2 min, 4 °C für 1 min.

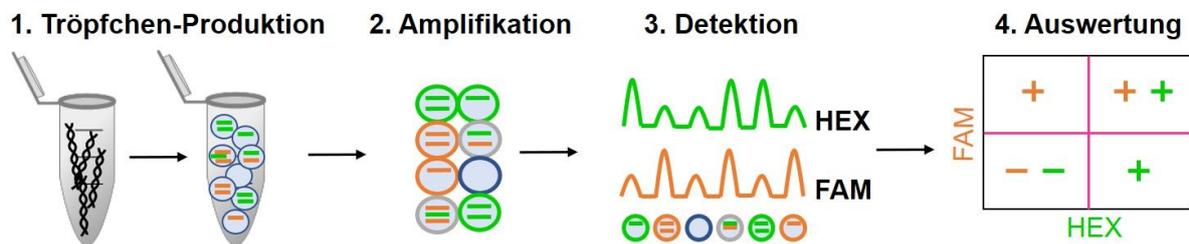
### 3.13.2 PCR-basierte Mutagenese zur Einführung neuer Restriktionsschnittstellen

Die Einführung neuer Restriktionsschnittstellen zur Klonierung erfolgte mit dem QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit. Als erstes wurde für jedes Plasmid der folgende Ansatz pipettiert: 5 µl des 10x Reaktionspuffer, 50 ng Plasmid, 125 ng je Primer (Fok1mut1 und Fok1mut2), 1 µl dNTP-Mix, 1,5 µl QuikSolution Reagenz, bis zu 50 µl Nuklease-freies Wasser und 1 µl QuikChange Lightning Enzym. Die Amplifikation erfolgte im PCR-Gerät Tprofessional Standard nach folgenden Angaben: 95 °C für 2 min, 18x [95 °C für 20 s, 60 °C für 10 s, 68 °C für 4,5 min], 68 °C für 5 min. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit 2 µl *DpnI* bei 37 °C für 5 min zur Entfernung des nicht-mutierten Plasmids. Danach erfolgte die Transformation von chemisch kompetenten Bakterien (Abschnitt 3.7).

### 3.13.3 Droplet digital PCR

In dieser Arbeit wurde die *droplet digitale* PCR (ddPCR) von Bio-Rad für die Detektion von Translokationen, die Bestimmung von Indelraten und der Messung von Genkopien angewendet. Der PCR-Ansatz enthielt neben den Primern sequenz-spezifische Hydrolysesonden, die am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzmolekül und am 3'-Ende mit einem *Black Hole Quencher* (BHQ) versehen waren, dieser blockiert das Fluoreszenzsignal, während die Hydrolysesonde nicht gebunden ist. Bei der ddPCR wird der PCR-Ansatz mit Hilfe des QX200 Droplet Generator mittels den D8 Gaskets, Cartridges und dem Droplet Gen Oil for Probes in bis zu 20,000 kleine Öltröpfchen eingeschlossen. In jedem Tröpfchen läuft dadurch eine unabhängige Amplifikation ab, wodurch eine mögliche Produkthemmung reduziert wird. Nach der Amplifikation werden die Öltröpfchen im QX2000 Droplet Reader gemessen. Bei dieser Messung werden die einzelnen Öltröpfchen in einem Ölstrom mit einem 2-farbigem optischen Detektionssystem auf das Vorhandensein von Fluoreszenzsignalen analysiert. Die

Auswertung der ddPCR erfolgte mit der Software QuantaSoft. Basierend auf der Poisson-Verteilung ermittelt die Software aus der Anzahl positiver und negativer Tröpfchen eine Kopienzahl pro Mikroliter für die analysierten Amplikons (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Ablauf einer droplet digital PCR (ddPCR).** Der angesetzten PCR-Mix mit fluoreszenzmarkierten Hydrolysesonden (FAM / HEX) wird in Öltröpfchen eingeschlossen und amplifiziert. Anschließend erfolgt die Messung der Fluoreszenz in jedem Öltröpfchen in einem Detektor. Durch eine Software wird der Anteil fluoreszenzpositiver Öl-Tröpfchen für jede Fluoreszenz (FAM / HEX) berechnet.

Bei jeder ddPCR wurde für alle Proben ein Mastermix angesetzt und dieser in 8er-PCR-Streifen vorgelegt. Pro *Well* wurde ein Ansatz mit insgesamt 25 µl (DNA mitgerechnet) mit folgenden Reagenzien verwendet: 12,5 µl 2X ddPCR Supermix for Probes (no dUTP), jeweils 1,5 µl der 15 µM Primer, jeweils 0,25 der 25 µM Sonden und Nuklease-freies Wasser. Anschließend wurde jedem Ansatz 30 ng - 60 ng DNA zugegeben, der Ansatz gevortext und kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Mischen der ddPCR-Ansätze erfolgte unter einer PCR-Werkbank (peqlabPCR Workstation Pro). Die Generation der Öl-Tröpfchen erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Droplet Digital PCR Application Guide) mit dem Droplet Generator. Nach der Tröpfchenproduktion wurden die ddPCR-Ansätze vorsichtig in eine 96-*Well* PCR-Platte (twin.tec™ semi-skirted) überführt, die Platte nach Herstellerangaben im PX1 PCR Plate Sealer versiegelt und nach folgendem PCR-Programm im Tprofessional Standard inkubiert: 95 °C für 10 min, 45x [94 °C für 30 s, 60 °C für 60 s], 98 °C für 10 min, 4 °C für 2 min. Alle Schritte erfolgten mit einer Temperaturveränderung (engl. *ramp rate*) von 2,0 °C/s. Nach der Amplifikation wurden die Tröpfchen ebenfalls nach Herstellerangaben innerhalb von 18 h am Droplet Reader gemessen. Die genaue, teilweise manuelle, Auswertung mit der Software QuantaSoft ist für die unterschiedlichen, in dieser Arbeit durchgeführten, ddPCRs im Folgenden angegeben (Abschnitte 3.13.4, 3.13.5, 3.13.6.).

### 3.13.4 ddPCR zur Bestimmung der Geneditierungsrate

Die Bestimmung der Geneditierungsrate (Indelfrequenz) erfolgte per GEF-ddPCR<sup>254</sup> für die Genloci *CCR5*, *CCR2* und *GPC5*. Folgende Primer und Sonden wurden für die einzelnen Genloci angewendet: *CCR5* = *CCR5\_1*, *CCR5\_2*, *CCR5ref*, *CCR5mut*; *CCR2* = *CCR2\_1*, *CCR2\_2*, *CCR5ref*, *CCR2mut*; *GPC5* = *GPC5\_1*, *GPC5\_2*, *GPC5ref*, *GPC5mut*. Vor der Detektion der amplifizierten Tröpfchen im Droplet Reader wurde ein Layout für die Messung mit der Software QuantaSoft unter Auswahl des Experiments absolute Quantifizierung (ABS) erstellt. Die Auswertung erfolgte für jede Probe manuell, wobei die Grenzen zwischen den

Tröpfchenpopulationen basierend auf den unbehandelten Kontrollproben, wie in einem Beispielplot in Abbildung S1 zu sehen, gezogen wurden. Die Indelfrequenz wurde aus der anschließend von der Software Quantasoft ermittelten *Ratio* wie folgt berechnet (Formel 2):

**Formel 2: Berechnung der Indelfrequenz**

$$\text{Indelfrequenz [\%]} = 100 - (\text{Ratio} * 100)$$

### 3.13.5 ddPCR zur Identifikation von chromosomalen Aberrationen

Die Detektion von chromosomalen Aberrationen zwischen dem *CCR5*- und *CCR2*-Lokus, wie Deletionen (dKO), Inversionen (Inv) und Insertionen (Ins), erfolgte mit EPOR\_1, EPOR\_2, EPORref, CCR5ref sowie folgenden spezifischen Primern: dKO = CCR2\_1, CCR5\_2; Inv = Inv1, CCR2\_1; Ins = Ins1, CCR2\_2. Vor der Detektion der amplifizierten Tröpfchen wurde ein Layout für die Messung mit der Software Quantasoft unter Auswahl des Experiments absolute Quantifizierung (ABS) erstellt. Die Auswertung erfolgte für jede Probe manuell, wobei die Grenzen zwischen den Tröpfchenpopulationen basierend auf den unbehandelten Kontrollproben, wie in einem Beispielplot in Abbildung S2 zu sehen, gezogen wurden. Die anschließend von der Software Quantasoft berechnete *Ratio* wurde in Prozent umgerechnet.

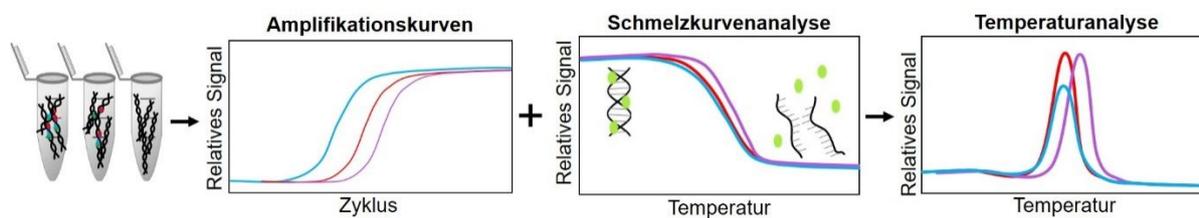
### 3.13.6 ddPCR zur Bestimmung der relativen Kopienzahl

Die Bestimmung der relativen Kopienzahl (RCN) zwischen den Genloci *CCR5* und *EPOR* erfolgte mit Primer und Sonden CCR5\_1, CCR5\_2, CCR5ref, EPOR\_1, EPOR\_2, EPORref. Vor der Detektion der amplifizierten Tröpfchen wurde ein Layout für die Messung mit der Software Quantasoft unter Auswahl des Experiments Kopienzahlvariation (*copy number variation*, CNV) erstellt. Die Auswertung erfolgte für jede Probe manuell, wobei die Grenzen zwischen den Tröpfchenpopulationen basierend auf den unbehandelten Kontrollproben, wie in einem Beispielplot in Abbildung S3 zu sehen, gezogen wurden. Die Kopienzahl wurde anschließend von der Software Quantasoft berechnet.

### 3.13.7 Quantitative Echtzeit-PCR

In dieser Arbeit wurde die quantitativen Echtzeit-PCR (RT-qPCR) unter Verwendung von interkalierenden Farbstoffen zur Detektion von *CCR5*-Uco-hetTALEN Nukleinsäuren (mRNA und Plasmid) benutzt. Interkalierende Farbstoffe detektieren jede Art von doppelsträngiger DNA, wodurch mögliche Kontaminationen, unspezifische PCR-Produkte oder Primer-Dimere nicht vom korrekten Amplikon unterschieden werden können. Da jedes DNA-Fragment aufgrund unterschiedlicher Basenabfolge und Amplikonlänge eine andere Schmelztemperatur ( $T_m$ ) hat, wurde im Anschluss an die RT-qPCR der Schmelzpunkt des RT-qPCR Ansatzes bestimmt (Abbildung 12). Die Schmelztemperatur der Standardkurve diente dabei als

Referenz. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe mit definierten Kopienzahlen aus den Plasmiden pCCR5-Uco-TALEN(ELD)poly(A)-KanR L und pCCR5-Uco-TALEN(KKR)poly(A)-KanR R. Dafür wurden die beiden Plasmide auf eine Konzentration von 10 ng/µl mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und 1:2 gemischt. Aus diesem Ansatz wurde eine 1:10-Verdünnungsreihe mit 7 Verdünnungen hergestellt. Für die Berechnung der Standardkurve wurden die von der LightCycler 480 Software berechneten Schwellenwertzyklen ( $C_p$ -Werte) gegen die Plasmidkopienzahlen in den Verdünnungen in GraphPad Prism nach folgenden Parametern aufgetragen: Nichtlineare Regression = *semilog line*; *fitting method* = *least square regression*; *convergence criteria* = *strict*; *weighting method* = keine; Replikate = N und SD einbezogen; kleinster X-Wert = 40. Die Plasmidkopienzahlen in jeder Verdünnung wurde mit Hilfe des webbasierten Programmes *DNA Copy Number and Dilution Calculator* unter Angabe der Plasmidlänge (8415 bp) berechnet.



**Abbildung 12: Darstellung der quantitativen Echtzeit-PCR.** Der mit SYBR-Green versetzte PCR-Mix wird amplifiziert und die Fluoreszenzzunahme nach jedem Zyklus gemessen. Nach der PCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, indem der PCR-Ansatz langsam erhitzt und die Fluoreszenzabnahme detektiert wird.

Die RT-qPCRs erfolgte für jede Probe und die Standards in Triplikaten. Alle Ansätze wurden auf Eis unter einer PCR-Werkbank (peqlabPCR Workstation Pro) pipettiert. Bei jeder RT-qPCR wurde ein Mastermix für alle Proben angesetzt und mit einer Multipette Xstream (und Combitips® advanced 0,5 ml) in eine 96-Well Lightcycler Platte verteilt. Anschließend wurden 2 µl des Ausgangsmaterials hinzu pipettiert, die Platte mit einer adhäsiven qPCR Folie abgedeckt, gevortext und in einer Plattenzentrifuge kurz zentrifugiert. Die Messung aller RT-qPCRs erfolgte am LightCycler 480 Instrument II (LC480) mit dem in Tabelle 3 angegeben Programm. Die Auswertung der RT-qPCRs erfolgte mit der LightCycler 480 Software nach den Angaben in den Abschnitten 3.13.8 und 3.13.9.

**Tabelle 3: RT-qPCR-Programm**

Temperatur	Zeit	Wiederholung	Temperaturveränderung	Fluoreszenzmessung
95 °C	30 s	1x		
95 °C	5 s	40x	4,4 °C/s	Einzelaufnahme
60 °C	30 s		2,2 °C/s	
95 °C	5 s	1x	4,4 °C/s	
60 °C	60 s	1x	2,2 °C/s	
95 °C			0,11 °C/s	Kontinuierlich
50 °C	30 s	1x	2,2 °C/s	

### 3.13.8 RT-qPCR zum Nachweis von CCR5-Uco-hetTALEN Kopien in cDNA Proben

Für den Nachweis von CCR5-Uco-hetTALEN Nukleinsäuren (mRNA und Plasmid) in cDNA-Proben (Abschnitt 3.3) wurde das TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) Kit nach Herstellerangaben (v201710Da) für das LC480 System verwendet. Zur Kontrolle wurde neben der CCR5-Uco-hetTALEN auch Kopien des endogenen Gens Importin 8 in allen Proben detektiert. Die Primer (TALEN: hetTALEN1 und hetTALEN2; Importin 8: IPO8\_1 und IPO8\_2) wurden jeweils in einer Endkonzentration von 0,4 µM eingesetzt. Die Analyse der gemessenen Proben und Standards erfolgte mit der *Abs Quant/2nd Derivate Max* Methode (Ermittlung der  $C_p$ -Werte mit folgenden Parametern: keine Kompensation, Filter 465 - 510, Mittelwert, hohe Konfidenz) und der Analysemethode *T<sub>m</sub> Calling* (keine Kompensation, Filter 465 - 510, zwei Maxima oder weniger, Format SYBR Green) automatisch durch die Software. Die Berechnung der Standardkurve erfolgte wie im Abschnitt 3.13.7 erläutert (Abbildung S4A+B).

### 3.13.9 RT-qPCR zum Nachweis von CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmiden

Der Nachweis von CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmiden in gDNA-Isolaten und cDNA-Proben erfolgte mit dem Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix nach dem Herstellerprotokoll (zweistufiges-Protokoll). Pro Reaktion wurden 20 ng gDNA (Abschnitt 3.1) verwendet. Die Primer Plasmid1 und Plasmid2 wurden in einer Konzentration von 0,4 µM eingesetzt. Für die Berechnung der CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien wurden Verdünnungsreihen mit den Plasmiden pCCR5-Uco-TALEN(ELD)poly(A)-KanR L und pCCR5-Uco-TALEN(KKR)poly(A)-KanR R für die jeweilige PCR erstellt (Details siehe Abschnitt 3.13.7 und Abbildung S4B). Der Nachweis von integriertem CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmid im *CCR5*-Lokus erfolgte mit dem TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) Kit nach Herstellerangaben (v201710Da) für das LC480 System. Die Primer (Int1 und Int2) wurden in einer Konzentration von 0,4 µM eingesetzt. Die Berechnung der  $C_p$ -Werte erfolgte für beide RT-qPCRs automatisch durch die LightCycler Software mittels der *fit points*-Methode nach folgenden Parametern: keine Kompensation, Filter 465 - 510, Effizienz 2,00. Die Schmelztemperatur wurde durch die Analysemethode *T<sub>m</sub> Calling* automatisch von der Software nach den folgenden Parametern berechnet: keine Kompensation, Filter 465 - 510, Mittelwert, hohe Konfidenz. Absolute Plasmidkopienzahlen wurden für jede Probe basierend auf der Standardkurve (Abbildung S4C) berechnet, bei der mindestens zwei der drei Replikate eine korrekte Schmelztemperatur aufwiesen.

## 3.14 Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse auf Einzelzellen

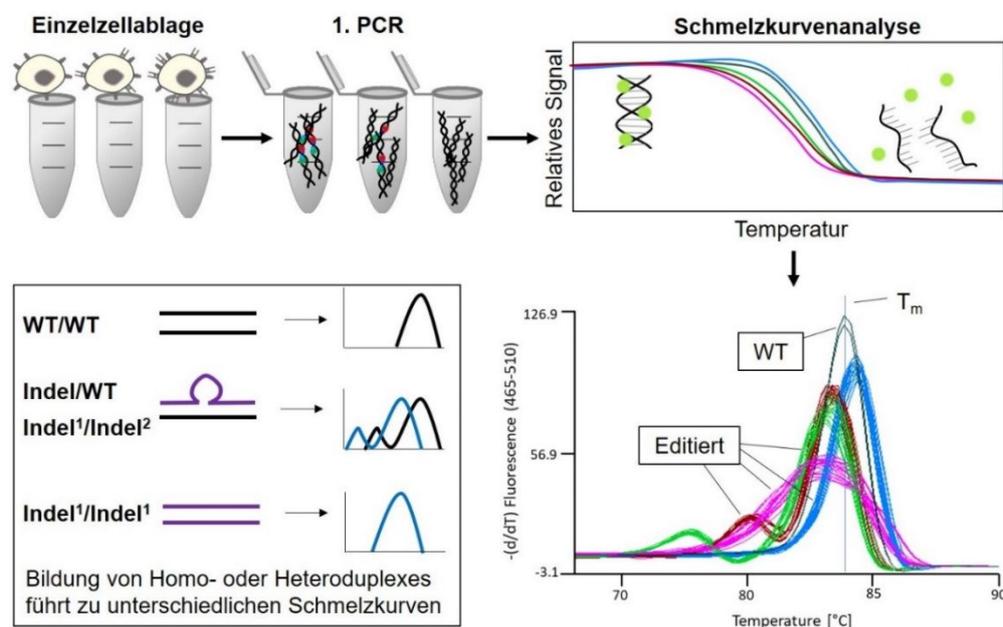
Für die Untersuchung von mono- beziehungsweise biallelischen Mutationen im *CCR5*-Gen wurde die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse auf Ebene einzelner Zellen (schRMCA) angewendet. Bei dieser Methode wird das Schmelzkurvenprofil einer Probe analysiert und mit

dem einer Referenz (Wildtyp) verglichen. Die Bildung von Homo- oder Heteroduplexen in der Probe lässt sich anhand des Schmelzkurvenprofils unterscheiden.<sup>255</sup> Eine Variation oder Mutation im amplifizierten Genabschnitt hingegen führt zu einer Verschiebung des Schmelzpunktes im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 13). Für die scHRMCA wurde in einer ersten PCR ein circa 1 kb großes Fragment des *CCR5*-Gens um die TALEN-Bindestelle herum aus einer Einzelzelle amplifizieren und dieses Fragment als Ausgangsmaterial in einer Schmelzkurvenanalyse verwendet. Für das Experiment wurden 10 µl des Lysepuffer in eine 96-Well-PCR-Platte vorgelegt und anschließend *CCR5*-TALEN behandelten T-Zellen sowie nicht behandelte (Wildtyp) T-Zellen mit dem FACSAria III Cell Sorter als Einzelzelle in die PCR-Platte sortiert (Abschnitt 3.15). Die Lyse der Zellen erfolgte bei 37 °C für 1 h in einem PCR-Geräte (Tprofessional Standard). Danach wurde die Reaktion durch eine Inkubation bei 95 °C für 10 min gestoppt.<sup>256</sup> Auf die lysierten Zellen wurde in jedes *Well* 15 µl des folgenden PCR-Ansatzes (hergestellt als Mastermix) gegeben: 2,5 µl 10x DreamTaq Buffer, jeweils 0,5 µl der 10 µM Primer (nesPCR1 und nesPCR2), 0,5 µl dNTP-Mix (10 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP), 0,1 µl 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl DreamTaq Polymerase, 10,4 µl Nuklease-freies Wasser. Nach der Zugabe des 1. PCR-Ansatzes zu den lysierten Zellen wurde die 96-Well-PCR-Platte mit einer adhäsive PCR-Folie abgedeckt, gevortext, kurz in einer Tischzentrifuge für Platten (Perfect Spin peqlab) zentrifugiert und im PCR-Gerät (Tprofessional Standard) nach folgendem PCR-Programm inkubiert: 95 °C für 3 min, 25x [94 °C für 30 s, 57 °C für 30 s, 72 °C 30 s], 72 °C 3 min, 4 °C für 1 min. Der Ansatz der ersten PCR wurde anschließend 1:80 mit frischem Reinstwasser (2,5 µl PCR-Ansatz + 197,5 µl Reinstwasser) in einer neuen 96-Well-PCR-Platte verdünnt. Für die Schmelzkurvenanalyse wurde ein Mastermix mit dem LC480 High Resolution Melting Master nach folgenden Angaben pro *Well* gemischt: 10,0 µl Resolight Master Mix, 2,0 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, jeweils 1,5 µl der 5 µM Primer HRM1 und HRM2, 4,1 µl Reinstwasser. Anschließend wurde mit einer Multipette (Xstream) jeweils 18,5 µl des Mastermixes pro *Well* in eine 96-Well Lightcycler Platte pipettiert. Anschließend wurden pro *Well* jeweils 1,5 µl des verdünnten PCR-Ansatzes in die Platte gegeben. Die Platte wurde mit einer adhäsiven qPCR Folie versiegelt, gevortext und kurz in einer Tischzentrifuge (Perfect Spin peqlab) zentrifugiert. Die Amplifikation und Messung erfolgte am LC480 (Tabelle 4).

**Tabelle 4: PCR-Programm der 2. PCR für die scHRMCA**

Temperatur	Zeit	Wiederholung	Temperaturveränderung	Fluoreszenzmessung
95 °C	10 s	1x		
95 °C	15 s	40x	4,4 °C/s	Einzelaufnahme
60 °C	30 s		2,2 °C/s	
72 °C	30 s			
72 °C	3 min			
40 °C	10 s	1x	2,2 °C/s	
65 °C	10 s	1x		
95 °C			0,11 °C/s	Kontinuierlich
40 °C	1 s	1x	2,2 °C/s	

Die Auswertung der Schmelzkurven erfolgte über die LC480 Software mit der Methode  $T_m$  Calling manuell für jede Probe einzeln (Parameter: keine Kompensation, Filter 465 - 510, zwei Maxima oder weniger, Format SYBR Green). Dabei wurde das Schmelzkurvenprofil jeder Probe mit dem der Wildtypzellen verglichen und einer der folgenden Kategorien unterteilt: (i) monoallelisch, (ii) biallelisch heterolog (Heteroduplex), (iii) biallelisch homolog (Homoduplex). Ein Heteroduplex einer monoallelischen Editierung ( $CCR5^{WT/Indel}$ ) weist die gleiche Schmelztemperatur (erstes Maximum) wie die Wildtypzellen auf, allerdings tritt ein zusätzliches zweites (meist niedrigerem) Maximum auf. Biallelische Heteroduplexe (heterolog) weisen ebenfalls ein zweites Maximum auf, jedoch ist die Schmelztemperatur des ersten Maximums im Vergleich zum Wildtyp verschoben. Hingegen zeigen biallelische Homoduplexe (homolog) nur ein Maximum, das sich von der Schmelztemperatur des Wildtyps unterscheidet.



**Abbildung 13: Darstellung der hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse auf Einzelzellen.** Zellen werden einzeln in ein PCR-Gefäß sortiert und lysiert. Anschließend erfolgt eine 1. PCR zur Amplifikation des zu untersuchenden Genbereiches. Daraufhin wird ein Teil des PCR-Ansatzes für eine 2. PCR mit SYBR Green im Ansatz amplifiziert und eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Aus den Daten der Schmelzkurvenanalyse lässt sich für jeden der Ansätze die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) bestimmen. Die Schmelzkurventemperatur und das Schmelzkurvenprofil sind je nach Länge des Amplikons, der Basenabfolge und der Anwesenheit von einem weiteren Amplikon unterschiedlich. Heteroduplexe weisen ein zweites Maximum auf.

### 3.15 Einzelzellablage für die schRMCA

Für die Einzelzellablage von T-Zellen für die schRMCA wurden TALEN-behandelte und unbehandelte primäre T-Zellen (mindestens) 8 Tage nach der Aktivierung geerntet, in ein 15 ml Falcon Reaktionsgefäß überführt, jeweils mit 5 ml DPBS (Gibco) versetzt, zentrifugiert (5 min bei 300x g und RT in der Zentrifuge Rotanta 460 R) und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde die Zellen in 500  $\mu$ l DPBS (Gibco) suspendiert. Danach erfolgte die Einzelzellablage in eine vorbereitete 96-Well-PCR-Platte (10  $\mu$ l Lysepuffer) am BD FACSAria III durch die *Cytometry and Cell Sorting Core Unit* des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Für die Zellsortierung wurde nur das Vorwärts- (FSC) und

Seitwärtsstreulicht (SSC) verwendet. Die Zellpopulation wurde zuerst in einem Dotplot mit der Fläche des FSC und SSC ausgewählt und anschließend nacheinander im FSC und danach im SSC nach Höhe und Weite aufgetragen. Die Zellen in der Mitte dieser Population wurde danach für die Einzelzellablage ausgewählt und daraus je 1 Zelle pro Well über eine 100 µm Düse (engl. *nozzle*) in die Platte sortiert. In die Reihen 1 – 11 der Platte wurden die TALEN-behandelten Zellen sortiert. In die letzte Reihe (12A - 12F) wurden die unbehandelten Zellen gegeben. 2 *Wells* (12G und 12H) wurden als Negativkontrolle ausgelassen. Nach der Einzelzellablage wurde die 96-*Well*-PCR-Platte sofort mit einer adhäsive PCR Folie versiegelt, in der Plattenzentrifuge (Perfect Spin peqlab) zentrifugiert und wie im Abschnitt 3.14 beschrieben weiter behandelt.

### 3.16 Design von codonoptimierten *Fok1*-Varianten

Da nur wenige Restriktionsschnittstellen hinter dem offenen Leserahmen der CCR5-Uco-TALEN in den Plasmiden pCCR5-Uco-TALEN L und pCCR5-Uco-TALEN R für eine Klonierung zur Verfügung standen, wurde ebenfalls der Bereich hinter der *Fok1*-Schneidedomäne ausgetauscht und neue Restriktionsschnittstellen für zukünftige Klonierungen eingefügt (Abbildung S5). Darüber hinaus wurde die bisher bei der IVT verwendeten Restriktionsschnittstelle *Xma*JI ersetzt und gegen eine *Hind*III Restriktionsschnittstelle ausgetauscht. Die Sequenz der *Fok1*-Schneidedomäne wurde nach Doyon et al<sup>227</sup> erstellt und mit Hilfe des GeneOptimizer von ThermoFisher Scientific codonoptimiert. Um den Effekt der Codonoptimierung mit zu berücksichtigen, wurde ebenfalls eine codonoptimierte homodimere *Fok1*-Variante (WT) erstellt. Die 5 *Fok1*-Varianten wurden über den GeneArt Service von ThermoFisher mit der entsprechenden Sequenz (Tabelle S11) synthetisiert und wie in Abschnitt 3.17 beschrieben in die CCR5-Uco-TALEN kloniert.

### 3.17 Klonierung codonoptimierten *Fok1*-Varianten in die CCR5-Uco-TALEN

Die DNA-Sequenzen mit den *Fok1*-Varianten ELD und DAD wurden als *Strings DNA-Fragments* bestellt und mit Hilfe des *CloneJet PCR Cloning Kits* nach Angaben des Herstellers in einen pJet-Vektor kloniert. Passende Klone wurden durch einen Restriktionsverdau (Enzyme *Stu*I/*Eco*31I) mit anschließender Analyse auf einem Agarosegel identifiziert. Die DNA-Sequenzen mit den *Fok1*-Varianten RVR, KKR und WT wurden als Genfragment im pMA-Vektor bestellt. Die Klonierung der *Fok1*-Varianten in die pCCR5-Uco-TALEN Plasmide erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *Eam*1104I und *Xho*I. Dazu wurde die benötigte *Xho*I-Schnittstelle über eine Mutagenese (Abschnitt 3.13.2) in die pCCR5-Uco-TALEN-Plasmide eingefügt (Abbildung S6). Jede der 5 *Fok1*-Varianten (ELD, KKR, DAD, RVR, WT) wurden in Plasmide beider CCR5-Uco-TALEN-Arme kloniert. Der detaillierte Ablauf der Klonierung ist in Abbildung S7 beschrieben.

### 3.18 Klonierung von pCCR5-Uco-hetTALENpoly(A)-KanR

Die Klonierung der Plasmide pCCR5-Uco-hetTALENpoly(A)-KanR L und R erfolgte nach dem Schema in Abbildung S8. Dafür wurde die Ampicillinresistenz in den pCCR5-Uco-hetTALEN-Plasmide (pCCR5-Uco-TALEN(ELD) L und pCCR5-Uco-TALEN(KKR) R) gegen ein Kanamycinresistenzgen (KanR), ausgetauscht. Anschließend wurde der Poly(A)-Anhang aus dem Vektor E977 hinter die CCR5-Uco-hetTALEN (pCCR5-Uco-TALEN(ELD)\_KanR L und pCCR5-Uco-TALEN(KKR)\_KanR R) kloniert (Abbildung S9). Die Inkubation der transformierten Bakterienkulturen von Plasmiden mit der Poly(A)-Sequenz erfolgte bei 32 °C.

### 3.19 In vitro Transkription von mRNA

Vor der Transkription wurden die benötigten DNA-Plasmide mit den benötigten Restriktionsenzymen für 2 h bei 37 °C linearisiert (Abschnitt 3.9) und mittels des PCR Purification Kits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 30 µl Nuklease-freiem Wasser. Die Konzentration der linearisierten und aufgereinigten Plasmide wurde im Anschluss am Qubit 2.0 Fluorometer mit dem dsDNA BR Assay Kit nach Angaben des Herstellers in den Qubit Assay Tubes gemessen. Pro Messung wurden 2 µl der linearisierten Plasmid-DNA eingesetzt. Vor jeder Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte die Messung des Standards #1 und #2 aus dem Kit. Die Restriktion der Plasmide pJetGFP erfolgte mit *HindIII*. Die Linearisierung der Plasmide pCCR5-Uco-TALEN L, pCCR5-Uco-TALEN R, pCCR5-Uco-hetTALEN(ELD) L, pCCR5-Uco-hetTALEN(KKR) R erfolgte mit *XmaI*. Die Plasmide pCCR5-Uco-hetTALENpoly(A)-KanR L und pCCR5-Uco-hetTALENpoly(A)-KanR R mit integriertem Poly(A)-Anhang wurden mit dem Restriktionsenzym *LguI* geschnitten. Die in vitro Transkription (IVT) erfolgte mit dem T7 mScript™ Standard mRNA Production System. Im Vorfeld wurden der Arbeitsplatz sowie alle Pipetten mit RNase AWAY dekontaminiert. Der Schritt der RNA-Synthese erfolgte wie im Herstellerprotokoll angegeben mit einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C im Thermomixer (comfort 1.5 ml) mit anschließender DNase I Behandlung. Die Aufreinigung der synthetisierten RNA wurde anders als im Herstellerprotokoll für die IVT angegeben mit Hilfe des RNeasy Mini Kit nach Angaben des Herstellers mit dem Protokoll RNA *Cleanup* durchgeführt (Ausgabe aus Juni 2012). Der RLT-Puffer wurde ohne β-Mercaptoethanol verwendet. Die Elution der RNA erfolgte mit 30 µl RNase-freiem Wasser nach einer Inkubationszeit von 5 min und anschließend mit weiteren 50 µl RNase-freiem Wasser. Für die Messung der RNA-Konzentration wurde 1 µl der synthetisierten RNA abgenommen und 1:50 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit dem Qubit RNA HS Assay Kit nach Herstellerprotokoll am Qubit 2.0 Fluorometer in Qubit Assay Tubes mit 2 µl der verdünnten RNA. Vor der Konzentrationsbestimmung der Proben wurden immer die

mitgelieferten Standards (#1 und #2) eingemessen. Das Anknüpfen der *Cap*-Struktur erfolgte nach dem IVT-Herstellerprotokoll mit 60 µg der hergestellten RNA unter Verwendung der ScriptCap 2'-O-Methyltransferase, zur Ausbildung einer *Cap1*-Struktur. Bei der *Cap*-Struktur handelt es sich um eine 7-Methylguanosin-Gruppe am 5'-Ende von mRNA, die in eukaryotischen Zellen für die Translation benötigt wird. Die *Cap1*-Struktur enthält eine 2'-O-Methylierung an der ersten Base der mRNA. Die Polyadenylierung erfolgte enzymatisch, wie im IVT-Herstellerprotokoll beschrieben, außer für die Plasmide pCCR5-Uco-hetTALENpoly(A)\_KanR L und pCCR5-Uco-hetTALENpoly(A)\_KanR R, da der Poly(A)-Anhang bereits im Plasmid integriert war. Die Aufreinigung der synthetisierten mRNA erfolgte anders als im IVT-Herstellerprotokoll angegeben mit Hilfe des RNeasy Mini Kit. Das Protokoll für RNA *Cleanup* wurde dafür an das höhere Volumen der synthetisierten mRNA-Ansätze angepasst. Das Volumen wurde im ersten Schritt des RNA *Cleanup* Protokolls auf 200 µl statt 100 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde dem Ansatz 750 µl RLT Puffer (statt 350 µl) zugegeben. Der RLT-Puffer wurde ohne β-Mercaptoethanol verwendet. Die Zugabe von 96 %igem Ethanol erfolgte mit 500 µl statt 250 µl. Die Elution erfolgte 3x mit je 40 µl RNase-freiem Wasser nach jeweils 5 min Inkubationszeit. Für die Messung der mRNA-Konzentration wurde 1 µl der synthetisierten mRNA abgenommen und 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Die Konzentrationsbestimmung der mRNA erfolgte mit dem Qubit RNA HS Assay Kit nach Herstellerprotokoll am Qubit 2.0 Fluorometer in Qubit Assay Tubes mit 2 µl der verdünnten mRNA. Vor der Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte immer die Messung der mitgelieferten Standards (#1 und #2). Anschließend wurde die mRNA in RNase-freie 1,5 ml Reaktionsgefäße (aus dem RNeasy Mini Kit) aliquotiert und bei einer Langzeitlagerung von > 1 Woche bei -80 °C gelagert, ansonsten erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

### 3.20 Isolation von primären, humanen mononukleären Zellen

Humane, primäre mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurden aus *Buffy Coats* mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. *Buffy Coats* entstehen als Nebenprodukt aus der Aufarbeitung von Vollblutspenden und bestehen aus Leukozyten und Thrombozyten, sowie Plasma und nicht vollständig entfernten Erythrozyten. Die in dieser Arbeit verwendeten *Buffy Coats* wurden freundlicherweise vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf von gesunden Blutspendern nach ihrem Einverständnis bereitgestellt. Die gesamte Menge eines *Buffy Coats* (ca. 60 - 65 ml) wurde in ein T75 Zellkulturgefäß überführt und 1:2 mit DPBS (Gibco) versetzt. Anschließend wurden jeweils bis zu 30 ml des verdünnten *Buffy Coats* vorsichtig auf 15 ml Biocoll Separating Solution in insgesamt vier 50 ml Falcon Reaktionsgefäß geschichtet und direkt im Anschluss bei 1000x g für 30 min bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse in der

Zentrifuge Rotanta 460 R zentrifugiert. Nach der Auftrennung wurde das Plasma von den vier 50 ml Reaktionsgefäßen abgenommen, in neue 50 ml Reaktionsgefäße überführt und für spätere Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die Interphase enthält die PBMCs welche danach vollständig abgenommen und auf zwei neue 50 ml Falcon Reaktionsgefäß aufgeteilt wurden. Die PBMCs wurden dreimal mit je 30 ml DPBS (Gibco) gewaschen. Der Zentrifugationsschritt erfolgte dabei in der Zentrifuge Rotanta 460 R mit 1200 rpm für 10 min bei RT mit Bremse (Stufe 9). Nach dem letzten Waschschrift wurden die PBMCs in 8 ml DPBS (Gibco) suspendiert und mit einer Neubauerzählkammer gezählt (Abschnitt 3.26). Für die Zellzählung wurde ein Aliquot der PBMCs abgenommen, 1:50 mit DPBS (Gibco) verdünnt und 1:2 mit Trypanblau-Lösung gefärbt. In der Zwischenzeit wurde das Plasma bei 57 °C für 30 min erhitzt. Anschließend wurden die ausgefallenen Bestandteile bei 1000x g für 10 min pelletiert. Das abzentrifugierte Plasma wurde in mehreren Aliquots in 15 ml Falcon Reaktionsgefäßen aufgeteilt und bei -20 °C eingefroren. Die PBMCs wurden entweder direkt verwendet (Abschnitt 3.21 und 3.24) oder kryokonserviert (Abschnitt 3.23).

### **3.21 Isolation von primären, humanen CD4<sup>+</sup>- Zellen aus PBMCs**

CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden mit Hilfe von CD4 MicroBeads (*Microbeads* konjugiert mit monoklonalem, anti-humanem CD4-Antikörper) aus PBMCs isoliert. Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls von Miltenyi Biotec mit LS MACS Separation Columns. Vor der Isolation wurde die Zellsuspension durch ein 70 µm Filter gegeben. Nach der Isolation wurden die CD4<sup>+</sup>-Zellen in Kultur genommen (Abschnitt 3.24) oder kryokonserviert (Abschnitt 3.22).

### **3.22 Kryokonservierung von humanen Zellen**

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen (PBMCs, CD4<sup>+</sup>-Zellen oder T-Zelllinien) wurden vor dem Einfrieren mit Hilfe einer Neubauerzählkammer gezählt (Abschnitt 3.26), pelletiert (5 min bei 300x g und RT in der Zentrifuge Rotanta 460 R) und der Überstand entfernt. Die Suspension erfolgte im entsprechenden Einfriermedium für Zelllinien (Einfriermedium I) oder primäre Zellen (Einfriermedium II) mit einer Konzentration von  $3 \times 10^6$  -  $5 \times 10^7$  Zellen/ml. Die Zellen wurden über Nacht in einem Mr. Frosty™ Gefrierbehälter bei -80 °C eingefroren und im Anschluss in flüssigem Stickstoff für die Langzeitlagerung überführt.

### **3.23 Auftauen von kryokonservierten humanen Zellen**

Die eingefrorenen humanen Zellen wurden nach der Entnahme aus dem Stickstofftank sofort in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend in ein 30 ml Reaktionsgefäß überführt. Tropfenweise wurden 5 ml des zellspezifischen Mediums (RPMI bei T-Zelllinien und TexMACS bei primären Zellen) zugeben und die Zellsuspension im Anschluss bei 300x g für

5 min bei RT (Rotanta 460 R) zentrifugiert. Das Medium wurde restlos abgenommen, um das DMSO zu entfernen. Danach wurden die Zellen in 5 ml zellspezifischem Vollmedium suspendiert, gezählt (Abschnitt 3.26) und in Kultur genommen (Abschnitt 3.24 und 3.25).

### **3.24 Aktivierung und Kultivierung von primären, humanen Zellen**

Nach der Isolation (Abschnitt 3.19 und 3.21) oder dem Auftauen (Abschnitt 3.23) wurden die primären T-Zellen aktiviert, das heißt zur Differenzierung und Proliferation angeregt. Die Aktivierung der primären T-Zellen erfolgte in dieser Arbeit mit humanem T Cell TransAct, eine polymere Nanomatrix konjugiert mit humanisierten CD3- und CD28-Agonisten. Die PBMCs wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml und die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml im T-Zell Medium II oder III (beschrieben in Tabelle S12) in einer 6-Well-Zellkulturplatte für Suspensionszellen ausgesät. Für die Aktivierung wurde den ausgesäten Zellen das T Cell TransAct in einem Verhältnis von 1:100 zum Medium (10 µl T Cell TransAct pro Milliliter Medium) zugefügt. Anschließend wurden die ausgesäten Zellen für 3 Tage bei 37 °C im Inkubator (Heraeus Heracell 150i CO<sub>2</sub>) gehalten. Am Tag 3 nach T Cell TransAct Zugabe (Aktivierung) erfolgte die Elektroporation der primären T-Zellen (Abschnitt 3.27). Ab dem 5. Tag nach Aktivierung wurden die T-Zellen in eine 12-Well-Platte überführt und alle 2 - 3 Tage mit frischem T-Zellmedium auf eine Zellkonzentration von etwa  $1 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt.

### **3.25 Kultivierung von T-Zelllinien**

Nach dem Auftauen wurden die T-Zelllinien (PM1 und Jurkat J76) im T-Zell Medium I in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml in T25- (10 ml Zellsuspension) oder T75-Zellkulturflaschen (25 ml Zellsuspension) für Suspensionszellen überführt und unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) im Inkubator (Heraeus Heracell 150i CO<sub>2</sub>) bis zur Elektroporation (Abschnitt 3.27) gehalten. Alle 2 - 3 Tage wurde 2/3 des Mediums gegen frisches ausgetauscht. 2 Tage nach der Elektroporation wurden die Zellen aus der 24-Well-Platte in eine 12-Well-Platte überführt.

### **3.26 Zellzahlbestimmung mittels Neubauerzählkammer**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauerzählkammer. Vor jeder Zählung wurden die Neubauerzählkammer und das verwendete Deckgläschen mit Ethanol gereinigt. Das Deckgläschen wurde befeuchtet und auf die Neubauerzählkammer über die Zählgitter geschoben. Für alle Zellzählungen wurde ein Aliquot der Zellen abgenommen und 1:2 mit einer 0,4 % Trypanblau-Lösung versetzt, um zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden zu können. Tote Zellen werden durch Trypanblau angefärbt und erscheinen unter dem Mikroskop blau. 10 µl der gefärbten Zellsuspension wurden an den Rand des Deckgläschens pipettiert. Die Zellzählung wurde mit der befüllten Neubauerzählkammer an einem Lichtmikroskop

(CKX41) in einer 10fachen Vergrößerung durchführt. In dieser Arbeit wurden pro zu zählendem Ansatz 4 Großquadrate ausgezählt. Zellen, die auf dem Rand der Großquadrate (dreifache Linie) lagen wurden nur für 2 der 4 Ränder mitgezählt. Bei sehr hohen Zellzahlen, mit über 120 Zellen pro Großquadrat, wurde die Zellzählung mit einer verdünnten Zellsuspension gefärbt mit Trypanblau (Verdünnung erfolgte mit Medium oder DPBS von Serana) wiederholt. Da das Zählgitter mit dem Deckgläschen ein definiertes Kammervolumen hat, kann daraus die Konzentration Zellzahl pro Volumeneinheit berechnet werden. In dieser Arbeit wurde folgende Formel für die Berechnung der Zellzahl pro Milliliter in der ursprünglichen Zellkultur verwendet (Formel 3):

**Formel 3: Zellzählung**

$$\text{Gesamtzellzahl der 4 Großquartrate} \div 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellen/Milliliter}$$

**3.27 Elektroporation von T-Zellen mit mRNA**

Zu Beginn wurde für jede Elektroporation 1 ml des zellspezifischen Mediums in eine 24-Well-Zellkulturplatte vorgelegt. Alle verwendeten mRNAs wurden auf Eis gehalten. Die für die Elektroporation vorgesehen T-Zellen wurden in ein 30 ml Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (5 min bei 300x g und RT in der Zentrifuge Rotanta 460 R), das Medium restlos abgenommen und die T-Zellen in 5 ml Opti-MEM I Medium suspendiert. Anschließend wurden die T-Zellen gezählt (Abschnitt 3.26), erneut zentrifugiert (5 min bei 300x g und RT in der Zentrifuge Rotanta 460 R) und das Opti-MEM I Medium restlos abgenommen. Die T-Zellen wurden mit einer Konzentration von  $2,0 \times 10^6$  Zellen/600  $\mu$ l für primäre T-Zellen und  $1,5 \times 10^6$  Zellen/600  $\mu$ l für T-Zelllinien in Opti-MEM I Medium suspendiert. Die Elektroporationen im kleinen Labormaßstab erfolgten am Elektroporator, GenePulser Xcell Total System mit 4 mm Elektroporationsküvetten. In Abhängigkeit vom Experiment wurden 300  $\mu$ l beziehungsweise 600  $\mu$ l der Zellsuspension (also  $1 \times 10^6$  oder  $2 \times 10^6$  Zellen) in eine Küvette vorgelegt, die mRNAs (TALEN und/oder GFP) zugegeben und der Ansatz durch mehrmaliges Antippen der Küvette durchmischt. Die gefüllte Küvette wurde in den Elektroporator gestellt und mit folgenden Parametern elektroporiert<sup>193,257</sup>: PM1 = 350 V, 3 x *square-wave* Pulse für jeweils 5 ms mit 0,1 ms Pause zwischen den Pulsen; Jurkat = 300 V, 1 x *square-wave* Puls für 20 ms; primäre T-Zellen = 300 V, 1 x *square-wave* Puls für 10 ms. Anschließend wurde die elektroporierte Zellsuspension mittels einer 200  $\mu$ l Pipette aus der Küvette in die vorbereitete 24-Well-Zellkulturplatte überführt und die Platte für 24 h bei 32 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator (Heraeus Heracell 150i CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Zugabe der GFP-mRNA erfolgte, wenn angegeben (Tabelle S12), als Kontrolle der Elektroporation. Innerhalb von 24 h nach der Elektroporation wurden die entsprechenden Proben auf ihre GFP-Expression hin am Durchflusszytometer untersucht (Abschnitt 3.28). Es wurden nur Proben zur weiteren Analyse verwendet bei denen mehr als 80 % der Zellen GFP positiv waren (Daten werden nicht gezeigt).

### 3.28 Durchflusszytometrie am BD FACS Canto II

Um eine erfolgreiche mRNA-Elektroporation schnell und einfach bestimmen zu können, wurden in einigen Experimenten die verwendeten T-Zellen zusätzlich mit GFP-mRNA elektroporiert. Zur Überprüfung der GFP-Expression wurde 18 h - 24 h nach der Elektroporation 200 µl - 350 µl der Zellsuspension abgenommen, in ein 5 ml Röhrchen überführt und mit 2 ml DPBS (Serana) versetzt. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 300x g und RT in der Zentrifuge Rotanta 460 R zentrifugiert, der Überstand abgegossen, die Zellen in 100 µl DPBS (Serana) suspendiert und 5 s gevortext. Die Messung der GFP-Expression erfolgte am BD FACS Canto II mit dem Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht und dem 488 nm Laser unter folgenden Einstellungen: Photodiode E, Langpassfilter = 502, Bandpassfilter = 530/30. Es wurde keine Kompensation für diese Messung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach den Angaben in Abbildung S10. Das *Gate* für die GFP-positive Zellpopulation wurde anhand von negativen Kontrollzellen eingestellt.

### 3.29 Färbung von Zellen für die Messung am MACSQuant

Die Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie am MACSQuant erfolgte im MACS-Puffer für 10 min bei RT im Dunkeln. Für die Färbung der Zellen direkt aus dem *Buffy Coat* wurde 100 µl der Zellsuspension abgenommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und in einem Endvolumen von 200 µl mit 90 µl Antikörpermix plus 10 µl 7AAD-Lösung gefärbt. Zur Lyse der roten Blutzellen wurde dem Ansatz 1800 µl Erylysepuffer zugegeben und die Zellen 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Bei der Färbung von separierten CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden 30 µl der Zellsuspension abgenommen und in einem Endvolumen von 100 µl mit 45 µl des Antikörpermixes plus 10 µl 7AAD-Lösung gefärbt. Das Immunzellrepertoire wurde mit folgenden Antikörpermix bestimmt: CD45-Vioblue, CD3-FITC, CD4-Viogreen, CD16-PE, CD56-PE, CD14-APC, CD19-PEVio770, CD8-APCVio770. Die T-Zell-Populationen wurde anhand folgender Antikörper analysiert: CD197-Vioblue, CD4-Viogreen, CD3-FITC, CD95-PE, CD62L-APC, CD45R0-PEVio770, CD8-APCVio770. Jeder Antikörper wurde in einer Endkonzentration von 1:50 eingesetzt. Die Zellen wurden nach der Färbung direkt am MACSQuant gemessen (Abschnitt 3.30)

### 3.30 Durchflusszytometrie am MACSQuant

Der MACSQuant wurde 30 min vor der Messung angeschaltet, um den 488 nm Laser auf mindestens 37,5 °C aufwärmen zu lassen. Die Kalibrierung des MACSQuant erfolgte wöchentlich mit den MACSQuant Calibration Beads nach Angaben des Herstellers. Die Kompensation für einen 8-farbigen Antikörpermix erfolgte mit Zellen oder mit Hilfe des MACS Comp Bead Kit, Anti-REA nach Angaben des Herstellers. Dafür wurden die Zellen oder MACS

Comp Bead einzeln mit einem Antikörper jedes Fluoreszenzfarbstoffes für 10 min bei RT im Dunkeln gefärbt und anschließend am MACSQuant im MultiColor Express Mode nach den Instruktionen des Gerätes gemessen. Die Berechnung der Kompensationsmatrix erfolgte automatisch durch die MACSQuant Software. Der Schwellenwert (*Trigger*) wurde basierend auf dem Vorwärtsstreulicht (FSC) eingestellt. Die Kompensation wurde mit den weiteren Instrumenteneinstellungen gespeichert und für die Messung der gefärbten Zellen ins Experiment geladen. Die Analysevorlage wurde zuvor händisch erstellt und ebenfalls vor der Messung ins Experiment geladen. Pro Messung wurden 50 µl beziehungsweise 100 µl der Zellsuspension gemessen abhängig von der Zelldichte. Jede Probe wurde direkt vor der Messung gevortext. Die automatische Mischung der Probe vom MACSQuant wurde ausgestellt. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden mit der Software FlowJo analysiert.

### **3.31 Vorbereitungen für den Prozess am CliniMACS Prodigy**

Einen Tag vor dem Start des automatischen Elektroporationsprozesses (*T Cell Engineering*, TCE) wurden der erforderlichen Puffer, die Antikörpermixe und das Medium angesetzt. Alle Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank. Aus dem CliniMACS PBS/EDTA Buffer (Beutel) wurde mittels einer 50 ml Spritze über eine stumpfe Sicherheitskanüle (Zugang mit rotem Gummi) 75 ml Puffer entnommen und anschließend 75 ml humanes Albumin 20% zugefügt. Der supplementierte CliniMACS PBS/EDTA Puffer wurde über Nacht bei RT gelagert. Für das Kulturmedium wurde das TexMACS GMP Medium mit humanem Serum von Sigma-Aldrich, sowie Interleukin-7 (IL-7) und Interleukin-15 (IL-15) versetzt. Dafür wurden aus dem TexMACS GMP Medium Beutel mit einer 50 ml Spritze über den Luer-Lock etwa 62 ml des Mediums abgenommen. Jeweils 1 ml davon wurde verwendet, um die lyophilisierten Interleukine zu lösen. Die gelösten Interleukine wurden über den Luer-Lock in das Medium gegeben und die Spritze zweimal mit Medium aus dem Beutel gespült. Im Anschluss wurden 60 ml humanes Serum mit einer 50 ml Spritze über den Luer-Lock in den Beutel gegeben. Das supplementierte TexMACS GMP Medium wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Die Antikörpermixe wurden wie in Abschnitt 3.29 beschrieben ohne Zugabe von 7-AAD für Färbeansätze von 100 µl angesetzt und bis zur Nutzung im Kühlschrank gelagert. Die Zugabe von 7-AAD zum Antikörpermix erfolgte direkt vor der Färbung. Die *Buffy Coats* (BCs) für die TCE Prozesse wurden am Vortag aus der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf abgeholt und über Nacht im Dunkeln auf einem Plattenschüttler auf niedrigster Stufe geschüttelt. Am nächsten Tag wurde an einen der Schläuche des BCs mit dem TSCD-II ein Single Sampling Adapter steril angeschweißt, die Flüssigkeit in dem Schlauch restlos in den Blutbeutel gedrückt, der Blutbeutel vorsichtig durchmischt und etwa 1 ml des BC für eine initiale Qualitätskontrolle abgenommen. Anschließend wurde der gefüllte Single Sampling Adapter Blutbeutel abgeschweißt und die

Probe wie in den Abschnitten 3.29 und 3.30 beschrieben analysiert. Der BC wurde vor Verwendung am CliniMACS Prodigy gewogen (KB 2400 - 2N) und das Gewicht notiert.

### 3.32 Installation des Tubing Sets für den TCE am CliniMACS Prodigy

Die Produktion von CCR5-editierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im großen Maßstab erfolgte mit Hilfe des automatisierten TCE Prozesses am CliniMACS Prodigy mit Elektroporationseinheit abgesichert durch eine unterbrechungsfreie Stromversorgung (USV, KR2000) (Abbildung S11). Die Installation der Schlauchsysteme (*Tubing Sets*) und erforderlichen Reagenzien erfolgte unter Anleitung der CliniMACS Prodigy Software und zusätzlichen Angaben des Herstellers. Hier werden kurz die wichtigsten Schritte zusammengefasst. Nach dem Start des Gerätes wurde das Programm *T Cell Engineering Process*, der Prozessfall 1 (*Full process with electroporation*) und ein Reagenz (vial) für die Separation ausgewählt. Dadurch erfolgte die Inkubation des CliniMACS CD4 Reagent mit den Zellen für 15 min bei 4 °C. Lauf 1 erfolgte mit der *T Cell Engineering Process* beta-Version V0.7.0.1, während die Läufe 2 - 4 mit der Version V0.6.2 im eigenen Labor durchgeführt wurden. Das CliniMACS Prodigy Tubing Set TS 520 wurde durch steriles Schweißen (TSCD-II) mit dem CliniMACS Prodigy EP-2 verbunden und danach am CliniMACS Prodigy eingelegt. Nach der Installation erfolgten drei Integritätstests zur Überprüfung der Schlauchsysteme (*Integrity Test upper part, Integrity Test lower part, Integrity Test EP2*). Der supplementierte TexMACS GMP Medium-Beutel wurde an den Schlauch von Ventil 3 (*valve 3*) mit dem TSCD-II steril angeschweißt und anschließend mit Alufolie lichtdicht abgedeckt. Der supplementierte CliniMACS PBS/EDTA Buffer wurde am Anschluss über den Zugang mit dem grauen Gummi mit dem Spike (Stachel-förmiger Anschluss) von Ventil 1 verbunden. Falls notwendig wurde die Verbindung mit Parafilm M umwickelt, um sie luftdicht abzuschließen. Anschließend wurde das Schlauchsystem mit dem supplementierten CliniMACS PBS/EDTA Buffer gespült (*Priming*).

### 3.33 TCE Prozess am CliniMACS Prodigy

Nach erfolgreichem Priming wurde der getestete BC steril an den Schlauch über dem Applikationsbeutel angeschweißt und in den Applikationsbeutel überführt. Der leere BC Beutel wurde abgeschweißt und gewogen. Die Gesamtzellzahl, Frequenz CD4<sup>+</sup>-Zellen (Abschnitt 3.30) und Volumen des Zellproduktes (berechnet aus dem Gewicht des BC-Beutels) wurde nach Abfrage ins System eingegeben. Anschließend wurde das CliniMACS CD4 Reagent über Ventil 2 angeschlossen und die Separation gestartet. Die Inkubation und Zentrifugation erfolgten in der Kammer innerhalb der CentriCult-Unit. Nach der Separation wurde über einen QC-Beutel eine Probe der Zellen abgenommen und erneut mit dem Antikörpermix für das Immunrepertoire analysiert. Die am MACSQuant ermittelte Zellkonzentration wurde nach Abfrage ins System eingegeben. Der Start der Kultur erfolgte, wenn nicht anders angegeben,

mit  $2,0 \times 10^8$  Zellen in 70 ml supplementiertes TexMACS GMP Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Da diese Softwareversion noch keine Temperaturkalibrierung enthielt und somit den eingegeben Wert nicht automatisch korrigierte, wurde die Temperatur für die Kultur manuell auf 39 °C gesetzt. Das MACS GMP T Cell TransAct wurde über Ventil 4 angeschlossen und der Kultur automatisch zugegeben. Alle nicht mehr benötigten Beutel und Teile des Tubing Sets wurden nach Herstellerinstruktionen entfernt. Die Aktivitätsmatrix wurde gemäß Tabelle S16 programmiert. Der Schüttler 2 (*shaker typ 2*) wurde, wenn nicht anders angegeben, beim Kulturstart aktiviert und am 3. Tag im Prozess vor der Elektroporation deaktiviert. An Tag 1 im Prozess wurde der Zellkultur 30 ml supplementiertes TexMACS GMP Medium zugefügt. Die Elektroporation erfolgte an Prozesstag 3. Für die Elektroporation wurden 10 ml des CliniMACS Electroporation Buffer unter einer sterilen Werkbank über den Luer-Lock mit einer 30 ml Spritze entnommen. 5 ml des Puffers wurden mit einer 10 ml Spritze in den Nucleic Acid Bag über den Sterilfilter gegeben. Anschließend wurde der CliniMACS Electroporation Buffer steril an Ventil 5 angeschweißt. Anschließend erfolgten das *Priming* des CliniMACS Prodigy EP2 und die Kalibration der Küvette sowie mehrere Testelektroporationen mit den 5 ml Puffer aus dem Nucleic Acid Bag. Die Zellen wurden in 20 ml CliniMACS Electroporation Buffer umgepuffert und über Bag 1 in den Bag 2 gepumpt. Die CCR5-Uco-hetTALEN-poly(A) L und R mRNA wurde nach den Mengen aus Tabelle S17 in 5 ml CliniMACS Electroporation Buffer verdünnt und über den Sterilfilter in den Nucleic Acid Bag injiziert. Die initiale mRNA-Menge berechnete sich aus der durchgeführten Titration der CCR5-Uco-hetTALENpoly(A) mRNA von BioNTech für  $2 \times 10^8$  Zellen plus 20 % Überschuss. In der Kammer wurden 116 ml supplementiertes TexMACS GMP Medium vorgelegt. Die Elektroporation erfolgte automatisch nach den in Tabelle S18 angegebenen Parametern in mehreren Schritten. Nach jeder Füllung der Küvette mit Zellen und mRNA, wurden diese elektroporiert und zurück in die Kammer gepumpt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen für 24 h bei 32 °C (Eingabe: 33 °C) ohne Schüttler gehalten. Etwa 17 h nach Elektroporation wurde die Kultur mit supplementiertem TexMACS GMP gewaschen (*culture wash, 1 cycle*). An Tag 4 im Prozess wurde der Schüttler 2 und an Tag 5 der Schüttler 3 (außer im Lauf 4) aktiviert. Bis zur Ernte wurde das TexMACS GMP Medium der T-Zellkultur täglich automatisch ersetzt. Während des Prozesses wurde der supplementierte TexMACS GMP Medium Beutel einmal gemäß dem Hersteller ausgetauscht. Bei Bedarf wurde der Abfallbeutel (*waste bag*) ebenfalls nach den Herstellerangaben gegen einen Transfer Bag 1000 gewechselt. Zu Analysezwecken wurden während des Prozesses Proben nach Herstellerangaben über die QC-Beutel entnommen, dazu wurde ein zusätzlicher neuer Triple Sampling Adapter steril an das Tubing Set geschweißt.

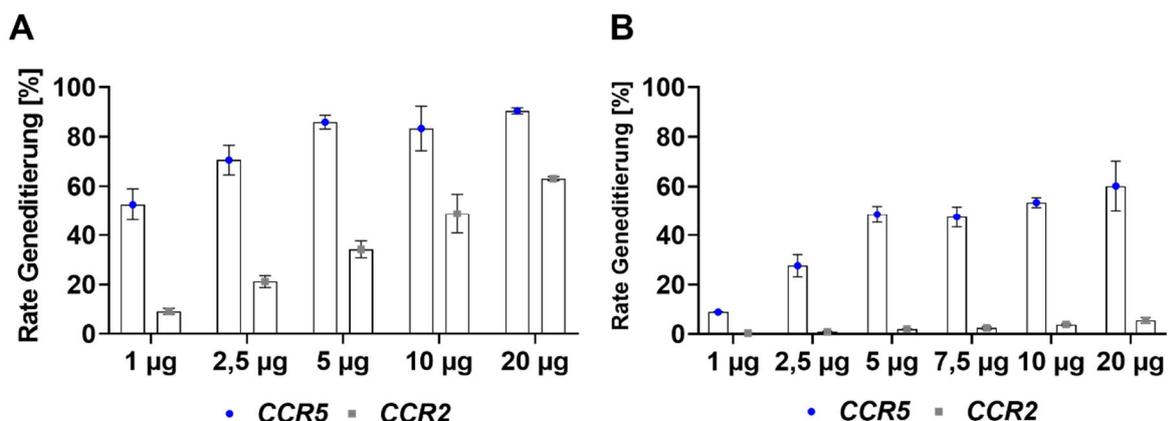
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der CCR5-Uco-TALEN Aktivität

Der erste Teil der Arbeit widmet sich einer genauen Charakterisierung der zuvor im Labor etablierten CCR5-Uco-TALEN.

#### 4.1.1 Die CCR5-Uco-TALEN zeigte einen starken Dosisseffekt am Off-Target CCR2

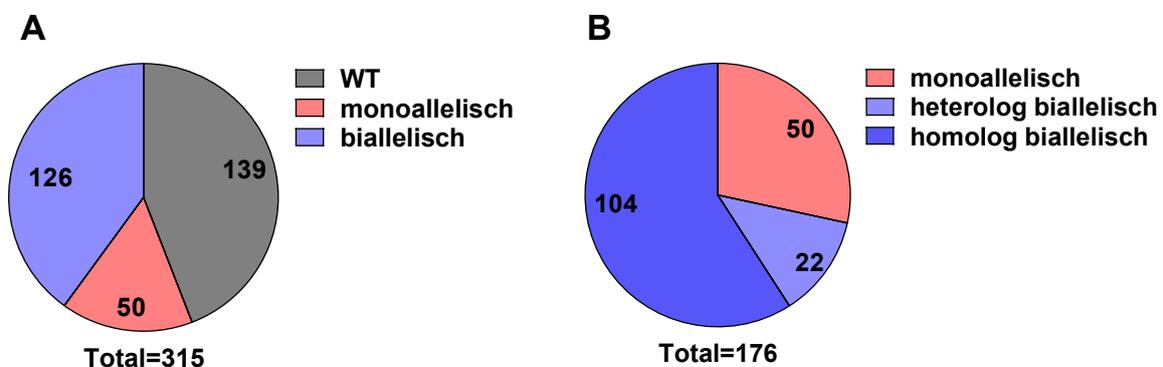
Die im Rahmen der Vorarbeiten durchgeführten Experimente zeigten eine Erhöhung der CCR5-Editierung mit steigender mRNA-Menge. Der Dosisseffekt sollte daher nochmal genauer analysiert und zugleich die Auswirkungen auf die CCR2 Off-Target-Aktivität untersucht werden. Daher wurden PM1-Zellen und humane, primäre T-Zellen mit steigenden CCR5-Uco-TALEN mRNA-Konzentrationen elektroporiert. Pro Ansatz wurden  $1,5 \times 10^6$  PM1-Zellen mit der angegebenen CCR5-Uco-TALEN mRNA-Menge pro Arm (1  $\mu$ g, 2,5  $\mu$ g, 5  $\mu$ g, 10  $\mu$ g und 20  $\mu$ g) elektroporiert. Für die Elektroporation der primären Zellen wurden PBMCs aus *Buffy Coats* isoliert. Nach der Aktivierung der T-Zellen für 3 Tage erfolgte die Elektroporation von je  $2 \times 10^6$  Zellen mit den angegebenen Mengen an CCR5-Uco-TALEN mRNA pro Arm (1  $\mu$ g, 2,5  $\mu$ g, 5  $\mu$ g, 7,5  $\mu$ g, 10  $\mu$ g und 20  $\mu$ g). 5 Tage nach der Elektroporation wurden die Zellen für die gDNA-Isolation geerntet und die Geneditierung an den Loci CCR5 und CCR2 mittels GEF-dPCR analysiert. Wie in Abbildung 14A + 14B gezeigt, ist die Geneditierungsrate beider Loci abhängig von der verwendeten mRNA-Dosis. Die Rate der CCR2- und CCR5-Editierung in primären Zellen ist geringer als in den PM1-Zellen. In beiden Zelltypen erreichte die CCR5-Editierung bei einer mRNA-Menge von 5  $\mu$ g pro TALEN-Arm ein Plateau, während die Geneditierung des CCR2-Lokus weiter linear stieg. Demnach ist eine genaue Dosierung der CCR5-Uco-TALEN mRNA essenziell, um eine möglichst hohe Indelrate am On-Target CCR5, bei gleichzeitig möglichst niedriger CCR2 Off-Target-Rate zu erreichen.



**Abbildung 14: CCR5-Uco-TALEN mRNA zeigte deutliche Dosisseffekte für die CCR5- und CCR2-Loci.** (A) Geneditierung am CCR5- (Kreis, blau) und CCR2-Lokus (Quadrat, grau) aus GEF-dPCR-Daten für PM1-Zellen nach CCR5-Uco-TALEN-Behandlung mit unterschiedlichen mRNA-Mengen. n=3. (B) Geneditierung am CCR5- (Kreis, blau) und CCR2-Lokus (Quadrat, grau) aus GEF-dPCR-Daten für primäre T-Zellen nach CCR5-Uco-TALEN-Behandlung mit unterschiedlichen mRNA-Mengen. n=3. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen (SD) an.

#### 4.1.2 Biallelische CCR5-Editierung bei TALEN-behandelten T-Zellen

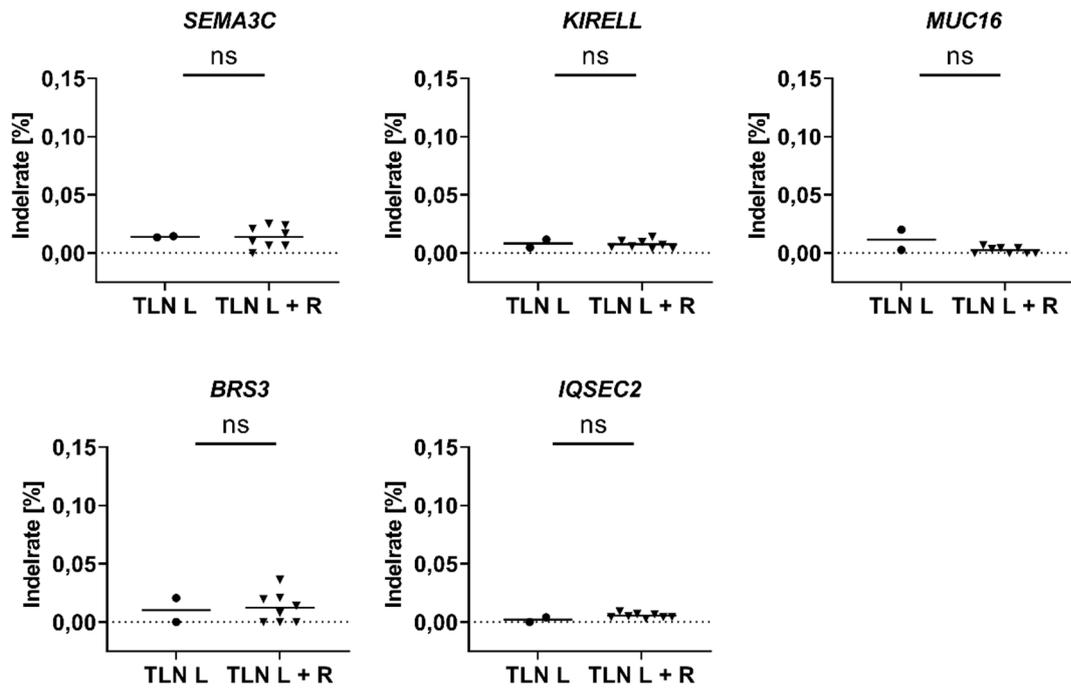
Die Herstellung CCR5-negativer und so mit HIV-resistenter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen setzt in der Regel voraus, dass die Geneditierung am CCR5-Lokus an beiden Allelen stattfindet. Um herauszufinden, ob die Aktivität der CCR5-Uco-TALEN zur Genveränderung beider Allele führt, wurde ein Protokoll für die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (scHRMCA) am CCR5-Lokus auf Einzelzellen entwickelt. Mit dieser Methode kann eine monoallelische (ein Allel betreffend) oder biallelische (zwei Allele betreffend) Geneditierung ermittelt werden, da bereits kleinste Änderungen der Amplikonsequenz zu einer Veränderung der Schmelztemperatur und des Schmelzkurvenprofils führen.<sup>258–260</sup> Für dieses Experiment wurden aus *Buffy Coats* isolierte PBMCs aktiviert und im T-Zell Medium II kultiviert. Die Elektroporation erfolgte mit 5 µg CCR5-Uco-TALEN mRNA pro 1x10<sup>6</sup> Zellen. Die scHRMCA am CCR5-Lokus erfolgte für insgesamt 315 Einzelzellen aus 3 unabhängigen Elektroporationen von primären menschlichen T-Zellen mit beiden Armen der CCR5-Uco-TALEN. Die Schmelztemperatur und -kurven der TALEN-behandelten Zellen wurden mit denen von unbehandelten (Wildtyp) Zellen verglichen. Insgesamt zeigten 139 (44 %) der analysierten Zellen ein dem der Wildtypzellen entsprechendes Schmelzkurvenprofil, während 50 (16 %) Zellen ein Schmelzkurvenprofil für eine monoallelische Geneditierung (CCR5<sup>WT/Indel</sup>) und 126 (40 %) eine Schmelztemperatur und -kurve einer biallelischen Geneditierung (CCR5<sup>Indel/Indel</sup>) zeigten (Abbildung 15A). Insgesamt wiesen demnach 72 % der editierten Zellen eine biallelische CCR5-Editierung auf. Die biallelischen Schmelzkurvenprofile wurden weiter daraufhin untersucht, ob die editierten Allele identisch (homolog, Bildung eines Homoduplex) oder unterschiedlich (heterolog, Bildung eines Heteroduplex) Sequenzen aufwiesen – in der Mehrzahl der editierten Zellen war die Mutation im CCR5-Gen in beiden Allelen gleich (Abbildung 15B). Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die CCR5-Uco-TALEN in den meisten transfizierten Zellen zu einer biallelischen Geneditierung am CCR5-Lokus und somit vermutlich zu HIV-resistenten T-Zellen führt.



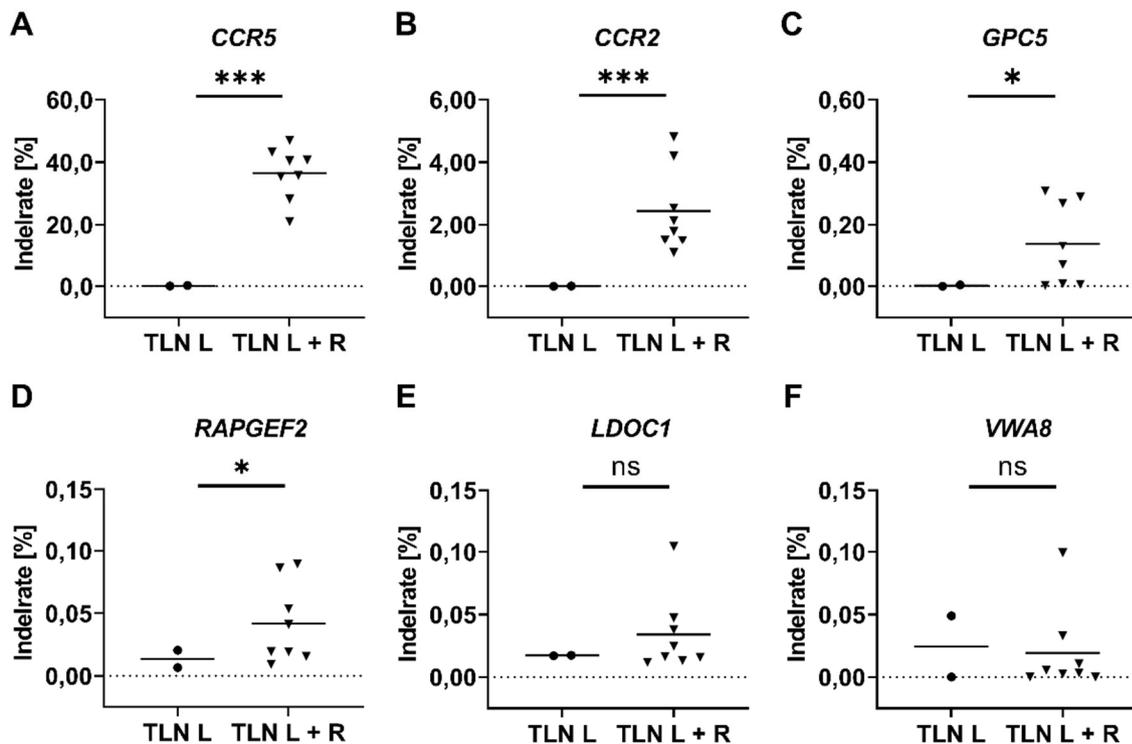
**Abbildung 15:** Die Mehrheit der modifizierten Zellen wies eine biallelische Geneditierung am CCR5-Lokus auf. scHRMCA-Daten für 315 Zellen aus CCR5-Uco-TALEN behandelten Proben (A) Anteil der Zellen mit monoallelischem, biallelischem und dem Wildtyp entsprechenden (WT) Schmelzkurvenprofil. (B) Anteil an monoallelischen, heterolog biallelischen und homolog biallelischen Schmelzkurvenprofilen.

#### 4.1.3 Die CCR5-Uco-TALEN wies Off-Target Aktivität an mindestens 3 Genloci auf

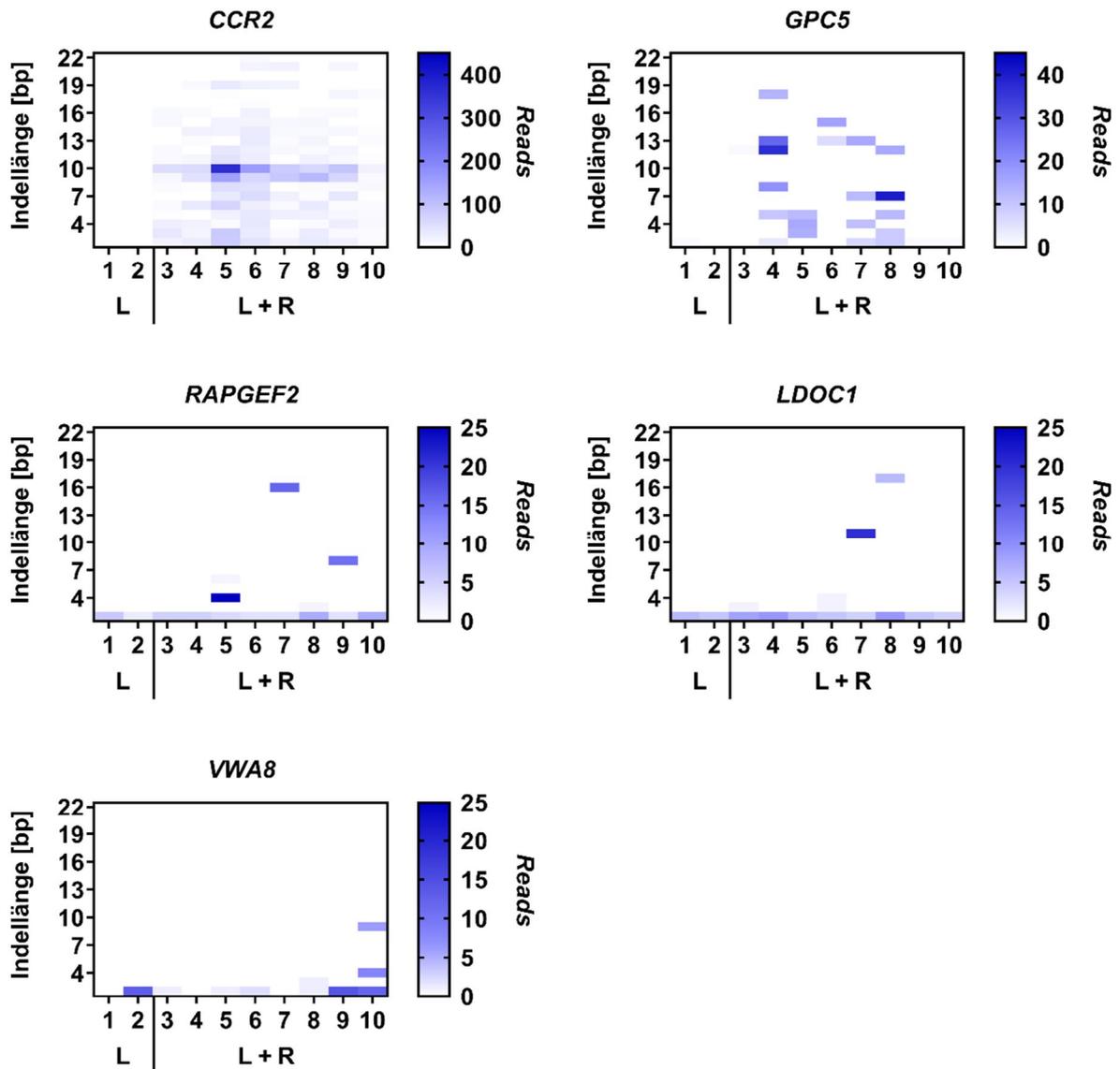
Die Nutzung von Designernukleasen, vor allem im Bereich der klinischen Anwendung, setzt eine gründliche Evaluierung potenzieller Risiken voraus, insbesondere der Off-Target-Aktivität (siehe Abschnitt 1.3.2). Die Suche nach potenziellen Off-Targets für CCR5-Uco-TALEN erfolgte *in silico* mit den zwei webbasierten Programmen PROGNOS und Paired Target Finder, welche homologe Sequenzen identifizieren. Aus den Ergebnissen wurden die 10 am häufigsten vorkommenden Off-Targets innerhalb der ersten 10 Ränge in jeder Liste ausgewählt, wobei insbesondere ein möglicher Einfluss in T- und/oder hämatopoetischen Stammzellen berücksichtigt wurde. Die 10 ausgewählten potenziellen Off-Targets (*CCR2*, *MUC16*, *VWA8*, *KIRELL*, *GPC5*, *IQSEC2*, *BRS3*, *LDOC1*, *RAPGEF2*, *SEMA3C*), sowie der *CCR5*-Lokus, wurden anschließend in CCR5-Uco-TALEN-behandelten Proben mittels Amplikon *Next Generation Sequencing* (ampNGS) durch die Firma Microsynth AG untersucht. Alle erhaltenden Sequenzen (*Reads*) wurden auf Indels im Bereich der CCR5-Uco-TALEN-Bindestelle hin analysiert. Alle *Reads* mit Indels in diesem Bereich wurden als editiert eingestuft. Sämtliche Indels außerhalb der CCR5-Uco-TALEN-Bindestelle oder *Reads*, die keine Geneditierungen zeigten, wurden als Wildtyp (WT) gezählt. Es wurden insgesamt 10 Proben (8 Proben behandelt mit beiden TALEN Armen und 2 Proben nur mit der linken TALEN behandelt) analysiert. Die Tiefe der Sequenzierung variierte von > 4.000 bis zu 65.000 *Reads* je nach Probe und Target (Abbildung S12). Es wurde kein Hinweis auf CCR5-Uco-TALEN Aktivität in 5 der 10 möglichen Off-Targets gefunden (*SEMA3C*, *KIRELL*, *MUC16*, *BRS3*, *IQSEC2*) (Abbildung 16). Wie erwartet zeigte der *CCR5*-Lokus eine hohe Rate an editierten *Reads* in den Proben, die mit beiden CCR5-Uco-TALEN Armen behandelt wurden. Es wurde keine *CCR5*-Geneditierung in Proben gefunden, die nur mit der linken TALEN behandelt wurden (Abbildung 17A). Das mögliche Off-Target *CCR2* wiederum zeigte signifikant erhöhte Indelfrequenzen im Bereich der CCR5-Uco-TALEN Bindestelle von 1,1 % - 4,8 % in allen damit behandelten Proben (Abbildung 17B). Die beiden Off-Targets *GPC5* und *RAPGEF2* zeigten ebenfalls signifikant erhöhte, wenn auch sehr niedrige Indelraten in 5 (*GPC*) beziehungsweise 3 (*RAPGEF2*) der 8 mit CCR5-Uco-TALEN behandelten Proben (Abbildung 17C+D). Für die Off-Targets *LDOC1* und *VWA8* wiesen die Mittelwerte der Indelraten keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden getesteten Probengruppen auf (Abbildung 17E+F). Allerdings zeigte jeweils eine Probe einzelne *Reads* mit größeren Indels (>4 Basenpaare) im Bereich der CCR5-Uco-TALEN Bindestelle, wie sie auch in den anderen Off-Targets (*GPC5*, *CCR2*, *RAPGEF2*) zu finden waren (Abbildung 18). Zusammengefasst zeigten 3 der 10 analysierten Off-Targets (*GPC5*, *CCR2*, *RAPGEF2*) eine, wenn auch geringe, CCR5-Uco-TALEN Aktivität. Bei 2 weiteren Loci (*LDOC1* und *VWA8*) könnte eine Off-Target-Aktivität der CCR5-Uco-TALEN möglich sein.



**Abbildung 16: ampNGS-Daten zeigten keine CCR5-Uco-TALEN-Aktivität in 5 der 10 analysierten Off-Targets.** Anteil an Indel-Reads im Vergleich zur Gesamtanzahl an Reads für 2 Proben nur mit der linken CCR5-Uco-TALEN (TLN L, Kreise) behandelt und 8 Proben mit linker und rechter CCR5-Uco-TALEN (TLN L+R, Dreiecke) behandelt. Die schwarze Linie zeigt den Mittelwert der Proben an. Für *UBXN10* konnte kein P-Wert bestimmt werden, da alle Werte bei Null lagen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Welch's *t*-Test. ns  $p > 0,1234$ .



**Abbildung 17: Nachweis einer CCR5-Uco-TALEN-Aktivität für die Loci *CCR5*, *CCR2*, *GPC5* und *RAPGEF2* per ampNGS.** Anteil an Indel-Reads im Vergleich zur Gesamtanzahl an Reads für 2 Proben behandelt nur mit der linken CCR5-Uco-TALEN (TLN L, Kreise) und 8 Proben behandelt mit linker und rechter CCR5-Uco-TALEN (TLN L+R, Dreiecke). Die schwarze Linie zeigt den Mittelwert der Proben an. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Welch's *t*-Test. ns  $p > 0,1234$ . \*  $p < 0,0332$ . \*\*\*  $p < 0,0002$ .



**Abbildung 18:** ampNGS-Daten zeigten unterschiedliche Indellängen für *CCR2*, *GPC5*, *RAPGEF2*, *LDOC1* und *VWA8* in den einzelnen Proben auf. ampNGS-Daten aller analysierten Proben (2 Proben behandelt nur mit der linken CCR5-Uco-TALEN (L) und 8 Proben behandelt mit linker und rechter CCR5-Uco-TALEN (L+R)) dargestellt in einer *Heatmap* mit der Anzahl an *Reads* für jede Indellänge zwischen 2 - 22 bp für die Off-Targets *CCR2*, *GPC5*, *RAPGEF2*, *LDOC1* und *VWA8*.

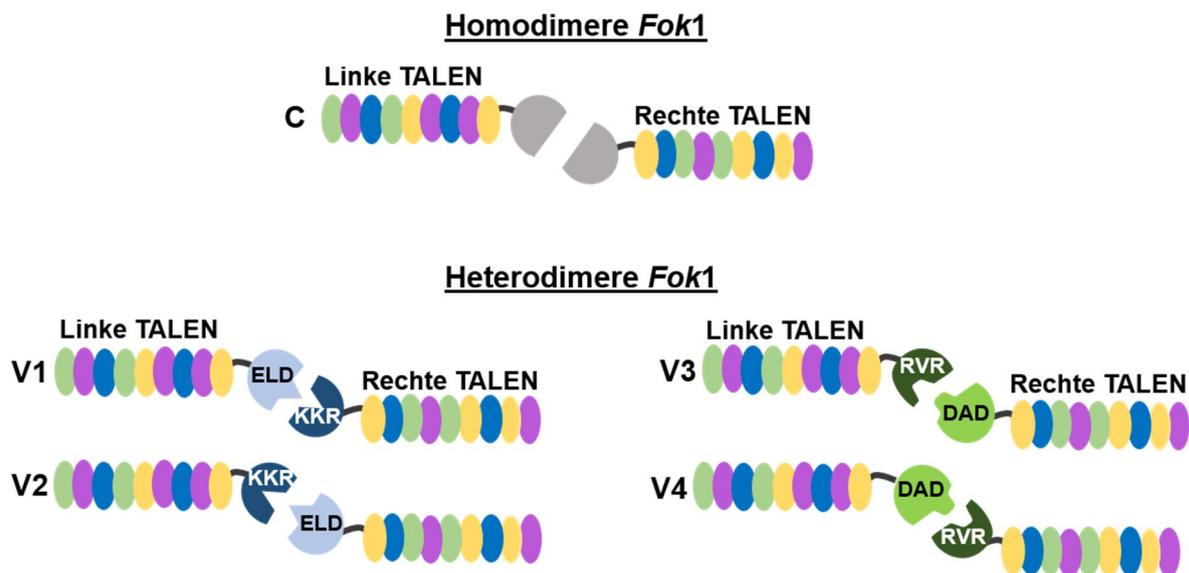
## 4.2 Optimierung der CCR5-Uco-TALEN für klinische Anwendungen

Im folgenden Teil der Arbeit sollte die oben beschriebene CCR5-Uco-TALEN für die Anwendung in der Klinik optimiert werden, um die höchstmögliche Effizienz und Sicherheit mit einfacher Anwendung zu verbinden.

### 4.2.1 Heterodimere CCR5-Uco-TALEN verringerte die Anzahl potenzieller Off-Targets

Die Untersuchung potenzieller Off-Targets hatte eine mögliche CCR5-Uco-TALEN Aktivität an 5 der 10 analysierten Bereiche gezeigt (siehe oben). Bei einer genaueren Analyse der *in silico*-Vorhersagen möglicher Off-Targets zeigte sich, dass die meisten, potenziellen Off-Targets

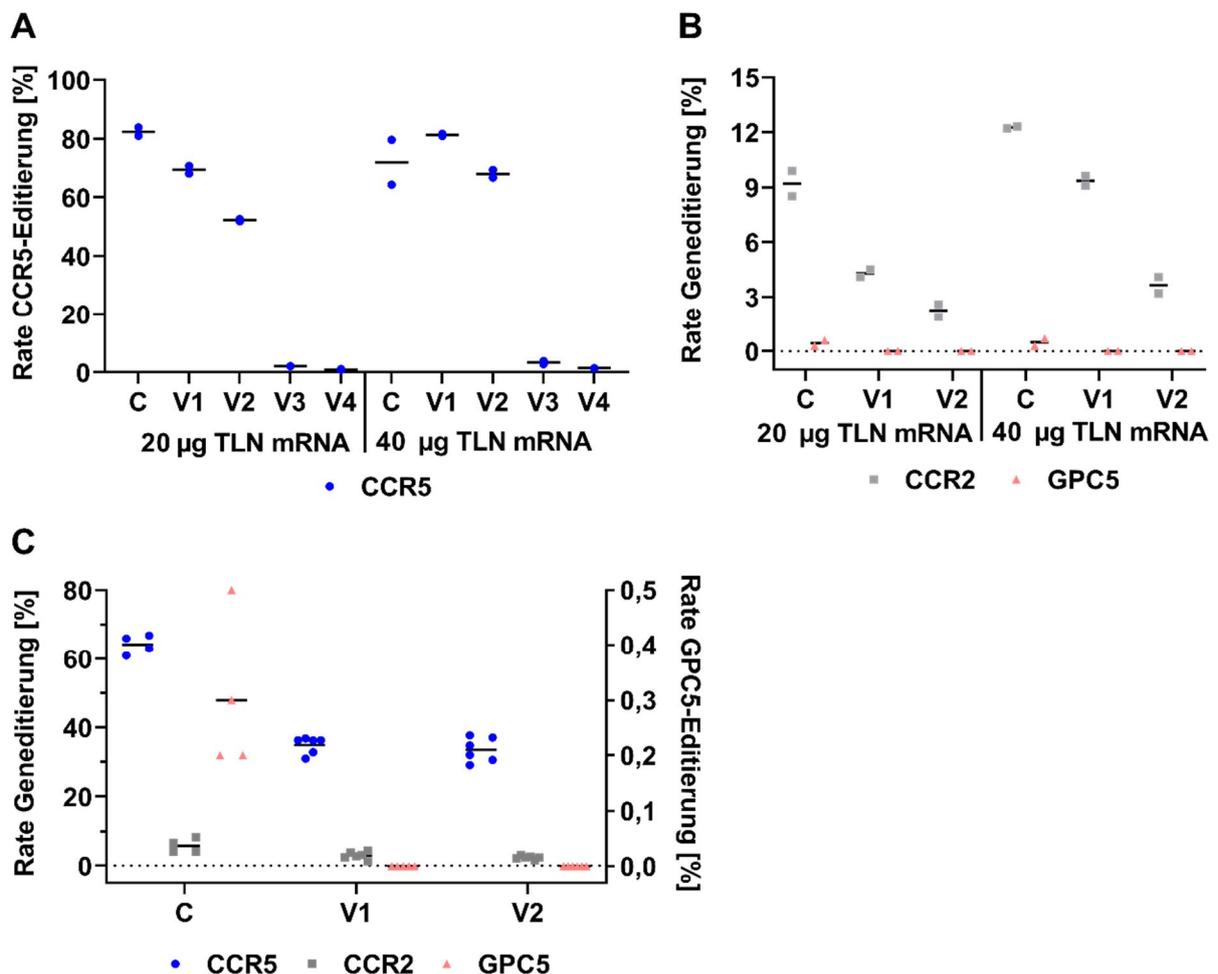
durch die benachbarte Bindung zweier gleicher (rechter) CCR5-Uco-TALEN Arme hervorgerufen werden. Um solche Homodimerisierungen zu verhindern und so die Anzahl potenzieller Off-Targets zu verringern, zielten die weiteren Arbeiten darauf ab, die bisher genutzte homodimere *Fok1*-Schneidedomäne gegen eine obligat heterodimere Variante auszutauschen. Dafür wurden zwei von Doyon et al<sup>227</sup> beschriebene obligat heterodimere Varianten der *Fok1*-Schneidedomäne (ELD/KKR und RVR/DAD) ausgewählt und anstelle der ursprünglichen *Fok1* in die CCR5-Uco-TALEN-Sequenz eingefügt. Da nur wenige Restriktionsschnittstellen hinter dem offenen Leserahmen der CCR5-Uco-TALEN in den Plasmiden pCCR5-Uco-TALEN L und pCCR5-Uco-TALEN R für eine Klonierung zur Verfügung standen, wurde ebenfalls der 3'-Bereich der *Fok1*-Schneidedomäne ausgetauscht und neue Restriktionsschnittstellen für zukünftige Klonierungen eingefügt. Zugleich wurde die Sequenz der *Fok1*-Schneidedomäne codonoptimiert. Um den Effekt der Codonoptimierung zu evaluieren, wurde ebenfalls eine codonoptimierte homodimere *Fok1*-Variante (WT) erstellt. Die 5 *Fok1*-Varianten wurden über den GeneArt Service synthetisiert und in die CCR5-Uco-TALEN kloniert. Die Paare, der obligat heterodimeren *Fok1*-Varianten wurden jeweils in beide Arme der CCR5-Uco-TALEN kloniert (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Schematische Darstellung der codonoptimierten *Fok1*-Varianten.** Klonierung der 5 *Fok1*-Schneidedomänen in die linke und rechte TALEN sortiert nach homodimeren und heterodimeren *Fok1*-Schneidedomänen. C = Homodimere *Fok1* Wildtyp TALEN. V1 = heterodimere *Fok1* ELD links und KKR rechts. V2 = heterodimere *Fok1* KKR links und ELD rechts. V3 = heterodimere *Fok1* RVR links und DAD rechts. V4 = heterodimere *Fok1* DAD links und RVR rechts.

Nach der erfolgreichen Klonierung der 5 codonoptimierten CCR5-Uco-TALEN-Varianten, wurde deren Funktion in T-Zellen getestet. Dafür wurden aus den klonierten Plasmiden mittels *in vitro* Transkription mRNA hergestellt. In einem ersten Experiment wurden für jede der 5 Varianten jeweils  $1,5 \times 10^6$  Jurkat-Zellen in Duplikaten mit je 10  $\mu\text{g}$  oder 20  $\mu\text{g}$  mRNA pro Arm elektroporiert. Nach der Ernte der Zellen und gDNA Extraktion, erfolgte die Analyse der

Geneditierung per GEF-dPCR zuerst am *CCR5*-Lokus. Die Rate der *CCR5*-Editierung lag bei der homodimeren, codonoptimierten *CCR5*-Uco-TALEN bei  $82,4 \pm 1,4$  % für 10  $\mu\text{g}$  mRNA pro Arm und bei  $71,9 \pm 7,6$  % für 20  $\mu\text{g}$  mRNA pro Arm (Abbildung 20A). Beide Varianten der *CCR5*-Uco-TALEN mit obligat heterodimeren *Fok1*-Schneidedomänen mit den Mutationen ELD und KKR (V1 = ELD links/KKR rechts und V2 = KKR links/ELD rechts), erzielten *CCR5*-Editierungsraten von mehr als 50 % bei beiden mRNA-Mengen. Die Varianten 3 (RVR links/DAD rechts) und 4 (DAD links/RVR rechts) hingegen wiesen nur geringe *CCR5*-Editierungsraten mit höchstens 3,4 % auf. Entsprechend erfolgte die weitere Analyse der Geneditierung an Off-Targets *CCR2* und *GPC5* nur mit den Varianten 1 und 2.



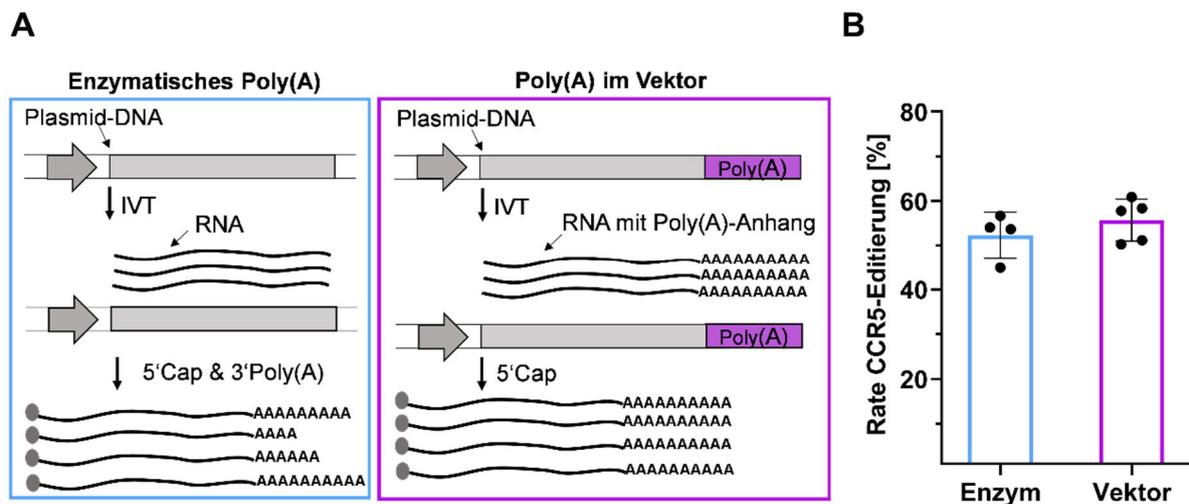
**Abbildung 20: On- und Off-Target Aktivität der *CCR5*-Uco-TALEN-Varianten.** Vergleich verschiedener TALEN-Varianten, die codonoptimierte, homo- und obligatorisch heterodimere *Fok1*-Nukleasen enthalten. (A) Rate der *CCR5*-Editierung in Jurkat-Zellen für die 5 unterschiedlichen *CCR5*-Uco-TALEN-Varianten ermittelt per GEF-dPCR.  $1,5 \times 10^6$  Jurkat-Zellen wurden mit 20  $\mu\text{g}$  (10  $\mu\text{g}$  pro Arm) oder 40  $\mu\text{g}$  (20  $\mu\text{g}$  pro Arm) selbsthergestellter *CCR5*-Uco-TALEN mRNA elektroporiert.  $n = 2$ . (B) Rate der *CCR2*-Editierung in Jurkat-Zellen für die 5 unterschiedlichen *CCR5*-Uco-TALEN-Varianten ermittelt durch GEF-dPCR.  $1,5 \times 10^6$  Jurkat-Zellen wurden mit 20  $\mu\text{g}$  (10  $\mu\text{g}$  pro Arm) oder 40  $\mu\text{g}$  (20  $\mu\text{g}$  pro Arm) selbsthergestellter *CCR5*-Uco-TALEN mRNA elektroporiert.  $n = 2$ . (C) Rate der Geneditierung an Loci *CCR5*, *CCR2* und *GPC5* in primären T-Zellen für 3 unterschiedlichen *CCR5*-Uco-TALEN-Varianten (C, V1 und V2).  $1 \times 10^6$  primäre T-Zellen wurden mit je 5  $\mu\text{g}$  selbsthergestellter *CCR5*-Uco-TALEN mRNA pro Arm elektroporiert. C:  $n = 4$ . V1:  $n = 5$  und V2:  $n = 6$ . Die Rate der *GPC5*-Editierung ist auf der linken Y-Achse abgebildet. Abkürzungen: C = homodimere TALEN-Variante. V1 = ELD linke TALEN, KKR rechte TALEN. V2 = KKR linke TALEN, ELD rechte TALEN. V3 = RVR linke TALEN, DAD rechte TALEN. V4 = DAD linke TALEN, RVR rechte TALEN. Der waagerechte Strich zeigt die jeweiligen Mittelwerte.

Wie erwartet, zeigten die Varianten 1 und 2 keine wesentliche Veränderung der Geneditierungsrate am *CCR2*-Lokus, da hier die Off-Target-Aktivität durch das Dimer aus linkem und rechtem Arm der CCR5-Uco-TALEN verursacht wird. Hingegen zeigten beide Varianten keine verbleibende Aktivität am *GPC*-Lokus, die durch Bindung zweier rechter TALEN-Arme induziert wird (Abbildung 20B). Anschließend wurden die beiden Varianten 1 und 2 zusammen mit der homodimeren, codonoptimierten CCR5-Uco-TALEN in humanen primären T-Zellen getestet. Hierfür wurden  $1 \times 10^6$  aktivierte primäre T-Zellen mit je 5  $\mu\text{g}$  mRNA der entsprechenden CCR5-Uco-TALEN Varianten pro Arm elektroporiert. Wie bereits in den Jurkat-Zellen wiesen die beiden obligat, heterodimeren *Fok1*-Varianten eine bis zu zweifach geringerer Aktivität am *CCR5*-Gen im Vergleich zur homodimeren TALEN auf. Wichtiger jedoch, beide obligat heterodimeren CCR5-Uco-TALEN zeigten erneut keine Aktivität am *GPC5*-Lokus (Abbildung 20C). Variante 1 der heterodimeren CCR5-Uco-TALEN wurde für alle zukünftigen Experimente weiterverwendet und wird nachfolgend als CCR5-Uco-hetTALEN bezeichnet.

#### **4.2.2 Plasmid-integrierte Poly(A)-Sequenz erlaubte eine effiziente mRNA-Produktion**

Ein weiterer zentraler Aspekt für den Erfolg eines Gentherapieansatzes ist die effiziente Einschleusung der fremden genetischen Information in die Zielzellen (engl. „*delivery*“). Hierbei sollte die Methode möglichst zielgerichtet, schonend und, für Designer-Nukleasen, transient sein. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Elektroporation eine effiziente Methode zur genetischen Modifikation insbesondere von T-Lymphozyten darstellt. Die Herstellung der mRNA durch *in vitro* Transkription (IVT) ist einfach, schnell und auch auf große Mengen hochskalierbar. Zugleich sollte die mRNA-Produktion vor allem bei der Anwendung im klinischen Bereich, wo sehr große Mengen benötigt werden, möglichst kosteneffektiv und reproduzierbar sein. Ein zentraler Schritt, während der mRNA Produktion ist die Polyadenylierung, die auch enzymatisch erfolgen kann. Allerdings kann die Länge des Poly(A)-Anhangs durch ein Enzym nicht gesteuert werden und unterscheidet sich daher möglicherweise auch von Charge zu Charge (Abbildung 21A). Außerdem erhöht die Verwendung des Enzyms die Herstellungskosten der mRNA erheblich. Um die Produktion der CCR5-Uco-hetTALEN mRNA zu verbessern, wurde in beide Produktionsplasmide eine Poly(A)-Sequenz von 120 Nukleotiden Länge hinter den offenen Leserahmen der CCR5-Uco-hetTALEN kloniert. Darüber hinaus wurde, wegen behördlicher Vorgaben in der Produktion von mRNA für klinische Anwendungen, das im Plasmid enthaltene Gen für eine Ampicillinresistenz gegen eine Kanamycinresistenz (KanR) ausgetauscht. Aus dem neu klonierten Plasmid mit integrierten Poly(A), sowie dem Plasmid ohne Poly(A) wurde durch IVT mRNA hergestellt. Um die Funktion der CCR5-Uco-hetTALEN<sub>poly(A)</sub> mRNA zu testen,

wurden  $1 \times 10^6$  aktivierte humane primäre T-Zellen mit je  $5 \mu\text{g}$  mRNA pro Arm elektroporiert. Als Kontrolle diente die entsprechende mRNA aus dem ursprünglichen Produktionsplasmid ohne integrierte Poly(A)-Sequenz mit enzymatischer Polyadenylierung. Die Zellen wurden 5 Tage nach der Elektroporation geerntet und die gDNA isoliert. Anschließend wurde die CCR5-Geneditierungsrate mittels GEF-dPCR bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Art der mRNA-Herstellung keinen Einfluss auf die Effizienz der CCR5-Geneditierung hatte. Die Indelfrequenzen lagen bei  $55,7 \pm 4,7 \%$  für das im Vektor integrierte Poly(A) und bei  $52,4 \pm 5,1 \%$  für die enzymatische Polyadenylierung (Abbildung 21B). Alle nachfolgenden Experimente wurden daher mit CCR5-Uco-hetTALEN mRNA von den neu klonierten Vektoren mit integrierter Poly(A)-Sequenz durchgeführt.

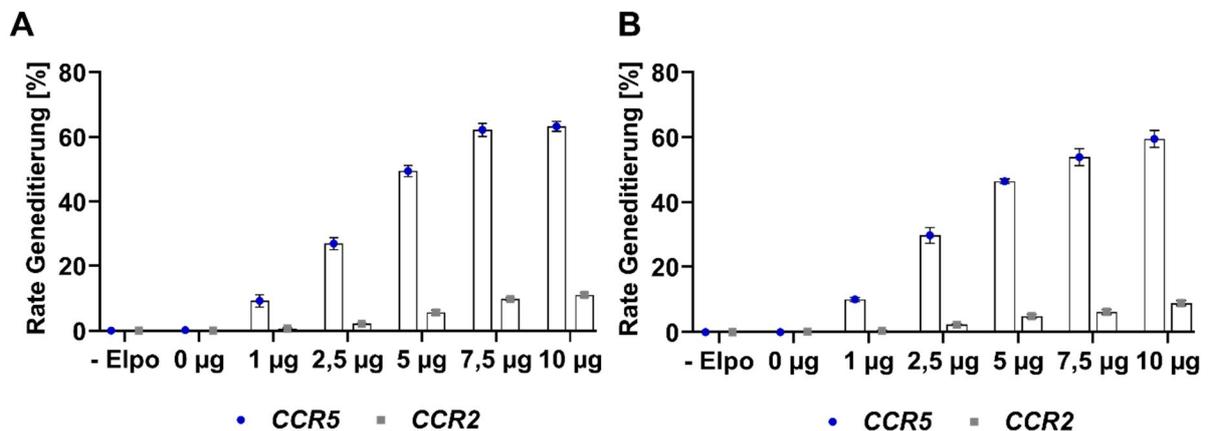


**Abbildung 21: Die Einführung einer Poly(A)-Sequenz in das IVT-Plasmid der CCR5-Uco-hetTALEN erlaubt die Produktion funktionaler mRNA ohne eine enzymatische Polyadenylierung.** (A) Schematische Darstellung der IVT mit (links) enzymatischer Polyadenylierung und (rechts) in das Produktionsplasmid integrierter Poly(A)-Sequenz. (B) Per GEF-dPCR ermittelte Rate der CCR5-Editierung in gDNA-Proben mit CCR5-Uco-hetTALEN behandelter Zellen. Die verwendete mRNA wurde mit enzymatischer Polyadenylierung (blau, Enzym) oder mit Hilfe eines Produktionsplasmids mit integrierter Poly(A)-Sequenz (lila, Vektor) hergestellt. Die Elektroporation von  $1 \times 10^6$  primären T-Zellen aus PBMC erfolgte mit  $5 \mu\text{g}$  der jeweiligen CCR5-Uco-hetTALEN mRNA. Vektor:  $n = 5$ . Enzym:  $n = 4$ . Fehlerbalken zeigen SD-Werte an.

#### 4.2.3 Die CCR5-Uco-hetTALEN vermittelte hohe CCR5- und niedrige CCR2-Indelraten

Bei der Herstellung von Zellprodukten für die Behandlung von Patienten muss die gesamte Produktion, wie bei allen Medikamenten, gemäß den Richtlinien der Guten Herstellungspraxis (*good manufacturing praxis*, GMP) laufen. Dies schließt auch die im Herstellungsprozess verwendete mRNA mit ein, die ebenfalls nach GMP-Maßgaben produziert werden muss. Da für die Charakterisierung der neu entwickelten CCR5-Uco-hetTALEN und die Hochskalierung des Protokolls zur Herstellung CCR5-edierter  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen größere Mengen der CCR5-Uco-hetTALENpoly(A) mRNA benötigt wurden, wurde die Firma BioNTech beauftragt, die mRNA nach einem GMP-kompatiblen Protokoll herzustellen. Die Experimente in 4.1.1 zeigten einen starken Dosiseffekt, auf Grund dessen eine Titration der neu produzierten CCR5-Uco-

hetTALEN mRNA auf primären T-Zellen notwendig war. Dafür wurden  $2 \times 10^6$  humane primäre T-Zellen, sowohl aktivierte T-Zellen aus PBMC ohne Separation als auch aktivierte T-Zellen nach CD4-Anreicherung, mit steigenden mRNA-Mengen elektroporiert. 4 Tage nach Elektroporation wurden die Zellen geerntet, die gDNA isoliert und die Geneditierung am *CCR5* und *CCR2*-Lokus untersucht. Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Abbildung 22A) und die T-Zellen aus den PBMCs (Abbildung 22B) zeigten ähnliche *CCR5*- und *CCR2*-Indelraten. Mit steigender mRNA-Menge stieg die *CCR5*-Indelrate auf bis zu  $63,3 \pm 1,5$  % für die T-Zellen ohne Separation und  $59,5 \pm 2,6$  % für die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Die *CCR2*-Indelraten lagen mit 10 µg mRNA pro Arm bei  $11,0 \pm 0,7$  % für die T-Zellen ohne Separation und  $8,9 \pm 0,8$  % für die angereicherten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Die optimale mRNA-Menge, der unter GMP-ähnlichen Bedingungen produzierten, *CCR5*-Uco-hetTALENpoly(A) mRNA, beträgt je nach benötigter Indelrate zwischen 2,5 µg und 7,5 µg. In diesem Bereich liegt die *CCR5*-Indelrate zwischen ~30 % bis ~55 %, während die *CCR2*-Editierung deutlich unter 10 % liegt.



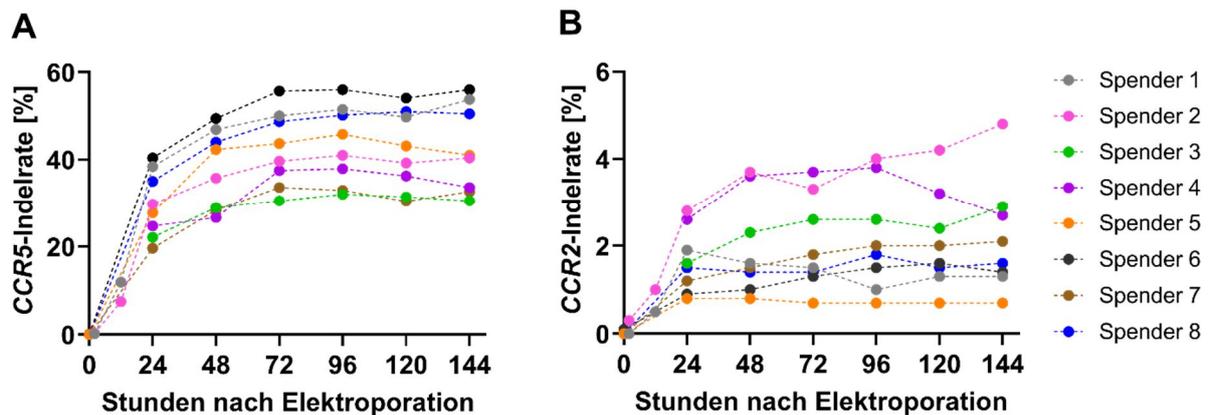
**Abbildung 22:** Die optimale Konzentration der GMP-ähnlich produzierten *CCR5*-Uco-hetTALENpoly(A) mRNA lag zwischen 2,5 µg bis 7,5 µg.  $2 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen der *CCR5*-Uco-hetTALENpoly(A) mRNA pro Arm elektroporiert. Die Rate der *CCR5*- (Kreis, blau) und *CCR2*-Editierung (Quadrat, grau) wurde in gDNA-Proben mittels GEF-dPCR bestimmt. Bei den -Elpo-Proben wurde keine Elektroporation durchgeführt. n = 3 (A) Titration der *CCR5*-Uco-hetTALENpoly(A) mRNA in aktivierten T-Zellen aus PBMCs. (B) Titration der *CCR5*-Uco-hetTALENpoly(A) mRNA in aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

### 4.3 Charakterisierung der *CCR5*-Uco-hetTALEN-Aktivität

Im folgenden Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der optimierten *CCR5*-Uco-hetTALEN charakterisiert. Als erstes wurden die Kinetik der Geneditierung im *CCR5*- und *CCR2*-Lokus im Detail erforscht sowie weitere chromosomale Veränderungen an diesen Gen-Loci untersucht. Potenzielle Off-Targets der *CCR5*-Uco-hetTALEN wurden nach erneuter *in silico* Berechnung mittels ampNGS analysiert. Darüber hinaus wurde die Anzahl an *CCR5*-Uco-hetTALEN-Kopien über einen Zeitraum von bis zu 216 h nach Elektroporation in behandelten Zellen bestimmt.

#### 4.3.1 CCR5-Uco-hetTALEN-Aktivität zeigte eine Spenderabhängigkeit

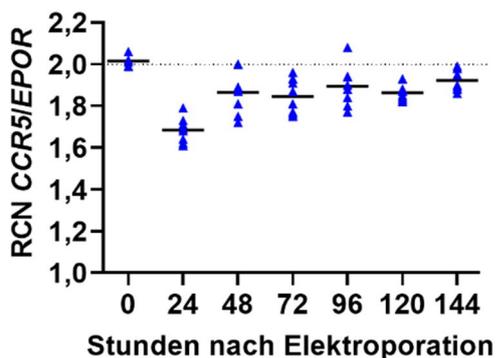
Eine genaue Beschreibung der Geneditierung am *CCR5*- und am *CCR2*-Lokus ist aus mehreren Gründen wichtig. Zum einen ist in den Freigabekriterien für die klinische Anwendung gefordert, dass die Geneditierung vor der Applikation des Zellproduktes in den Patienten abgeschlossen sein muss. Zum anderen ist die Überprüfung einer erfolgreichen Modifikation der T-Zellen und Untersuchung möglicher Off-Target-Effekte zu einem frühen Zeitpunkt im Prozess notwendig, um eine fehlerhafte Produktion schnell zu identifizieren. Darüber hinaus könnten Untersuchungen zur Kinetik der Geneditierung wichtige Einblicke in die zugrunde liegende Biologie und den Einfluss spenderspezifischer Merkmale liefern. Um diese Fragen zu beantworten, wurde die TALEN-induzierte Geneditierung über einen Zeitraum von bis zu 144 h in 8 verschiedenen Spendern untersucht. Dazu wurden  $2 \times 10^6$  aktivierte humane  $CD4^+$ -T-Zellen mit je  $3 \mu\text{g}$  CCR5-Uco-hetTALENpoly(A) mRNA pro Arm elektroporiert. Der Anteil der Geneditierung wurde mittels GEF-dPCR bestimmt. 144 h nach der Elektroporation zeigten die Zellen eine durchschnittliche Indelrate von  $42 \pm 10 \%$  am *CCR5*-Lokus und  $2,2 \pm 1,3 \%$  am *CCR2*-Lokus (Abbildung 23A + 23B). Tatsächlich erfolgte die Editierung im *CCR5*-Gen vor allem innerhalb der ersten 48 h, wobei einzelne Proben noch bis zu 72 h nach Elektroporation größere Veränderungen der Editierungsrate zeigten. Im Gegensatz dazu war die *CCR2*-Editierung offensichtlich in allen analysierten Proben innerhalb von 48 h nach Elektroporation abgeschlossen, in der Hälfte der Proben sogar bereits nach 24 h. Dies legt nahe, dass für die Off-Target- größere Mengen an TALEN benötigt werden als für die On-Targetaktivität.



**Abbildung 23: CCR5-Uco-hetTALEN-Aktivität an On-Target *CCR5* und Off-Target *CCR2* war nur innerhalb der ersten 72 h detektierbar.**  $2 \times 10^6$  primäre menschliche  $CD4^+$ -T-Zellen von 8 verschiedenen Spendern wurden mit je  $3 \mu\text{g}$  CCR5-Uco-hetTALENpoly(A) mRNA (BioNTech) pro Arm elektroporiert. Vor und alle 24 h nach Elektroporation wurden Zellen entnommen, die gDNA-isoliert und mittels GEF-dPCR untersucht. (A) Geneditierung am *CCR5*-Lokus. (B) Geneditierung am *CCR2*-Lokus. Gleiche Farben in A und B weisen auf Proben desselben Spender hin.

Um den Verlauf der Geneditierung noch genauer zu untersuchen, wurde neben der GEF-dPCR eine weitere dPCR-Methode eingesetzt. Mit dieser Methode wurden die Kopienzahlen von *CCR5* und einem Referenzgen, in diesem Fall dem menschlichem Erythropoietinrezeptor (*EPOR*), bestimmt und zur Berechnung der relativen Kopienzahl (*relative copy number*, RCN)

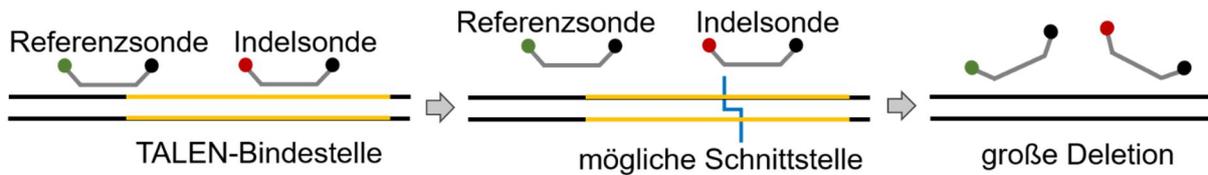
verwendet. Der Ablauf dieser dPCR und die Berechnung der RCN ist in Abschnitt 3.13.6 beschrieben. Alle 8 getesteten Spender zeigten vor der Elektroporation eine durchschnittliche RCN von  $2,01 \pm 0,03$  (Abbildung 24). 24 h nach der CCR5-Uco-hetTALEN-Behandlung war die RCN auf durchschnittlich  $1,68 \pm 0,06$  gefallen; der tiefste Wert im gesamten Analysezeitraum. Demnach war der Unterschied zwischen den CCR5- und den EPOR-Kopien an diesem Zeitpunkt am größten. Pro diploidem EPOR Genom ließen sich nur durchschnittlich 1,6 - 1,7 CCR5-Genkopien detektieren. Die Kopienzahlen der beiden Gene konvergierten bei 48 h nach der Elektroporation, blieben aber für CCR5 im Vergleich zu EPOR während des gesamten Analysezeitraums geringer. 144 h nach Elektroporation lag die RCN durchschnittlich bei  $1,92 \pm 0,05$ . Der Unterschied in den RCN könnte auf zwei unterschiedliche Gründe zurückzuführen sein. Früh nach der Transfektion spiegelt eine niedrige RCN höchstwahrscheinlich die laufende Nukleaseaktivität wider, die zu DSBs führt und dadurch eine Amplifikation verhindert. Zu späteren Zeitpunkten könnten eine niedrigere RCN ein Hinweis auf den Verlust des CCR5-Sondensignals sein. Die zweite Möglichkeit wird im folgenden Abschnitt näher untersucht.



**Abbildung 24:** Die relative Kopienzahl (*relative copy number*, RCN) von CCR5 versus EPOR war zu allen Analysezeitpunkten nach TALEN-Behandlung reduziert. Die dPCR wurde an den zuvor per GEF-dPCR analysierten Proben für 7 der 8 Spender durchgeführt. Die Dreiecke geben die Werte der einzelnen Proben an. Angegeben sind Mittelwerte (schwarze Linien) und der Wert bei identischer Kopienzahl von Referenzgen EPOR und CCR5 (gepunktete Linie). n = 7.

#### 4.3.2 Die Off-Target-Aktivität der CCR5-Uco-hetTALEN führte zu Aberrationen

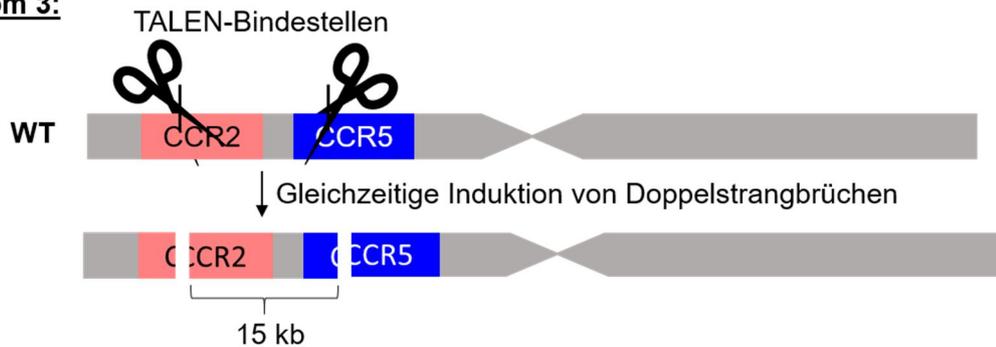
Wie die Ermittlung der RCN zeigte, lag die Anzahl an CCR5-Kopien auch 144 h nach der Elektroporation noch unter der Kopienzahl 2 des Referenzgens EPOR. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte eine fehlende Bindung der CCR5-Referenzsonde sein, die sich oberhalb der TALEN-Bindestelle befindet. Ein Grund dafür könnte das Vorhandensein größerer Indels sein, die sich über den Bindebereich der Referenzsonde hinaus erstrecken (Abbildung 25). Aufgrund dessen wurden mögliche Mechanismen für die Entstehung großer Indels untersucht und einige davon mit einer angepassten dPCR überprüft.



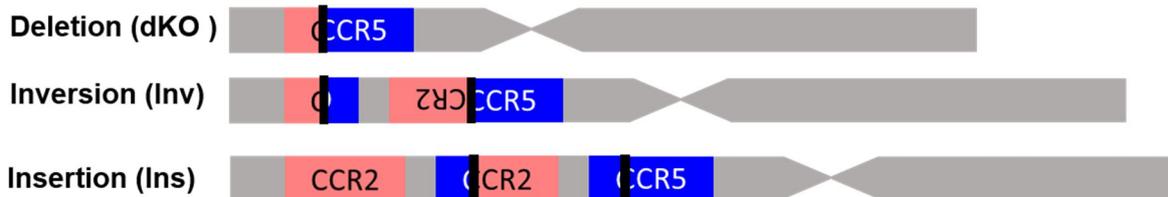
**Abbildung 25: Größere Deletionen in der TALEN-Bindestelle können zum Signalverlust der Referenzsonde führen.** Schematische Darstellung der Bindung der GEF-dPCR-Sonden (Referenzsonde und Indelsonde) im Amplikon und der TALEN-Bindestelle. Die Referenzsonde ist aufgrund der geringen Länge des Amplikons nur 40 bp von der potenziellen TALEN-Schnittstelle entfernt. Bei Deletionen, die ihren Bindebereich einschließen (linke Abbildung), geht auch das Signal der Referenzsonde verloren und das Allel wird nicht detektiert.

Die beiden On- und Off-Targets, *CCR5* und *CCR2*, sind benachbarte Gene auf Chromosom 3 mit einem Abstand von circa 10 kb zwischen den proteinkodierenden Bereichen. Eine gleichzeitige Induktion von Doppelstrangbrüchen (DSB) an beiden Loci kann daher zu chromosomalen Veränderungen führen (Abbildung 26). Eine mögliche chromosomale Veränderung ist dabei die Deletion des 15 kb großen Fragmentes zwischen den beiden

### Chromosom 3:



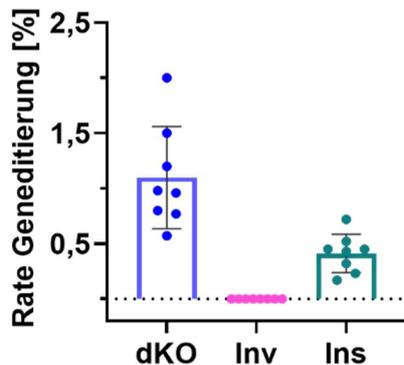
### Mögliche chromosomale Aberrationen:



**Abbildung 26: Mögliche chromosomale Aberrationen induziert durch die gleichzeitige Bildung von Doppelstrangbrüchen (DSB) in den benachbarten Genen *CCR5* und *CCR2*.** Die beiden Gene *CCR5* und *CCR2* liegen in benachbarten Regionen auf einem Arm von Chromosom 3. Durch die gleichzeitige Induktion von DSB durch die *CCR5*-Uco-hetTALEN kann ein Fragment mit einer Länge von 15 kb ausgeschnitten werden. Dieses könnte verloren gehen und somit eine Deletion (dKO) von 15 kb erzeugen. Darüber hinaus könnte das Fragment in reverser Orientierung wieder in das Chromosom eingefügt werden (Inv) oder in das ebenfalls zu diesem Zeitpunkt geschnittene zweite Allel integriert werden (Ins). Die schwarzen Balken weisen auf mögliche zusätzliche Mutationen in diesen Bereichen hin.

*CCR5*-Uco-hetTALEN-Bindestellen am *CCR5*- und *CCR2*-Gen (dKO). Darüber hinaus könnte das ausgeschnittene 15-kb-Fragment auch in reverser Orientierung durch die zellulären Reparaturmechanismen wieder in das Chromosom eingesetzt werden (Inversion, Inv) oder nach dem Ausschneiden in den ebenfalls geschnittenen *CCR5*-Lokus des zweiten Allels eingefügt werden (Insertion, Ins). Um dies zu überprüfen, wurden die Proben aus

Abschnitt 4.3.1 144 h nach Elektroporation mittels drei verschiedener dPCRs untersucht. Am häufigsten traten Deletionen des 15 kb großen Fragmentes mit einer durchschnittlichen Häufigkeit von  $1,1 \pm 0,5$  % auf. Während keine Inversionsereignisse mit der angewendeten Methode gefunden wurden, konnte die Integration in die Schnittstelle am *CCR5*-Lokus mit einer mittleren Häufigkeit von  $0,4 \pm 0,2$  % detektiert werden (Abbildung 27).

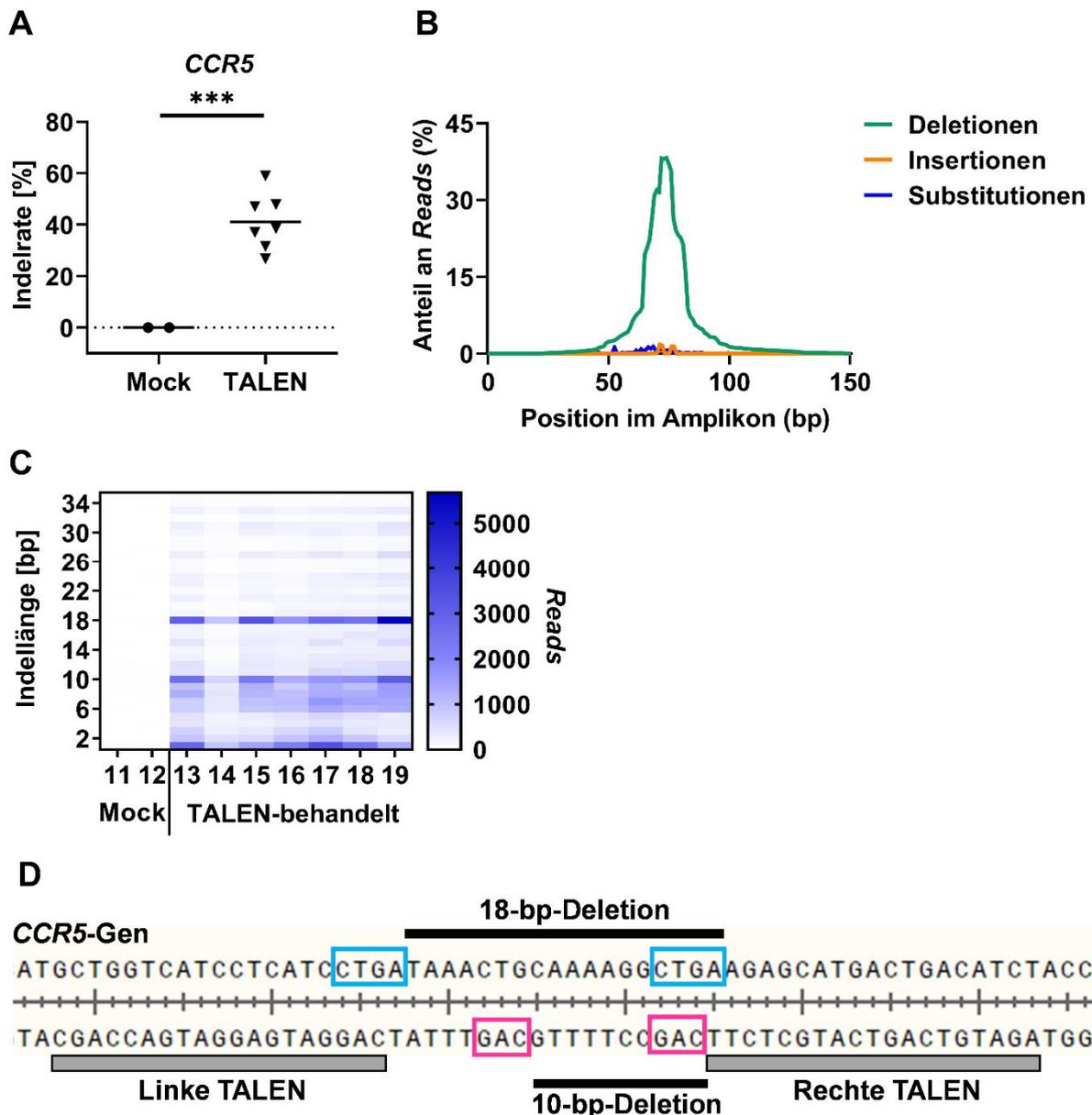


**Abbildung 27: Aktivität der *CCR5*-Uco-hetTALEN führte zu chromosomalen Aberrationen zwischen *CCR2* und *CCR5*.** Mögliche chromosomale Aberrationen, wie Deletion eines 15-kb-Fragmentes zwischen *CCR5* und *CCR2* (dKO), Inversion (Inv) oder Integration (Ins) dieses Fragmentes wurde mittels 3 unterschiedliche dPCRs untersucht. Dargestellt sind die Raten der Geneditierung als Einzelwerte (Punkte), Mittelwerte (Säulen) und die Standardabweichungen (SD) in Prozent, 144 h nach Elektroporation. n = 8.

#### 4.3.3 Die TALEN-Aktivität führte vorwiegend zu Deletionen in primären T-Zellen

Doppelstrangbrüche, wie sie durch Schneiden der *CCR5*-Uco-hetTALEN entstehen, werden von der Zelle durch verschiedene Mechanismen repariert, zum Beispiel durch die Nicht-homologe End-zu-Endverknüpfung (*non-homologous end-joining*, NHEJ) oder mikrohologiebasierte End-zu-Endverknüpfung (*microhomology-mediated end joining*, MMEJ). Bei beiden Mechanismen kann es dabei zu größeren und kleineren Deletionen, sowie Insertionen kommen. Im vorherigen Abschnitt konnten bereits große Indels mit einer Länge von 15 kb detektiert werden. Um die durch *CCR5*-Uco-hetTALEN-Aktivität entstandenen Indels mit einer Länge von bis zu 70 bp genauer zu charakterisieren, wurde der *CCR5*-Lokus mittels ampNGS in 7 mit beiden TALEN Armen behandelten Proben und 2 unbehandelten Proben (Mock) untersucht. Wie aufgrund der GEF-dPCR Daten zu erwarten, wurden für den *CCR5*-Lokus hohe Indelraten (26,7 % - 58,9 %) in den *CCR5*-Uco-hetTALEN-behandelten Proben gefunden (Abbildung 28A). Die meisten Indels hatten eine Länge von 1 - 35 bp (88,8 % - 95,9 %). Die Mehrheit dieser Indels stellten Deletionen dar, die am häufigsten zwischen den *CCR5*-Uco-hetTALEN-Bindestellen auftraten (Abbildung 28B). Eine weitere Analyse der Indels zeigte, dass die meisten eine Länge von 18 bp aufwiesen, gefolgt von Indels mit 10 bp und 1 bp Länge (Abbildung 28C). Dabei handelte es sich bei den Indels mit einer Länge von 18 bp und 10 bp am häufigsten um Deletionen, die an der gleichen Stelle im *CCR5*-Lokus gefunden wurden. An diesen Stellen im *CCR5*-Gen kommen Mikrohologien

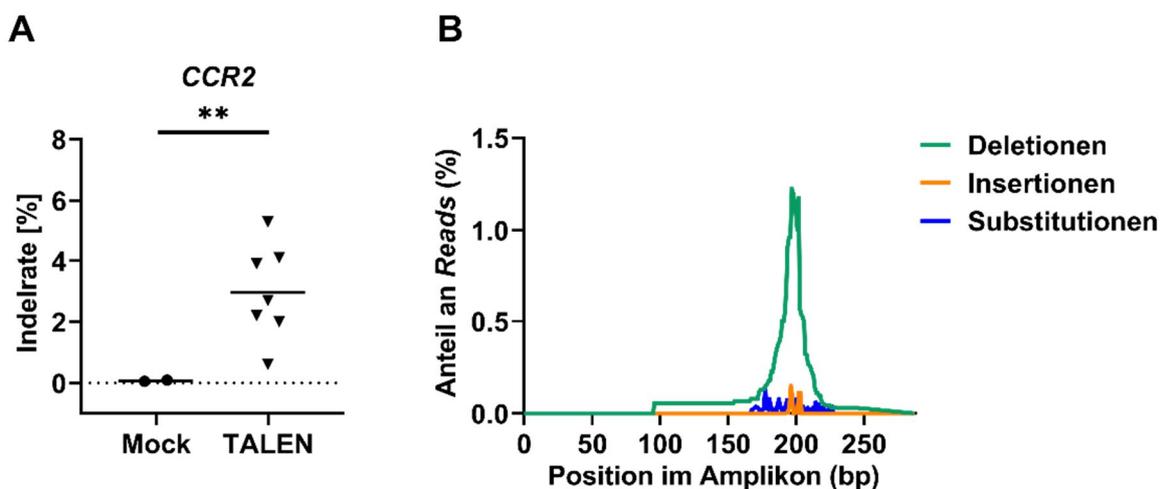
vor, die vermutlich zur Entstehung dieser beiden Deletionen (18 bp und 10 bp in diesem Bereich) führen. Dies wiederum weist auf MMEJ als einen häufigen Reparaturmechanismus in primären T-Zellen nach TALEN-Behandlung hin (Abbildung 28D).



**Abbildung 28: Die hohe Aktivität der CCR5-Uco-hetTALEN am CCR5-Lokus führt hauptsächlich zu Deletionen.** (A) CCR5-Indelraten für 2 unbehandelte Proben (Mock, Kreise) und 7 CCR5-Uco-hetTALEN-behandelte Proben (TALEN, Dreiecke). Die schwarze Linie zeigt den Mittelwert der Proben an. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Welch's *t*-Test \*\*\*  $p < 0,0002$ . (B) Anteil der Reads mit Deletionen (grün), Insertionen (orange) und Substitutionen (blau) in Prozent für jede Position in der Referenzsequenz des Amplikons am Beispiel der CCR5-Uco-hetTALEN-behandelten Probe 18, die gleiche Probe wie beim Off-Target CCR2. Die Berechnung der Anteile erfolgte mit dem webbasierten Programm CRISPResso2. (C) Anzahl der CCR5-Indel-Reads aufgetragen gegen die Indellänge für 2 unbehandelte (Mock) und 7 CCR5-Uco-hetTALEN-behandelte Proben. (D) Schematische Darstellung der Positionen, der häufigsten 18 bp und 10 bp Deletionen im CCR5-Gen in CCR5-Uco-hetTALEN behandelten Proben. Die 18-bp- (hellblau) und 10-bp-Deletionen (pink) befinden sich zwischen den beiden TALEN-Bindestellen in Bereichen mit einer Mikrohomologie (eingerahmt).

#### 4.3.4 Nur *CCR2* stellt ein Off-Target der *CCR5-Uco-hetTALEN* dar

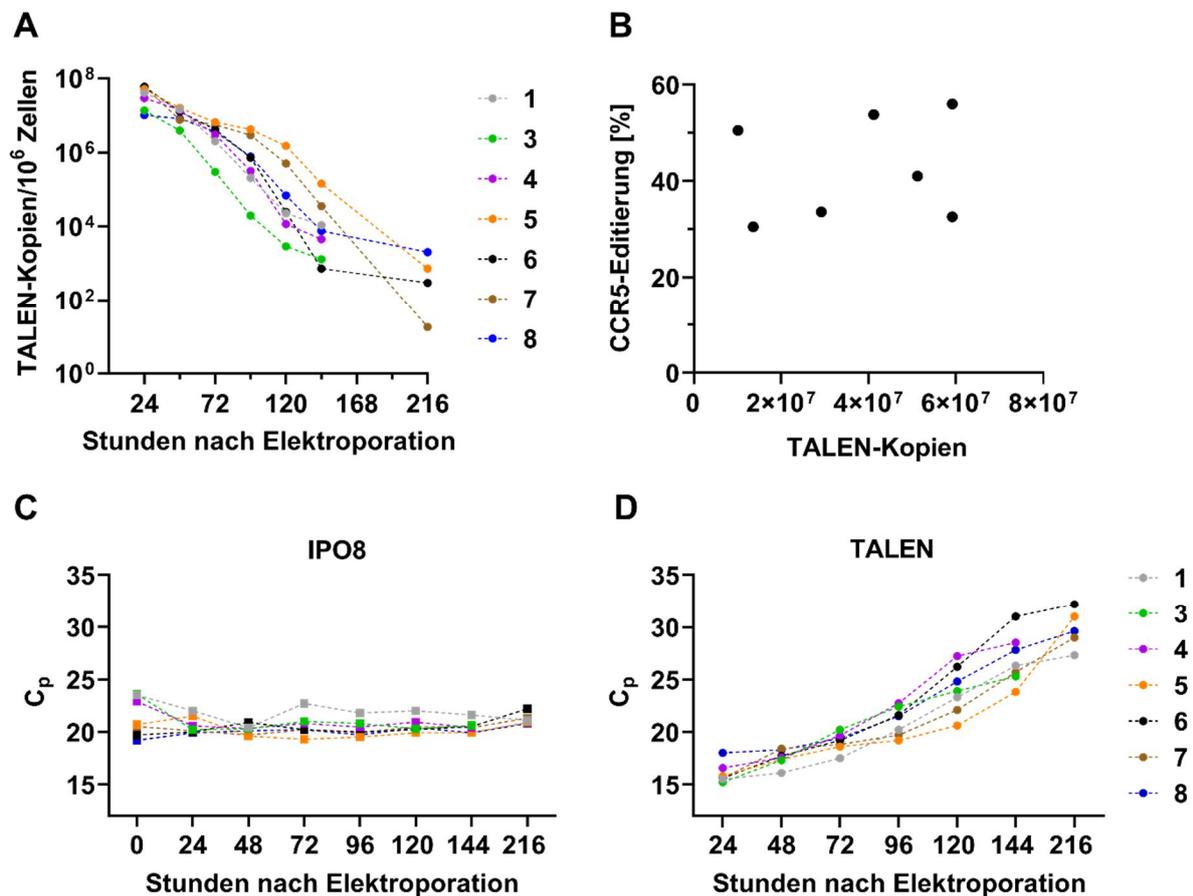
Die oben beschriebenen Analysen potenzieller Off-Targets waren auf Grundlage der homodimeren *CCR5-Uco-TALEN* erfolgte. Zur Charakterisierung der obligat heterodimeren *CCR5-Uco-hetTALEN* musste daher eine neue *in silico* Berechnung potenzieller *Off-Targets* mit den webbasierten Programmen PROGNOS und Paired Target Finder durchgeführt werden. Der Fokus bei der Auswahl der zu analysierenden Zielsequenz lag erneut auf Off-Targets innerhalb von Genen oder Promotoren, da für Mutationen in diesen Bereichen ein negativer Einfluss auf Zellen wahrscheinlicher ist. Die potenziellen Off-Targets *CCR2*, *CXCR6*, *GLP1R*, *CACNA1B*, *ASIC*, *SAMD12*, *ADYC2*, *PGC*, *MAT2B* und *UBXN10* wurden mittels ampNGS für die angegebenen Proben untersucht (Tabelle S7). Im Vergleich zu den TALEN-behandelten Proben wurden zwei Kontrollen (Mock) mitgeführt. Für alle analysierten Targets, außer *PGC* und *UBXN10*, konnten für die meisten Proben 10.000 bis > 100.000 *Reads* generiert werden (Abbildung S13). In Übereinstimmung mit den GEF-dPCR-Daten wurden in den ampNGS-Daten Indels im *CCR2*-Lokus in den *CCR5-Uco-hetTALEN*-behandelten Proben gefunden (Abbildung 29A). Bei den meisten Indels handelte es sich um Deletionen und nur ein geringer Anteil an *Reads* zeigten Insertionen. Substitutionen kamen noch seltener vor, wie in Abbildung 29B exemplarisch für die *CCR5-Uco-hetTALEN*-behandelte Probe Nr. 18 mit der höchsten *CCR2*-Indelrate (5,3 %), zu sehen. Wie das On-Target *CCR5* zeigte auch *CCR2* vor allem Deletionen mit einer Länge von 1 bp, gefolgt von Deletionen mit 10 bp und 9 bp. Die überwiegende Mehrheit an detektierten Deletionen für *CCR2* war kleiner als 15 bp (Abbildung 30A). Beim größten Anteil an *Reads* im *CCR2*-Lokus handelte sich um Deletionen mit einer Länge von 10 bp zwischen Bereichen mit einer Mikrohomologie (Abbildung 30B).



**Abbildung 29: ampNGS-Daten bestätigen Aktivität der *CCR5-Uco-hetTALEN* am *CCR2*-Lokus.** (A) *CCR2*-Indelraten für 2 unbehandelte Proben (Mock, Kreise) und 7 *CCR5-Uco-hetTALEN*-behandelte Proben (TALEN, Dreiecke). Die schwarze Linie zeigt den Mittelwert der Proben an. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Welch's t-Test \*\*  $p < 0,02$ . (B) Prozentualer Anteil der *Reads* mit Deletionen (grün), Insertionen (orange) und Substitutionen (blau) für jede Position im Amplikon am Beispiel einer *CCR5-Uco-hetTALEN*-behandelten Probe (Nr. 18). Die Berechnung der Anteile erfolgte mit dem webbasierten Programm CRISPResso2.



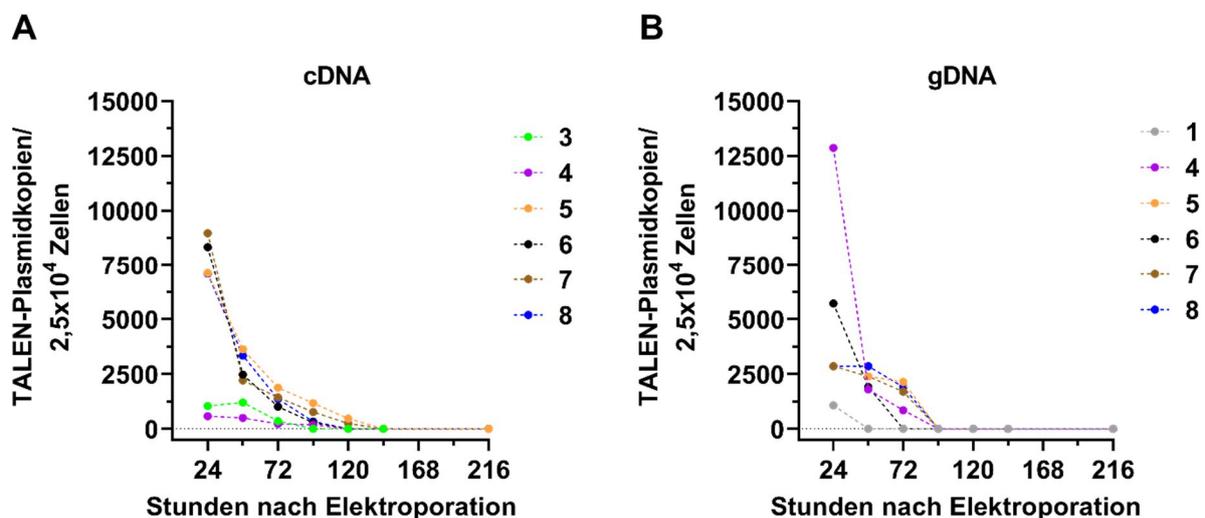
der Elektroporation eine hohe Varianz von  $1 \times 10^7$  -  $6 \times 10^7$  TALEN-Kopien pro 1 Mio. Zellen in den verschiedenen Spendern. Nach den ersten 24 h sank die Anzahl an TALEN-Kopien in den untersuchten Proben drastisch und lag 144 h nach der Elektroporation zwischen 714 - 35.212 TALEN-Kopien pro 1 Mio. Zellen. Die höchste berechnete Anzahl an TALEN-Kopien nach 216 h betrug bei einem Spender noch 2.000 pro 1 Mio. Zellen (oder 1 Kopie alle 500 Zellen). Die Anzahl an CCR5-Uco-hetTALEN Kopien 24 h nach der Elektroporation korrelierte nicht mit den unterschiedlichen CCR5-Editierungsraten (aus GEF-dPCR-Daten) für die verschiedenen Spender am letzten Analysezeitpunkt (Abbildung 31B). Um auszuschließen, dass die hohe Varianz auf Grund von unterschiedlicher Menge an Ausgangsmaterial entstanden ist, wurde ebenfalls die  $C_p$ -Werte für eine endogene mRNA, Importin 8 (IPO8), ermittelt. Über den gesamten Zeitraum der Beobachtung lagen die IPO8  $C_p$ -Werte für alle Spender in einem ähnlichen Bereich und würden nicht die Unterschiede in den  $C_p$ -Werten der TALEN erklären (Abbildung 31C + 31D).



**Abbildung 31: CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien sanken deutlich innerhalb von 216 h nach Elektroporation.** Die Detektion der CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien in cDNA-Proben erfolgte mittels RT-qPCR. Dazu wurden  $2 \times 10^6$  primäre  $CD4^+$ -T-Zellen von 7 verschiedenen Spendern mit je  $3 \mu\text{g}$  CCR5-Uco-hetTALENpoly(A) mRNA pro Arm behandelt und aus  $0,5 \times 10^6$  Zellen die RNA isoliert. (A) Anzahl von CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Elektroporation. Die Berechnung der Kopienzahlen basiert auf  $C_p$ -Werten aus einer Standardkurve mit definierten TALEN-Plasmidkopien. (B) Anteil der CCR5-Editierung in den jeweiligen letzten analysierten Proben von Spender 1 und 3-8 aufgetragen gegen die Anzahl der CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien 24 h nach Elektroporation. Die Berechnung der Korrelation in Prism GraphPad war nicht signifikant. (C)  $C_p$ -Werte für die Amplifikate der endogenen Referenz Importin 8 (IPO8) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Elektroporation. (D)  $C_p$ -Werte für die Amplifikate der TALEN-Kopien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Elektroporation.

#### 4.3.6 144 h nach Elektroporation war kein CCR5-Uco-hetTALEN Plasmid nachweisbar

Wie zuvor beschrieben, wird die für die Elektroporation benötigte mRNA mittels IVT von einem Plasmid aus produziert. Im Anschluss an das Umschreiben von DNA in die RNA wird das Plasmid durch die Behandlung mit einer DNA-Nuklease (DNase I) oder anderen Verfahren entfernt. Dennoch können geringe Mengen an Plasmid in den mRNA-Präparationen verbleiben und durch die Elektroporation in die Zellen gelangen. Um das Vorhandensein von Plasmidresten in den geernteten Proben zu untersuchen, wurde eine weitere RT-qPCR etabliert, die spezifisch das Plasmid in CCR5-Uco-hetTALEN mRNA behandelten gDNA- und cDNA-Proben detektiert. Die Detektion von Plasmid in cDNA-Proben aus Zellen war möglich, da kein Verdau mit DNase I nach der RNA-Isolation durchgeführt wurde. Für die Detektion des CCR5-Uco-hetTALEN Plasmids wurden die Proben aus Abschnitt 4.3.5 von 7 (cDNA) und 6 (gDNA) Spendern getestet. Die cDNA-Proben enthielten 24 h nach der Elektroporation zwischen 574 und 8969 Plasmidkopien pro 25.000 Zellen (Abbildung 32A), in den folgenden 24 h sank die Kopienzahl deutlich ab. 144 h nach der Elektroporation war das Plasmid in keiner der getesteten cDNA-Proben mehr nachweisbar. Die gDNA-Proben enthielten 24 h nach der Elektroporation zwischen 1.069 und 12.870 Plasmidkopien pro 25.000 Zellen (Abbildung 32B). Auch in diesen Proben konnte 144 h nach der Elektroporation kein CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmid mehr nachgewiesen werden.



**Abbildung 32: CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmidkopien waren 144 h nach Elektroporation nicht mehr nachweisbar.** Die Detektion der CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien in cDNA- und gDNA-Proben erfolgte mittels RT-qPCR. Dazu wurden  $2 \times 10^6$  primäre CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von 7 (cDNA) und 6 (gDNA) verschiedenen Spendern mit je  $3 \mu\text{g}$  CCR5-Uco-hetTALENpoly(A) mRNA pro Arm behandelt und aus je  $0,5 \times 10^6$  Zellen die RNA beziehungsweise gDNA isoliert. Die Berechnung der Kopienzahlen basiert auf  $C_p$ -Werten aus einer Standardkurve mit definierten TALEN-Plasmidkopien. (A) Anzahl von CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmidkopien in cDNA-Proben. (B) Anzahl von CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmidkopien in gDNA-Proben.

Neben dem Nachweis von CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmid in den Zellen wurde eine weitere RT-qPCR durchgeführt, um eine mögliche Integration des Plasmides in das Zellgenom zu untersuchen. Aufgrund der CCR5-Uco-hetTALEN-Aktivität besteht die Möglichkeit, dass das

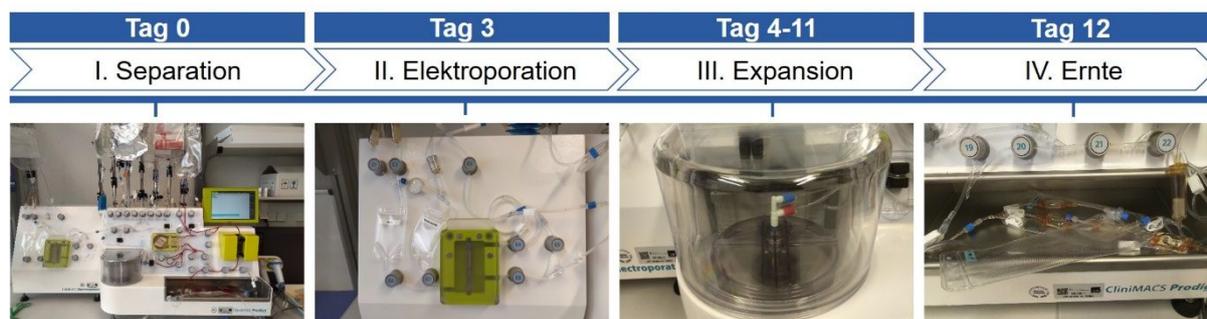
linearisierte Plasmid aus der *in vitro* Transkription in die geschnittenen Loci, vor allem *CCR5* integriert wird. Daher wurden Primer für eine RT-qPCR entwickelt, die ein im *CCR5*-Lokus integriertes Plasmid detektieren würden. Die Untersuchung von gDNA Proben zum Zeitpunkt vor der Elektroporation, 24 h und 216 h nach Elektroporation in 4 der bereits zuvor getesteten Spender, zeigte keinen Hinweis auf eine mögliche Integration des *CCR5*-Uco-hetTALEN-Plasmids in den *CCR5*-Lokus (Abbildung S15).

#### **4.4 GMP-kompatible Produktion von TALEN modifizierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen**

Die Translation der *CCR5*-Uco-hetTALEN-modifizierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in die klinische Prüfung erforderte die Etablierung eines neuen, GMP-kompatiblen *large-scale*-Prozesses. Eine realistische (niedrige) Dosis für eine erste klinische Prüfung könnte bei ca.  $1 \times 10^7$  Zellen pro Kilogramm Körpergewicht des Patienten liegen. Bei einem erwachsenen Menschen mit 100 kg Körpergewicht würden damit insgesamt mindestens  $1 \times 10^9$  Zellen benötigt werden. Neben den bereits hohen Ansprüchen für die GMP-Produktion, unterliegt die Herstellung *CCR5*-CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus HIV-positiven Patienten einer weiteren Herausforderung, da die Produktion in einem GMP-Labor der Biosicherheitsstufe 2\*\* durchgeführt werden muss. Eine weitestgehend automatisierte Produktion würde dabei den personellen Aufwand und mögliche Risiken reduzieren. Aus diesen Gründen erfolgte die Etablierung eines GMP-kompatiblen Produktionsprozesses am CliniMACS Prodigy. Dabei handelt es sich um ein automatisiertes, geschlossenes System zur Herstellung verschiedener Zelltherapieprodukte aus Knochenmark, Vollblut, *Buffy Coat* oder Leukaphereseprodukten, wobei auch genetische Modifikationen (mittels Transduktion oder Transfektion) möglich sind. Im Folgenden sind die Ergebnisse von 4 Herstellungsprozessen am CliniMACS Prodigy beschrieben, inklusive der Charakterisierung der *CCR5*-Uco-hetTALEN-behandelten Zellen.

##### **4.4.1 Etablierung eines GMP-kompatiblen Prozesses am CliniMACS Prodigy**

Um ein GMP-kompatibles, automatisiertes Protokoll zur Herstellung von *CCR5*-CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mittels TALEN-mRNA-Elektroporation zu erstellen und zu bewerten, wurden 4 unabhängige Läufe (1 - 4) des *T Cell Engineering* (TCE)-Prozesses am CliniMACS Prodigy durchgeführt. Die verwendeten Parameter und Einstellungen in der Aktivitätenmatrix folgten nach Empfehlungen des Herstellers. Jeder Lauf beinhaltete die folgenden Schritte nach der Installation des Schlauchsatzes: (I) Separation von CD4<sup>+</sup>-Zellen aus einem *Buffy Coat* und Aktivierung von T-Zellen, (II) Elektroporation mit *CCR5*-Uco-hetTALEN L+R mRNA, (III) Expansion der T-Zellen und (IV) Ernte des Zellprodukts (Abbildung 33). Während der Läufe wurden Zellproben an den Tagen 0, 3 bis 7 und 12 im Prozess entnommen und analysiert.

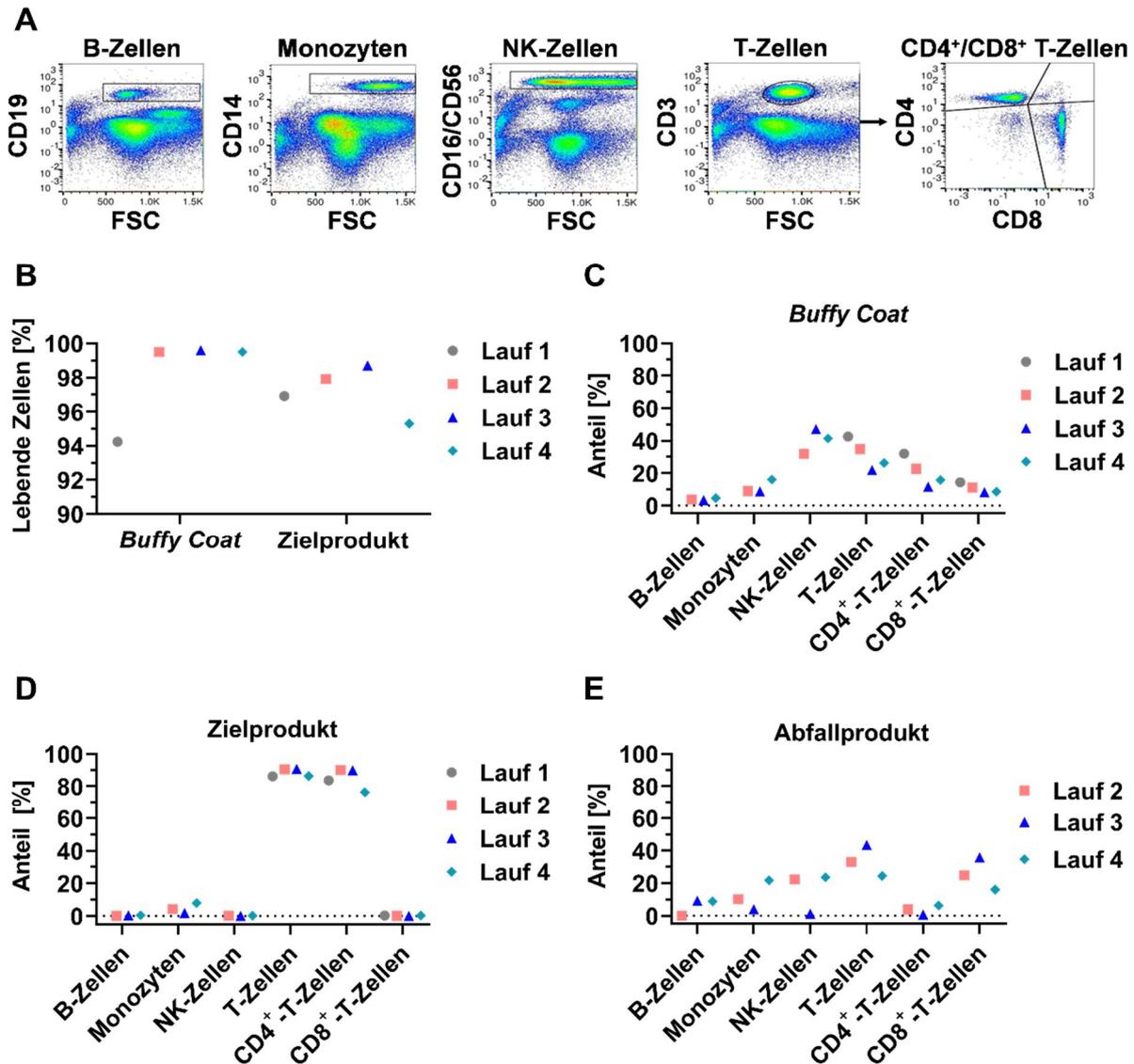


**Abbildung 33: Übersicht des automatisierten T Cell Engineering (TCE)-Prozesses am CliniMACS Prodigy.** Die Herstellung CCR5-edierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erfolgte innerhalb eines 12-tägigen Prozesses. Nach der Installation des Schlauchsystems (TS 520 + EP-2) unterteilte sich der Prozess in folgende Schritte: (I.) Magnetische Separation CD4<sup>+</sup> Zellen aus einem frischen *Buffy Coat* und Aktivierung der T-Zellen mit MACS GMP T Cell TransAct an Tag 0. (II.) Automatisierte Elektroporation der Zellen mit TALEN-mRNA und anschließende Inkubation der Zellen bei 32 °C für 24 h an Tag 3. (III.) Expansion der elektroporierten Zellen mit täglichem Mediumwechsel (supplementiertes TexMACS GMP Medium) in den Tagen 4 - 11. (IV.) Ernte der Zellen an Tag 12.

#### 4.4.2 Effiziente Anreicherung der CD4<sup>+</sup>-Zellen am CliniMACS Prodigy

Um die Qualität des *Buffy Coats*, die Zellzahl und den Anteil CD4<sup>+</sup>-Zellen bestimmen zu können, wurde eine Probe des *Buffy Coats* an Tag 0 des Prozesses vor Beginn der Separation entnommen und daran das Immunzellrepertoire mittels Durchflusszytometrie am MACSQuant analysiert. Die Zellen von Lauf 2 - 4 wurden dafür mit einem Antikörpermix zum Nachweis von B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, sowie CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gefärbt. Die Zellen aus dem *Buffy Coat* von Lauf 1 wurden nur mit den Antikörpern gegen CD3, CD4, CD45 und CD8 gefärbt, da zu diesem Zeitpunkt die anderen Antikörper (CD16, CD56, CD19, CD14) nicht zur Verfügung standen. Darüber hinaus wurde der Anteil lebender Zellen mit einer 7AAD-Färbung in allen 4 Läufen bestimmt und nur lebende Lymphozyten (CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) in die in Abbildung 34A dargestellte Analyse einbezogen. Die Rate lebender Zellen im *Buffy Coat* betrug in den 4 Läufen durchschnittlich 98,2 ± 2,3 % (Abbildung 34B). Der Anteil an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bezogen auf CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> lag im jeweiligen *Buffy Coat* in den 4 Läufen bei 15,7 % - 32,0 %, während der Anteil an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen 8,1 % - 14,4 % betrug. Insgesamt machten die T-Zellen in den 4 Läufen 21,8 % - 42,5 % der Lymphozyten aus. In den Läufen 2 - 4 lag der durchschnittliche Anteil an B-Zellen bei 3,8 ± 0,7 %, Monozyten bei 11,2 ± 4,2 % und NK-Zellen bei 40,1 ± 7,6 % der Lymphozyten (Abbildung 34C). Nach der Separation erfolgte eine weitere Analyse des Immunzellrepertoires, sowohl für das Ziel- als auch das „Abfallprodukt“. Die Rate an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Zielprodukt betrug in den 4 Läufen zwischen 76,4 % - 90,1 %. Neben den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen konnten ebenfalls durchschnittlich 4,6 ± 3,1 % Monozyten (Läufe 2 - 4) im Zielprodukt identifiziert werden. Monozyten können ebenfalls den CD4-Rezeptor exprimieren und damit durch die magnetische Separation angereichert werden. B- und NK-Zellen waren im Zielprodukt nicht mehr nachweisbar und waren somit effektiv depletiert worden (Abbildung 34D). Die Rate lebender Zellen nach der Separation im Zielprodukt betrug durchschnittlich 97,2 ± 1,3 % (Abbildung 34B). Die Analysen der Zellen im Abfallprodukt zeigten für Lauf 2 und 4 noch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die nicht über die

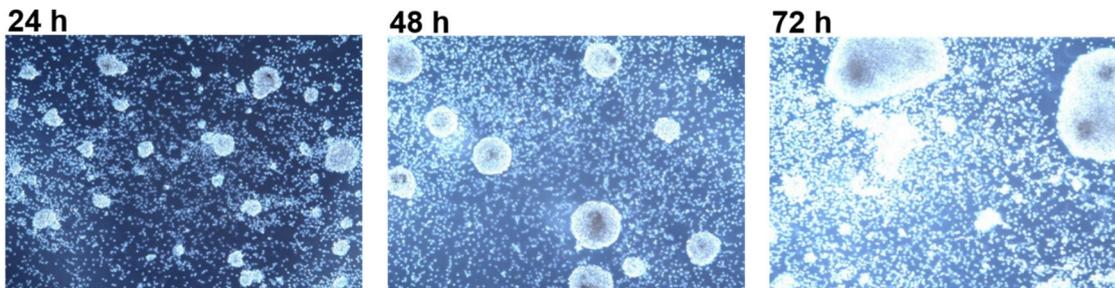
magnetische Separation getrennt wurden. Der Anteil dieser Zellen lag im Lauf 2 bei 3,8 % und im Lauf 4 bei 6,2 % der lebenden Lymphozyten im Abfallprodukt (Abbildung 34E). Die magnetische Separation CD4<sup>+</sup>-Zellen am CliniMACS Prodigy führte zu einer hohen (> 76 %), wenn auch nicht restlosen, Anreicherung CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.



**Abbildung 34: Der automatisierte TCE-Prozess ermöglichte eine effiziente Trennung lebender CD4<sup>+</sup>-Zellen in Lauf 1 - 4.** Daten aus der durchflusszytometrischen Analyse am MACSQuant für das Immunzellrepertoire. Für den 1. Lauf lagen nur die Werte der T-Zellen vor. (A) Beispielhafte Darstellung der *Dotplots* anhand von Lauf 1 mit gefärbten Zellen aus dem *Buffy Coat*. *Dotplots* mit den verwendeten Gates für die Identifizierung von B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen anhand der Expression der angegebenen Marker. Alle *Dotplots* zeigen CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>-Zellen. (B) Anteil lebender Lymphozyten (CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>-Zellen) im *Buffy Coat* und dem Zielprodukt nach Separation. (C) Zusammensetzung der Zellen im *Buffy Coat* für alle 4 Läufe. (D) Zusammensetzung der Zellen nach der Separation für das Zielprodukt für alle 4 Läufe. (E) Zusammensetzung der Zellen nach der Separation für das Abfallprodukt für die Läufe 2 - 4.

Der Start der Kultur erfolgte mit einer Gesamtzahl von  $2,0 \times 10^8$  Zellen mit Ausnahme des 4. Durchlaufs, bei dem nur  $1,4 \times 10^8$  Zellen nach der Separation zur Verfügung standen. Um das Wachstum und Erscheinungsbild der Zellen im CliniMACS Prodigy zu visualisieren, wurde die Kultur während des 2. Durchlaufes von Tag 0 bis Tag 4 nicht geschüttelt. Die Bildaufnahmen

der Kultur erfolgte mit der im CliniMACS Prodigy integrierten Kamera 24 h, 48 h und 72 h nach der Aktivierung, aber vor der Elektroporation. Nach der Zugabe des MACS GMP T Cell TransAct zeigten die T-Zellen die für eine Aktivierung typische Bildung von Zellhaufen, die im Laufe der Zeit an Größe zunahmen (Abbildung 35). Zusammenfassend, konnten am CliniMACS Prodigy CD4<sup>+</sup>-Zellen erfolgreich angereichert und aktiviert werden.

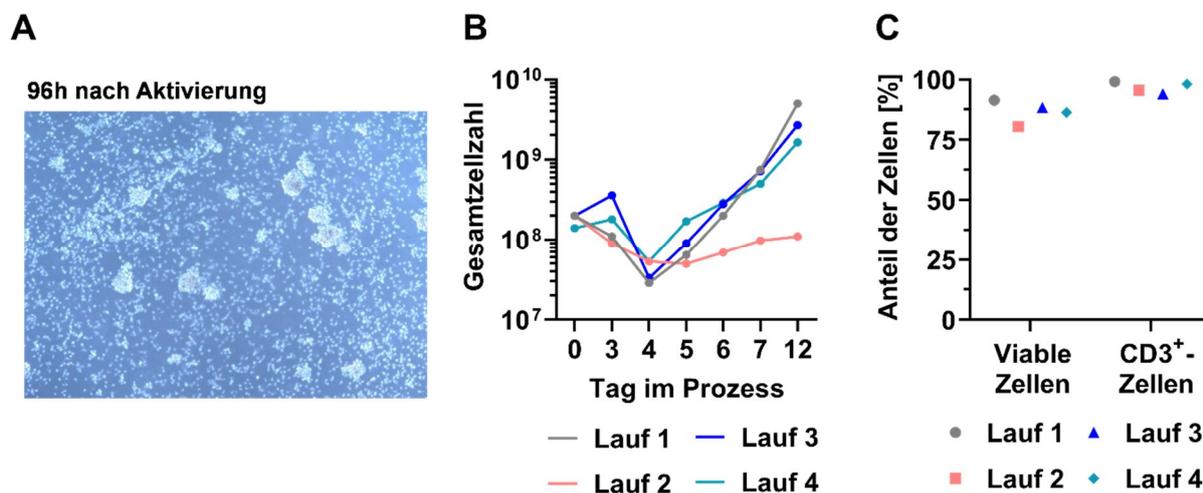


**Abbildung 35: Bilder der T-Zell-Kultur weisen auf eine Aktivierung der T-Zellen hin.** Bilder aus der Zellkultur von Lauf 2, aufgenommen mit der internen Kamera des CliniMACS Prodigy (400fache Vergrößerung) 24 h, 48 h und 72 h nach Aktivierung unter statischen Kulturbedingungen. Das Bild bei 72 h nach der Aktivierung wurde vor der Elektroporation aufgenommen.

#### 4.4.3 Die Zellexpansion am CliniMACS Prodigy generierte bis zu $5 \times 10^9$ lebende Zellen

An Tag 3 nach Aktivierung erfolgte die Elektroporation mit CCR5-Uco-hetTALENpoly(A) L+R mRNA am CliniMACS Prodigy mit anschließender hypothermischer Kultur bei 32 °C für 24 h (Abbildung 33). Für den 1. Lauf wurde die mRNA-Menge basierend auf der im Labormaßstab durchgeführten Titration der CCR5-Uco-hetTALEN L+R mRNA hochgerechnet (Abschnitt 4.2.3). Als Grundlage wurde eine mRNA-Menge von 6 µg /  $2 \times 10^6$  Zellen verwendet, da bei dieser mRNA-Menge schätzungsweise 50 % der Zellen im CCR5-Lokus editiert sein sollten. Das finale Zellprodukt wurde am 12. Tag des Prozesses geerntet. Während des Prozesses wurden an Tag 4 - 7 und 12 Proben des Zellproduktes entnommen und analysiert. Die Messung der Zellzahlen an Tag 4 im Prozess zeigte eine verringerte Anzahl an Zellen nach der Elektroporation. Außerdem zeigte die Bildaufnahme der Kultur mit der integrierten Kamera im Lauf 2 ebenfalls reduzierte Zellmengen und Zellhaufen (Abbildung 36A). Allerdings war zu diesem Zeitpunkt die genaue Zellzahl aufgrund der Bildung größerer Zellklumpen nach dem Waschschrift an Tag 4 im Prozess möglicherweise nicht sicher bestimmbar. Die nachfolgende Wachstumskinetik zeigte keine auffälligen negativen Auswirkungen der Elektroporation oder der hypothermischen Bedingungen auf die Zellen in den Läufen 1, 3 und 4. Die Gesamtzellzahl im Endprodukt reichte von  $1,65 \times 10^9$  bis  $5,00 \times 10^9$  Zellen in den Läufen 1, 3 und 4 (Abbildung 36B). Bei den Läufen 1, 3 und 4 betrug die durchschnittliche Viabilität der Zellen  $88,7 \pm 2,1$  % im finalen Produkt (Abbildung 36C). Im Gegensatz dazu wurden nur etwa  $1 \times 10^8$  Zellen mit einer Viabilität von ca. 80 % im Lauf 2 geerntet. Jedoch kam es im Lauf 2 während der T-Zell-Aktivierungsphase für 9 Stunden zu einer Unterbrechung der zentralen CO<sub>2</sub>-Versorgung im Forschungsgebäude. Die unterbrochene Gasversorgung

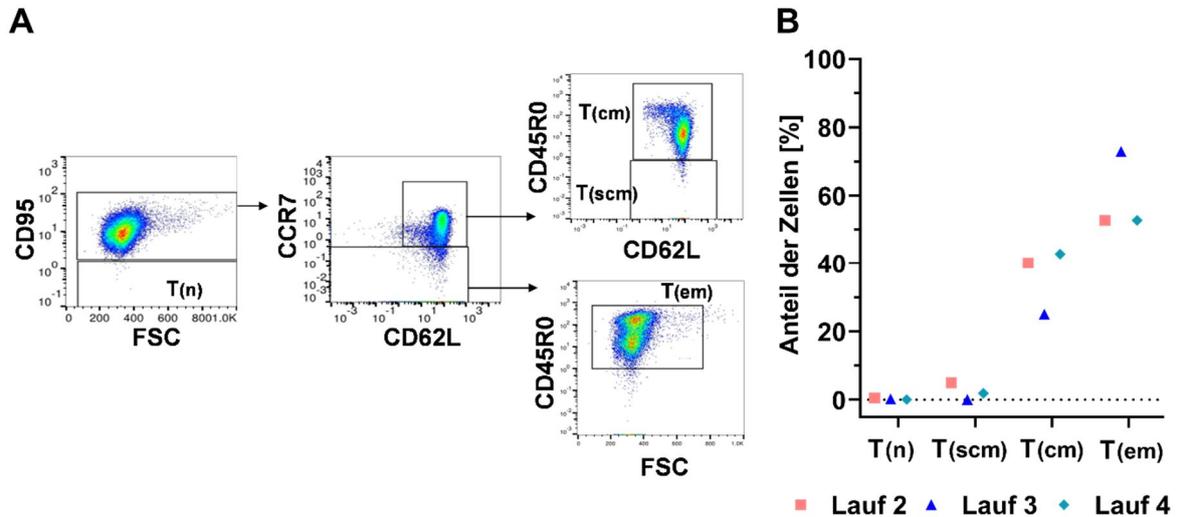
beeinträchtigte wahrscheinlich die Lebensfähigkeit und das Wachstumspotenzial aktivierter T-Zellen stark. Bei den durchflusszytometrischen Analysen wurde ebenfalls der Anteil CD3<sup>+</sup>-Zellen bestimmt. Dieser lag bei allen Läufen im finalen Produkt über 94 %. Sofern die CO<sub>2</sub>-Versorgung der Zellen funktionierte, wurde mehr als 1,65x10<sup>9</sup> lebende Zellen pro TCE-Lauf am CliniMACS Prodigy hergestellt.



**Abbildung 36: Der automatisierte TCE-Prozess ermöglichte eine effiziente Expansion der T-Zellen.** (A) Bild aus der Zellkultur von Lauf 2, aufgenommen mit der internen Kamera des CliniMACS Prodigy (400fache Vergrößerung) 96 h nach Aktivierung unter statischen Kulturbedingungen. (B) Berechnete Gesamtzahl der Zellen im TCE-Lauf 1 - 4 am Tag 0, 3, 4, 5, 6, 7 und 12. (C) Zusammengefasste Daten aus der Durchflusszytometrie des finalen Zellprodukts nach Ernte. Viabilität der Zellen and Anteil der CD3<sup>+</sup>-Zellen.

#### 4.4.4 Expandierte Zellen (~ 53 % - 73 %) waren meist Effektor-Gedächtnis-T-Zellen

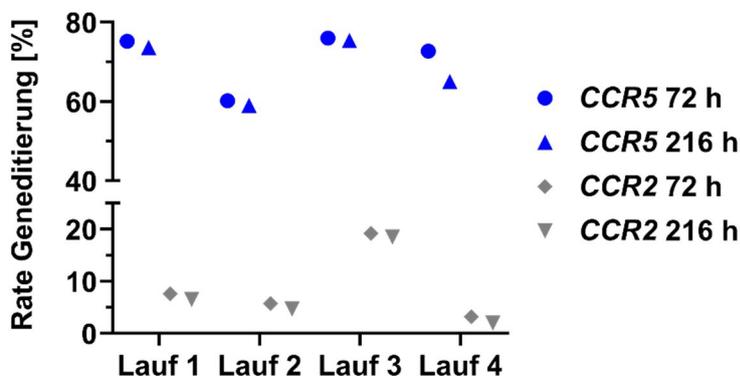
Idealerweise sollten CCR5-modifizierte T-Zellen lange im Patienten überleben. Allerdings sind die Überlebens- und Selbsterneuerungsraten zwischen den verschiedenen T-Zell-Subpopulationen sehr heterogen. Die Selbsterneuerung und das Überleben sind in Effektor-Gedächtnis-T-Zellen am geringsten, während sie bei stammzellähnlichen Gedächtnis-T-Zellen am höchsten und längsten sind. Die unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen im finalen Produkt wurden für die Läufe 2 - 4 am Durchflusszytometer nach Antikörperfärbung bestimmt. Hierbei wurden anhand der Anwesenheit bestimmter Marker naive T-Zellen, stammzellähnliche Gedächtnis-T-Zellen, zentrale Gedächtnis-T-Zellen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen unterschieden. Lebende CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden aufgrund ihrer Expression von CD95, CD62L, CCR7 und CD45RO klassifiziert (Abbildung 37A). Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T(em): CD95<sup>+</sup>, CCR7<sup>-</sup>, CD45RO<sup>+</sup>) waren dabei in allen analysierten Läufen mit 52,7 % - 72,9 % die häufigste T-Zellsubpopulation, während zentrale Gedächtnis-T-Zellen, T(cm), etwa 25 % - 42 % aller CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ausmachten. Die Expression von CD62L war in allen analysierten Läufen innerhalb der Effektor T-Zellen heterogen. Wie erwartet waren im Endprodukt in allen analysierten Läufen keine naiven T-Zellen (T(n): CD95-negativ) vorhanden. Der Anteil der stammzellähnlichen Gedächtnis-T-Zellen war unterschiedlich und reichte von 0 - 5 % (Abbildung 37B).



**Abbildung 37:** Die phänotypische Charakterisierung expandierter Zellen im TCE-Lauf (2 - 4) zeigte eine hohe Rate an Effektor Gedächtnis-T-Zellen. A) Charakterisierung von T-Zell-Subpopulationen auf Grundlage der Expressionsmarker CD95, CCR7, CD62L und CD45RO. Dotplots aus der Durchflusszytometrie mit dem verwendeten Gating am Beispiel von Lauf 4. Dotplots zeigen lebende CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen. Mit dem Gating werden naive T-Zellen, T(n):CD95<sup>-</sup>, stammzellähnliche Gedächtnis-T-Zellen, T(scm):CD95<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD45RO<sup>-</sup>, zentrale Gedächtnis-T-Zellen, T(cm):CD95<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup> und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, T(em):CD95<sup>+</sup>, CCR7<sup>-</sup>, CD45RO<sup>+</sup> unterschieden. Einige Zellpopulationen befinden sich außerhalb des dargestellten Bereich innerhalb der Gates (B) Vergleich der Frequenz von T(n), T(scm), T(cm) und T(em) für Lauf 2 - 4.

#### 4.4.5 Die CCR5-Editierung war in allen TCE-Läufen hoch (> 59 %)

Um die Geneditierungsraten während des Prozesses zu untersuchen, wurden die CCR5- und CCR2-Indelraten in allen 4 Läufen mittels GEF-dPCR an zwei relevanten Punkten des Prozesses ermittelt: (I.) Zum frühestmöglichen Zeitpunkt, 72 h nach der Elektroporation und (II.) am Tag der Ernte (216 h nach der Elektroporation) im finalen Produkt. Die Geneditierungsrate für CCR5 und CCR2 waren für beide Zeitpunkte sehr ähnlich (Abbildung 38). Die Rate an CCR5-editierten Zellen betrug in allen Läufen zwischen 59 % und 75 %. Selbst die 3-fache Reduktion der mRNA-Mengen im Lauf 4 (gegenüber Lauf 1) verringerte die CCR5-Editierungsrate nicht wesentlich. Allerdings war die Zellzahl im 4. Lauf

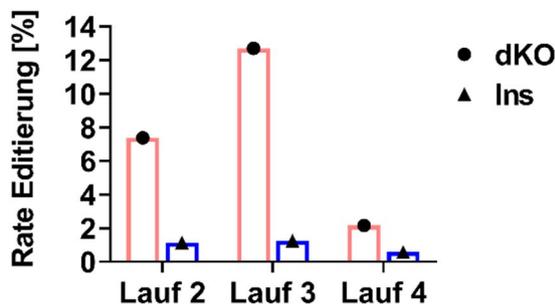


**Abbildung 38:** Geneditierungen im CCR5- und CCR2-Lokus in TALEN-behandelten Zellen aus den TCE-Läufen 1 - 4. (A) Geneditierungsraten an zwei Zeitpunkten nach der Elektroporation für CCR5 [Kreis (72 h), Dreieck (216 h), blau] und CCR2 [Raute (72 h) und umgedrehtes Dreieck (216 h), grau] für die Läufe 1 - 4, berechnet aus GEF-dPCR-Daten.

geringer als in Lauf 1. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die *CCR2*-Editierungsraten stark zwischen den einzelnen Läufen. Besonders hohe *CCR2*-Editierungsraten von 18,5 % wurden im Lauf 3 beobachtet. Die Reduktion der mRNA-Mengen im Lauf 4 auf 1/3 der Anfangsdosis führte zu einer im Wesentlichen konservierten *CCR5* On-Target-Aktivität mit einer stark reduzierten *CCR2* Off-Target-Editierung (2 % im Endprodukt).

#### 4.4.6 Geringe Frequenz lokaler chromosomaler Aberrationen

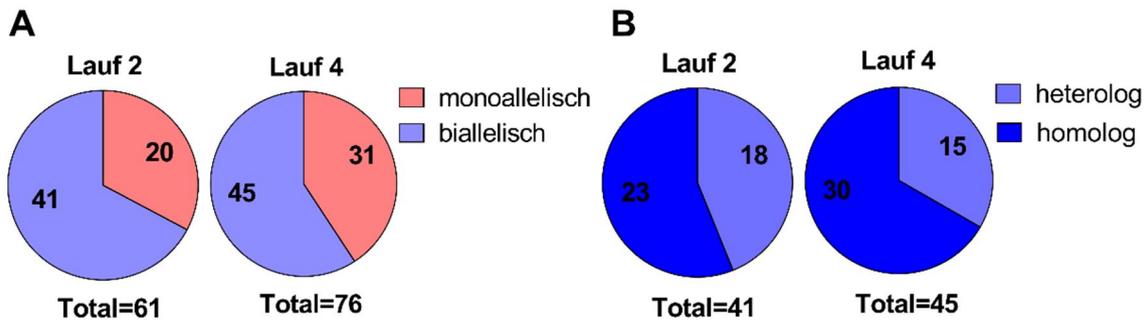
Das simultane Schneiden sowohl am *CCR5*-Lokus als auch im *CCR2* Off-Target kann, wie bereits in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, auf unterschiedliche Weise zu größeren Aberrationen im Chromosom führen. Um solche Aberrationen in den finalen Zellprodukten zu identifizieren, wurden mittels dPCR die Deletion des 15-kb-Fragments zwischen den beiden TALEN-Bindungsstellen an *CCR5* und *CCR2* (dKO), die Inversion (Inv) und die Insertion des Fragmentes in den *CCR5*-Lokus des zweiten Allels (Ins) in den Läufen 2 - 4 analysiert. Die dKO-Rate war in Lauf 3 mit 12,7 % am höchsten, während die Raten bei Lauf 2 (7,4 %) und 4 (2,2 %) deutlich geringer waren. Wie auch in den Labormaßstabexperimenten, wurde die Insertion des ausgeschnittenen 15-kb-Fragments in den am CliniMACS Prodigy produzierten Zellen beobachtet, jedoch mit niedrigen Frequenzen (Lauf 2: 1,1 %, Lauf 3: 1,3 % und Lauf 4: 0,6 %). Es wurde auch hier keine Inversionen des 15-kb-Fragments detektiert (Abbildung 39).



**Abbildung 39: Das finale Produkt aus dem TCE Prozess wies Translokationen auf.** Rate an Deletion (dKO) und Insertion (Ins) des 15-kb-Fragmentes zwischen den *CCR5*-Uco-hetTALEN-Bindestellen am *CCR5*- und *CCR2*-Lokus berechnet aus GEF-dPCR-Daten für Lauf 2 - 4 aus Zellproben 216 h nach der Elektroporation.

#### 4.4.7 TCE-produzierte Zelle zeigten biallelisch *CCR5*-Editierungen (> 60 %)

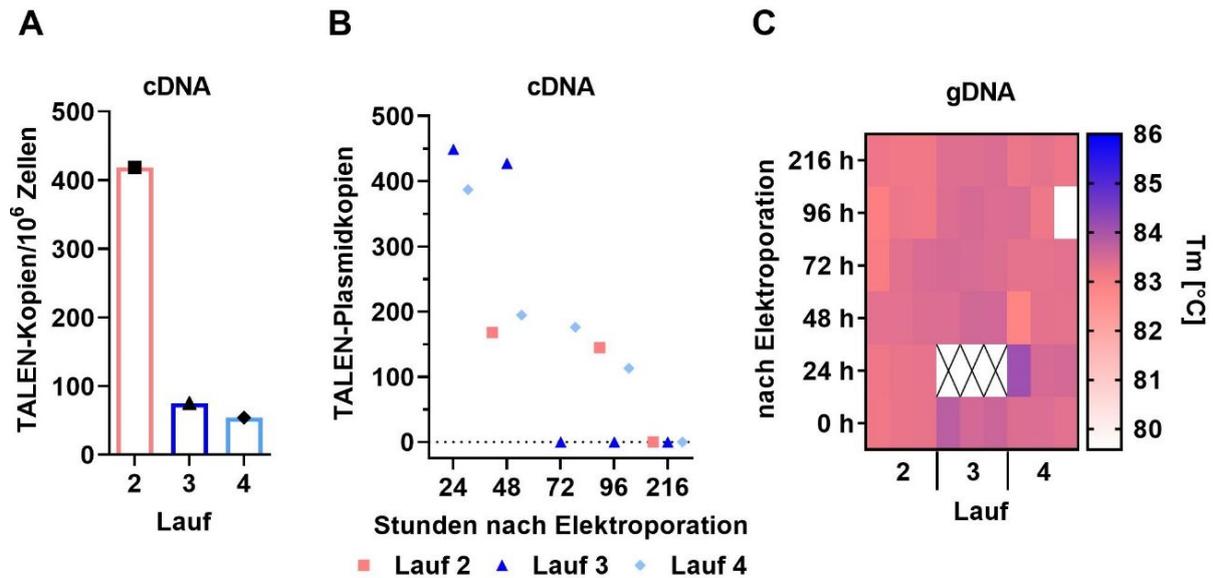
Die Erzeugung von T-Zellen, die gegen *CCR5*-tropisches HIV resistent sind, erfordert in der Regel den Knockout beider *CCR5*-Allele. Um die Anzahl der Zellen mit monoallelischer beziehungsweise biallelischer *CCR5*-Geneditierung durch die *CCR5*-Uco-hetTALEN zu quantifizieren, wurde eine schRMCA (siehe auch 4.1.2) für die Läufe 2 und 4 durchgeführt. Die Untersuchung ergab, dass etwa 67 % der analysierten Zellen für Lauf 2 und 60 % der analysierten Zellen für Lauf 4 ein biallelisches Schmelzkurvenprofil aufwiesen (Abbildung 40A). Von den Zellen mit biallelischer *CCR5*-Geneditierung zeigten 56 % (Lauf 2) und 67 % (Lauf 4) ein homologes Schmelzprofil (Abbildung 40B).



**Abbildung 40: Die Mehrheit der modifizierten Zellen wies eine biallelische Geneditierung am CCR5-Lokus auf.** schRMCA für Lauf 2 und 4. (A) Anteil der Zellen mit monoallelischem und biallelischem Schmelzkurvenprofil. (B) Anteil an heterologen oder homologen Schmelzkurvenprofilen der biallelisch CCR5-editierten Zellen.

#### 4.4.8 Finale Produkte der TCE-Läufe wiesen CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien auf

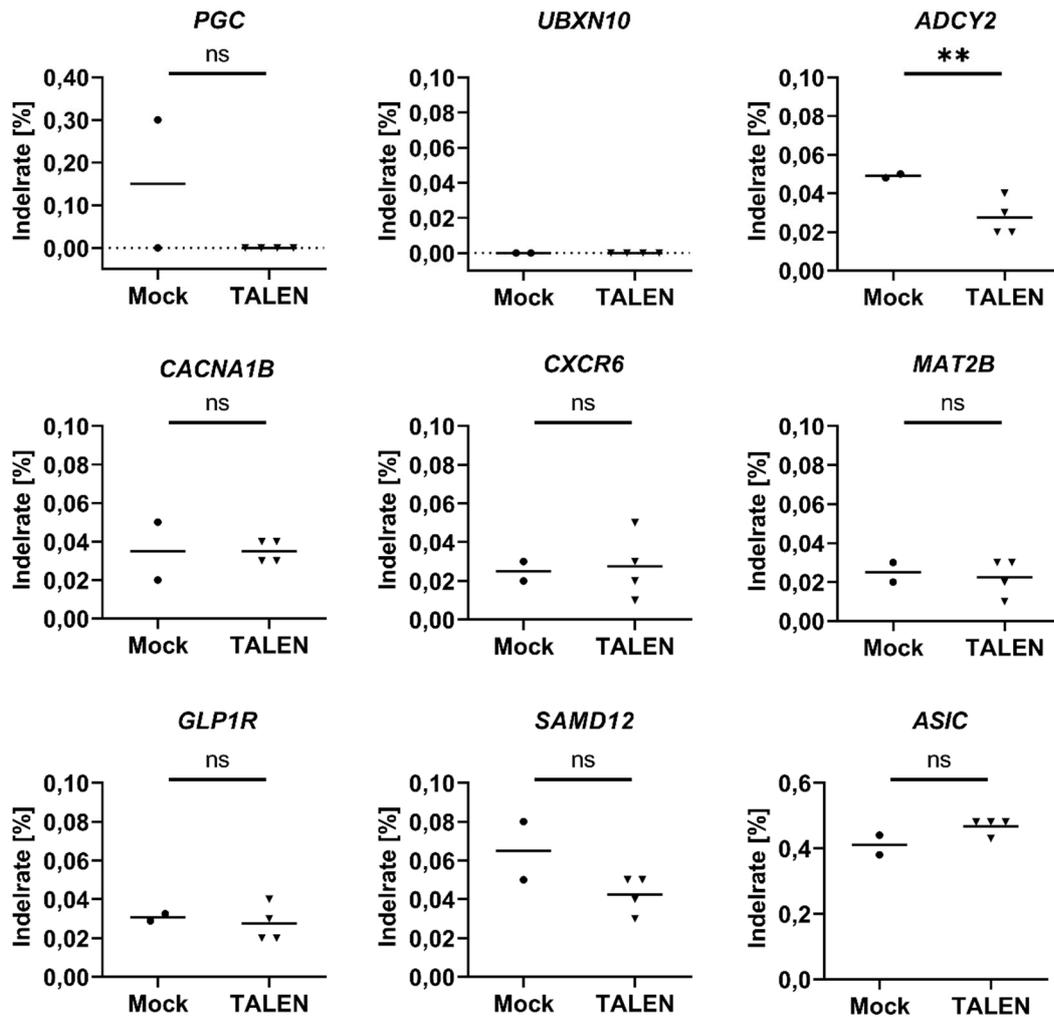
Exogene Nukleinsäuren könnten bei Patienten eine Immunreaktion hervorrufen, daher sollten hohe Mengen an TALEN mRNA oder Plasmid-DNA im Endprodukt vermieden werden. Die Detektion von CCR5-Uco-hetTALEN mRNA und Plasmid erfolgte mittels RT-qPCR für die Läufe 2 bis 4 mit Proben vom Erntetag (216 h nach der Elektroporation). Aus den  $C_p$ -Werten der RT-qPCRs wurde durch eine Standardkurve (Abbildung S4) die Anzahl der CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien berechnet und, wenn möglich, auf  $1 \times 10^6$  Zellen hochgerechnet. Für den 2. Lauf wurden 419 CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien pro  $1 \times 10^6$  Zellen im Endprodukt nachgewiesen, das entspricht etwa 1 CCR5-Uco-hetTALEN-Kopie je 2400 Zellen. Niedrigere Anzahlen an CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien wurden in Lauf 3 (75 Kopien pro  $1 \times 10^6$  Zellen, das heißt 1 Kopie pro 13.300 Zellen) und Lauf 4 (54 Kopien pro  $1 \times 10^6$ , das heißt 1 Kopie pro 18.500 Zellen) detektiert (Abbildung 41A). Aufgrund der fehlenden DNase-Behandlung der RNA-Isolate, können die cDNA-Proben auch das CCR5-Uco-hetTALEN Plasmid enthalten, das ebenfalls durch die verwendeten Primer in der zuvor beschriebenen RT-qPCR detektiert wird. Daher erfolgte anschließend eine spezifische Detektion von CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmidkopien in den cDNA-Proben zu verschiedenen Zeitpunkten für Läufe 2 - 4. In Lauf 2 und 4 konnten bis 96 h nach der Elektroporation noch bis zu 145 CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmidkopien detektiert werden. In keinem der getesteten Läufe konnte in den cDNA-Proben im finalen Produkt (216 h nach Elektroporation) das CCR5-Uco-hetTALEN Plasmid nachgewiesen werden (Abbildung 41B), demnach handelt es sich bei den zuvor detektierten CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien im finalen Produkt um mRNA-Kopien. Das Vorhandensein von CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmidkopien wurde ebenfalls in einer weiteren RT-qPCR-Analyse in gDNA-Isolaten untersucht. In keiner der untersuchten gDNA-Proben konnte das CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmid nachgewiesen werden (Abbildung 41C). Darüber hinaus wurde wie im Abschnitt 4.3.6 eine mögliche Integration des CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmids im CCR5-Lokus in gDNA-Proben aus den Läufen 2 - 4 untersucht. In keiner der analysierten Proben ließ sich per RT-qPCR integriertes CCR5-Uco-hetTALEN-Plasmid nachweisen (Abbildung S15).



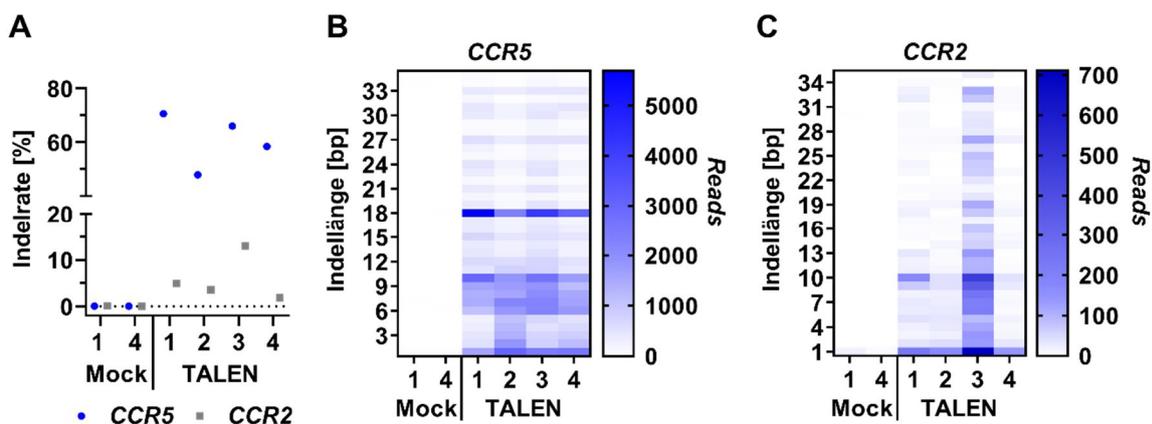
**Abbildung 41: Das finale Zellprodukt enthielt nur wenige CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien.** (A) Anzahl der CCR5-Uco-hetTALEN Kopien in cDNA-Proben aus RNA-Isolaten für Läufe 2 - 4 im finalen Produkt ermittelt über eine RT-qPCR. Die  $C_p$ -Werte der Proben wurden, mit denen einer Plasmid-Standardkurve verglichen und die CCR5-Uco-hetTALEN Kopien daraus berechnet. (B) Anzahl der CCR5-Uco-hetTALEN Plasmidkopien in cDNA-Proben aus RNA-Isolaten für Läufe 2 - 4 ermittelt über eine RT-qPCR. Jede Probe bei der mindestens 2 der 3 Replikate eine zum Standard passende Schmelzkurve anzeigte, wurde als positiv gewertet. Die  $C_p$ -Werte der Proben wurden, mit denen einer Plasmid-Standardkurve verglichen und die CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien daraus berechnet. (C) Amplifikation des CCR5-Uco-hetTALEN Plasmids in gDNA-Proben mittels RT-qPCR.  $T_m$  aller getesteten Proben in Replikaten. Die mittlere Schmelztemperatur der mitgelaufenen Standardverdünnungsreihe betrug  $85,6 \pm 0,2$  °C.

#### 4.4.9 Keine CCR5-Uco-hetTALEN-Aktivität in 9 der 10 untersuchten Off-Targets

Um die Off-Target-Aktivität der CCR5-Uco-hetTALEN auch in den im CliniMACS Prodigy produzierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu untersuchen, wurden Proben der Läufe 1 - 4 ebenfalls per ampNGS für die Off-Targets *PGC*, *UBXN10*, *ADYC2*, *CACNA1B*, *CXCR6*, *MAT2B*, *GLP1R*, *SAMDA12*, *ASIC* und *CCR2* analysiert. Darüber hinaus wurde das On-Target *CCR5* untersucht. Proben von Lauf 1 und 3 vor der TALEN-Behandlung dienten als Kontrollen. Wie in den ampNGS-Daten für die Proben aus dem Labormaßstab (Abschnitt 4.3.4) wurden für die Off-Targets *PGC* und *UBXN10* nur eine geringe Anzahl an *Reads* generiert (<600). Alle anderen Targets wiesen zwischen 27041 - 108780 *Reads* pro Probe auf (Abbildung S16). Außer *CCR2*, zeigte keines der potenziellen Off-Targets einen Hinweis auf eine CCR5-Uco-hetTALEN Aktivität (Abbildung 42). Im Einklang mit den früheren Experimenten im Labormaßstab war *CCR2* das einzige bestätigte Off-Target mit Indelraten zwischen 1,8 % und 13,0 %. Für das On-Target *CCR5* wurden Indelraten zwischen 48 % - 71 % ermittelt (Abbildung 43A). Um auch hier die Indels genauer zu untersuchen wurde die Länge der Indels gegen die Anzahl der *Reads* aufgetragen. Wie in den Experimenten im Labormaßstab, zeigt sich auch bei diesen Proben eine hohe Prävalenz von Indels mit einer Länge von 18 bp im *CCR5*-Lokus (Abbildung 43B). Im *CCR2*-Lokus fanden sich vor allem Indels mit einer Länge von 1 bp, 9 bp oder 10 bp. Insgesamt waren die meisten Indels  $\leq 15$  bp (Abbildung 43C).



**Abbildung 42:** Auch für die TCE-Läufe wurde per ampNGS nur *CCR2* als definitives *CCR5*-Uco-hetTALEN Off-Target identifiziert. Anteil an Indel-Reads im Vergleich zur Read-Gesamtanzahl für 2 unbehandelte Proben (Mock) und 4 *CCR5*-Uco-hetTALEN-behandelte Proben (TALEN) aus den 4 Läufen. Die schwarze durchgehende Linie zeigt den jeweiligen Mittelwert der Proben an. Für *UBXN10* konnte kein P-Wert bestimmt werden, da alle Werte bei null lagen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Welch's *t*-Test. ns = nicht signifikant.



**Abbildung 43:** ampNGS-Daten zeigten ähnliche *CCR2* Off-Target und *CCR5* On-Target Aktivität der *CCR5*-Uco-heTALEN in den TCE-Läufen (1 - 4) wie in den Experimenten im Labormaßstab. (A) Ermittelte Indelraten für *CCR5* (Kreis, blau) und *CCR2* (Quadrat, grau) der behandelten Proben von Lauf 1 - 4 und unbehandelten Proben (Mock) vor der Elektroporation von Lauf 1 und 4. (B) *CCR5*-Lokus. Anzahl der Indel-Reads aufgetragen gegen die Indellänge (1 - 35 bp) für behandelte und unbehandelte Proben der Läufe 1 - 4. (C) *CCR2*-Lokus. Anzahl der Indel-Reads aufgetragen gegen die Indellänge (1 - 35 bp) für behandelte und unbehandelte Proben der Läufe 1 - 4.

## 5 Diskussion

Die Einführung von cART machte die HIV-Infektion zu einer chronischen, aber behandelbaren Erkrankung mit einer fast normalen Lebenserwartung unter optimalen Bedingungen. Dennoch sind lebenslange Therapien mit einer Reihe von Nachteilen verbunden, darunter beispielsweise Arzneimittelresistenzen oder Wechselwirkungen mit Medikamenten in einer alternden Bevölkerung. Zudem stellt eine HIV-Infektion für viele Patienten eine permanente psychische Belastung dar - nicht zuletzt, weil diese Erkrankung immer noch stigmatisiert wird. Darüber hinaus stellen HIV-Infektionen ebenfalls eine Herausforderung im Zusammenhang mit anderen neuartigen Behandlungen, wie CAR-T-Zelltherapien dar, da die modifizierten T-Zellen anfällig gegenüber HIV sind. Entsprechend besteht auch weiterhin ein großer Bedarf an alternativen Behandlungsstrategien für HIV-positive Patienten. Einige dieser Strategien kombinieren mehrere Behandlungsmethoden zu denen auch gentherapeutische Ansätze wie die Genomeditierung gehören. Als interessantes Ziel hat sich dafür der HIV-Korezeptor CCR5 herauskristallisiert, vor allem nach der erfolgreichen Eliminierung der HIV-Infektion bei zwei Patienten als Resultat einer Transplantation hämatopoetischer Stammzellen von CCR5-negativen Spendern.<sup>119,120</sup> Im Rahmen dieser Dissertation wurde die in unserem Labor bereits entwickelte TALE Designernuklease, CCR5-Uco-TALEN, für eine zukünftige klinische Anwendbarkeit weiter verbessert und umfassend charakterisiert. Darüber hinaus konnte für die optimierte CCR5-Uco-hetTALEN ein GMP-kompatibles Protokoll am CliniMACS Prodigy etabliert werden, dass eine Grundvoraussetzung für die Translation in eine erste klinische Studie darstellt.

### 5.1 Charakterisierung der CCR5-Uco-TALEN On- und Off-Target Aktivitäten

Für die Translation der CCR5-Uco-TALEN in eine klinische Anwendung muss die Aktivität der Nuklease am On-Target und möglichen Off-Targets genau untersucht werden. Die CCR5-Editierungsrate, die durch die CCR5-Uco-TALEN induziert wird, ist abhängig von der verwendeten mRNA-Menge.<sup>193</sup> Neben dem bereits untersuchten Dosisseffekt am On-Target CCR5 zeigte sich ebenfalls ein starker, linear verlaufender Dosisseffekt am Off-Target CCR2.<sup>261,262</sup> Eine genaue Dosierung der CCR5-Uco-TALEN ist daher wichtig für eine hohe CCR5 On-Target und möglichst niedrige CCR2 Off-Target Indelrate.

Zur Produktion CCR5-negativer Zellen muss bei den meisten Menschen die Geneditierung an beiden CCR5-Allelen stattfinden. Da nicht alle primären CD4<sup>+</sup>-T-Zellen CCR5 exprimieren, lässt sich der vollständige Knockout des Gens phänotypisch nicht nachweisen. Zudem kann mittels der GEF-ddPCR nur eine durchschnittliche Rate an editierten CCR5-Genen in der Zellpopulation ermittelt werden. Für die Unterscheidung einer erfolgreichen Geneditierung (monoallelisch vs. biallelisch) am CCR5-Lokus in primären T-Zellen wurde daher in dieser

Arbeit die neue Technik der Hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse für Einzelzellen (scHRMCA) entwickelt und erfolgreich angewendet. Während andere Gruppen bereits zeigen konnten, dass sich die HRMCA zur Unterscheidung von induzierten hetero- und homozygoter Mutationen in Zellklonen oder gemischten Zellpopulationen eignet,<sup>260,263,264</sup> konnte die Technik hier für die Anwendung an Einzelzellen weiterentwickelt werden. Da die Generierung von Zellklonen aus primären T-Lymphozyten (und vielen anderen Zelltypen) schwierig und zeitaufwendig ist, dürfte die neue scHRMCA-Technik für viele Gruppen, die im Bereich der Geneditierung arbeiten, sehr nützlich sein.

Anhand der scHRMCA zeigte sich, dass mehr als 75 % der editierten primären T-Zellen Mutationen in beiden *CCR5*-Allelen beherbergten. Diese Rate biallelischer Editierung war deutlich höher als in mehreren anderen Studien<sup>265-267</sup> berichtet, aber ähnlich den von DiGiusto et al. mit der Zinkfingernuklease SB-728 erhobenen Daten (> 72 % biallelische Editierung), dort allerdings in hämatopoetischen Stammzellen.<sup>268</sup> Interessanterweise wiesen die meisten biallelischen Mutationen im *CCR5*-Gen ein homologes Schmelzkurvenprofil auf, das auf nur ein Amplikon in der PCR hinweist. Ähnliche Resultate wurden von Carlson et al berichtet, die diese Editierung auf eine Homologie-vermittelte Reparatur (HDR) des 2. Allels unter Verwendung des bereits editierten Schwesterchromosoms zurückführten.<sup>269</sup> Eine weitere mögliche Erklärung für die beobachteten homologe Schmelzkurvenprofile wäre eine fehlende Amplifikation eines Allels aufgrund größerer Deletionen (über die Primerbindungsstellen hinaus), wie sie in dieser Arbeit ermittelt werden konnten, sodass es sich eigentlich um eine heterologe biallelische Editierung handeln würde. Alternativ könnte ein gehäuftes Auftreten der mikrohomologiebasierten End-zu-End Verknüpfung (MMEJ) zu homologen biallelischen Editierungen in beiden Allelen geführt haben. Tatsächlich wird dies durch die Ergebnisse des Amplikon *Next Generation Sequencing* (ampNGS) nahegelegt, bei dem sehr viele der detektierten *Reads* identische Deletionen zwischen Mikrohomologien aufwiesen.

Off-Target-Effekte, die durch Designernukleasen verursacht werden, stellen ein potenzielles Risiko in der Gentherapie dar. Im schlimmsten, aber relativ unwahrscheinlichen Fall könnte eine Off-Target-Aktivität direkt zu Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen führen. Nicht unwahrscheinlich ist jedoch, dass die gleichzeitige Induktion mehrerer Doppelstrangbrüche in chromosomalen Aberrationen, wie zum Beispiel Deletionen oder Translokationen, resultiert. Solche Aberrationen können eine maligne Transformation entweder ebenfalls direkt, über die Aktivierung von Onkogenen (Translokationen) oder den Verlust von Tumorsuppressorgenen (Deletionen), oder auch indirekt über die Induktion einer Genominstabilität verursachen. Während die direkten Effekte unmittelbar zu typischen Kennzeichen von Krebszellen („*hallmarks of cancer*“) wie unbegrenztes Wachstum oder auch Apoptoseresistenz führen, stellt die Genominstabilität nach Weinberg und Hanahan ein krebsförderndes Merkmal dar.<sup>270</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mögliche Off-Target-Aktivitäten der CCR5-Uco-TALEN an 10 ausgewählten, *in silico* vorhergesagten Loci mittels ampNGS untersucht. Zwei der vorhergesagte Loci, *CCR2* und *GPC5*, konnten als eindeutige Off-Targets der CCR5-Uco-TALEN identifiziert werden. Darüber hinaus zeigten drei weitere Loci *VWA8*, *RAPGEF2* und *LDOC1* erhöhte Zahlen von *Reads* mit Deletionen > 4 Basenpaaren in einigen der Proben, wodurch eine CCR5-Uco-TALEN Aktivität an diesen Loci als möglich angesehen wird. Wichtig ist an dieser Stelle, dass die CCR5-Uco-TALEN die Wildtyp *Fok1*-Schneidedomäne enthielt, die eine Homodimerisierung zweier gleicher TALEN-Arme (zwei linke bzw. zwei rechte TALEN-Arme) ermöglichte. Tatsächlich zeigte eine genauere Betrachtung der *in silico* Vorhersagen, dass mit Ausnahme von *CCR2* sich viele der identifizierte und alle untersuchten Off-Targets auf die Aktivität homodimerer TALEN-Paaren zurückführen ließen. Die CCR5-Uco-TALEN wies zwar im Vergleich mit einigen anderen Designernukleasen<sup>194,268</sup> eine niedrige Anzahl an bestätigten Off-Targets und nur eine niedrige Aktivität an diesen Loci auf, dennoch sollte die Wahrscheinlichkeit auftretender, möglicherweise auch noch unentdeckten Off-Targets für eine klinische Anwendung auf das unvermeidliche Minimum reduziert werden.

## 5.2 Optimierung der CCR5-Uco-TALEN für klinische Anwendungen

Das Risiko von Off-Target-Schnitten ist bei ZFN aufgrund der kürzeren Zielsequenzen und des sog. *Cross-talk-Effekts* deutlich höher als bei TALEN. Da sich auch dort das Problem der Homodimerisierung der *Fok1*-Schneideomäne, wurden von Doyen et al bereits 2011 unterschiedliche obligat heterodimere Varianten entwickelt.<sup>227</sup> Die obligat heterodimeren Varianten sind abgeleitet von der homodimeren Wildtyp *Fok1*-Schneidedomäne und enthalten Mutationen an spezifischen Stellen im offenen Leserahmen.<sup>224,227,271</sup> Diese Mutationen destabilisieren die Dimerisierung der zwei *Fok1*-Schneidedomänen vermutlich durch eine Verringerung der Bindungsenergie, wodurch die Nukleaseaktivität stark reduziert wird. Die so verringerte beziehungsweise nicht mehr nachweisbare Aktivität an homodimeren Off-Targets wurde durch unterschiedliche Gruppen bestätigt.<sup>225,227,271,272</sup> Aufbauend auf jenen Arbeiten wurde die homodimere *Fok1* auch in der CCR5-Uco-TALEN gegen verschiedene obligat heterodimere Nukleasedomänen ausgetauscht. Tatsächlich konnte für die obligat heterodimeren CCR5-Uco-TALEN-Varianten keine Off-Target-Aktivität am homodimeren Off-Target *GPC5* mehr nachgewiesen werden. Dies war jedoch auch mit einer reduzierte On-Target-Aktivität der neuen obligat heterodimeren CCR5-Uco-TALEN-Varianten im Vergleich zur homodimeren CCR5-Uco-TALEN (bei gleicher mRNA-Konzentration) verbunden, ein Resultat, das auch von Knipping et al beobachtet wurde.<sup>273</sup> Zwei der 4 getesteten heterodimeren TALEN Varianten (DAD/RVR) zeigten sogar eine sehr geringe On-Target Aktivität von unter 3 %. Durch Anpassung der eingesetzten mRNA-Konzentrationen konnten für die Variante 1 jedoch die gleichen Raten an *CCR5*-Editierung wie bei der homodimeren

CCR5-Uco-TALEN erreicht werden. Variante 1 wurde danach als CCR5-Uco-hetTALEN bezeichnet und charakterisiert.

Wie oben erwähnt handelte es sich bei den *in silico* vorhergesagten wahrscheinlichsten Off-Targets der CCR5-Uco-TALEN, *CCR2* ausgenommen, nur um homodimere Off-Targets, für die dann die entsprechenden ampNGS-Analysen durchgeführt wurden. Daher war es notwendig, für die obligat heterodimere CCR5-Uco-hetTALEN eine neue *in silico*-Analyse zur Identifikation der 10 wahrscheinlichsten Off-Targets (inklusive *CCR2*) durchzuführen. Die folgende ampNGS erbrachte keinen Hinweis auf eine Nukleaseaktivität der CCR5-Uco-hetTALEN an 9 der TOP10 vorhergesagten Off-Targets (außer *CCR2*). Diese Daten unterstreichen die weiter verbesserte Spezifität der obligatorisch heterodimeren CCR5-Uco-hetTALEN im Vergleich zur homodimeren CCR5-Uco-TALEN. Für das Off-Target *CCR2* zeigten die ampNGS-Daten für die mit CCR5-Uco-hetTALEN behandelten Proben ähnliche Indelraten für die CCR5-Uco-TALEN. Die Aktivität der CCR5-Uco-hetTALEN am *CCR2*-Lokus wird durch die Bindung der linken und rechten TALEN induziert, sodass die Einführung der obligat heterodimeren *Fok1*-Schneidedomäne wie erwartet keinen Einfluss auf die Aktivität an diesem Off-Target hatte. Aus diesem Grund müssen, wie bereits erwähnt, die mRNA-Mengen für die CCR5-Uco-hetTALEN in zukünftigen klinischen Anwendungen sorgfältig angepasst werden, um die Off-Target-Aktivität am *CCR2* Lokus zu minimieren. Zugleich kann an dieser Stelle nochmals darauf verwiesen werden, dass bereits die CCR5-Uco-TALEN im Vergleich zu anderen CCR5-Designernukleasen, einschließlich der bereits klinisch verwendeten ZFN,<sup>197</sup> eine deutlich niedrigere Off-Target-Aktivität aufwies.<sup>193,194,268</sup> Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die CCR5-Uco-hetTALEN ein sehr gutes Sicherheitsprofil hat. Auch wenn das Vorhandensein von weiteren Off-Targets nicht völlig ausgeschlossen werden kann, ist ihre Wahrscheinlichkeit mit der obligat heterodimeren Variante vergleichsweise gering, da für die Induktion eines Doppelstrangbruches (DSB) eine Dimerisierung der *Fok1*-Schneidedomäne unabdingbar ist.<sup>274</sup> Dennoch sind weiterführende Untersuchungen möglicher Off-Targets durch alternative Methoden (z. B. GUIDE-Seq oder IDLV), die keine vorherige *in silico* Identifikation benötigen, sinnvoll.<sup>275,276</sup>

### 5.3 Charakterisierung der CCR5-Uco-hetTALEN für klinische Anwendungen

Nachdem die Reduktion der Off-Target Aktivität durch die Einführung einer obligat heterodimeren Schneidedomäne in der Designernuklease gezeigt wurde, erfolgten anschließend alle weiteren Charakterisierungen mit CCR5-Uco-hetTALEN behandelten Zellen. Neben der bereits untersuchten Aktivität der CCR5-Uco-hetTALEN an potenziellen Off-Targets ist es ebenfalls relevant, die Auswirkungen am On-Target *CCR5* zu kennen. *CCR5* ampNGS-Daten aus CCR5-Uco-hetTALEN behandelten Proben wiesen am häufigsten eine Deletion von 18 bp zwischen den TALEN-Bindungsstellen auf. Diese Deletion deutete auf die

mikrohomologiebasierte End-zu-End-Verknüpfung (MMEJ) als einen wichtigen Reparaturmechanismus von DSBs in den Nuklease-behandelten humanen Zellen hin, was ebenfalls von anderen Forschergruppen berichtet wurde.<sup>277-279</sup> Diese Schlussfolgerung wird durch die Beobachtung gestützt, dass die gleiche 18-bp-Deletion im sehr ähnlichen Off-Target *CCR2* nicht vorhanden war, bei dem sich an dieser Position keine Mikrohomologie befindet. Eine 18-bp-Deletion führt nicht zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens im *CCR5*-Gen, sondern stattdessen zum Verlust von sechs Aminosäuren in der ICL1 des *CCR5*-Proteins (Abbildung 4). Wie weiterführende Experimente innerhalb unserer Arbeitsgruppe zeigten, führt diese Deletion (*CCR5*<sup>Δ55-60</sup>) zum nahezu vollständigen Verlust der *CCR5*-Zelloberflächenexpression. Berichte aus Studien zu den natürlich vorkommenden Varianten *CCR5*<sup>R60S</sup> und *CCR5*<sup>L55Q</sup>, die beide ebenfalls eine reduzierte Oberflächenexpression aufweisen beziehungsweise zu einer beschleunigten Internalisierung führen, deuten auf eine Schlüsselfunktion der ICL1 für die Zelloberflächenexpression von *CCR5* hin.<sup>280-282</sup> Demnach liegt der Schluss nahe, dass Geneditierungen im Bereich der *CCR5*-Uco-hetTALEN-Bindestellen in der ICL1 auch ohne Zerstörung des ORF zu HIV-resistenten Zellen führen können.

Die Translation der *CCR5*-Uco-hetTALEN in die Klinik erfordert darüber hinaus eine genaue Bestimmung der Geneditierungskinetik am *CCR5*- und *CCR2*-Lokus in primären T-Zellen. Zum einen um einen geeigneten Zeitpunkt für eine Qualitätskontrolle im Herstellungsprozess zu bestimmen und zum anderen um mögliche spenderspezifische Unterschiede zu detektieren. Die durchgeführten Experimente zur Kinetik der Geneditierung zeigten, dass die *CCR5*-Uco-hetTALEN-Aktivität am *CCR5* Lokus innerhalb der ersten 48 h - 72 h nach der Elektroporation stattfand. Folglich sollte die Effizienz der *CCR5*-Editierung frühestens 3 Tage nach der Elektroporation bestimmt werden - eine essenzielle Information für die Planung der Qualitätskontrollen innerhalb des Herstellungsprozesses am CliniMACS Prodigy. Interessanterweise fand die Geneditierung im Off-Target *CCR2* durch die *CCR5*-Uco-hetTALEN hauptsächlich innerhalb der ersten 24 h nach Elektroporation statt. Dies legt nahe, dass eine Off-Target-Aktivität bevorzugt auftritt, wenn überschüssige Nuklease verfügbar ist. Die Überprüfung der Geneditierung zeigte außerdem eine hohe Spenderabhängigkeit, sowohl am On-Target als auch am Off-Target *CCR2*.

Die Aktivität von Designernukleasen kann nicht nur zur Induktion kleinerer Indel (< 35 bp), sondern auch zu Deletionen mit einer Größe von Hundert bis mehreren Tausend Basenpaaren führen. Bei Deletionen dieser Größenordnung ist die Detektion der Mutation mit den in dieser Arbeit benutzten Methoden (GEF-dPCR und ampNGS) nicht mehr möglich. Daher wurde durch eine weitere ddPCR die Anzahl der detektierbaren *CCR5*-Genkopien mit der Anzahl der Genkopien eines Referenzgens (*EPOR*) verglichen. Die relative Kopienzahl (RCN) zwischen *CCR5* und dem Referenzgen *EPOR* wiesen 24 h nach der Elektroporation den höchsten

Unterschied auf, was vermutlich auf eine hohe Anzahl an geschnittenen *CCR5*-Genen zu diesem Zeitpunkt zurückzuführen ist. Unterschiede in den Genkopien zu späteren Zeitpunkten hingegen könnten auf die Existenz von *CCR5*-Uco-hetTALEN induzierten Deletionen hinweisen, die über die Bindungsstellen der PCR-Primer und -Sonden hinausgehen. Der Nachweis einer 15 kb großen Deletion am *CCR5*-Lokus zwischen den TALEN-Bindestellen am *CCR5*- und *CCR2*-Lokus unterstützt diese Vermutung. Folglich sind die ermittelten Indelraten am On-Target *CCR5* und vermutlich auch am Off-Target *CCR2* aufgrund der PCR-basierten Messmethode niedriger als der wirkliche Anteil geneditierter Zellen. Dieser Punkt sollte bei der Festlegung von Produktkriterien für die Herstellung gentechnisch veränderter Zellen berücksichtigt werden. Eine Reihe von Studien wiesen die Entstehung chromosomaler Veränderungen, wie Deletionen von mehreren Kilobasen durch unterschiedliche Mechanismen nach.<sup>283–285</sup> Mit speziell entwickelten dPCR-Assays konnten in dieser Arbeit ebenfalls Deletionen und Integrationen eines 15-kb-Fragmentes zwischen dem Off-Target *CCR2* und On-Target *CCR5*, die sich unmittelbar nebeneinander auf Chromosom 3 befinden, detektiert werden. Diese chromosomalen Veränderungen könnten durch eine zeitgleiche Induktion der Doppelstrangbrüche oder aufgrund einer hohen Sequenzähnlichkeit durch eine Homologie-vermittelte Reparatur entstehen. Im Gegensatz zu Berichten anderer Studien<sup>269,285</sup> konnte in dieser Arbeit keine Inversion des 15-kb-Fragmentes detektiert werden. Allerdings könnten Indels im Bereich der reparierten Stellen zu einem Verlust der Primer- oder Sondenbindung geführt und somit eine Detektion verhindert haben.<sup>286</sup> Die vollständige Deletion oder Integration des 15-kb-Fragments in das zweite *CCR5* Allel wurde in den Experimenten im Labormaßstab nur in niedrigen Frequenzen beobachtet. Wie zu erwarten, zeigten die Ergebnisse aus den am CliniMACS Prodigy produzierten Zellen aus dem Lauf 3, dass der Anteil der 15-kb-Fragment-Deletion mit der Erhöhung der *CCR2* Off-Target-Aktivität zunimmt. Dies unterstreicht die Bedeutung einer kurzen und gut dosierten Expression der *CCR5*-Uco-hetTALE Nuklease. Durch paralleles Schneiden der Loci *CCR5* und *CCR2* und dem daraus resultierendem gleichzeitigen Knockout beider Gene, könnten die Funktionalität der betroffenen T-Zellen verringern werden, insbesondere wenn beide Allele betroffen sind.<sup>193</sup> Da jedoch nur ein kleiner Bruchteil der T-Zellen diese Veränderungen haben wird, ist kein Einfluss auf die Wirksamkeit des Zellproduktes zu erwarten.

Im Hinblick auf die Patientensicherheit wäre jedoch weniger ein möglicher Funktionsverlust der T-Zellen relevant als vielmehr potenziell wachstumsfördernde oder sogar transformierende Ereignisse. In diesem Zusammenhang sind frühere Befunde aus unserer und kollaborierenden Arbeitsgruppen wichtig die zeigen, dass sich primäre T-Zellen im Gegensatz zu Blutstammzellen nur sehr schwer transformieren lassen. Selbst nach der Transduktion mit onkogenexprimierenden, mutagenen  $\gamma$ -retroviralen Vektoren waren T-Zellen sehr resistent gegen Transformationen.<sup>287–290</sup> Außerdem sind inzwischen Tausende Patienten im Rahmen

von adoptiven Immuntherapien mit sehr großen Mengen an CAR- beziehungsweise TCR-transgenen T-Zellen als Teil von klinischen Studien oder zugelassenen Therapien behandelt worden. Bei vielen dieser Ansätze wurden und werden weiterhin die sehr mutagenen  $\gamma$ -retroviralen Vektoren eingesetzt, ohne dass dies zu vektorvermittelten Komplikationen geführt hätte.<sup>291-294</sup> Auch erste Immuntherapiestudien mit TALEN- sowie CRISPR/Cas-editierten T-Zellen, bei denen vergleichsweise hohe Frequenzen (bis zu 4 %) an Translokationen und Deletionen beobachtet wurden, erbrachten keine Hinweise auf unerwünschte Nebenwirkungen.<sup>295,296</sup>

Die langfristige Expression einer Designernuklease kann, wie oben dargestellt, die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Off-Target-Aktivitäten erhöhen. Zudem sind die beiden Proteindomänen der TALEN bakterieller Herkunft, sodass sie im Menschen eine adaptive Immunreaktion auslösen würden. Daher sollte zum Zeitpunkt der Infusion editierter Zellen in den Patienten möglichst keine mRNA mehr vorhanden sein, die als Matrize für die TALEN-Translation dienen könnte. Darüber hinaus kann die Anwesenheit exogener Nukleinsäuren in Säugetierzellen auch zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems führen, das der Abwehr von Pathogenen wie Viren und Bakterien dient. Verschiedene Sensoren in den Zellen, wie die sogenannten Toll-like Rezeptoren, erkennen fremde DNA oder RNA und aktivieren die Expression von Molekülen, die lokale Entzündungsreaktionen auslösen.<sup>297-299</sup> Insgesamt ist es für die klinische Anwendung eines Zellproduktes also wichtig, dass möglichst keine exogenen Nukleinsäuren im Endprodukt enthalten sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Menge an CCR5-Uco-hetTALEN Nukleinsäuren (mRNA und Plasmid) in den behandelten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht. Dabei zeigten sich, sowohl im Labormaßstab als auch in den am CliniMACS Prodigy produzierten T-Zellen, minimale Reste an CCR5-Uco-hetTALEN mRNA (bis zu 50 Kopien pro 25.000 Zellen). Die absoluten CCR5-Uco-TALEN-Kopienzahlen variierten deutlich zwischen den verschiedenen Spendern. Da die Analyse des Referenzgenes IPO8 keine großen Unterschiede aufzeigte, lassen sich die Variationen in den CCR5-Uco-TALEN-Kopienzahlen nicht mit ungleichen Mengen an Ausgangsmaterial oder unterschiedlicher Prozessierung desselben erklären. Eine mögliche Begründung für die Varianz könnten unterschiedliche Proliferationsraten der T-Zellen der einzelnen Spender bieten. Allerdings war in Lauf 2, bei dem die Zellzahlen kaum angestiegen sind, keine erhöhte Rate an CCR5-Uco-TALEN-Kopienzahlen im Vergleich zu den anderen Läufen zu beobachten. Neben der Proliferationsraten, könnte auch der Abbau der mRNA in den Spendern variieren. Der Abbau von mRNA in Zellen unterliegt unterschiedlichen Mechanismen<sup>300</sup> und ist abhängig von der Zelle und dem Aufbau der mRNA<sup>301,302</sup>. Interessant wäre die direkte Detektion der mRNA in Zellen und die Untersuchung, ob bestimmte T-Zellpopulationen die mRNA langsamer abbauen, beziehungsweise ob sich die verbliebenen CCR5-Uco-hetTALEN-Kopien in einzelnen Zellen befinden oder normalverteilt sind. Um den

Abbau der bisher verwendeten mRNA zu beschleunigen, könnte diese modifiziert werden, damit im finalen Zellprodukt keine Kopien der CCR5-Uco-TALEN mehr vorhanden sind. Mögliche Modifikationen müssten allerdings auf ihre Aktivität im Vergleich zur nicht modifizierten mRNA getestet werden. Überraschenderweise wurde im Verlauf der ersten RT-qPCR Experimente zum Nachweis der CCR5-Uco-hetTALEN mRNA in der cDNA eine Kontamination der RNA-Proben mit dem für die IVT verwendeten CCR5-Uco-hetTALEN Plasmiden festgestellt. Aus diesem Grund wurden alle Proben mit zwei für das Plasmid spezifischen RT-qPCRs zur Detektion von integriertem Plasmid und allen Plasmidkopien erneut untersucht. Damit konnte das CCR5-Uco-hetTALEN Plasmid bis zu 120 h nach der Elektroporation nachgewiesen werden. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine Integration des linearisierten IVT-Plasmids in den *CCR5*-Lokus nachgewiesen werden. In keiner der untersuchten Proben wurde zu einem späteren Zeitpunkt das CCR5-Uco-hetTALEN Plasmid detektiert, sodass die Übertragung geringer Plasmidmengen während der mRNA-Elektroporation für die klinische Anwendung nicht relevant sein dürfte.

#### **5.4 Etablierung eines GMP-kompatiblen Prozesses für die Produktion CCR5-edierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen**

Die Umsetzung von Gentherapiekonzepten in eine klinische Anwendung stellt eine große Herausforderung dar. Dazu gehört nicht nur die Entwicklung und Organisation klinischer Studien, sondern auch die Herstellung der zellulären medizinischen Gentherapieprodukte (*Gene Therapy Medicinal Products*, GTMP) für die klinische Anwendung gemäß den Vorschriften der guten Herstellungspraxis (GMP) und im Einklang mit den einschlägigen Biosicherheitsrichtlinien (Gentechnikrecht, Infektionsschutzgesetz), was spezielle Reinräume und viel hochqualifiziertes Personal erfordert. Besonders wichtig wird das Thema Biosicherheit bei CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von HIV-positiven Patienten, da dann die Schutzmaßnahmen noch über den normalerweise geforderten Sicherheitsstandard S2 hinausgehen müssen.

Im letzten Teil der vorgelegten Arbeit wurde ein GMP-kompatibles Protokoll am CliniMACS Prodigy zur automatisierten Produktion von CCR5-edierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen etabliert, das dabei helfen soll, einige der oben genannten Herausforderungen zu bewältigen. In den letzten Jahren wurden am CliniMACS Prodigy mehrere Protokolle zur automatisierten Separation und Transduktion humaner Zellen etabliert.<sup>303–308</sup> Durch die vorliegende Arbeit konnte ein neuer Prozess hinzugefügt werden, der die gezielte, TALEN-vermittelte (*CCR5*-) Geneditierung auf Basis der mRNA-Elektroporation in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ermöglicht und eine große Anzahl (*CCR5*-) editierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen generiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 4 TCE-Läufe am CliniMACS Prodigy mit einem angepassten Protokoll zur Geneditierung von T-Zellen auf Basis der mRNA-Elektroporation durchgeführt, welches folgende Einzelschritte umfasste: (i) Separation von CD4<sup>+</sup>-Zellen aus dem *Buffy Coat*

gesunder Spender und Aktivierung von T-Zellen, (ii) Elektroporation der aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit mRNA der optimierten CCR5-Uco-hetTALEN, (iii) Expansion der T-Zellen und (iv) Ernte des genveränderten Zellprodukts. Bei der Separation der CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden vor allem CD4<sup>+</sup>-T-Zellen angereichert mit einem geringen Anteil von Monozyten, vermutlich aufgrund einer niedrigen CD4-Expression in einem Teil dieser Zellen.<sup>309,310</sup> Während des 12-tägigen Prozesses konnten die T-Zellen, mit Ausnahme von Lauf 2 mit nur  $1 \times 10^8$  Zellen im Endprodukt, um mindestens das 11-fache der eingesetzten Zellzahl auf  $1,65 \times 10^9$  -  $5,00 \times 10^9$  expandiert werden. Die geringe Expansion im 2. Lauf lässt sich sehr wahrscheinlich auf einen Ausfall der zentralen CO<sub>2</sub>-Versorgung in unserem Forschungsgebäude zum Zeitpunkt der Aktivierung zurückführen. Die finalen absoluten Zellzahlen aus dieser Arbeit ähnelten den Ergebnissen anderer Autoren, wobei die Zellvermehrung in unseren Experimenten im direkten Vergleich geringer war, da in jenen Studien mit niedrigeren Ausgangszellzahlen gearbeitet wurde.<sup>311,312</sup> Zu berücksichtigen ist auch, dass in den genannten Studien ein T-Zell-Transduktionsprozess (TCT) am CliniMACS Prodigy durchgeführt. Im Gegensatz dazu umfasste der hier beschriebene Prozess die Elektroporation von Zellen, die Einführung einer TALE-Nuklease und die Inkubation der elektroporierten Zellen für 24 h bei 32 °C, was zu einer Wachstumsverzögerung geführt haben könnte.

Subpopulationen von T-Zellen variieren in ihrer Überlebensrate und der Fähigkeit zu proliferieren. Bei den meisten Gentherapien, so auch bei der Behandlung von HIV-Patienten, ist ein Zellprodukt gewünscht, welches langfristig im Körper überlebt. Ein signifikanter Befund war daher der hohe Anteil (25 % - 42 %) an langlebigen zentralen Gedächtnis-T-Zellen in den finalen Zellprodukten der TCE-Läufe, wie es ebenfalls von Zhu et al und Mock et al für TCT-Prozesse beschrieben wurde.<sup>313,314</sup> In zwei der TCE-Läufe konnten ebenfalls 5,0 % bzw. 1,9 % stammzellähnliche Gedächtnis-T-Zellen beobachtet werden. Diese Raten waren jedoch geringer als von Mock et al berichtet.<sup>314</sup>

Besonders wichtig für die klinische Testung ist jedoch, dass in allen 4 TCE-Läufen hohe CCR5-Editierungsraten von mindestens 65 % beobachtet wurden und die schRMCA-Analysen der finalen Zellprodukte zweier TCE-Läufe ebenfalls hohen Raten einer biallelischen Geneditierungen im CCR5-Lokus (67 % und 60 %) aufzeigten. Davon ausgehend ergibt sich ein Anteil von mindestens 40 % an biallelisch CCR5-editierten Zellen (65 % x 65 %) in der Gesamtpopulation. Aus den ampNGS-Daten am CCR5-Lokus und den Untersuchungen zur Expression der CCR5<sup>Δ55-60</sup> Variante (18-bp-Deletion) lässt sich darüber hinaus ableiten, dass der Großteil der Geneditierungen (71 % - 77 %) zu einem Verlust der CCR5-Expression in den biallelisch editierten Zellen führt. Auf Grund der möglichen Beteiligung der ICL1 im Transport von CCR5 zur Zelloberfläche ist vermutlich sogar ein größerer Anteil der biallelisch editierten Zellen (insgesamt etwa 30 %) CCR5-negativ. In der klinischen Studie von Tebas et al<sup>197</sup> mit der CCR5-ZFN zeigten sich nur bei einem Patienten Hinweise auf eine klinische Wirksamkeit

im Sinne der Unterdrückung der Virusreplikation. Jener Patient war heterozygot für das *CCR5*Δ32-Allel, so dass das ihm infundierte Zellpräparat trotz der relativ geringen Aktivität der *CCR5*-ZFN einen kompletten *CCR5*-Knockout in knapp 20 % der Zellen aufwies. Der Anteil komplett geschützter Zellen ist nach Behandlung mit dem in dieser Arbeit entwickelten Protokoll somit, selbst bei Patienten ohne das *CCR5*Δ32-Allel, um mindestens ein Drittel höher. Gleichzeitig bestätigte sich in den TCE-Läufen die, bereits im Labormaßstab beobachtete, Spenderabhängigkeit und der Dosisseffekt der TALEN-vermittelten Geneditierung am On-Target *CCR5* und Off-Target *CCR2*. In Einklang mit früheren Daten<sup>193</sup> erreichte das On-Target *CCR5* bei hohen TALEN-mRNA Konzentrationen ein Plateau, während das Off-Target *CCR2* weiter linear zunahm. Tatsächlich zeigte sich im 3. TCE-Lauf trotz gleicher mRNA-Menge wie im 2. Lauf eine deutlich erhöhte *CCR2* Off-Target-Rate, was die Spender- wie auch Dosisabhängigkeit der beobachteten Effekte bestätigt. Im letzten TCE-Prozess wurde eine 3-fach geringere mRNA-Menge, bezogen auf den ersten TCE-Lauf, verwendet, ohne dass die *CCR5*-Editierung dadurch erheblich beeinträchtigt wurde. Hingegen konnte die *CCR2* Off-Target-Aktivität stark reduziert werden. Diese Beobachtung macht außerdem deutlich, dass eine direkte Hockskalierung der mRNA-Menge von Labormaßstab auf den CliniMACS Prodigy Prozess nicht immer erfolgreich ist. Mögliche Gründe dafür könnten in den verschiedenen verwendeten Elektroporationsküvetten und in etwas unterschiedlichen Mischungsverhältnis von mRNA und Zellen liegen.

Zusammenfassend konnte ich die zuvor entwickelte *CCR5*-spezifische TALEN (*CCR5*-Uco-TALEN) erfolgreich für eine mögliche klinische Anwendung verbessern und umfassend charakterisieren. Darüber hinaus konnte ich einen GMP-kompatiblen Prozess am CliniMACS Prodigy zur Herstellung *CCR5*-editierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen etablieren. Hervorzuheben ist insbesondere, dass die *CCR5*-Uco-hetTALEN auch in dem großmaßstäbigen, GMP-kompatiblen Herstellungsprozess zu einer effizienten, mehrheitlich biallelischen Geneditierung des *CCR5*-Lokus in den primären, humanen T-Zellen führte. Da der Großteil der dabei entstehenden Indels zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens oder, im Falle der 18-bp-Deletion, zu einer verhinderten Zelloberflächenexpression von *CCR5* führen kann, ist davon auszugehen, dass die meisten der biallelisch editierten Zellen gegen HIV geschützt sind. So legt die Charakterisierung der verbesserten *CCR5*-Uco-hetTALEN und das etablierte GMP-kompatible Protokoll die Grundlage für die Translation neuartiger Zelltherapien mit weitgehend geschützten T-Zellen in die klinische Anwendung zur Behandlung HIV-positiver Patienten. Basierend auf der Flexibilität der CliniMACS-Plattform kann der hier vorgestellte Prozess problemlos mit weiteren Modifikationen, z.B. einer Transduktion der T-Zellen mit CAR-Vektoren, kombiniert werden und gestattet so ein weites Repertoire an Einsatzmöglichkeiten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, et al. Pneumocystis carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men. *N Engl J Med.* 1981;305(24):1425-1431. doi:10.1056/NEJM198112103052401
2. Masur H, Michelis MA, Greene JB, et al. An Outbreak of Community-Acquired Pneumocystis carinii Pneumonia. *N Engl J Med.* 1981;305(24):1431-1438. doi:10.1056/NEJM198112103052402
3. Durack DT. Opportunistic Infections and Kaposi's Sarcoma in Homosexual Men. *N Engl J Med.* 1981;305(24):1465-1467. doi:10.1056/NEJM198112103052408
4. Urmacher C, Myskowski P, Ochoa Jr. M, Kris M, Safai B. Outbreak of Kaposi's sarcoma with cytomegalovirus infection in young homosexual men. *Am J Med.* 1982;72(4):569-575. doi:10.1016/0002-9343(82)90450-8
5. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(12):7415-7419. doi:10.1073/pnas.77.12.7415
6. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983;220(4599):868-871. doi:10.1126/science.6189183
7. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* 1984;224(4648):500 LP - 503. doi:10.1126/science.6200936
8. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science.* 1984;224(4648):497-500. doi:10.1126/science.6200935
9. UNAIDS. Global HIV & AIDS statistics - 2020 fact sheet. <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>. Accessed November 9, 2020.
10. World Health Organization (WHO). HIV/AIDS - Key facts. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>. Accessed November 7, 2020.
11. Nyamweya S, Hegedus A, Jaye A, Rowland-Jones S, Flanagan KL, Macallan DC. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Rev Med Virol.* 2012;23(4):221-240. doi:10.1002/rmv.1739
12. Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient High Levels of Viremia in Patients with Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *N Engl J Med.* 1991;324(14):961-964.
13. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature.* 1993;362:355-358.
14. Clark SJ, Saag MS, Decker WD, et al. High Titers of Cytopathic Virus in Plasma of Patients with Symptomatic Primary HIV-1 Infection. *N Engl J Med.* 1991;325:954-959.
15. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004;200(6):761-770. doi:10.1084/jem.20041196
16. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, et al. Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS Med.* 2006;3(12):2335-2348. doi:10.1371/journal.pmed.0040484

17. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 2004;200(6):749-759. doi:10.1084/jem.20040874
18. Zhang Z, Schuler T, Zupancic M, et al. Sexual Transmission and Propagation of SIV and HIV in Resting and Activated CD4+ T Cells. *Science*. 1999;286(5443):1353-1357. doi:10.1126/science.286.5443.1353
19. Schacker T, Little S, Connick E, et al. Productive infection of T cells in lymphoid tissues during primary and early human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*. 2001;183(4):555-562. doi:10.1086/318524
20. Fauci AS, Schnittman SM, Poli G, Koenig S, Pantaleo G. Immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med*. 1991;114(8):678-693. doi:10.7326/0003-4819-114-8-678
21. Hazenberg MD, Hamann D, Schuitemaker H, Miedema F. T cell depletion in HIV-1 infection: How CD4+ T cells go out of stock. *Nat Immunol*. 2000;1(4):285-289. doi:10.1038/79724
22. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: What the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med*. 2006;12(3):289-295. doi:10.1038/nm1380
23. Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol*. 2003;21(February 2003):265-304. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141053
24. Poorolajal J, Hooshmand E, Mahjub H, Esmailnasab N, Jenabi E. Survival rate of AIDS disease and mortality in HIV-infected patients: a meta-analysis. *Public Health*. 2016;139:3-12. doi:10.1016/j.puhe.2016.05.004
25. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and Immunologic Characterization of Long-Term Survivors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Med*. 1995;332(4):201-208.
26. Muñoz A, Kirby AJ, He YD, et al. Long-term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal patterns of CD4+ lymphocytes. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology*. 1995;8(5):496-505. doi:10.1097/00042560-199504120-00010
27. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, et al. HIV controllers: A homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis*. 2005;41(7):1053-1056. doi:10.1086/433188
28. Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, et al. Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US department of defense HIV natural history study. *J Infect Dis*. 2009;200(11):1714-1723. doi:10.1086/646609
29. Promer K, Karris MY. Current Treatment Options for HIV Elite Controllers: a Review. *Curr Treat Options Infect Dis*. 2018;10(2):302-309. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
30. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, et al. CC CKR5: A RANTES, MIP-1a, MIP-1b, Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. *Science*. 1996;272:1955-1958. doi:10.1126/science.272.5270.1955
31. Bazan HA, Alkhatib G, Broder CC, Berger EA. Patterns of CCR5, CXCR4, and CCR3 Usage by Envelope Glycoproteins from Human Immunodeficiency Virus Type 1 Primary Isolates. *J Virol*. 1998;72(5):4485-4491. doi:10.1128/jvi.72.5.4485-4491.1998
32. Björndal A, Deng H, Jansson M, et al. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol*. 1997;71(10):7478-7487. doi:10.1128/jvi.71.10.7478-7487.1997

33. van't Wout AB, Kootstra NA, Mulder-Kampinga GA, et al. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J Clin Invest.* 1994;94(5):2060-2067. doi:10.1172/JCI117560
34. Wilkinson DA, Operskalski EA, Busch MP, Mosley JW, Koup RA. A 32-bp deletion within the CCR5 locus protects against transmission of parenterally acquired human immunodeficiency virus but does not affect progression to AIDS-defining illness. *J Infect Dis.* 1998;178(4):1163-1166. doi:10.1086/515675
35. Schuitemaker H, Kootstra NA, de Goede RE, de Wolf F, Miedema F, Tersmette M. Monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture. *J Virol.* 1991;65(1):356-363. doi:10.1128/jvi.65.1.356-363.1991
36. Scarlatti G, Tresoldi E, Björndal A, et al. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med.* 1997;3(11):498-502.
37. Liu R, Paxton WA, Choe S, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell.* 1996;86(3):367-377. doi:10.1016/S0092-8674(00)80110-5
38. Reynes J, Portales P, Segondy M, et al. CD4 + T Cell Surface CCR5 Density as a Determining Factor of Virus Load in Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Infect Dis.* 2000;181(3):927-932. doi:10.1086/315315
39. Jlizi A, Edouard J, Fadhloui-Zid K, et al. Identification of the CCR5-Δ32 HIV resistance allele and new mutations of the CCR5 gene in different Tunisian populations. *Hum Immunol.* 2007;68(12):993-1000. doi:10.1016/j.humimm.2007.10.003
40. Salem AH, Batzer MA. Distribution of the HIV resistance CCR5-Δ32 allele among Egyptians and Syrians. *Mutat Res.* 2007;616:175-180. doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.11.024
41. Brumme ZL, Goodrich J, Mayer HB, et al. Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals. *J Infect Dis.* 2005;192(3):466-474. doi:10.1086/431519
42. Delobel P, Sandres-Sauné K, Cazabat M, et al. R5 to X4 switch of the predominant HIV-1 population in cellular reservoirs during effective highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;38(4):382-392. doi:10.1097/01.qai.0000152835.17747.47
43. Nielsen C, Pedersen C, Lundgren JD, Gerstoft J. Biological properties of HIV isolates in primary HIV infection: consequences for the subsequent course of infection. *AIDS.* 1993;7(8):1035-1040. doi:10.1097/00002030-199308000-00002
44. Fenyö EM, Morfeldt-Månson L, Chiodi F, et al. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J Virol.* 1988;62(11):4414-4419. doi:10.1128/jvi.62.11.4414-4419.1988
45. Gelderblom HR, Hausmann EHS, Özel M, Pauli G, Koch MA. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology.* 1987;156(1):171-176. doi:https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90449-1
46. Frankel AD, Young JAT. HIV-1: Fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:1-25. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.1
47. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature.* 2002;418(6898):646-650.

48. Fischer U, Meyer S, Teufel M, Heckel C, Lührmann R, Rautmann G. Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. *EMBO J*. 1994;13(17):4105-4112. doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06728.x
49. Abraham L, Fackler OT. HIV-1 Nef: A multifaceted modulator of T cell receptor signaling. *Cell Commun Signal*. 2012;10:1-11. doi:10.1186/1478-811X-10-39
50. Landi A, Iannucci V, Van Nuffel A, Meuwissen P, Verhasselt B. One Protein to Rule them All: Modulation of Cell Surface Receptors and Molecules by HIV Nef. *Curr HIV Res*. 2011;9(7):496-504. doi:10.2174/157016211798842116
51. Basmaciogullari S, Pizzato M. The activity of Nef on HIV-1 infectivity. *Front Microbiol*. 2014;5:1-12. doi:10.3389/fmicb.2014.00232
52. Dayton AI, Sodroski JG, Rosen CA, Goh WC, Haseltine WA. The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell*. 1986;44(6):941-947. doi:10.1016/0092-8674(86)90017-6
53. Peterlin BM, Luciw PA, Barr PJ, Walker MD. Elevated levels of mRNA can account for the trans-activation of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(24):9734-9738. doi:10.1073/pnas.83.24.9734
54. Gelderblom HR, Özel M, Hausmann EHS, Winkel T, Pauli G, Koch MA. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV), immunolocalization of structural proteins and virus-cell relation. *Micron Microsc Acta*. 1988;19(1):41-60. doi:https://doi.org/10.1016/0739-6260(88)90039-1
55. Tazi J, Bakkour N, Marchand V, Ayadi L, Aboufirassi A, Branlant C. Alternative splicing: Regulation of HIV-1 multiplication as a target for therapeutic action. *FEBS J*. 2010;277(4):867-876. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07522.x
56. Lee SK, Potempa M, Swanstrom R. The choreography of HIV-1 proteolytic processing and virion assembly. *J Biol Chem*. 2012;287(49):40867-40874. doi:10.1074/jbc.R112.399444
57. Bell NM, Lever AML. HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends Microbiol*. 2013;21(3):136-144. doi:https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.006
58. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, et al. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*. 1984;312(5996):767-768. doi:10.1038/312767a0
59. Dalglish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984;312(5996):763-767.
60. McDougal JS, Kennedy MS, Slish JM, Cort SP, Mawle A, Nicholson JK. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science*. 1986;231(4736):382 LP - 385. doi:10.1126/science.3001934
61. Xu H, Franks T, Gibson G, et al. Evidence for biphasic uncoating during HIV-1 infection from a novel imaging assay. *Retrovirology*. 2013;10(70):1-16. doi:10.1186/1742-4690-10-70
62. Mamede JI, Cianci GC, Anderson MR, Hope TJ. Early cytoplasmic uncoating is associated with infectivity of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(34):E7169-E7178. doi:10.1073/pnas.1706245114
63. Francis AC, Marin M, Shi J, Aiken C, Melikyan GB. Time-Resolved Imaging of Single HIV-1 Uncoating In Vitro and in Living Cells. *PLoS Pathog*. 2016;12(6):1-28. doi:10.1371/journal.ppat.1005709

64. Burdick RC, Li C, Munshi MH, et al. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(10):5486-5493. doi:10.1073/pnas.1920631117
65. Heinzinger NK, Bukrinsky MI, Haggerty SA, et al. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(15):7311-7315. doi:10.1073/pnas.91.15.7311
66. Bukrinsky MI, Sharova N, McDonald TL, Pushkarskaya T, Tarpley WG, Stevenson M. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(13):6125-6129. doi:10.1073/pnas.90.13.6125
67. Miller MD, Farnet CM, Bushman FD. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol*. 1997;71(7):5382-5390. doi:10.1128/jvi.71.7.5382-5390.1997
68. Colin L, Van Lint C. Molecular control of HIV-1 postintegration latency: Implications for the development of new therapeutic strategies. *Retrovirology*. 2009;6(111). doi:10.1186/1742-4690-6-111
69. Varmus H. Regulation of HIV and HTLV gene expression. *Genes Dev*. 1988;2(9):1055-1062. doi:10.1101/gad.2.9.1055
70. Ocwieja KE, Sherrill-Mix S, Mukherjee R, et al. Dynamic regulation of HIV-1 mRNA populations analyzed by single-molecule enrichment and long-read sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(20):10345-10355. doi:10.1093/nar/gks753
71. Lassen KG, Bailey JR, Siliciano RF. Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcriptional Elongation in Resting CD4+ T Cells In Vivo. *J Virol*. 2004;78(17):9105-9114. doi:10.1128/jvi.78.17.9105-9114.2004
72. Schwartz S, Felber BK, Fenyö EM, Pavlakis GN. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J Virol*. 1990;64(11):5448-5456. doi:10.1128/jvi.64.11.5448-5456.1990
73. Arya SK, Gallo RC. Three novel genes of human T-lymphotropic virus type III: Immune reactivity of their products with sera from acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(7):2209-2213. doi:10.1073/pnas.83.7.2209
74. Salfeld J, Gottlinger HG, Sia RA, Park RE, Sodroski JG, Haseltine WA. A tripartite HIV-1 tat-env-rev fusion protein. *EMBO J*. 1990;9(3):965-970. doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb08195.x
75. Ganser-Pornillos B, Yeager M, Sundquist WI. The Structural Biology of HIV Assembly. *Curr Opin Biotechnol*. 2008;18(2):203. doi:10.1016/j.sbi.2008.02.001.The
76. Sundquist WI, Kräusslich H-G. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a006924.
77. Martin-Serrano J, Neil SJD. Host factors involved in retroviral budding and release. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(7):519-531. doi:10.1038/nrmicro2596
78. Janeway C, Travers PJ, Walport M, Shlomchik MJ. *The Immune System in Health and Disease*. 5th ed. New York: Garland Science; 2001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10757/>.
79. Read KA, Powell MD, McDonald PW, Oestreich KJ. IL-2, IL-7, and IL-15: Multistage regulators of CD4+ T helper cell differentiation. *Exp Hematol*. 2016;44(9):799-808. doi:10.1016/j.exphem.2016.06.003

80. Jameson SC, Masopust D. Understanding Subset Diversity in T Cell Memory. *Immunity*. 2018;48(2):214-226. doi:10.1016/j.immuni.2018.02.010
81. Gattinoni L, Restifo NP. Moving T memory stem cells to the clinic. *Blood J*. 2013;121(4):567-568. doi:10.1182/blood-2009-07-229880
82. Gattinoni L, Speiser DE, Lichterfeld M, Bonini C. T memory stem cells in health and disease. *Nat Med*. 2017;23(1):18-27. doi:10.1038/nm.4241
83. Cieri N, Oliveira G, Greco R, et al. Generation of human memory stem T cells after haploidentical T-replete hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2015;125(18):2865-2874. doi:10.1182/blood-2014-11-608539
84. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-173. doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.001045
85. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996;383:787-793.
86. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med*. 1998;187(1):129-134. doi:10.1084/jem.187.1.129
87. Yamamoto J, Adachi Y, Onoue Y, et al. Differential expression of the chemokine receptors by the Th1-and Th2-type effector populations within circulating CD4+ T cells. *J Leukoc Biol*. 2000;68(4):568-574.
88. Loetscher P, Uguccioni M, Lorenza Bordoli, Marco Baggiolini BM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*. 1998;391:344-345.
89. Taub DD, Ortaldo JR, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ.  $\beta$  Chemokines costimulate lymphocyte cytotoxicity, proliferation, and lymphokine production. *J Leukoc Biol*. 1996;59(1):81-89. doi:10.1002/jlb.59.1.81
90. Contento RL, Molon B, Boularan C, et al. CXCR4-CCR5: A couple modulating T cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(29):10101-10106. doi:10.1073/pnas.0804286105
91. Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C, Germain RN. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature*. 2006;440(7086):890-895. doi:10.1038/nature04651
92. Chan O, Burke JD, Gao DF, Fish EN. The chemokine CCL5 regulates glucose uptake and AMP kinase signaling in activated T cells to facilitate chemotaxis. *J Biol Chem*. 2012;287(35):29406-29416. doi:10.1074/jbc.M112.348946
93. Gao D, Rahbar R, Fish EN. CCL5 activation of CCR5 regulates cell metabolism to enhance proliferation of breast cancer cells. *Open Biol*. 2016;6(6):160122. doi:10.1098/rsob.160122
94. Tan Q, Zhu Y, Li J, et al. Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science*. 2013;341(6152):1387-1390. doi:10.1126/science.1241475
95. Combadiere C, Ahuja SK, Lee Tiffany H, Murphy PM. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and RANTES. *J Leukoc Biol*. 1996;60(1):147-152. doi:10.1002/jlb.60.1.147
96. Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular Cloning and Functional Expression of a New Human CC-Chemokine Receptor Gene. *Biochemistry*. 1996;35(11):3362-3367. doi:10.1021/bi952950g

97. Farzan M, Mirzabekov T, Kolchinsky P, et al. Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell*. 1999;96(5):667-676. doi:10.1016/S0092-8674(00)80577-2
98. Rabut GEE, Konner JA, Kajumo F, Moore JP, Dragic T. Alanine Substitutions of Polar and Nonpolar Residues in the Amino-Terminal Domain of CCR5 Differently Impair Entry of Macrophage- and Dualtropic Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol*. 1998;72(4):3464-3468. doi:10.1128/jvi.72.4.3464-3468.1998
99. Blanpain C, Wittamer V, Vanderwinden JM, et al. Palmitoylation of CCR5 Is Critical for Receptor Trafficking and Efficient Activation of Intracellular Signaling Pathways. *J Biol Chem*. 2001;276(26):23795-23804. doi:10.1074/jbc.M100583200
100. Venkatesan S, Petrovic A, Locati M, Kim YO, Weissman D, Murphy PM. A Membrane-proximal Basic Domain and Cysteine Cluster in the C-terminal Tail of CCR5 Constitute a Bipartite Motif Critical for Cell Surface Expression. *J Biol Chem*. 2001;276(43):40133-40145. doi:10.1074/jbc.M105722200
101. Venkatesan S, Rose JJ, Lodge R, Murphy PM, Foley JF. Distinct Mechanisms of Agonist-induced Endocytosis for Human Chemokine Receptors CCR5 and CXCR4. *Mol Biol Cell*. 2003;14:3305-3324. doi:10.1091/mbc.E02
102. Nibbs RJB, Yang J, Landau NR, Mao JH, Graham GJ. LD78 $\beta$ , a non-allelic variant of human MIP-1 $\alpha$  (LD78 $\alpha$ ), has enhanced receptor interactions and potent HIV suppressive activity. *J Biol Chem*. 1999;274(25):17478-17483. doi:10.1074/jbc.274.25.17478
103. Gong W, Howard OMZ, Turpin JA, et al. Monocyte Chemotactic Protein-2 Activates CCR5 and Blocks CD4/CCR5-mediated HIV-1 Entry/Replication. *J Biol Chem*. 1997;273(8):4289-4292.
104. Blanpain C, Migeotte I, Lee B, et al. CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood*. 1999;94(6):1899-1905. doi:10.1182/blood.v94.6.1899.418k31\_1899\_1905
105. Jin J, Momboisse F, Boncompain G, et al. CCR5 adopts three homodimeric conformations that control cell surface delivery. *Sci Signal*. 2018;11(529):eaal2869. doi:10.1126/scisignal.aal2869
106. Govaerts C, Bondue A, Springael JY, et al. Activation of CCR5 by chemokines involves an aromatic cluster between transmembrane helices 2 and 3. *J Biol Chem*. 2003;278(3):1892-1903. doi:10.1074/jbc.M205685200
107. Mueller A, Kelly E, Strange PG. Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5. *Blood*. 2002;99(3):785-791. doi:10.1182/blood.V99.3.785
108. Roche M, Jakobsen MR, Ellett A, et al. HIV-1 predisposed to acquiring resistance to maraviroc (MVC) and other CCR5 antagonists in vitro has an inherent, low-level ability to utilize MVC-bound CCR5 for entry. *Retrovirology*. 2011;8(1):89. doi:10.1186/1742-4690-8-89
109. Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 $\beta$ , and MIP-1 $\alpha$ . *J Biol Chem*. 1996;271(29):17161-17166. doi:10.1074/jbc.271.29.17161
110. Mummidi S, Ahuja SS, McDaniel BL, Ahuja SK. The Human CC Chemokine Receptor 5 (CCR5) Gene. *J Biol Chem*. 1997;272(49):30662-30671. doi:10.1074/jbc.272.49.30662

111. Barmania F, Pepper MS. C-C chemokine receptor type five (CCR5): An emerging target for the control of HIV infection. *Appl Transl Genomics*. 2013;2(1):3-16. doi:10.1016/j.atg.2013.05.004
112. Nkenfou CN, Mekue LCM, Nana CT, Kuate JR. Distribution of CCR5-Delta32, CCR5 promoter 59029 A/G, CCR2-64I and SDF1-3'A genetic polymorphisms in HIV-1 infected and uninfected patients in the West Region of Cameroon. *BMC Res Notes*. 2013;6(1):288. doi:10.1186/1756-0500-6-288
113. Kulkarni S, Lied A, Kulkarni V, et al. CCR5AS lncRNA variation differentially regulates CCR5, influencing HIV disease outcome. *Nat Immunol*. 2019;20(7):824-834. doi:10.1038/s41590-019-0406-1
114. Su B, Sun G, Lu D, et al. Distribution of three HIV-1 resistance-conferring polymorphisms (SDF1-3'A, CCR2-641, and CCR5-Δ32) in global populations. *Eur J Hum Genet*. 2000;8(12):975-979. doi:10.1038/sj.ejhg.5200568
115. Michael NL, Chang G, Louie LG, et al. The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression NELSON. *Nat Med*. 1997;3(3):338-340.
116. Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu Y, Clegg JB. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet*. 1997;16:100-103.
117. Limborska SA, Balanovsky OP, Balanovskaya E V., et al. Analysis of CCR5Δ32 Geographic distribution and its correlation with some climatic and geographic factors. *Hum Hered*. 2002;53(1):49-54. doi:10.1159/000048605
118. Rautenbach A, Williams AA. Metabolomics as an approach to characterise the contrasting roles of CCR5 in the presence and absence of disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4):1472. doi:10.3390/ijms21041472
119. Hütter G, Nowak D, Mossner M, et al. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 2009;360(7):692-697. doi:10.1056/NEJMoa0802905
120. Gupta RK, Abdul-jawad S, McCoy LE, et al. HIV-1 remission following CCR5Δ32/Δ32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*. 2019;568(7751):244-248. doi:10.1038/s41586-019-1027-4
121. Gupta RK, Peppas D, Hill AL, et al. Evidence for HIV-1 cure after CCR5Δ32/Δ32 allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report. *Lancet HIV*. 2020;7(5):e340-e347. doi:10.1016/S2352-3018(20)30069-2
122. Rodger AJ, Cambiano V, Bruun T, et al. Sexual Activity Without Condoms and Risk of HIV Transmission in Serodifferent Couples When the HIV-Positive Partner Is Using Suppressive Antiretroviral Therapy. *JAMA*. 2016;316(2):171-181. doi:10.1001/jama.2016.5148
123. Bavinton BR, Pinto AN, Phanuphak N, et al. Viral suppression and HIV transmission in serodiscordant male couples: an international, prospective, observational, cohort study. *Lancet HIV*. 2018;5(8):e438-e447. doi:10.1016/S2352-3018(18)30132-2
124. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, et al. Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission. *N Engl J Med*. 2016;375(9):830-839. doi:10.1056/NEJMoa1600693.Antiretroviral
125. Ostertag W, Roesler G, Krieg CJ, et al. Induction of endogenous virus and of thymidine kinase by bromodeoxyuridine in cell cultures transformed by Friend virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71(12):4980-4985. doi:10.1073/pnas.71.12.4980

126. Sperling R. Zidovudine. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1998;6(5):197-203. doi:10.1002/(SICI)1098-0997(1998)6:5<197::AID-IDOG2>3.0.CO;2-1
127. Sperling RS, Shapiro DE, Coombs RW, et al. Maternal Viral Load, Zidovudine Treatment, and the Risk of Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 from Mother to Infant. *N Engl J Med.* 1996;335(22):1621-1629. doi:10.2307/2137978
128. Hogg RS, Yip B, Kully C, et al. Improved survival among HIV-infected patients after initiation of triple-drug antiretroviral regimens. *Cmaj.* 1999;160(5):659-665.
129. Gill VS, Lima VD, Zhang W, et al. Improved virological outcomes in British Columbia concomitant with decreasing incidence of HIV type 1 drug resistance detection. *Clin Infect Dis.* 2010;50(1):98-105. doi:10.1086/648729
130. Hogg R, Lima V, Sterne JA, Grabar S, Battegay M, et al. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet.* 2008;372:293-299.
131. Bhaskaran K, Hamouda O, Sannes M, et al. Changes in the risk of death after HIV seroconversion compared with mortality in the general population. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2008;300(1):51-59. doi:10.1001/jama.300.1.51
132. Kleinpeter AB, Freed EO. HIV-1 maturation: Lessons learned from inhibitors. *Viruses.* 2020;12(9):940. doi:10.3390/v12090940
133. Cihlar T, Fordyce M. Current status and prospects of HIV treatment. *Curr Opin Virol.* 2016;18:50-56. doi:10.1016/j.coviro.2016.03.004
134. Dorr P, Westby M, Dobbs S, et al. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(11):4721-4732. doi:10.1128/AAC.49.11.4721-4732.2005
135. Lunzen J Van. How Will CCR5 Antagonists Influence the Recommendations for the Antiretroviral Treatment of HIV-1 Infection. *Eur J Med Res.* 2007;12:435-440.
136. Langley DR, Roy Kimura S, Sivaprakasam P, et al. Homology models of the HIV-1 attachment inhibitor BMS-626529 bound to gp120 suggest a unique mechanism of action. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 2015;83(2):331-350. doi:10.1002/prot.24726
137. Kozal M, Aberg J, Pialoux G, et al. Fostemsavir in Adults with Multidrug-Resistant HIV-1 Infection. *N Engl J Med.* 2020;382(13):1232-1243. doi:10.1056/nejmoa1902493
138. Wild C, Greenwell T, Matthews T. A Synthetic Peptide from HIV-1 gp41 Is a Potent Inhibitor of Virus-Mediated Cell—Cell Fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1993;9(11):1051-1053. doi:10.1089/aid.1993.9.1051
139. Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, et al. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med.* 1998;4(11):1302-1307. doi:10.1038/3293
140. Tressler R, Godfrey C. NRTI backbone in HIV treatment: Will it remain relevant? *Drugs.* 2012;72(16):2051-2062. doi:10.2165/11640830-000000000-00000
141. Usach I, Melis V, Peris JE. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: A review on pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability. *J Int AIDS Soc.* 2013;16:18567. doi:10.7448/IAS.16.1.18567
142. Himmel DM, Arnold E. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors join forces with integrase inhibitors to combat HIV. *Pharmaceuticals.* 2020;13(6):122. doi:10.3390/ph13060122

143. Balakrishnan M, Yant SR, Tsai L, et al. Non-Catalytic Site HIV-1 Integrase Inhibitors Disrupt Core Maturation and Induce a Reverse Transcription Block in Target Cells. *PLoS One*. 2013;8(9):e74163. doi:10.1371/journal.pone.0074163
144. Torbett BE, Goodsell DS, Richman D. *The Future of HIV-1 Therapeutics*. Springer; 2015.
145. Badowski M, Pérez SE, Silva D, Lee A. Two's a Company, Three's a Crowd: A Review of Initiating or Switching to a Two-Drug Antiretroviral Regimen in Treatment-Naïve and Treatment-Experienced Patients Living with HIV-1. *Infect Dis Ther*. 2020;9(2):185-208. doi:10.1007/s40121-020-00290-w
146. Saag MS, Gandhi RT, Hoy JF, et al. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2020 Recommendations of the International Antiviral Society–USA Panel. *JAMA*. 2020;324(16):1651-1669. doi:10.1001/jama.2020.17025
147. McCann NC, Horn TH, Hyle EP, Walensky RP. HIV Antiretroviral Therapy Costs in the United States, 2012-2018. *JAMA Intern Med*. 2020;180(4):601-603. doi:10.1001/jamainternmed.2019.7108
148. Roberts DA, Tan N, Limaye N, Irungu E, Barnabas R V. Cost of Differentiated HIV Antiretroviral Therapy Delivery Strategies in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2019;82:S339-S347. doi:10.1097/QAI.0000000000002195
149. European Centre for Disease Prevention and Control. HIV treatment and care. Monitoring implementation of the Dublin Declaration on Partnership to fight HIV/AIDS in Europe and Central Asia: 2017 progress report. [https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/HIV treatment and care.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/HIV_treatment_and_care.pdf). Published 2017.
150. Lartey M, Asante-Quarshie A, Essel A, Kenu E, Ganu V, Neequaye A. Adverse drug reactions to antiretroviral therapy during the early art period at a tertiary hospital in Ghana. *Pan Afr Med J*. 2014;18:25. doi:10.11604/pamj.2014.18.25.3886
151. Li H, Marley G, Ma W, et al. The Role of ARV Associated Adverse Drug Reactions in Influencing Adherence Among HIV-Infected Individuals: A Systematic Review and Qualitative Meta-Synthesis. *AIDS Behav*. 2017;21(2):341-351. doi:10.1007/s10461-016-1545-0
152. Hagos L, Fessehaye S, Anand IS. Nature and prevalence of adverse drug reaction of antiretroviral medications in Halibet National Referral Hospital: A retrospective study. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2019;20(1):24. doi:10.1186/s40360-019-0307-9
153. Abah IO, Ncube NBQ, Bradley HA, Agbaji OO, Kanki P. Antiretroviral Therapy-associated Adverse Drug Reactions and their Effects on Virologic Failure- A Retrospective Cohort Study in Nigeria. *Curr HIV Res*. 2019;16(6):436-446. doi:10.2174/1389450120666190214144609
154. Chowta MN, Kamath P, Ramapuram JT, Shenoy KA, Hadigal S. Evaluation of Adverse Drug Reaction Profile of Drugs Used as First-Line Antiretroviral Therapy. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2018. doi:10.1155/2018/8095609
155. Hoffmann C, Welz T, Sabranski M, et al. Higher rates of neuropsychiatric adverse events leading to dolutegravir discontinuation in women and older patients. *HIV Med*. 2017;18(1):56-63. doi:10.1111/hiv.12468
156. Elzi L, Erb S, Furrer H, et al. Adverse events of raltegravir and dolutegravir. *Aids*. 2017;31(13):1853-1858. doi:10.1097/QAD.0000000000001590

157. Hoosen K, Mosam A, Dlova NC, Grayson W. An Update on Adverse Cutaneous Drug Reactions in HIV/AIDS. *Dermatopathology*. 2019;6(2):111-125. doi:10.1159/000496389
158. Fasinu S, Rosenkranz B. Drug-drug interactions in ageing HIV-infected individuals. *African J Pharm Pharmacol*. 2012;6(38):2710-2723. doi:10.5897/ajpp12.487
159. Molas E, Luque S, Retamero A, et al. Frequency and severity of potential drug interactions in a cohort of HIV-infected patients Identified through a Multidisciplinary team. *HIV Clin Trials*. 2018;19(1):1-7. doi:10.1080/15284336.2017.1404690
160. Pinkevych M, Cromer D, Tolstrup M, et al. HIV Reactivation from Latency after Treatment Interruption Occurs on Average Every 5-8 Days—Implications for HIV Remission. *PLoS Pathog*. 2015;11(7):e1005000. doi:10.1371/journal.ppat.1005000
161. Dubrocq G, Rakhmanina N. Antiretroviral therapy interruptions: Impact on HIV treatment and transmission. *HIV/AIDS - Res Palliat Care*. 2018;10:91-101. doi:10.2147/HIV.S141965
162. World Health Organization (WHO). *HIV Drug Resistance Report*; 2019. <http://scholar.google.com/scholar/Who+hiv+drug+resistance+report+2012>.
163. Günthard HF, Calvez V, Paredes R, et al. Human Immunodeficiency Virus Drug Resistance: 2018 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *Clin Infect Dis*. 2019;68(2):177-187. doi:10.1093/cid/ciy463
164. Lévy Y, Gahéry-Ségard H, Durier C, et al. Immunological and virological efficacy of a therapeutic immunization combined with interleukin-2 in chronically HIV-1 infected patients. *Aids*. 2005;19(3):279-286.
165. Lévy Y, Durier C, Lascaux AS, et al. Sustained control of viremia following therapeutic immunization in chronically HIV-1-infected individuals. *Aids*. 2006;20(3):405-413. doi:10.1097/01.aids.0000206504.09159.d3
166. Sgadari C, Monini P, Tripiciano A, et al. Continued decay of HIV proviral DNA upon vaccination with HIV-1 Tat of subjects on long-term ART: An 8-year follow-up study. *Front Immunol*. 2019;10:233. doi:10.3389/fimmu.2019.00233
167. McGary CS, Deleage C, Harper J, et al. CTLA-4+PD-1– Memory CD4+ T Cells Critically Contribute to Viral Persistence in Antiretroviral Therapy-Suppressed, SIV-Infected Rhesus Macaques. *Immunity*. 2017;47(4):776-788.e5. doi:10.1016/j.immuni.2017.09.018
168. Gay CL, Bosch RJ, Ritz J, et al. Clinical trial of the anti-PD-L1 antibody BMS-936559 in HIV-1 infected participants on suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2017;215(11):1725-1733. doi:10.1093/infdis/jix191
169. Evans VA, Van Der Sluis RM, Solomon A, et al. Programmed cell death-1 contributes to the establishment and maintenance of HIV-1 latency. *Aids*. 2018;32(11):1491-1497. doi:10.1097/QAD.0000000000001849
170. Fromentin R, DaFonseca S, Costiniuk CT, et al. PD-1 blockade potentiates HIV latency reversal ex vivo in CD4+ T cells from ART-suppressed individuals. *Nat Commun*. 2019;10(1):814. doi:10.1038/s41467-019-08798-7
171. Van der Sluis RM, Kumar NA, Pascoe RD, et al. Combination immune checkpoint blockade to reverse HIV latency. *J Immunol*. 2020;204(5):1242-1254. doi:10.4049/jimmunol.1901191.Combination
172. Kim Y, Anderson JL, Lewin SR. Getting the “Kill” into “Shock and Kill”: Strategies to Eliminate Latent HIV. *Cell Host Microbe*. 2018;23(1):14-26. doi:10.1016/j.chom.2017.12.004

173. Matalon S, Rasmussen TA, Dinarello CA. Histone deacetylase inhibitors for purging HIV-1 from the latent reservoir. *Mol Med.* 2011;17(5-6):466-472. doi:10.2119/molmed.2011.00076
174. Archin NM, Liberty AL, Kashuba AD, et al. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature.* 2012;487(7408):482-485. doi:10.1038/nature11286
175. Søggaard OS, Graversen ME, Leth S, et al. The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLoS Pathog.* 2015;11(9):e1005142. doi:10.1371/journal.ppat.1005142
176. Vansant G, Bruggemans A, Janssens J, Debyser Z. Block-and-lock strategies to cure HIV infection. *Viruses.* 2020;12:84. doi:10.3390/v12010084
177. Sahu GK, Sango K, Selliah N, Ma Q, Skowron G, Junghans RP. Anti-HIV Designer T Cells Progressively Eradicate a Latently Infected Cell Line by Sequentially Inducing HIV Reactivation then Killing the Newly Gp120-Positive Cells. *Virology.* 2013;446(0):268-275. doi:10.1016/j.virol.2013.08.002.Anti-HIV
178. Liu L, Patel B, Ghanem MH, et al. Novel CD4-Based Bispecific Chimeric Antigen Receptor Designed for Enhanced Anti-HIV Potency and Absence of HIV Entry Receptor Activity. *J Virol.* 2015;89(13):6685-6694. doi:10.1128/jvi.00474-15
179. Liu B, Zou F, Lu L, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells Guided by the Single-Chain Fv of a Broadly Neutralizing Antibody Specifically and Effectively Eradicate Virus Reactivated from Latency in CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes Isolated from HIV-1- Infected Individuals Receiving Suppressive . *J Virol.* 2016;90(21):9712-9724. doi:10.1128/JVI.00852-16.Editor
180. Hale M, Mesojednik T, Romano Ibarra GS, et al. Engineering HIV-Resistant, Anti-HIV Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Mol Ther.* 2017;25(3):570-579. doi:10.1016/j.ymthe.2016.12.023
181. Hu W, Kaminski R, Yang F, et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(31):11461-11466. doi:10.1073/pnas.1405186111
182. Kaminski R, Bella R, Yin C, et al. Excision of HIV-1 DNA by gene editing: A proof-of-concept in vivo study. *Gene Ther.* 2016;23(8-9):690-695. doi:10.1038/gt.2016.41
183. Lebbink RJ, De Jong DCM, Wolters F, et al. A combinational CRISPR/Cas9 gene-editing approach can halt HIV replication and prevent viral escape. *Sci Rep.* 2017;7:41968. doi:10.1038/srep41968
184. Yin C, Zhang T, Qu X, et al. In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models. *Mol Ther.* 2017;25(5):1168-1186. doi:10.1016/j.ymthe.2017.03.012
185. Dash PK, Kaminski R, Bella R, et al. Sequential LASER ART and CRISPR Treatments Eliminate HIV-1 in a Subset of Infected Humanized Mice. *Nat Commun.* 2019;10(1):2753. doi:10.1038/s41467-019-10366-y
186. Ueda S, Ebina H, Kanemura Y, Misawa N, Koyanagi Y. Anti-HIV-1 potency of the CRISPR/Cas9 system insufficient to fully inhibit viral replication. *Microbiol Immunol.* 2016;60(7):483-496. doi:10.1111/1348-0421.12395
187. Karpinski J, Hauber I, Chemnitz J, et al. Directed evolution of a recombinase that excises the provirus of most HIV-1 primary isolates with high specificity. *Nat Biotechnol.* 2016;34(4):401-409. doi:10.1038/nbt.3467

188. Boncompain G, Herit F, Tessier S, et al. Targeting CCR5 trafficking to inhibit HIV-1 infection. *Sci Adv.* 2019;5(10):eaax0821. doi:10.1126/sciadv.aax0821
189. Shi B, Li J, Shi X, et al. TALEN-mediated knockout of CCR5 confers protection against infection of human immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2017;74(2):229-241. doi:10.1097/QAI.0000000000001190
190. Kang HJ, Minder P, Park MA, Mesquitta WT, Torbett BE, Slukvin II. CCR5 disruption in induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 provides selective resistance of immune cells to CCR5-tropic HIV-1 virus. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2015;4(12):e268. doi:10.1038/mtna.2015.42
191. Liu Z, Chen S, Jin X, et al. Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Cell Biosci.* 2017;7(1):47. doi:10.1186/s13578-017-0174-2
192. Zhou J, Sathethan S, Li H, et al. Cell-specific RNA aptamer against human CCR5 specifically targets HIV-1 susceptible and inhibits HIV-1 infectivity. *Chem Biol.* 2015;22(3):379-390. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
193. Mock U, Machowicz R, Hauber I, et al. mRNA transfection of a novel TAL effector nuclease (TALEN) facilitates efficient knockout of HIV co-receptor CCR5. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(11):5560-5571. doi:10.1093/nar/gkv469
194. Mussolino C, Alzubi J, Fine EJ, et al. TALENs facilitate targeted genome editing in human cells with high specificity and low cytotoxicity. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(10):6762-6773. doi:10.1093/nar/gku305
195. Holt N, Wang J, Kim K, et al. Zinc finger nuclease-mediated CCR5 knockout hematopoietic stem cell transplantation controls HIV-1 in vivo. *Nat Biotechnol.* 2010;28(8):839-847. doi:10.1038/nbt.1663.Zinc
196. Maier DA, Brennan AL, Jiang S, et al. Efficient clinical scale gene modification via zinc finger nuclease-targeted disruption of the HIV co-receptor CCR5. *Hum Gene Ther.* 2013;24(3):245-258. doi:10.1089/hum.2012.172
197. Tebas P, Stein D, Tang WW, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med.* 2014;370(10):901-910. doi:10.1056/NEJMoa1300662.Gene
198. Krishnan AY. A Pilot Study to Evaluate the Feasibility, Safety and Engraftment of Zinc Finger Nuclease (ZFN) CCR5 Modified CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells (SB-728mR-HSPC) in HIV-1 (R5) Infected Patients. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02500849>. Accessed September 21, 2020.
199. Zhang B, Chen H. Safety and Feasibility Study of Allotransplantation of CRISPR/Cas9 CCR5 Gene Modified CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in HIV-infected Subjects With Hematological Malignancies. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03164135>. Accessed September 21, 2020.
200. Pingoud A, Wilson GG, Wende W. Type II restriction endonucleases - A historical perspective and more. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(12):7489-7527. doi:10.1093/nar/gku447
201. Silva G, Poirot L, Galetto R, et al. Meganucleases and Other Tools for Targeted Genome Engineering: Perspectives and Challenges for Gene Therapy. *Curr Gene Ther.* 2011;11(1):11-27. doi:10.2174/156652311794520111
202. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(3):1156-1160. doi:10.1073/pnas.93.3.1156

203. Hiroyuki S, Susumu K. New restriction endonucleases from *Flavobacterium okeanokoites* (FokI) and *Micrococcus luteus* (MluI). *Gene*. 1981;16(1-3):73-78. doi:10.1016/0378-1119(81)90062-7
204. Li L, Wu LP, Chandrasegaran S. Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(10):4275-4279. doi:10.1073/pnas.89.10.4275
205. Smith J, Bibikova M, Whitby FG, Reddy AR, Chandrasegaran S, Carroll D. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(17):3361-3369. doi:10.1093/nar/28.17.3361
206. Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*. 1991;252(5007):809 LP - 817. doi:10.1126/science.2028256
207. Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 2010;186(2):756-761. doi:10.1534/genetics.110.120717
208. Carlson DF, Fahrenkrug SC, Hackett PB. Targeting DNA With Fingers and TALENs. *Mol Ther — Nucleic Acids*. 2012;1(1):e3. doi:10.1038/mtna.2011.5
209. Bultmann S, Morbitzer R, Schmidt CS, et al. Targeted transcriptional activation of silent oct4 pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(12):5368-5377. doi:10.1093/nar/gks199
210. Valton J, Dupuy A, Daboussi F, et al. Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. *J Biol Chem*. 2012;287(46):38427-38432. doi:10.1074/jbc.C112.408864
211. Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, et al. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sci*. 2019;232:116636. doi:10.1016/j.lfs.2019.116636
212. Khan SH. Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2019;16:326-334. doi:10.1016/j.omtn.2019.02.027
213. Ghosh P. Process of Protein Transport by the Type III Secretion System. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(4):771-795. doi:10.1128/mmbr.68.4.771-795.2004
214. Büttner D, Bonas U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev*. 2010;34(2):107-133. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00192.x
215. Bonas U, Stall RE, Staskawicz B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *MGG Mol Gen Genet*. 1989;218(1):127-136. doi:10.1007/BF00330575
216. Boch J, Bonas U. *Xanthomonas AvrBs3* Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annu Rev Phytopathol*. 2010;48(1):419-436. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081936
217. Deng D, Yan C, Pan X, et al. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*. 2012;335(6069):720-723. doi:10.1126/science.1215670
218. Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*. 2011;29(2):143-150. doi:10.1038/nbt.1755
219. Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*. 2009;326(5959):1509-1512. doi:10.1126/science.1178811
220. Yang J, Zhang Y, Yuan P, et al. Complete decoding of TAL effectors for DNA recognition. *Cell Res*. 2014;24(5):628-631. doi:10.1038/cr.2014.19

221. Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, Dannemann N, Lahaye T, Cathomen T. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(21):9283-9293. doi:10.1093/nar/gkr597
222. Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One.* 2008;3(11):e3647. doi:10.1371/journal.pone.0003647
223. Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. Golden gate shuffling: A one-pot DNA shuffling method based on type IIS restriction enzymes. *PLoS One.* 2009;4(5):e5553. doi:10.1371/journal.pone.0005553
224. Szczepek M, Brondani V, Büchel J, Serrano L, Segal DJ, Cathomen T. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 2007;25(7):786–793.
225. Cade L, Reyon D, Hwang WY, et al. Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(16):8001-8010. doi:10.1093/nar/gks518
226. Ramalingam S, Kandavelou K, Rajenderan R, Chandrasegaran S. Creating Designed Zinc Finger Nucleases with Minimal Cytotoxicity. *J Mol Biol.* 2011;405(3):630-641. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted
227. Doyon Y, Vo TD, Mendel MC, et al. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat Methods.* 2011;8(1):74-79. doi:10.1038/nmeth.1539
228. Liang F, Han M, Romanienko PJ, Jasin M. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(9):5172-5177. doi:10.1073/pnas.95.9.5172
229. Chen CC, Feng W, Lim PX, Kass EM, Jasin M. Homology-Directed Repair and the Role of BRCA1, BRCA2, and Related Proteins in Genome Integrity and Cancer. *Annu Rev Cancer Biol.* 2018;2:313-336. doi:10.1146/annurev-cancerbio-030617-050502
230. Pfeiffer P, Thode S, Hancke J, Vielmetter W. Mechanisms of overlap formation in nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell Biol.* 1994;14(2):888-895. doi:10.1128/mcb.14.2.888
231. Chiruvella KK, Liang Z, Wilson TE. Repair of double-strand breaks by end joining. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5:a012757. doi:10.1101/cshperspect.a012757
232. Lieber MR. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End Joining Pathway. *Annu Rev Biochem.* 2011;79(3):181-211. doi:10.1146/annurev.biochem.052308.093131.
233. Roth DB, Wilson JH. Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction. *Mol Cell Biol.* 1986;6(12):4295-4304. doi:10.1128/mcb.6.12.4295
234. McVey M, Lee SE. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.* 2008;24(11):529-538. doi:10.1016/j.tig.2008.08.007
235. Sfeir A, Symington LS. Microhomology-mediated end joining: a back-up survival mechanism or dedicated pathway? *Trends Biochem Sci.* 2015;40(11):701-714. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040

236. Seol JH, Shim EY, Lee SE. Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2018;809:81-87. doi:10.1016/j.mrfmmm.2017.07.002
237. Richardson C, Jasin M. Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature.* 2000;405(6787):697-700. doi:10.1038/35015097
238. Weinstock DM, Brunet E, Jasin M. Formation of NHEJ-derived reciprocal chromosomal translocations does not require Ku70. *Nat Cell Biol.* 2007;9(8):978-981. doi:10.1038/ncb1624
239. Ghezraoui H, Pignaeau M, Renouf B, et al. Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. *Mol Cell.* 2014;55(6):829-842.
240. Jin L, Zeng X, Liu M, Deng Y, He N. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics.* 2014;4(3):240-255. doi:10.7150/thno.6914
241. Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. Delivering crispr: A review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.* 2018;25(1):1234-1257. doi:10.1080/10717544.2018.1474964
242. Batista Napotnik T, Miklavčič D. In vitro electroporation detection methods – An overview. *Bioelectrochemistry.* 2018;120:166-182. doi:10.1016/j.bioelechem.2017.12.005
243. Shi J, Ma Y, Zhu J, et al. A review on electroporation-based intracellular delivery. *Molecules.* 2018;23(11):3044. doi:10.3390/molecules23113044
244. Sommermeyer D, Neudorfer J, Weinhold M, et al. Designer T cells by T cell receptor replacement. *Eur J Immunol.* 2006;36(11):3052-3059. doi:10.1002/eji.200636539
245. Lusso P, Cocchi F, Balotta C, et al. Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *J Virol.* 1995;69(6):3712-3720. doi:10.1128/jvi.69.6.3712-3720.1995
246. Clement K, Rees H, Canver MC, et al. CRISPResso2 provides accurate and rapid genome editing sequence analysis. *Nat Biotechnol.* 2019;37(3):215-226. doi:10.1038/s41587-019-0032-3
247. Yates A, Akanni W, Amode MR, et al. Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:D710-D716. doi:10.1093/nar/gkv1157
248. Cunningham F, Achuthan P, Akanni W, et al. Ensembl 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D745-D751. doi:10.1093/nar/gky1113
249. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuik Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:W5-W9. doi:10.1093/nar/gkn201
250. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134. doi:10.1186/1471-2105-13-134
251. Fine EJ, Cradick TJ, Zhao CL, Lin Y, Bao G. An online bioinformatics tool predicts zinc finger and TALE nuclease off-target cleavage. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(6):e42. doi:10.1093/nar/gkt1326
252. Doyle EL, Booher NJ, Standage DS, et al. TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: Tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:W117-W122. doi:10.1093/nar/gks608

253. Mülhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Vol 6. Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
254. Mock U, Hauber I, Fehse B. Digital PCR to assess gene-editing frequencies (GEF-dPCR) mediated by designer nucleases. *Nat Protoc*. 2016;11(3):598-615. doi:10.1038/nprot.2016.027
255. Vossen RHAM, Aten E, Roos A, Den Dunnen JT. High-resolution melting analysis (HRMA) - More than just sequence variant screening. *Hum Mutat*. 2009;30(6):860-866. doi:10.1002/humu.21019
256. Cornils K, Thielecke L, Hüser S, et al. Multiplexing clonality: Combining RGB marking and genetic barcoding. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(7):1-10. doi:10.1093/nar/gku081
257. Berdien B, Mock U, Atanackovic D, Fehse B. TALEN-mediated editing of endogenous T-cell receptors facilitates efficient reprogramming of T lymphocytes by lentiviral gene transfer. *Gene Ther*. 2014;21(6):539-548. doi:10.1038/gt.2014.26
258. Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. Amplicon melting analysis with labeled primers: A closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem*. 2003;49(3):396-406. doi:10.1373/49.3.396
259. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*. 2003;49(6):853-860. doi:10.1373/49.6.853
260. Thomas HR, Percival SM, Yoder BK, Parant JM. High-throughput genome editing and phenotyping facilitated by high resolution melting curve analysis. *PLoS One*. 2014;9(12):e114632. doi:10.1371/journal.pone.0114632
261. Frock RL, Hu J, Meyers RM, Ho Y, Kii E, Alt FW. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat Biotechnol*. 2015;33(2):179-186. doi:10.1038/nbt.3101.Genome-wide
262. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. 2013;31(9):827-832. doi:10.1038/nbt.2647
263. Samarut É, Lissouba A, Drapeau P. A simplified method for identifying early CRISPR-induced indels in zebrafish embryos using High Resolution Melting analysis. *BMC Genomics*. 2016;17(1):547. doi:10.1186/s12864-016-2881-1
264. Dahlem TJ, Hoshijima K, Jurynek MJ, et al. Simple Methods for Generating and Detecting Locus-Specific Mutations Induced with TALENs in the Zebrafish Genome. *PLoS Genet*. 2012;8(8):e1002861. doi:10.1371/journal.pgen.1002861
265. Perez EE, Wang J, Miller JC, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*. 2008;26(7):808-816. doi:10.1038/nbt1410
266. Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*. 2005;435(7042):646-651. doi:10.1038/nature03556
267. Liu PQ, Chan EM, Cost GJ, et al. Generation of a triple-gene knockout mammalian cell line using engineered zinc-finger nucleases. *Biotechnol Bioeng*. 2010;106(1):97-105. doi:10.1002/bit.22654
268. DiGiusto DL, Cannon PM, Holmes MC, et al. Preclinical development and qualification of ZFN-mediated CCR5 disruption in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. 2016;3:16067. doi:10.1038/mtm.2016.67

269. Carlson DF, Tan W, Lillico SG, et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(43):17382-17387. doi:10.1073/pnas.1211446109
270. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
271. Miller JC, Holmes MC, Wang J, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*. 2007;25(7):778-785. doi:10.1038/nbt1319
272. Miller JC, Patil DP, Xia DF, et al. Enhancing gene editing specificity by attenuating DNA cleavage kinetics. *Nat Biotechnol*. 2019;37(8):945-952. doi:10.1038/s41587-019-0186-z
273. Knipping F, Osborn MJ, Petri K, et al. Genome-wide Specificity of Highly Efficient TALENs and CRISPR/Cas9 for T Cell Receptor Modification. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. 2017;4:213-224. doi:10.1016/j.omtm.2017.01.005
274. Bitinaite J, Wah DA, Aggarwal AK, Schildkraut I. Fok1 dimerization is required for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(18):10570-10575. doi:10.1073/pnas.95.18.10570
275. Zischewski J, Fischer R, Bortesi L. Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnol Adv*. 2017;35(1):95-104. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.12.003
276. Gabriel R, Lombardo A, Arens A, et al. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol*. 2011;29(9):816-823. doi:10.1038/nbt.1948
277. Bae S, Kweon J, Kim HS, Kim JS. Microhomology-based choice of Cas9 nuclease target sites. *Nat Methods*. 2014;11(7):705-706. doi:10.1038/nmeth.3015
278. Kim S Il, Matsumoto T, Kagawa H, et al. Microhomology-assisted scarless genome editing in human iPSCs. *Nat Commun*. 2018;9(1):939. doi:10.1038/s41467-018-03044-y
279. Ansai S, Inohaya K, Yoshiura Y, et al. Design, evaluation, and screening methods for efficient targeted mutagenesis with transcription activator-like effector nucleases in medaka. *Dev Growth Differ*. 2014;56(1):98-107. doi:10.1111/dgd.12104
280. Blanpain C, Lee B, Tackoen M, et al. Multiple nonfunctional alleles of CCR5 are frequent in various human populations. *Blood*. 2000;96(5):1638-1645. doi:10.1182/blood.v96.5.1638
281. Tamasauskas D, Powell V, Saksela K, Yazdanbakhsh K. A homologous naturally occurring mutation in Duffy and CCR5 leading to reduced receptor expression. *Blood*. 2001;97(11):3651-3654. doi:10.1182/blood.V97.11.3651
282. Dong HF, Wigmore K, Carrington MN, Dean M, Turpin JA, Howard OMZ. Variants of CCR5, which are permissive for HIV-1 infection, show distinct functional responses to CCL3, CCL4 and CCL5. *Genes Immun*. 2005;6(7):609-619. doi:10.1038/sj.gene.6364247
283. Lee HJ, Kweon J, Kim E, Kim S, Kim JS. Targeted chromosomal duplications and inversions in the human genome using zinc finger nucleases. *Genome Res*. 2012;22(3):539-548. doi:10.1101/gr.129635.111
284. Birling MC, Schaeffer L, André P, et al. Efficient and rapid generation of large genomic variants in rats and mice using CRISMERE. *Sci Rep*. 2017;7(March):43331. doi:10.1038/srep43331

285. Kosicki M, Tomberg K, Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol.* 2018;36(8):765-771. doi:10.1038/nbt.4192
286. Lee HJ, Kim E, Kim JS. Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. *Genome Res.* 2010;20(1):81-89. doi:10.1101/gr.099747.109
287. Newrzela S, Cornils K, Li Z, et al. Resistance of mature T cells to oncogene transformation. *Blood.* 2008;112(6):2278-2286. doi:10.1182/blood-2007-12-128751
288. Bonini C, Grez M, Traversari C, et al. Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. *Nat Med.* 2003;9(4):367-369. doi:10.1038/nm0403-367
289. Newrzela S, Cornils K, Heinrich T, et al. Retroviral insertional mutagenesis can contribute to immortalization of mature T lymphocytes. *Mol Med.* 2011;17(11):1223-1232. doi:10.2119/molmed.2010.00193
290. Heinrich T, Rengstl B, Muik A, et al. Mature T-cell lymphomagenesis induced by retroviral insertional activation of Janus kinase 1. *Mol Ther.* 2013;21(6):1160-1168. doi:10.1038/mt.2013.67
291. Recchia A, Bonini C, Magnani Z, et al. Retroviral vector integration deregulates gene expression but has no consequence on the biology and function of transplanted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(5):1457-1462. doi:10.1073/pnas.0507496103
292. Scholler J, Brady TL, Gwendolyn Binder-Scholl W-TH, et al. Decade-Long Safety and Function of Retroviral-Modified Chimeric Antigen Receptor T-cells. *Sci Transl Med.* 2015;34(3):132ra53. doi:10.1126/scitranslmed.3003761.Decade-Long
293. Deeks SG, Wagner B, Anton PA, et al. A phase II randomized study of HIV-specific T-cell gene therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy. *Mol Ther.* 2002;5(6):788-797. doi:10.1006/mthe.2002.0611
294. Walker RE, Bechtel CM, Natarajan V, et al. Long-term in vivo survival of receptor-modified syngeneic T cells in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood.* 2000;96(2):467-474.
295. Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med.* 2017;9(374):eaaj2013. doi:10.1126/scitranslmed.aaj2013
296. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science.* 2020;367(6481):eaba7365. doi:10.1126/science.aba7365
297. Morrison C, Baer MR, Zandberg DP, Kimball A, Davila E. Effects of Toll-like receptor signals in T-cell neoplasms. *Futur Oncol.* 2011;7(2):309-320. doi:10.2217/fon.10.185
298. Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity.* 2005;23(2):165-175. doi:10.1016/j.immuni.2005.06.008
299. Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics-developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(10):759-780. doi:10.1038/nrd4278
300. Wu X, Brewer G. The Regulation of mRNA Stability in Mammalian Cells: 2.0. *Gene.* 2012;500(1):10-21. doi:10.1016/j.gene.2012.03.021.The
301. Wu Q, Medina SG, Kushawah G, et al. Translation affects mRNA stability in a codon-dependent manner in human cells. *Elife.* 2019;8:e45396. doi:10.7554/eLife.45396

302. Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, et al. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*. 2006;108(13):4009-4017. doi:10.1182/blood-2006-04-015024
303. Priesner C, Aleksandrova K, Esser R, et al. Automated Enrichment, Transduction, and Expansion of Clinical-Scale CD62L+ T Cells for Manufacturing of Gene Therapy Medicinal Products. *Hum Gene Ther*. 2016;27(10):860-869. doi:10.1089/hum.2016.091
304. Lock D, Mockel-Tenbrinck N, Drechsel K, et al. Automated Manufacturing of Potent CD20-Directed Chimeric Antigen Receptor T Cells for Clinical Use. *Hum Gene Ther*. 2017;28(10):914-925. doi:10.1089/hum.2017.111
305. Morales MJ, Münch N, Peter K, et al. Automated Clinical Grade Expansion of Regulatory T Cells in a Fully Closed System. *Front Immunol*. 2019;10:38. doi:10.3389/fimmu.2019.00038
306. Aleksandrova K, Leise J, Priesner C, et al. Functionality and Cell Senescence of CD4 / CD8-Selected CD20 CAR T Cells Manufactured Using the Automated CliniMACS Prodigy ® Platform. *Transfus Med Hemotherapy*. 2019;46:47-54. doi:10.1159/000495772
307. Tittlbach H, Schneider A, Strobel J, et al. GMP-production of purified human B lymphocytes for the adoptive transfer in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Transl Med*. 2017;15(1):228. doi:10.1186/s12967-017-1330-5
308. Skorska A, Müller P, Gaebel R, et al. GMP-conformant on-site manufacturing of a CD133+ stem cell product for cardiovascular regeneration. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):33. doi:10.1186/s13287-016-0467-0
309. Stewart SJ, Fujimoto J, Levy R. Human T lymphocytes and monocytes bear the same Leu-3(T4) antigen. *J Immunol*. 1986;136(10):3773 LP - 3778.
310. Zhen A, Krutzik SR, Levin BR, Kasparian S, Zack JA, Kitchen SG. CD4 Ligation on Human Blood Monocytes Triggers Macrophage Differentiation and Enhances HIV Infection. *J Virol*. 2014;88(17):9934-9946. doi:10.1128/jvi.00616-14
311. Jackson Z, Roe A, Sharma AA, et al. Automated Manufacture of Autologous CD19 CAR-T Cells for Treatment of Non-hodgkin Lymphoma. 2020;11:1941. doi:10.3389/fimmu.2020.01941
312. Fernández L, Fernández A, Mirones I, et al. GMP-Compliant Manufacturing of NKG2D CAR Memory T Cells Using CliniMACS Prodigy. *Front Immunol*. 2019;10:2361. doi:10.3389/fimmu.2019.02361
313. Zhu F, Shah N, Xu H, et al. Closed-system manufacturing of CD19 and dual-targeted CD20/19 chimeric antigen receptor T cells using the CliniMACS Prodigy device at an academic medical center. *Cytotherapy*. 2018;20(3):394-406. doi:10.1016/j.jcyt.2017.09.005
314. Mock U, Nickolay L, Philip B, et al. Automated manufacturing of chimeric antigen receptor T cells for adoptive immunotherapy using CliniMACS prodigy. *Cytotherapy*. 2016;18(8):1002-1011. doi:10.1016/j.jcyt.2016.05.009

## Anhang

Tabelle S1: Parameter für die *in silico* Berechnung von Off-Targets mittels dem Paired Target Finder.

	Homodimere TALEN	Heterodimere TALEN
<b>Genom</b>	Homo sapiens (promoterome)	Homo sapiens (promoterome)
<b>RVD 1</b>	NK HD NG NK NG HD NI NG HD NG HD NI NG HD NG NN	NK HD NG NK NG HD NI NG HD NG HD NI NG HD NG NN
<b>RVD 2</b>	NI NN NI NG NN NG HD NI NK NG HD NI NG NK HD NG HD NG	NI NN NI NG NN NG HD NI NK NG HD NI NG NK HD NG HD NG
<b>Spacer-Länge</b>	15 - 30	10 - 30
<b>Score cut off</b>	4.0	4.0
<b>1. RVD</b>	T oder C	T oder C
<b>Dimertyp</b>	beide	nur Heterodimere
<b>Scoring Matrix</b>	Doyle et al.	Doyle et al.

Tabelle S2: Parameter für die *in silico* Berechnung von Off-Targets mittels dem PROGNOS.

	Homodimere TALEN	Heterodimere TALEN
<b>Nuklease-Typ</b>	TALEN	TALEN
<b>Sequenzeingabe</b>	Komplementäre Stränge	Komplementäre Stränge
<b>RVD-Sequenz links</b>	01NK02HD03NG04NK05NK06NG07 HD08NI09NG10HD11HD12NG13HD 14NI15NG16HD17HD18NG19NN	01NK02HD03NG04NK05NK06NG07 HD08NI09NG10HD11HD12NG13HD 14NI15NG16HD17HD18NG19NN
<b>RVD-Sequenz rechts</b>	01NI02NN03NI04NG05NN06NG07H D08NI09NK10NG11HD12NI13NG14 NK15HD16NG17HD18NG19NG	01NI02NN03NI04NG05NN06NG07H D08NI09NK10NG11HD12NI13NG14 NK15HD16NG17HD18NG19NG
<b>Fehlpaarungen</b>	7	7
<b>Spacer-Länge</b>	10-30	10-30
<b>Homodimer</b>	Ja	Nein
<b>Genom</b>	Human (hg19)	Human (hg19)

Tabelle S3: Ergebnisse der *in silico* Berechnung von Off-Targets mittels dem Paired Target Finder und PROGNOS für die homodimere CCR5-Uco-TALEN innerhalb der ersten 10 Ränge.

Rang	Paired Target Finder – nur T	Prognos RVD - nur T	Prognos RVD - advanced	Prognos RVD - all	Paired Target Finder - all
1	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5
2	CCR2	CCR2	CCR5	CCR2	CCR2
3	RAPGEF2	RAPGEF2	CCR2	LDOC1	RAPGEF2
4	MUC16	GPC5	LDOC1	SPANXA2	LARGE
5	GPC5	VWA8	SPANXA2	RAPGEF2	MUC16
6	VWA8	BRS3	RBMV1A3P	RBMV1A3P	KIRREL
7	BRS3	LINC00534	RAPGEF2	TTY13	EPM2A
8	ARHGAP6	TMTC2	UBXN10	LRRC7	IQSEC2
9	SEMA3C	SEMA3C	LRRIQ3	RTN1	GPC5
10	IFNE	ARHGAP6	TTY13	KIRELL	VWA8

**Tabelle S4: Ergebnisse der *in silico* Berechnung von Off-Targets mittels dem Paired Target Finder und PROGNOSE für die heterodimere CCR5-Uco-TALEN innerhalb der ersten 15 Ränge.**

Rang	Paired Target Finder – T oder C	Prognos – nur T	Prognos RVD - advanced	Prognos RVD – T oder C
1	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5
2	CCR2	CCR2	CCR2	CCR2
3	CACNA1B	MAT2B	HS6ST3	MAT2B
4	ASIC-202	UBXN10	LRRIQ3	UBXN10
5	SAMD12	LRRIQ3	ADCY2	LRRIQ3
6		ADCY2	CSNK1G2	SAMD12
7		SAMD12	EPHA7	GLP1R
8		MTM1	MTM1	LOC286114
9		CLVS1	AGBL3	LPHN2
10		GLP1R	FAM41AY1	KLHL4
11		LOC286114	DPP10	PGC
12		EIF3IP1	EIF3IP1	NEK11
13		LPHN2	TMTC2	LOC100124692
14		KLHL4	CXCR6	ARHGAP10
15		AACS	DAOA-AS1	FMN1

**Tabelle S5: Ausgewählte Off-Targets der homodimeren CCR5-Uco-TALEN für die ampNGS.**

Genlokus	Fehlpaarung (links/rechts)	Chromosom	TALEN 1	TALEN 2	Arm
CCR2	3/3	3	TGCTGGTCGT CCTCATCTTA	TTCACGAACT GACTGTAAAT	L+R
MUC16	5/5	19	TGCATGTCCT CCTCATACTT	CTTCAACTCC CACTTGTCGT	L
VWA8	7/4	13	TAAATGTCAG CTCTGCACAC	ATCTCGTAAT GACCGTAGGT	R
KIRREL	7/4	11	CAGTTCTCAG CAATGTACTT	ATCGTGTACT GACTGTAGAC	R
GPC5	6/6	13	TAAACATCAGT CTAGATCTT	AACCTGTACT AACTGTAAAT	R
IQSEC2	5/7	X	CACATGTCTG TCCTGCTTTT	GTTTCGTACT GTCGATAAAC	R
BRS3	5/5	X	TAGCTGTCAG GCATGTGCAT	TTCCCGTAAA GACGGAAGAT	R
RAPGEF2	5/6	4	TAAAAATCAGT TATGCTCAT	TACTCGTCTT GACTAAAAAT	R
LDOC1	3/6	X	CAAATGTCAG TCATGCACTT	TTCTGGTACTA ACTAATGTT	R
SEMA3C	5/5	7	TAGAACTCAG TGCTGCTCTG	TTGGTGTCAG CCAAGCTCTG	R

Tabelle S6: Ausgewählte Off-Targets der homodimeren CCR5-Uco-TALEN für die ampNGS.

Genlocus	Fehlpaarung -links/rechts	Chromo- -som	TALEN 1	TALEN 2
CCR2	3/3	3	TGCTGGTCATCCTCATC CTG	AAGAGCATGACTGACAT CTA
CXCR6	7/5	3	TGCTGGTCGTCCTCATC TTA	AAGTGCTTGACTGACATT TA
GLP1R	5/5	6	TGCTGGTCATATCCATCT TC	CAGAGCCTGACGGATGT GTT
CACNA1B	7/6	9	TTCGGGTCATCTGCATC GTG	ATGTGCAAGACAGACAT CAA
ASIC-202	5/8	17	CAGCCTTAAGACATGCT CCT	CCCTGGCCATCCTCCTG CTC
SAMD12	6/4	8	TTCTTGTCATCATCATCA TA	TCAATGCCAGACCAGAT CTC
ADCY2	5/4	5	TGTAAGTCAGACATTCTC AT	TGTTAGCCTTCCTCATCC TG
PGC	7/4	6	TGCGGGTGAGCCTCATC CAT	AAGAGAAAGACTGAAAT CTC
MAT2B	7/3	5	TTGTTGTGGGCCCCATC CTG	AACAGCATTCTGGCAT CTA
UBXN10	7/3	1	TATCTGGAGACCATGCT CTT	CAGGATGGAGGTGACCA GCA

Tabelle S7: Für ampNGS verwendeten Proben aus den Experimenten im Labormaßstab.

Proben- number	Spender	Zell- type	Zytokine	Dimertyp	Arm	mRNA- Menge	mRNA- Produktion
1	B	PBMCs	IL-2	Homodimer	L	10 µg	eigene
2	E				L	10 µg	eigene
3	A				L+R	10 µg	eigene
4	A				L+R	20 µg	eigene
5	B				L+R	10 µg	eigene
6	B				L+R	10 µg	eigene
7	C				L+R	10 µg	eigene
8	D				L+R	10 µg	eigene
9	E				L+R	10 µg	eigene
10	E				L+R	10 µg	eigene
11	2	CD4 <sup>+</sup>	IL-15 + IL-7	Heterodimer	Keiner	-	-
12	3	PBMCs	IL-2		Keiner	-	-
13	4	PBMCs	IL-2		L+R	10 µg	eigene
14	5	PBMCs	IL-2		L+R	5 µg	eigene
15	3	PBMCs	IL-2		L+R	20 µg	eigene
16	2	CD4 <sup>+</sup>	IL-15 + IL-7		L+R	5 µg	BioNTech
17	2	CD4 <sup>+</sup>	IL-15 + IL-7		L+R	7,5 µg	BioNTech
18	2	CD4 <sup>+</sup>	IL-15 + IL-7		L+R	10 µg	BioNTech
19	6	CD4 <sup>+</sup>	IL-2		L+R	10 µg	eigene

**Tabelle S8: Angaben zum Lokustyp und Position im humanen Genom für die untersuchten On- und Off-Targets der CCR5-Uco-TALEN.** Die Positionen im Genomlokus wurde über das webbasierte Programm Ensemble im humanen Genom (GRCh38.p4 und 13) ermittelt.

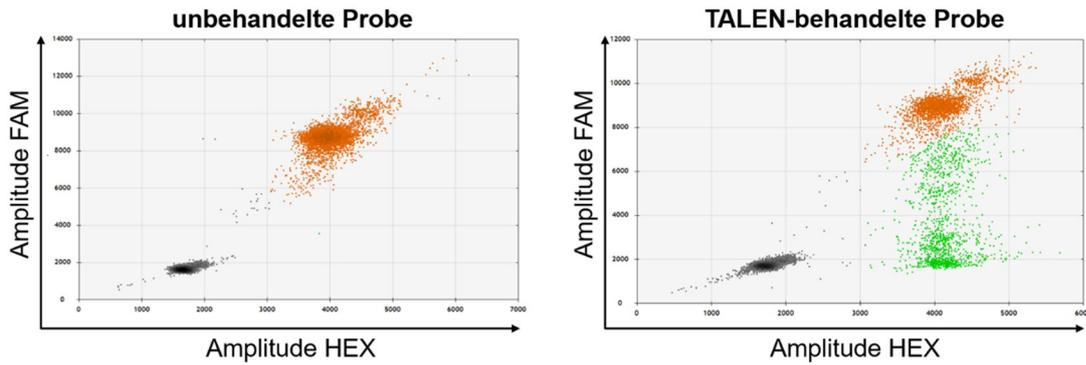
Genlokus	Lokustyp	Genomlokus TALEN 1 nach Ensembl	Genomlokus TALEN 2 nach Ensembl
CCR5	Exon	3:46373047-46373067	3:46373085-46373105
CCR2	Exon	3:46357708-46357728	3:46357746-46357766
MUC16	Exon	19:8907812-8907832	19:8907847-8907867
VWA8	Intron	13:41704215-41704235	13:41704259-41704279
KIRREL	Intron	11:126960010-126960030	11:126960047-126960067
GPC5	Intron	13:91520343-91520363	13:91520379-91520399
IQSEC2	Intron	X:53258265-53258285	X:53258306-53258326
BRS3	Intergenetisch	X:136470544-136470564	X:136470589-136470609
RAPGEF2	Intergenetisch	4:159928614-159928634	4:159928654-159928674
LDOC1	Intergenetisch	X:141096898-141096918	X:141096933-141096953
SEMA3C	Intergenetisch	7:81141123-81141143	7:81141166-81141186

**Tabelle S9: Angaben zum Lokustyp und Position im humanen Genom für die untersuchten On- und Off-Targets der heterodimeren CCR5-Uco-hetTALEN.** Die Positionen im Genomlokus wurde über das webbasierte Programm Ensemble im humanen Genom (GRCh38.p4 und 13) ermittelt.

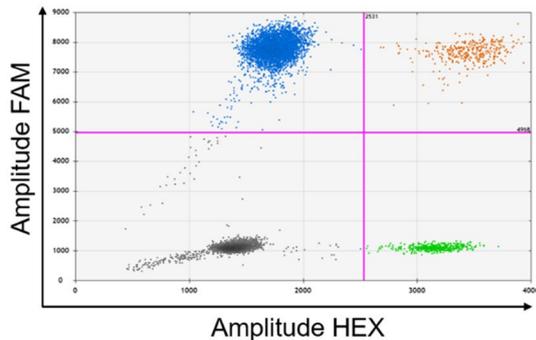
Genlokus	Lokustyp	Genomlokus TALEN 1 nach Ensembl	Genomlokus TALEN 2 nach Ensembl
CCR5	Exon	3:46373047-46373067	3:46373085-46373105
CCR2	Exon	3:46357708-46357728	3:46357746-46357766
CXCR6	Exon	3: 45988128 - 45988147	3: 45988160 - 45988179
GLP1R	Exon	6: 39046907 - 39046926	6: 39046951 - 39046970
CACNA1B	Intron	9: 140808143 - 140808162	9: 140808191 - 140808210
ASIC-202	Intron	17: 31957835 - 31957854	17: 31957879 - 31957898
SAMD12	Intron	8: 119526689 - 119526708	8: 119526731 - 119526750
ADCY2	Intron	5: 7668370 - 7668389	5: 7668405 - 7668424
PGC	Promotor	6: 41715530 - 41715549	6: 41715567 - 41715586
MAT2B	Intergenetisch	5: 163063841 - 163063860	5 163063880 - 163063899
UBXN10	Intergenetisch	1: 20565574 - 20565593	1: 20565618 - 20565637

**Tabelle S10: Parameter für das webbasierte Programm CRIPRESSO2.0**

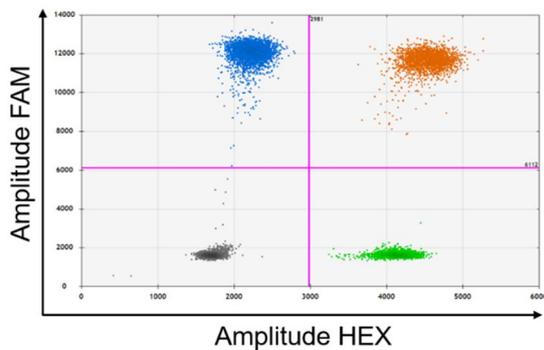
Parameter	Einstellung
<i>Editing Tool</i>	<i>Costum</i>
<i>Sequencing design</i>	<i>Paired end reads</i>
<i>Homology</i>	50 %
<i>Quantification</i>	<i>Center -10</i>
	<i>Window size 30</i>
<i>Quality</i>	<i>Average &gt;20</i>
	<i>Single &gt;10</i>
	<i>Base replacement (No Filter)</i>
	<i>Exclude bp disabled</i>
	<i>No Timming</i>



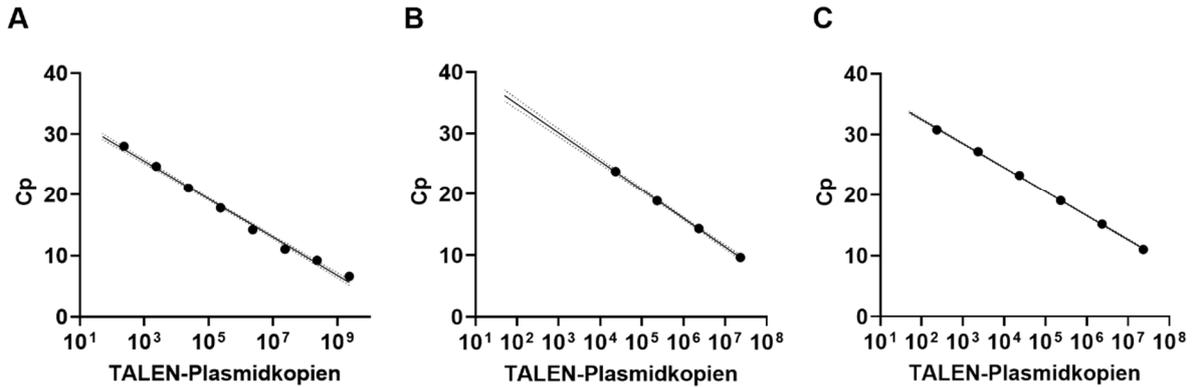
**Abbildung S1: Auswertung der Proben aus der GEF-dPCR anhand von zwei Beispielplots.** Beide Graphen (links unbehandelte Probe; rechts TALEN-behandelte Probe) zeigen die Ergebnisse einer GEF-dPCR am *CCR5*-Lokus. Aufgetragen ist die Amplitude des HEX- (Referenzsonde) gegen die Amplitude des FAM-Kanals (Indel-Sonde). Die grauen Punkte stehen für negative Tröpfchen, die orangefarbenen Punkte für doppelt-positive Tröpfchen und die grünen Punkte für HEX-positive, FAM-negative Tröpfchen.



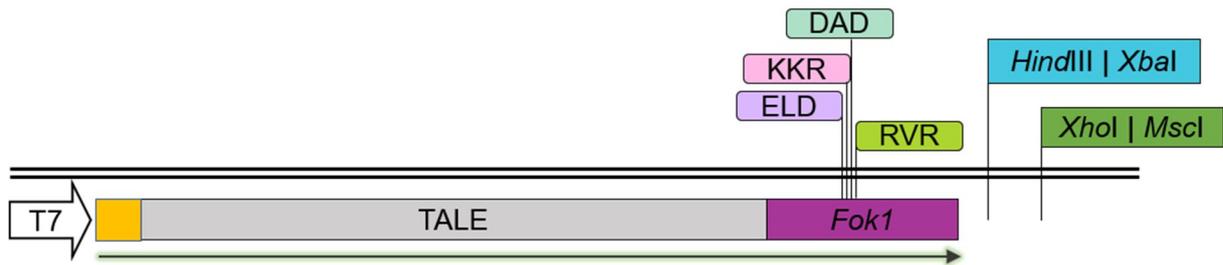
**Abbildung S2: Beispielplot für die Auswertung der Proben aus der ddPCR für den Nachweis von chromosomalen Aberrationen.** Der Graph zeigt das Ergebnis einer ddPCR zur Detektion von chromosomalen Aberrationen am *CCR5*- und *EPOR*-Lokus. Aufgetragen ist die Amplitude des HEX- (Aberration) gegen die Amplitude des FAM-Kanals (*EPOR*). Die grauen Punkte stehen für negative Tröpfchen, die orangefarbenen Punkte für doppelt-positive Tröpfchen, die blauen Punkte für FAM-positive Tröpfchen und die grünen Punkte für HEX-positive.



**Abbildung S3: Beispielplot für die Auswertung der Proben aus der ddPCR für den Nachweis der relativen Kopienzahlen (RCN).** Der Graph zeigt das Ergebnis einer ddPCR zur Bestimmung der RCN am *CCR5*- und *EPOR*-Lokus. Aufgetragen ist die Amplitude des HEX- (*CCR5*) gegen die Amplitude des FAM-Kanals (*EPOR*). Die grauen Punkte stehen für negative Tröpfchen, die orangefarbenen Punkte für doppelt-positive Tröpfchen, die blauen Punkte für FAM-positive Tröpfchen und die grünen Punkte für HEX-positive.



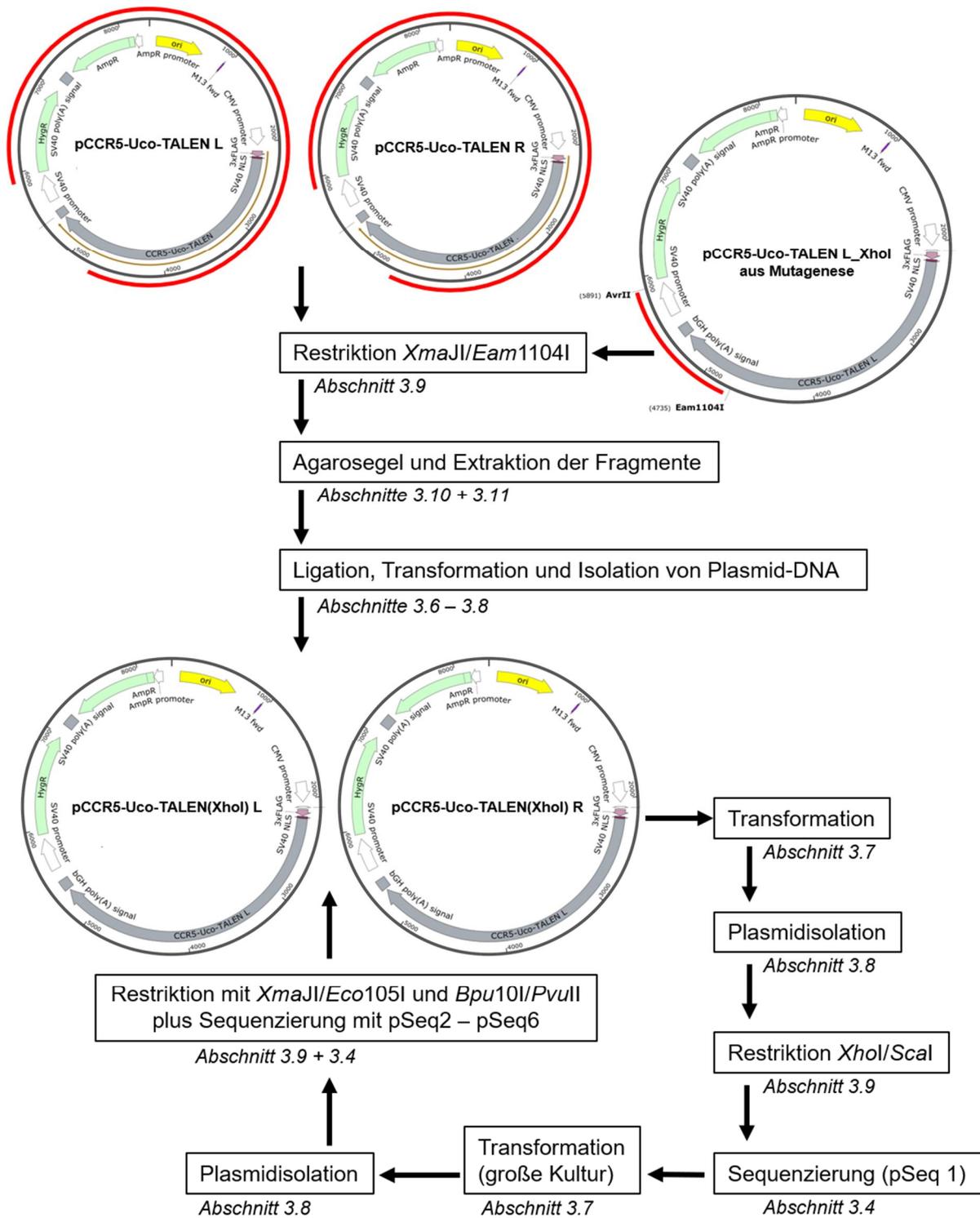
**Abbildung S4: Standardkurven der CCR5-Uco-hetTALEN Plasmid-Verdünnungsreihen zum Nachweis von CCR5-Uco-hetTALEN mRNA und Plasmid.** Die Verdünnungsreihe der CCR5-Uco-hetTALEN Plasmide L+R wurde in einer bestimmten Konzentration angesetzt und in Triplikaten in der jeweiligen RT-qPCR eingesetzt. Die (Semilog) Linie wurde durch eine nichtlineare Regression mittels der geringsten quadratischen Methode in GraphPad Prism 8.4.3 an die Datenpunkte angepasst. Gepunktete Linien stellen die Vorhersagelinien mit einem Konfidenzintervall von 95 % an. (A) qPCR zur Detektion von CCR5-Uco-hetTALEN mit Primern hetTALEN1 und hetTALEN2. R<sup>2</sup>-Wert = 0,9921. (B) qPCR zum Nachweis von CCR5-Uco-hetTALEN Plasmid in cDNA-Proben mit Primern KanR1 und KanR2. R<sup>2</sup>-Wert = 0,9959. (C) qPCR zum Nachweis von CCR5-Uco-hetTALEN Plasmid in gDNA-Isolaten mit Primern KanR1 und KanR2. R<sup>2</sup>-Wert = 0,9993.



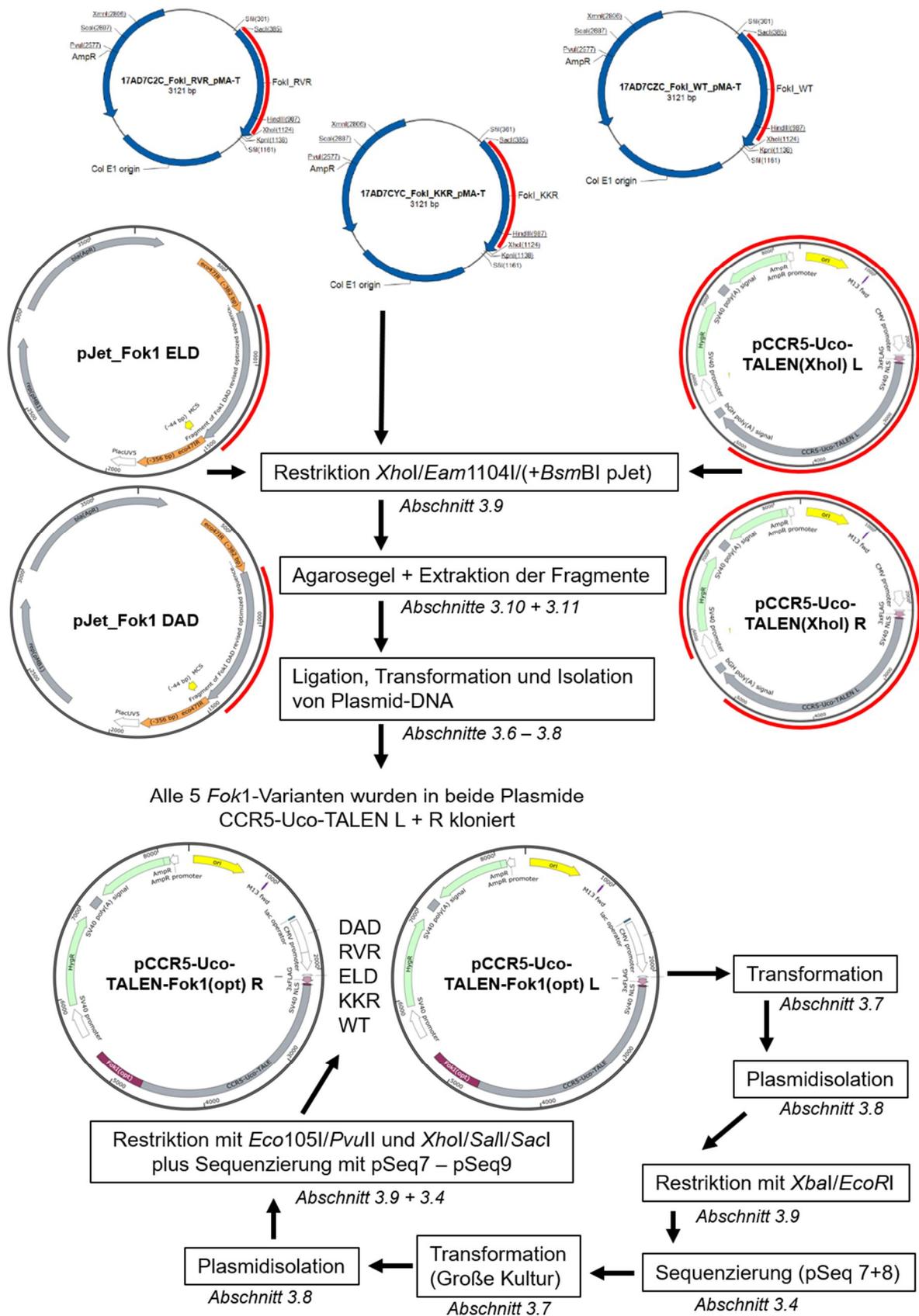
**Abbildung S5: Schematische Darstellung der CCR5-Uco-TALEN im Vektor.** Vor dem Transkript befindet sich ein T7-Promotor zur *in vitro* Transkription vom mRNA. Die CCR5-Uco-TALEN enthält das TALE-Protein (DNA-Bindedomäne) und die Sequenz der Fok1. Markiert sind die Mutationsstellen für die heterodimeren Fok1-Varianten. Hinter der Fok1 wurden zusätzliche Restriktionsschnittstellen wie markiert eingefügt.

Tabelle S11: Sequenzen der eingefügten DNA-Fragmente mit den codonoptimierten *Fok1*-Varianten

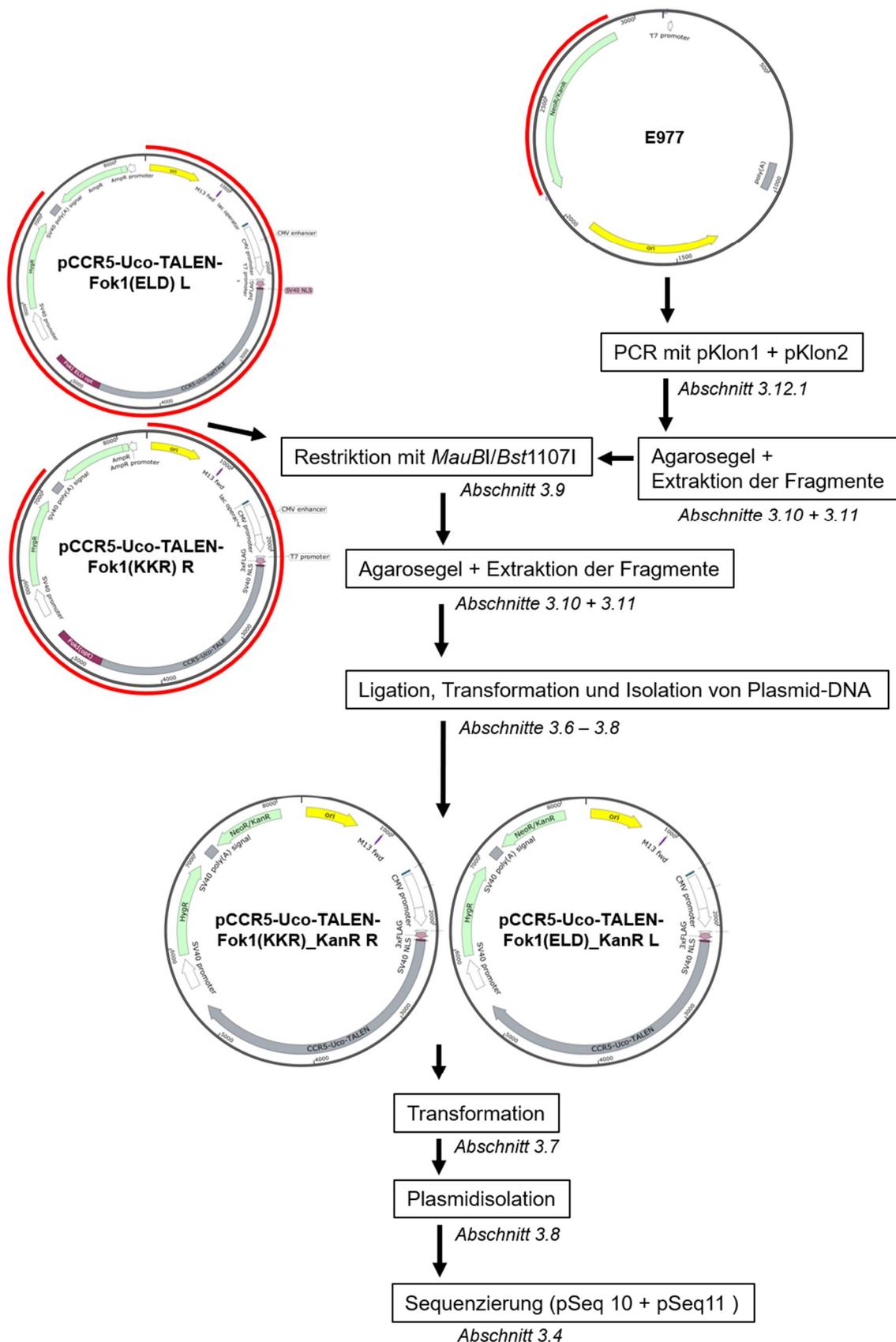
Variante	Sequenz
WT	CAACTCGTGAAGAGTGAAC TTGAGGAGAAGAAGTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGA AATACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCAGAAACAGCACCCA GGACAGAATCCTGGAAATGAAGGTCATGGAGTTCTTTATGAAGGTGTACGGCTACC GGGGCAAGCACCTCGGAGGATCACGAAAGCCTGACGGCGCCATCTATAACCGTGGG CAGCCCTATTGATTACGGCGTGATCGTGGATACCAAGGCCTACAGCGGCGGCTAC AATCTGCCTATCGGGCAGGCCGACGAGATGCAGAGATACGTGGAAGAAAACCAGA CACGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAAGTGTACCCACAGCAGCGT GACCGAGTTCAAGTTCCTGTTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCC AGCTGACCCGGCTGAACCACATCACA AATTGCAACGGCGCTGTGCTGTCTGTGGAA GAACTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGAACACTGACACTGGAAGAAG TGCGGCGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCCGGTCCTGA
DAD	CAACTCGTGAAGAGTGAAC TTGAGGAGAAGAAGTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGA AATACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCAGAAACAGCACCCA GGACAGAATCCTGGAAATGAAGGTCATGGAGTTCTTTATGAAGGTGTACGGCTACC GGGGCAAGCACCTCGGAGGATCACGAAAGCCTGACGGCGCCATCTATAACCGTGGG CAGCCCTATTGATTACGGCGTGATCGTGGATACCAAGGCCTACAGCGGCGGCTAC AATCTGCCTATCGGGCAGGCCGACGAGATGCAGGACTACGTGGAAGAAAACCAGA CCAGAGACAAGCACGCAATCCTAACGAGTGGTGGAAAGTGTACCCACAGCAGCGT GACCGAGTTCAAGTTCCTGTTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCC AGCTGACCCGGCTGAACCACATCACA AATTGCAACGGCGCTGTGCTGTCTGTGGAA GAACTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGAACACTGACACTGGAAGAAG TGCGGCGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCCGGTCCTGA
ELD	CAACTCGTGAAGAGTGAAC TTGAGGAGAAGAAGTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGA AATACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCAGAAACAGCACCCA GGACAGAATCCTGGAAATGAAGGTCATGGAGTTCTTTATGAAGGTGTACGGCTACC GGGGCAAGCACCTCGGAGGATCACGAAAGCCTGACGGCGCCATCTATAACCGTGGG CAGCCCTATTGATTACGGCGTGATCGTGGATACCAAGGCCTACAGCGGCGGCTAC AATCTGCCTATCGGGCAGGCCGACGAGATGGAACGCTACGTGGAAGAAAACCAGA CCAGGGACAAGCACCTGAATCCTAACGAGTGGTGGAAAGTGTACCCACAGCAGCGT GACCGAGTTCAAGTTCCTGTTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCC AGCTGACCCGGCTGAACCACATCACA AATTGCAACGGCGCTGTGCTGTCTGTGGAA GAACTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGAACACTGACACTGGAAGAAG TGCGGCGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCCGGTCCTGA
KKR	CAACTCGTGAAGAGTGAAC TTGAGGAGAAGAAGTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGA AATACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCAGAAACAGCACCCA GGACAGAATCCTGGAAATGAAGGTCATGGAGTTCTTTATGAAGGTGTACGGCTACC GGGGCAAGCACCTCGGAGGATCACGAAAGCCTGACGGCGCCATCTATAACCGTGGG CAGCCCTATTGATTACGGCGTGATCGTGGATACCAAGGCCTACAGCGGCGGCTAC AATCTGCCTATCGGGCAGGCCGACGAGATGCAGAGATACGTGAAAGAGAACCAGA CACGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAAGTGTACCCACAGCAGCGT GACCGAGTTCAAGTTCCTGTTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCC AGCTGACCCGGCTGAACAGGAAGACAAATTGCAACGGCGCTGTGCTGAGCGTGGA AGA ACTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGAACACTGACACTGGAAGAA GTGCGGCGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCCGGTCCTGA
RVR	CAACTCGTGAAGAGTGAAC TTGAGGAGAAGAAGTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGA AATACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCAGAAACAGCACCCA GGACAGAATCCTGGAAATGAAGGTCATGGAGTTCTTTATGAAGGTGTACGGCTACC GGGGCAAGCACCTCGGAGGATCACGAAAGCCTGACGGCGCCATCTATAACCGTGGG CAGCCCTATTGATTACGGCGTGATCGTGGATACCAAGGCCTACAGCGGCGGCTAC AATCTGCCTATCGGGCAGGCCGAGAGATGCAGAGATACGTGGAAGAAAACCAGA CACGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAAGTGTACCCACAGCAGCGT GACCGAGTTCAAGTTCCTGTTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCC AGCTGACCCGGCTGAACAGAGTGACAAATTGCAACGGCGCTGTGCTGAGCGTGGA AGA ACTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGAACACTGACACTGGAAGAA GTGCGGCGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCCGGTCCTGA



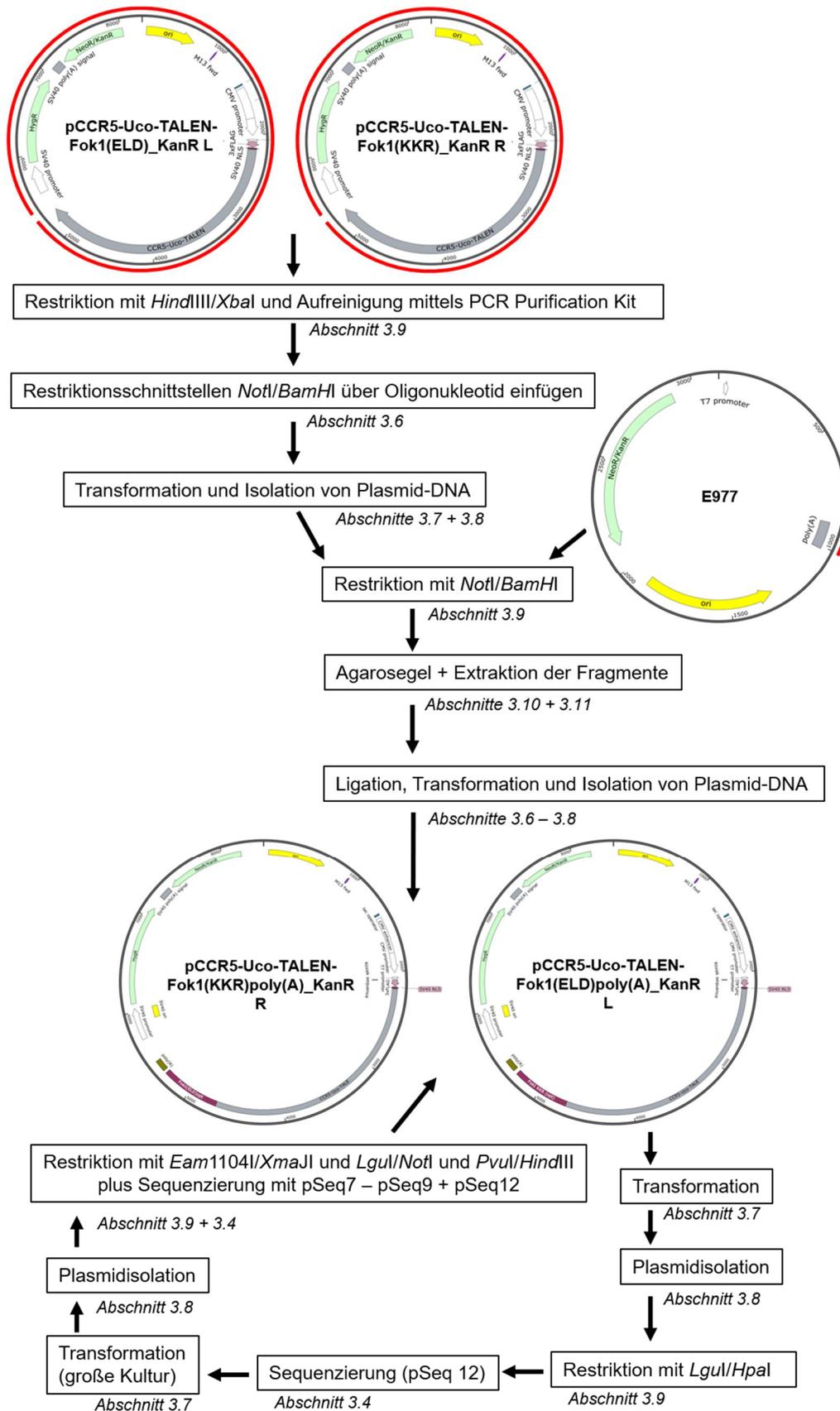
**Abbildung S6: Darstellung der Klonierung einer XhoI-Schnittstelle in die TALEN-Plasmide zur nachfolgenden Einführung einer codonoptimierten FokI-Variante.** Nach der PCR-basierten Mutagenese zur Einführung der XhoI-Schnittstelle, wurde das Fragment aus diesem Vektor zwischen den Restriktionsschnittstellen XmaJI und Eam1104I ausgeschnitten und in die Plasmide pCCR5-Uco-TALEN L und pCCR5-Uco-TALEN R wie dargestellt eingefügt, da durch die PCR im Plasmid pCCR5-Uco-TALEN\_XhoI auf Grund der Mutagenese Mutationen in der TALEN entstanden sein könnten. Die roten Ränder markieren die ausgeschnittenen Bereiche der Plasmide, die für die Ligation verwendet wurden.



**Abbildung S7: Darstellung der Klonierung für die Einführung der *FokI*-Varianten in die CCR5-Uco-TALEN.** Alle 5 *FokI*-Varianten (DAD, RVR, ELD, KKR und WT) wurden in beide Plasmide pCCR5-Uco-TALEN\_Xho L und pCCR5-Uco-TALEN\_Xho über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *Eam1104I* wie dargestellt eingefügt. Die roten Ränder markieren die ausgeschnittenen Bereiche der Plasmide, die für die Ligation verwendet wurden.



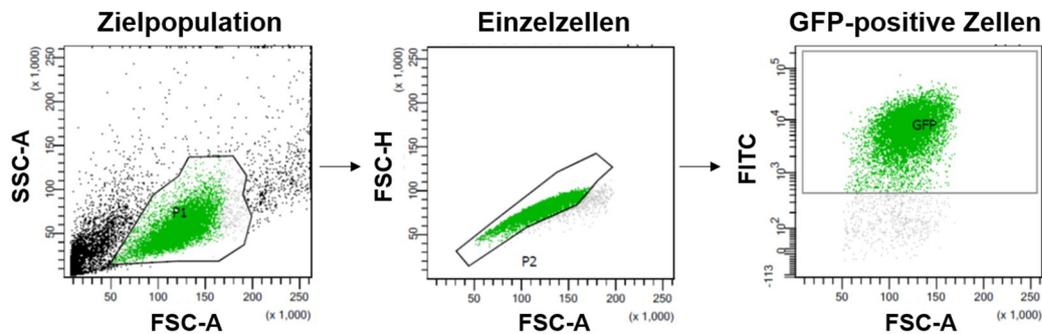
**Abbildung S8: Austausch des Ampicillinresistenzgens in den CCR5-Uco-hetTALEN Plasmiden (pCCR5-Uco-TALEN-Fok1(ELD) L und pCCR5-Uco-TALEN-Fok1(KKR) R) gegen ein Kanamycinresistenzgen. Das Kanamycinresistenzgen im Vektor E977 wurde über eine PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *MauBI* und *Bst1107I* in die angegebenen Plasmide kloniert. Die roten Ränder markieren die Bereiche der Plasmide, die für die Ligation verwendet wurden.**



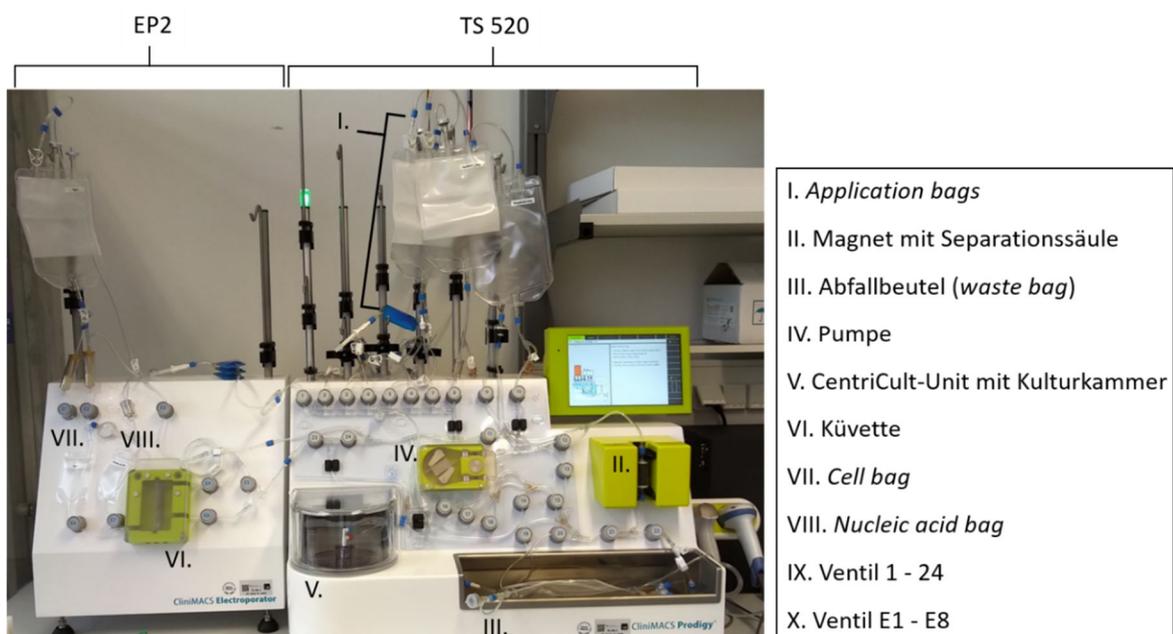
**Abbildung S9:** Einführung einer Poly(A)-Sequenz in die CCR5-Uco-hetTALEN Plasmide (pCCR5-Uco-TALEN-Fok1(ELD)\_KanR L und pCCR5-Uco-TALEN-Fok1(KKR)\_KanR R). Für die Klonierung mussten die *NotI* und *BamHI*-Restriktionsschnittstellen in die Plasmide pCCR5-Uco-TALEN-Fok1(ELD)\_KanR L und pCCR5-Uco-TALEN-Fok1(KKR)\_KanR R über Oligonukleotide eingefügt werden. Anschließend wurde die Poly(A)-Sequenz aus dem Vektor E977 über die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *BamHI* in die neuen Plasmide kloniert. Die roten Ränder markieren die Bereiche der Plasmide, die für die Ligation verwendet wurden.

**Tabelle S12: Angaben zu den Proben bezüglich der verwendeten GFP-mRNA-Menge und dem Medium.**  
Alle Proben für die ampNGS sind extra aufgeführt.

Experiment	Abschnitt	Zelltyp	GFP-mRNA pro Elektroporation	Verwendetes Medium
Dosiseffekt	4.1.1	PM1	2 µg	T-Zell Medium I
Dosiseffekt	4.1.1	aktivierte PBMCs	2 µg	T-Zell Medium II
schHRMCA	4.1.2	aktivierte PBMCs	1 µg	T-Zell Medium II
<i>Fok1</i> -Varianten	4.2.1	PM1, Jurkat	2 µg	T-Zell Medium I
<i>Fok1</i> -Varianten	4.2.1	aktivierte PBMCs	1 µg	T-Zell Medium II
Poly(A)-Test	4.2.2	aktivierte PBMCs	1 µg	T-Zell Medium II
Titration	4.2.3	aktivierte PBMCs	2 µg	T-Zell Medium III
Titration	4.2.3	CD4 <sup>+</sup> Zellen	2 µg	T-Zell Medium III
hetTALEN	4.3	CD4 <sup>+</sup> Zellen	/	T-Zell Medium IV



**Abbildung S10: Gating-Strategie zum durchflusszytometrischen Nachweis der GFP-Expression nach einer Elektroporation mit GFP-mRNA.** Die Zielpopulation wurde in einem Dotplot über die Fläche des Seitwärts- (SSC) und Vorwärtsstreuung (FSC) markiert. Anschließend wurden aus diesen Zellen doppelte Zellen ausgeschlossen, indem die Fläche des FSC gegen die Höhe des FSC aufgetragen wurde. Die Einzelzellen wurden danach auf die Expression von GFP im FITC-Kanal untersucht.



**Abbildung S11: Abbildung des CliniMACS Prodigy und dem CliniMACS Electroporator mit installiertem Tubing Set TS 520 und EP2.**

Tabelle S13: Aktivitätsmatrix für den TCE-Prozess.

Tag	Aktivität	Einstellung
0	<i>Activate shaker</i>	<i>Type 2</i>
1	<i>Feed Medium</i>	30 ml
3	<i>Electroporation</i> <i>Set temperature</i>	Ep.v. 20 ml, r.v. 66 ml 33°C
4	<i>Culture wash</i> <i>Activate shaker</i> <i>Set temperature</i>	<i>1 cycle</i> <i>Type 2</i> 39°C
5	<i>Media exchange</i> <i>Activate shaker</i>	-125 ml / +175 ml <i>Type 3</i>
6	<i>Media exchange</i>	-125 ml / +125 ml
7	<i>Culture wash</i>	<i>1 cycle</i>
8	<i>Media exchange</i>	-180 ml / +180 ml
9	<i>Media exchange</i>	-180 ml / +180 ml
10	<i>Media exchange</i>	-180 ml / +180 ml
11	<i>Media exchange</i>	-180 ml / +180 ml
12	<i>Harvest</i>	<i>Type 1</i>

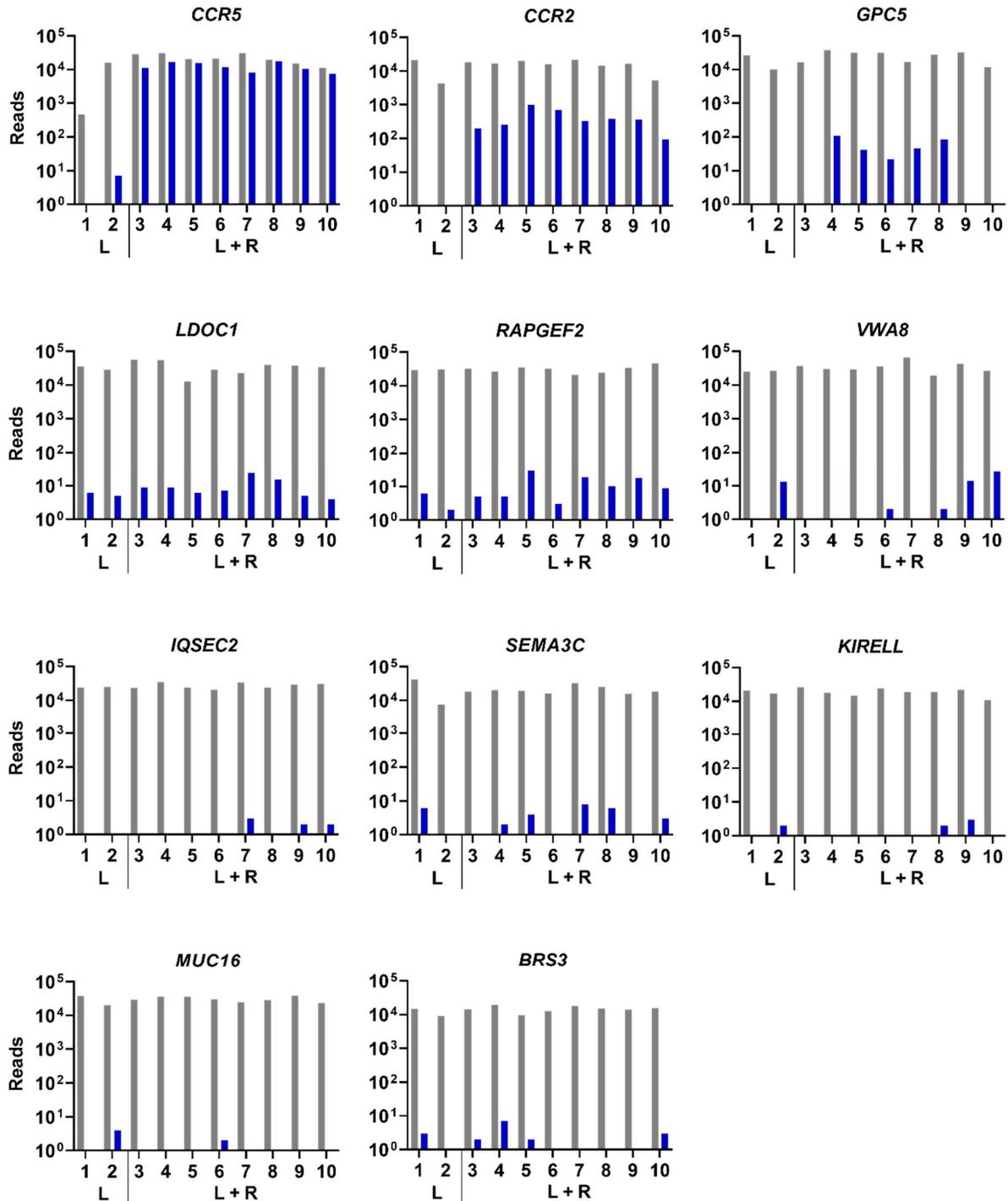
Ep.v = Elektroporationsvolumen (Zellsuspension); r.v = recovery volume (Vorgelegte Mediummenge)

Tabelle S14: Zellzahlen und mRNA-Mengen für die TCE-Prozesse

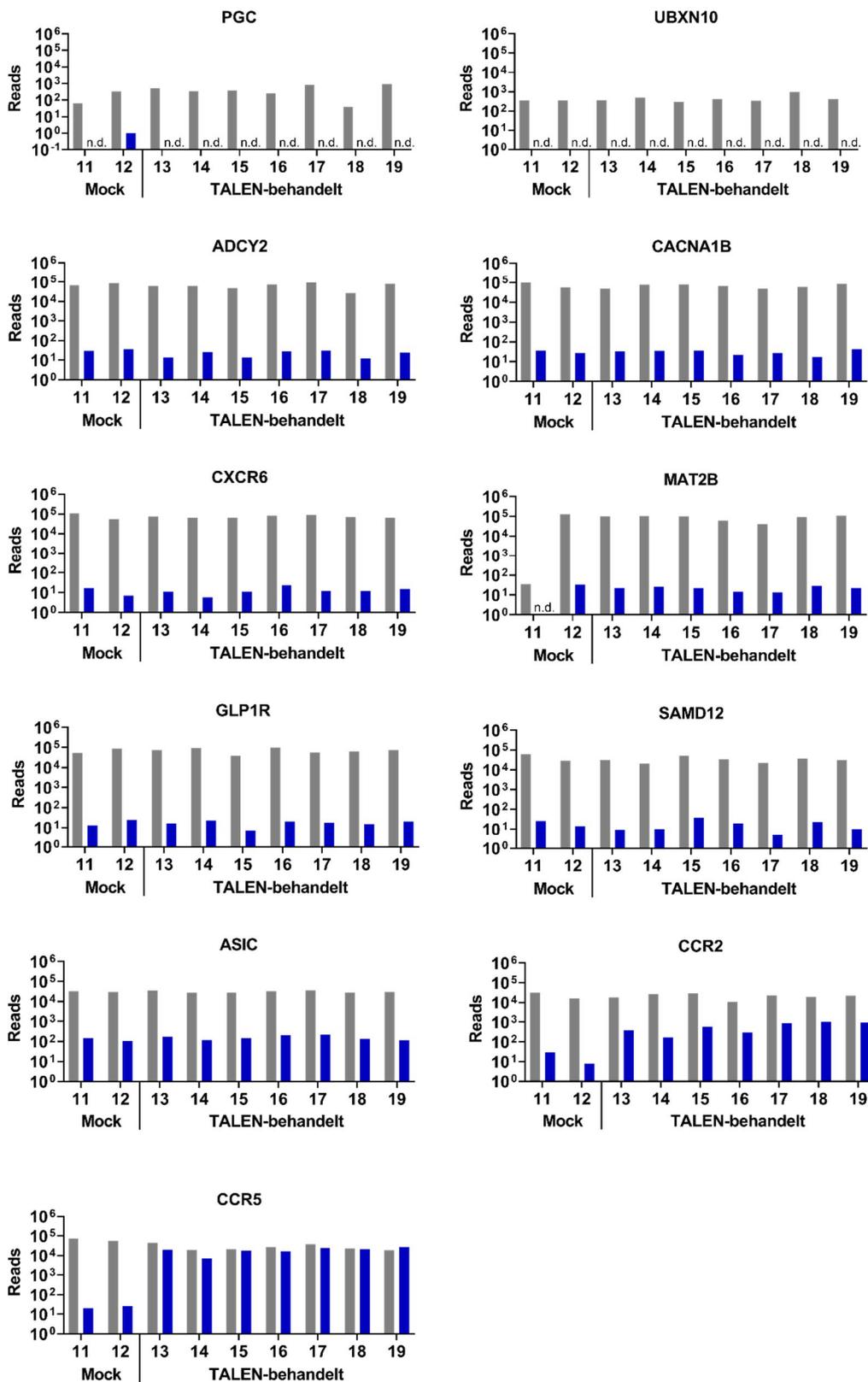
Lauf	Startzellzahl	mRNA
1	2,0x10 <sup>8</sup> Zellen	720 µg pro Arm
2	2,0x10 <sup>8</sup> Zellen	600 µg pro Arm
3	2,0x10 <sup>8</sup> Zellen	600 µg pro Arm
4	1,4x10 <sup>8</sup> Zellen	240 µg pro Arm

Tabelle S15: Elektroporationsparameter für den TCE-Prozess am CliniMACS Prodigy.

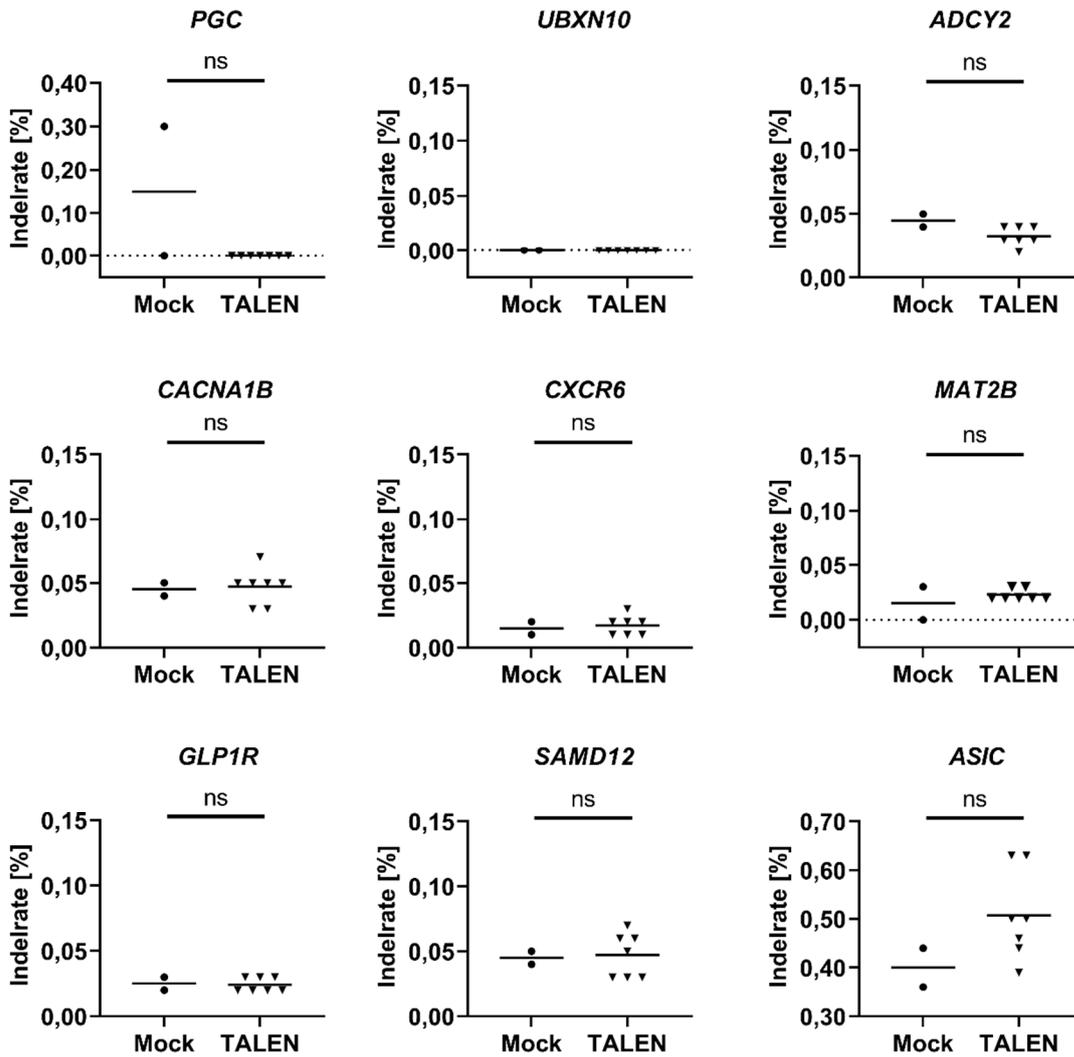
Puls	Parameter	Einstellung
1	Spannung ( <i>voltage</i> )	600 V
	Pulslänge ( <i>pulse length</i> )	120 µs
	Betriebsart ( <i>mode</i> )	<i>Burst</i>
	Richtung ( <i>direction</i> )	bipolar
	Burstlänge ( <i>burst length</i> )	8 µs
2	Spannung ( <i>voltage</i> )	500 V
	Pulslänge ( <i>pulse length</i> )	1000 µs
	Einstellung ( <i>mode</i> )	<i>Burst</i>
	Burstlänge ( <i>burst length</i> )	8 µs



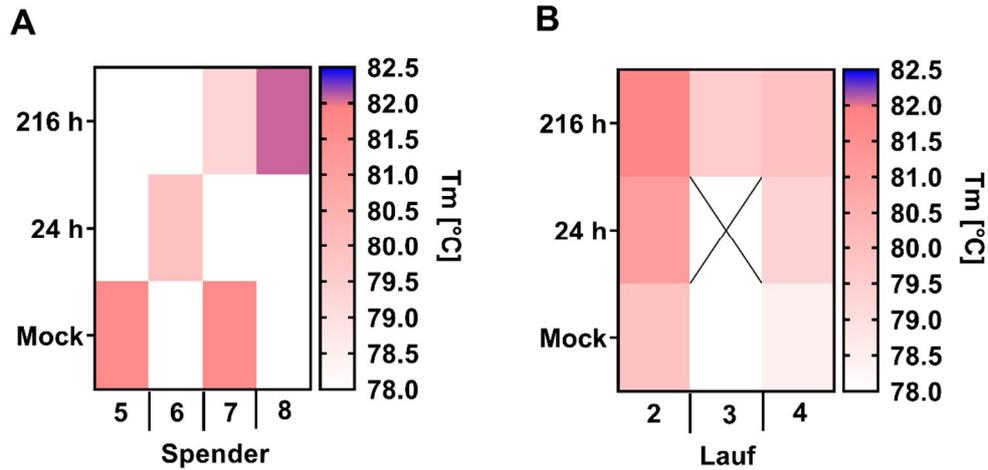
**Abbildung S12: Anzahl der Reads aus den Daten der ampNGS für die CCR5-Uco-TALEN.** Dargestellt sind die Ergebnisse von Proben ( $n=8$ ) behandelt mit der homodimeren CCR5-Uco-TALEN, entweder mit beiden TALEN-Armen (L+R) oder nur mit der linken TALEN-Armen ( $n=2$ ) für das On-Target CCR5 und 9 potenziellen Off-Targets (CCR2, GPC5, LDOC1, RAPGEF2, VWA8, IQSEC2, SEMA3C, KIRELL, MUC16 und BRS3). Alle Reads, die Insertionen und Deletionen (Indels) an den TALEN-Bindungsstellen enthielten wurden als Indel-Reads (rechte, blaue Balken) gezählt, während alle anderen Reads als nicht editiert betrachtet wurden (linke, graue Balken).



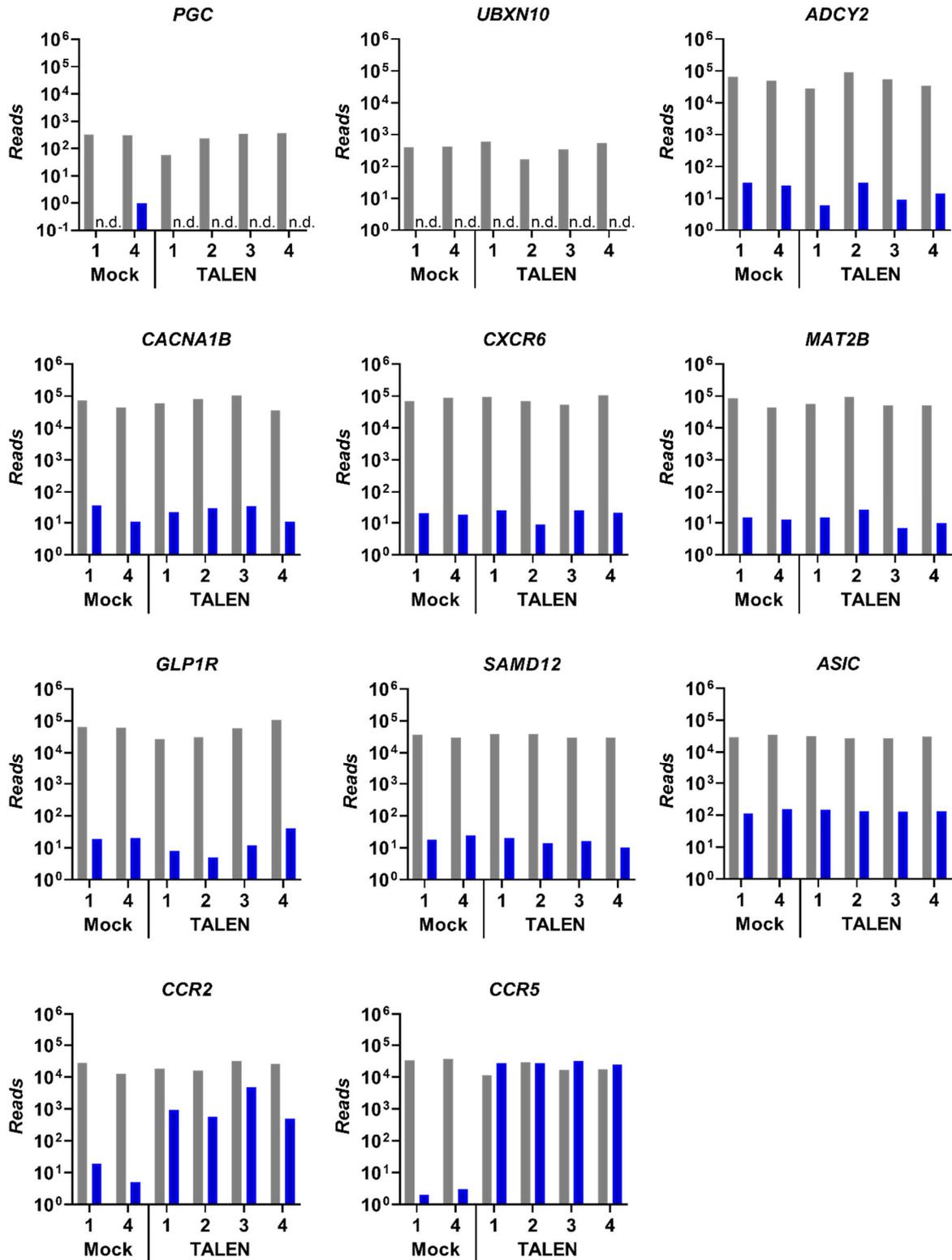
**Abbildung S13: Anzahl der Reads aus den Daten der ampNGS für die CCR5-Uco-hetTALEN.** Dargestellt sind die Ergebnisse von Proben (n=7) behandelt mit der heterodimeren CCR5-Uco-hetTALEN oder unbehandelten Proben (n=2) für 9 potenzielle Off-Targets (*PGC*, *UBXN10*, *ADCY2*, *CACNA1B*, *CXCR6*, *MAT2B*, *GLP1R*, *SAMD12*, und *ASIC*) und das On-Target *CCR5*. Alle Reads, die Insertionen und Deletionen (Indels) an den TALEN-Bindungsstellen enthielten wurden als Indel-Reads (rechte, blaue Balken) gezählt, während alle anderen Reads als nicht editiert betrachtet wurden (linke, graue Balken). n.d. = nicht detektierbar.



**Abbildung S14: Indelraten aus den Daten der ampNGS für die CCR5-Uco-hetTALEN.** Dargestellt sind die Indelraten von Proben (n=7) behandelt mit der heterodimeren CCR5-Uco-hetTALEN oder unbehandelten Proben (n=2) für 9 potenzielle Off-Targets (*PGC*, *UBXN10*, *ADYC2*, *CACNA1B*, *CXCR6*, *MAT2B*, *GLP1R*, *SAMD12*, und *ASIC*) und das On-Target *CCR5*. Alle *Reads*, die Insertionen und Deletionen (Indels) an den TALEN-Bindungsstellen enthielten wurden als *Indel-Reads* gezählt. Aus der Gesamtanzahl an *Reads* wurde der Anteil (*Ratio*) an *Indel-Reads* für alle Proben berechnet. Die schwarze Linie zeigt den Mittelwert der Proben an. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Welch's *t*-Test. ns = nicht signifikant.



**Abbildung S15: Keine nachgewiesene Integration des Produktionsplasmids in den geschnittenen CCR5-Lokus im Bereich der CCR5-Uco-hetTALEN-Bindestelle.** Amplifikation der pCCR5-Uco-hetTALENpoly(A)-KanR Plasmide integriert im CCR5-Lokus mit spezifischen Primern in einer RT-qPCR mit unbehandelten Kontrollproben (Mock), Proben 24 h und 216 h nach Elektroporation mit 3  $\mu$ g CCR5-Uco-hetTALEN mRNA pro Arm. Die RT-qPCR erfolgte in Triplikaten mit gDNA der Spender 5 - 8 und der TCE-Läufe 2 - 4. Angegeben sind die Mittelwerte der Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) in  $^{\circ}$ C. Die Positivkontrolle hatte eine mittlere Schmelztemperatur von  $82,48 \pm 0,03^{\circ}$ C. (A) Proben aus den Experimenten im Labormaßstab von Spender 5 - 8. (B) Proben aus den TCE-Läufen 2 - 4 am ClineMACS Prodigy.



**Abbildung S16: Anzahl der Reads aus den Daten der ampNGS für die CCR5-Uco-hetTALEN-behandelten Zellen aus den TCE-Prozessen.** Dargestellt sind die Ergebnisse von Proben aus allen 4 TCE-Läufen behandelt mit der heterodimeren CCR5-Uco-hetTALEN (TALEN) oder unbehandelten Proben (Mock) für die beiden TCE-Läufe 1 und 4 aus Zellen vor der TALEN-Behandlung für 9 potenzielle Off-Targets (*PGC*, *UBXM10*, *ADCY2*, *CACNA1B*, *CXCR6*, *MAT2B*, *GLP1R*, *SAMD12*, und *ASIC*) und das On-Target *CCR5*. Alle Reads, die Insertionen und Deletionen (Indels) an den TALEN-Bindungsstellen enthielten wurden als Indel-Reads (rechte, blaue Balken) gezählt, während alle anderen Reads als nicht editiert betrachtet wurden (linke, graue Balken). n.d. = nicht detektierbar.

## Danksagung

Als erstes gilt mein Dank meinem Betreuer Prof. Dr. Boris Fehse. Es war sehr schön die letzten 5 Jahre Teil seiner Arbeitsgruppe sein zu dürfen. Ich konnte in den letzten Jahren eine Vielzahl an Seminaren, Konferenzen und Fortbildungen besuchen und habe dort hilfreiche Kommentare zu meiner Arbeit und neue Ideen bekommen. Es war mir möglich meine Projekte selbständig zu gestalten und alle relevanten Entscheidungen selbst zu treffen, wodurch ich enorm viel gelernt habe. Vielen Dank für all das, besonders die Unterstützung, die geduldige Hilfe und das Vertrauen in meine Fähigkeiten.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Thomas Dobner für die Begutachtung meiner Dissertation und das positive Feedback zu meinem Projekt. Ich durfte immer mal wieder den Fortschritt meines Projektes bei ihm in der Arbeitsgruppe vorstellen und die Vorträge zu halten hat mir immer viel Spaß gemacht. Vielen Dank!

Lieben Dank an alle meine Korrekturleser (Julia Lüpkes, Jill-Sandra Schoefinius, Ludmilla Unrau, Almut Uhde, Tanja Sonntag und Sebastian Jänichen) für die Fehlersuche und die hilfreichen Kommentare.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Stefan Horn, bei dem ich während meiner Masterarbeit sehr viel Wertvolles lernen konnte und in der Zeit meine Begeisterung für die wissenschaftliche Arbeit entdeckt habe. Ohne diese gute Anleitung, hätte ich in meiner Doktorarbeit nicht so viel erreicht. Danke dafür!

Ein großes Dankeschön an Tanja Sonntag für die Bereitschaft das ganze Training und die Läufe am CliniMACS mit mir zusammen zu machen. Ich war sehr froh über die kompetente Unterstützung und die Zusammenarbeit hat mir sehr viel Spaß gemacht.

Anita Badbaran hat mich bei allen meiner Anliegen, vor allem rund um die ddPCR mit Rat und Tat unterstützt. Vielen Dank dafür, sowie für die vielen Gespräche, die witzigen Stunden und die aufmunternden Worte.

Jill-Sandra Schoefinius und Ludmilla Unrau danke ich von Herzen für die grandiose Zeit im und außerhalb des Labors, die aufbauenden Worte bei der manchmal sehr frustrierenden Laborarbeit, sowie die moralische und fachliche Hilfe bei allen Schwierigkeiten. Ich bin sehr froh, dass ich euch habe.

Herzlichen Dank an alle jetzigen und ehemaligen Kollegen und Kolleginnen für die lustigen Stunden, die vielen hilfreichen Tipps, Fachgespräche, Albernheiten und die Geduld mit meinen Fragen und Anliegen. Die letzten Jahre waren einfach großartig und ich bin sehr froh über diese Zeit! Danke auch besonders an meine ehemaligen und momentanen Bürokollegen für eine tolle Atmosphäre und eine lustige Zeit.

Außerdem gilt mein herzlicher Dank Prof. Dr. Gerald Willimsky und seinem Team, Sabrina Schmitz, Dr. Stefan Wild und Dr. Caren Clark für die hilfreiche Unterstützung am CliniMACS Prodigy. Ohne diese Hilfe hätte ich das Projekt nicht bewältigen können.

Konstantin Hoffer und Anne Kruchen haben mich sehr bei meinen ersten Schritten am MACSQuant unterstützt. Vielen Dank für die ständige Bereitschaft mir meine Fragen bei Problemen zu beantworten.

Vielen Dank an das Team aus der FACS Core und der Transfusionsmedizin für die Hilfe während meiner Arbeit, sowie einen lieben Dank an unsere Spülfrauen, die uns immer viel Arbeit abgenommen und uns den Laboralltag erleichtert haben.

Mein Dank geht auch an meine ehemaligen Kollegen und Kolleginnen von Agena Bioscience, wo ich während meines Studiums gearbeitet habe, besonders Dr. Caren Vollmart. Ich habe in dieser Zeit vieles im Labor gelernt und bin dankbar für die ganzen wertvollen Ratschläge.

Ich danke ebenfalls dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) für die Unterstützung des Projektes.

Ich danke herzlich meiner Familie für ihre umfassende Unterstützung, ihr unendliches Vertrauen in mich und ihre Liebe. Besonders danke ich meinem Lebensgefährten Dennis Bruhn für seinen Beistand und seine Geduld mit langen Arbeitszeiten, den vielen Reisen und dem ganzen Stress.

Herzlichen Dank an alle, die mir in dieser Zeit geholfen haben, mich kritisiert, mir Mut gemacht und mich zum Lachen gebracht haben.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, Dezember 2020

---

Lea Isabell Schwarze