TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik

Gezielte Genmodifikation in Mauszygoten durch sequenzspezifische Nukleasen

Melanie Meyer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:		Univ.-Prof. Dr. E. Grill
Prüfer der Dissertation:	1.	Univ.-Prof. Dr. W. Wurst
	2.	Univ.-Prof. A. Schnieke, Ph.D.
	3.	Priv.-Doz. Dr. J. Beckers

Die Dissertation wurde am 17.04.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.09.2013 angenommen.

Danksagung

Als erstes möchte ich mich beim meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wurst, für die Aufnahme an seinem Institut und die Bereitstellung der Projekte für diese Dissertation bedanken. Sowohl sein Einfallsreichtum, sein großes Interesse an meinem Forschungsthema als auch die vielen Diskussionen im Rahmen zahlreicher Vorträge haben meine Arbeit vorangetrieben und mich immer wieder neu motiviert nicht aufzugeben.

Meinem direkten Betreuer, Herrn Dr. Ralf Kühn, möchte ich ganz besonders für seine hervorragende Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit, für seine immer vorhandene Verfügbarkeit, für seine Hilfe bei praktischen Problemen und das zur Verfügung stellen seiner Zeit nach dem Ende meines Arbeitsvertrages bis zu Abgabe dieser Arbeit danken.

Ich möchte mich außerdem bei Frau Prof. Dr. Angelika Schnieke, Herrn Dr. Johannes Beckers und Herrn Prof. Dr. Erwin Grill bedanken, dass sie sich bereit erklärt haben meine Dissertation zu beurteilen und die Promotionsprüfung durchzuführen.

Bei meinen ehemaligen Kollegen Dr. Benedikt Wefers und Dr. Oskar Ortiz möchte ich mich besonders für die Unterstützung im Labor und bei der Anfertigung von zwei wissenschaftlichen Artikeln bedanken.

Sascha Allwein, Aljoscha Kleinhammer, Dr. Anna Pertek, Svenja Hensler und Christina Brandl möchte ich für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und ihre Unterstützung im Labor danken.

Bei Claudia Arndt, Adrianne Tasdemir, Susanne Weidemann, Peggy Kunath und Adelheid Krause möchte ich mich für die Hilfe bei den Pronukleus-Injektionen, dem Transfer und der Tierpflege bedanken. Allen technischen Assistentinnen des IDG, insbesondere Regina Kneuttinger und Annerose Kurz-Drexler möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei technischen Problemen danken. Ich danke außerdem allen anderen Mitarbeitern des IDG für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft, die das Arbeiten besonders angenehm gemacht hat. Besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Angelika Landgraf für die Hilfe bei all den Formalitäten und der Unterstützung bei beruflichen und privaten Fragen bedanken.

Dr. Christoph Hecht möchte ich für das Korrekturlesen und die ehrliche Kritik an meinen Texten danken. Meiner Familie und meinem Freund danke ich für die liebevolle Unterstützung, den Zuspruch und die Geduld, die sie mir während und vor allem gegen Ende der Anfertigung dieser Arbeit entgegengebracht haben. Ihr habt mir sehr geholfen diesen Weg zu gehen und nicht aufzugeben.

Inhaltsverzeichnis

Abstract 1

Zusammenfassung 3

1 Einleitung 5
- 1.1 Verschiedene Arten der Genom-Manipulation . . . 5
  - 1.1.1 Der *phiC31*-Integrase vermittelte Kassettenaustausch . . . 7
  - 1.1.2 Gen-*Targeting* mit Hilfe verschiedener sequenzspezifischer Nukleasen . 8
    - 1.1.2.1 Zinkfinger-Nukleasen . . . 12
    - 1.1.2.2 *Transcription activator-like effector nucleases* . . . 16
- 1.2 Zielsetzung dieser Arbeit . . . 19

2 Ergebnisse 21
- 2.1 Gezielte Genom-Modifikation durch die *phiC31*-Integrase vermittelte Rekombination . . . 21
- 2.2 Genom-Modifikationen mittels ZFN . . . 24
  - 2.2.1 Genetische Manipulation des *Rosa26*-Locus . . . 24
    - 2.2.1.1 Integration des β-*Gal*-Reportergens . . . 24
    - 2.2.1.2 Integration des *Venus*-Reportergens . . . 36
  - 2.2.2 ZFN-unterstützte Einbringung von Punktmutationen in das *Rab38*-Gen 49
    - 2.2.2.1 Integration der IDGCht-Punktmutation durch Injektionen in Zygoten . . . 49
    - 2.2.2.2 Integration der IDGWT-Punktmutation durch die HR in das Genom von Zygoten . . . 56
- 2.3 *TALEN*-vermittelte Genom-Manipulation . . . 68
  - 2.3.1 Modifikation des *Rab38*-Locus durch die Vorkern-Injektion von TALEN 68
    - 2.3.1.1 Integration der IDGCht-Punktmutation in das Genom von *Rab38*^{WT}-Zygoten . . . 70
    - 2.3.1.2 Integration der IDGWT-Punktmutation in den *Rab38*-Locus durch die Verwendung von TALEN in Zygoten . . . 78

3 Diskussion 85
- 3.1 Integration exogener DNA-Sequenzen durch die *phiC31* Integrase-vermittelte Rekombination . . . 85
- 3.2 ZFN-vermittelte Genom-Modifikation . . . 86
- 3.3 TALEN-vermittelte Manipulation des Genoms . . . 89
- 3.4 Vergleich der ZFN mit den TALEN . . . 90
- 3.5 Schlussfolgerung und Ausblick . . . 92

4 Material 93
- 4.1 Verwendete Geräte . . . 93
- 4.2 Verbrauchsmaterialien . . . 94
- 4.3 Chemikalien . . . 95
- 4.4 Kits . . . 99

4.5 Oligonukleotide . . . 99
4.5.1 Oligonukleotide für Genotypisierungs-PCRs . . . 99
4.5.2 PCR zur Herstellung von *Southern Blot*-Sonden . . . 100
4.6 Lösungen . . . 100
4.7 Mauslinien . . . 104

5 Methoden 105
5.1 Molekularbiologische Methoden . . . 105
5.1.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien . . . 105
5.1.2 Transformation von elektrokompetenten Bakterien . . . 105
5.1.3 Blau-Weiß-Selektion . . . 106
5.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA . . . 106
5.1.5 Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen . . . 106
5.1.6 Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA-Fragmenten . . . 107
5.1.7 Präzipitation von DNA . . . 107
5.1.8 Bestimmung der Massenkonzentration von Nukleinsäuren . . . 108
5.1.8.1 Bestimmung der Massenkonzentration in Photometer . . . 108
5.1.8.2 Bestimmung der DNA-Massenkonzentration mit Hilfe eines Agarose-Gels . . . 108
5.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten . . . 108
5.1.10 Isolierung genomischer DNA . . . 109
5.1.10.1 DNA-Isolierung aus Embryonen . . . 109
5.1.10.2 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen . . . 109
5.1.11 Polymerase-Ketten-Reaktion . . . 109
5.1.12 Aufreinigung von PCR-Produkten . . . 110
5.1.13 Sequenzierung von DNA-Fragmenten . . . 110
5.1.14 *Southern Blot* Analyse . . . 110
5.1.14.1 Restriktionsverdau und *Blotten* der genomischen DNA . . . 111
5.1.14.2 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden . . . 112
5.1.14.3 Hybridisierung . . . 112
5.1.14.4 Autoradiographie . . . 112
5.1.15 *In vitro* Transkription der RNA . . . 112
5.1.16 Herstellung der Injektionslösungen für die Vorkern-Injektion . . . 113
5.2 Histologie . . . 114
5.2.1 lacZ-Färbung von Embryonen . . . 114
5.2.2 Analyse der β-*Gal*-Expression in ES-Zellen . . . 114
5.2.3 lacZ-Färbung von Zygoten zur β-*Gal*-Expressionanalyse . . . 114
5.3 Zellkultur . . . 115
5.3.1 Arbeiten mit ES-Zellen . . . 115
5.3.1.1 Splitten von ES-Zellen . . . 115
5.3.1.2 Einfrieren von ES-Zellen . . . 115
5.3.1.3 Auftauen von ES-Zellen . . . 116
5.3.1.4 Elektroporation von ES-Zellen . . . 116
5.3.2 Arbeiten mit HEK293-Zellen . . . 116
5.3.2.1 Kultivierung der Zellen . . . 117
5.3.2.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen . . . 117

5.3.2.3 Lysieren von Zellen . . . 117
5.3.2.4 β-Gal Aktivitätsmessung am Luminometer . . . 118
5.4 Die Arbeit mit Mäusen . . . 119
5.4.1 Maushaltung . . . 119
5.4.2 Vorkern-Injektion in Zygoten . . . 119
5.4.3 Embryonentransfer . . . 120

6 Anhang 137
6.1 Abkürzungsverzeichnis . . . 137
6.2 Symbole für Aminosäuren . . . 143
6.3 Vektoren und Oligonukleotide . . . 144
6.3.1 Vektoren für die homologe Rekombination . . . 144
6.3.1.1 pBvenusB . . . 144
6.3.1.2 pRosa26.5 . . . 144
6.3.1.3 pRosa 26.8-2 . . . 144
6.3.1.4 pRosa 26.3-3 . . . 144
6.3.1.5 pEF-5HA-cht-3HA . . . 145
6.3.1.6 pEF-5HA-wt-3HA . . . 145
6.3.1.7 pEF-5HA-TALcht-3HA . . . 145
6.3.1.8 pEF-5HA-TALwt-3HA . . . 145
6.3.2 Oligonukleotide für die homologe Rekombination . . . 146
6.3.2.1 ZFNcht>IDGWT . . . 146
6.3.2.2 TALENwt>IDGCht . . . 146
6.3.3 Expressionsvektoren für ZFN und TALEN . . . 146
6.3.3.1 pphiC31 . . . 146
6.3.3.2 pRosaZFN-FokEL . . . 147
6.3.3.3 pRosaZFN-FokKK . . . 147
6.3.3.4 pRabZFN-FokKK . . . 147
6.3.3.5 pRabZFN-FokEL . . . 147
6.3.3.6 pRabTALEN1-FokWT . . . 148
6.3.3.7 pRabTALEN2-FokWT . . . 148
6.3.4 sonstige Vektoren . . . 148
6.3.4.1 pCR-II-Rosa5'-Sonde . . . 148
6.3.4.2 pCR-II-Rosa3'-Sonde . . . 148
6.3.4.3 pUC18 . . . 149
6.3.4.4 pSC-B-amp/kan . . . 150
6.4 ES-Zellkultur Testexperiment mit den *Rosa26* ZFN . . . 151
6.5 Expressionsanalyse des *Venus*-Reportergens in verschiedenen Organen . . . 152
6.6 Fellfarben der $Rab38^{Z\text{-}IDGCht}$ Nachkommen . . . 154
6.7 Eigene Publikationen . . . 155
6.8 Genehmigungen zur Veröffentlichung . . . 160
6.8.1 PNAS . . . 160

Abstract

The age of targeted genomic modifications of stem cells and of the generation of genetically modified mice started in the ‘80s with the establishment of the isolation and cultivation of embryonic stem (ES) cells and with the discovery of the homologous recombination in mammalian cells by Capecchi, Smithies and Evans. Since the frequency of the homologous recombination in ES cells without any selection is very low (10^{-5}-10^{-7}), the need for development of new and more efficient technologies became a priority in this field of science.

The aim of this work was to investigate and further develop various techniques which lead to an increase in the frequency of the homologous recombination in mammalian cells and can be applied for the genetic modification of mouse zygotes.

In the first approach, the recombination-mediated cassette exchange, previously established for modification of mouse ES cells, was applied directly in mouse zygotes. For this purpose, the *phiC31* integrase was injected together with a reporter-containing donor molecule into the male pronucleus of zygotes, which hold one allele of the corresponding recipient sequence. No recombination event could be identified among 160 analyzed mice after the application of this method, emphasizing the inefficiency of this approach for the direct transfer into mouse zygotes.

The discovery describing the induction of the endogenous homologous recombination as well as the non-homologous end joining by targeted DNA double strand breaks increased the effort for the construction of user-specific endonucleases. The key requirements for this approach were to design nucleases which could bind to an infinite number of unique targets and at the same time to be highly active as well as highly specific for the given sequence. Therefore, the second part of this thesis focused on testing an application of the newly discovered technique of zinc finger nucleases (ZFNs) for gene transfer into mouse zygotes.
In this approach two zinc finger pairs, recognizing a specific sequence in the *Rosa26* locus and a sequence in the *Rab38* locus, were combined with the heterodimeric form of the *FokI* nuclease and injected together with various targeting constructs (two reporter genes on a targeting vector, different point mutations on a targeting vector or on a targeting oligonucleotide) into the male pronucleus of zygotes.
As a result, integration of the desired sequence due to the homologous recombination (5 %) or small deletions/insertions due to the non-homologous end joining (12,9 %) were identified. This technique proved to be suitable for the direct generation of genetically modified mice in zygotes. Nevertheless, the construction of user-specific ZFNs, which target a unique sequence with a high specificity and activity, remains to be challenging due to the absence of known finger modules for some nucleotide triplets and due to the context-dependency of the fingers in one array.

In comparison to the ZFNs, the recently developed transcription activator-like effector nulceases (TALENs) have the advantage of being easier to generate and to apply even in non-specialized laboratory. Therefore the aim of this last approach was to test whether TALENs could also be used for the direct genome manipulation of mouse zygotes with the same efficiency as observed for ZFNs.

TALENs were constructed against the *Rab38* locus and injected into the male pronucleus of mouse zygotes together with various targeting constructs. Animals with integrations of the desi-

red sequence as well as animals where small deletions occurred could be identified. The highest frequency for homologous recombination in this trail was 6,7 % and 8,9 % for non-homologous end joining, suggesting that TALENs are at least as efficient as the ZFNs for the introduction of specific genomic modifications.

These results show that ZFNs as well as TALENs can be used to introduce entire reporter genes as well as single point mutations in a short timeframe into the murine genome via zygote injection. Nevertheless, the simplicity and efficiency of TALENs can overcome the limitations of the original technologies for the genomic manipulation of distinct organisms or cell types and is proving to be a new possibility for the genetic modification of all organisms.

Zusammenfassung

Mit der Etablierung der Isolation und Kultivierung von embryonalen Stammzellen und der Entdeckung der homologen Rekombination in Säugerzellen durch Capecchi, Smithies und Evans in den 80er Jahren begann die Ära der gezielten genomischen Manipulation in embryonalen Stammzellen und der Herstellung von genetisch modifizierten Mäusen mit Hilfe dieser Methode. Da die Frequenz der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen ohne Selektion jedoch sehr gering ist (10^{-5}-10^{-7}), sucht man seither nach Möglichkeiten diese zu erhöhen und damit auch die genetische Modifikation von anderen Organismen, bei denen die Kultivierung von embryonalen Stammzellen nicht etabliert ist, zu ermöglichen.

Zuerst wurde versucht die in embryonalen Stammzellen etablierte Methode des Rekombinase-vermittelten Kassettenaustauschs auf die Zygoten von Mäusen zu übertragen. Dazu wurde die *phiC31* Integrase zusammen mit einem Donormolekül in den männlichen Vorkern von heterozygoten Zygoten, die ein Allel mit der korrespondierenden Empfängersequenz aufweisen, injiziert. Es konnte jedoch unter den 160 analysierten Mäusen kein Tier mit einer stattgefundenen Rekombination identifiziert werden. Diese Methode eignet sich somit nicht zur Anwendung in Zygoten.

Seit der Entdeckung, dass das Erzeugen eines gezielten DNA-Doppelstrangbruchs die Frequenz der endogenen homologen Rekombination und des *non-homologous end joining* erhöht, wurden große Mühen in die Verbesserung der Konstruktion und der Effizienz von Nutzer-spezifischen Nukleasen investiert. Der Schlüssel dazu war die Etablierung von Nukleasen, die so bearbeitet werden können, dass sie scheinbar an eine unendliche Zahl von einzigartigen Zielsequenzen binden können und zugleich sowohl sehr aktiv als auch sehr spezifisch für eine vorgegebene Sequenz sind. Deshalb sollte im zweiten Teil dieser Arbeit die Anwendung der neu etablierten Technik der Zinkfinger-Nukleasen in Zygoten getestet werden. Dazu wurden zwei Zinkfinger-Paare, die spezifisch eine Sequenz im *Rosa26*-Locus und eine Sequenz im *Rab38*-Locus erkennen, mit der heterodimeren Form der *FokI*-Nuklease verbunden und zusammen mit verschiedenen Gen-*Targeting*konstrukten (zwei Reportergenen auf Gen-*Targeting*vektoren, verschiedenen Punktmutationen auf Gen-*Targeting*vektoren und -oligonukleotiden) in den männlichen Vorkern von Zygoten injiziert. In diesen Versuchen konnten mehrere Tiere mit einer Integration der gewünschten Sequenz oder kleineren Deletionen/Insertionen identifiziert werden. Im Gesamten wurde eine maximale Frequenz für die homologe Rekombination von 5 % und für das *non-homologous end joining* von 12,9 % erreicht. Diese Technik kann somit zur direkten Herstellung von genetisch modifizierten Mäusen in der Zygote mit einer relativ hohen Effizienz verwendet werden.

Die Herstellung von Nutzer-spezifischen Zinkfinger-Nukleasen, die auf eine bestimmte Sequenz mit einer hohen Spezifität und Aktivität abzielen, bleibt jedoch aufgrund des Fehlens von bekannten Zinkfinger-Modulen für einige Nukleotid-Triplets und der Kontext-Abhängigkeit der einzelnen Finger in einer Reihe zueinander eine Herausforderung.

Im Vergleich zu den Zinkfinger-Nukleasen sind die kürzlich entwickelten *transcription activator-like effector*-Nukleasen viel einfacher in jedem molekularbiologischen Labor herzustellen. Zum Schluss dieser Arbeit sollte deshalb herausgefunden werden, ob die *transcription activator-like effector*-Nukleasen auch für die Genom-Manipulation in Zygoten geeignet und so effizient wie Zinkfinger-Nukleasen sind. Dazu wurden in unserem Labor *transcription activator-like*

effector-Nukleasen gegen den *Rab38*-Locus konstruiert und zusammen mit verschiedenen Gen-*Targeting*konstrukten in den männlichen Vorkern von Zygoten injiziert. Auch hier konnten Tiere mit einer Integration der gewünschten Sequenz oder mit einer aufgetretenen Deletion von einigen Basenpaaren identifiziert werden. Die maximale Frequenz für die homologe Rekombination beträgt in diesen Versuchen 6,7 % und für das *non-homologous end joining* 8,9 %. Die *transcription activator-like effector*-Nukleasen sind somit bei der Einbringung von spezifischen Genom-Modifikationen genauso effizient wie die Zinkfinger-Nukleasen, jedoch viel einfacher und billiger herzustellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl Zinkfinger-Nukleasen als auch *transcription activator-like effector*-Nukleasen verwendet werden können, um sowohl ganze Reportergene als auch einzelne Punktmutationen in das murine Genom durch die Zygoten-Injektion in kürzester Zeit einzubringen.

Die Einfachheit und Effizienz der *transcription activator-like effector*-Nukleasen kann somit die Limitierungen der ursprünglichen genetischen Manipulationstechnologien auf bestimmte Organismen und Zelltypen überwinden und neue Möglichkeiten zur genetischen Modifikation von Organismen aufzeigen.

1 Einleitung

1.1 Verschiedene Arten der Genom-Manipulation

Der klassische Ansatz der Genomanalyse, auch bekannt als *forward genetics*, beschäftigt sich mit der Identifikation eines neuen Phänotyps, der entweder spontan oder durch die Erzeugung zufälliger Mutationen entstanden ist. Dabei wird versucht die zugrunde liegenden Gene zu identifizieren und deren Funktion zu analysieren. Der zweite Ansatz, auch bekannt unter dem Begriff *reverse genetics*, befasst sich mit der Identifikation der Gensequenz, um spezifische Mutationen zu erzeugen und anschließend den resultierenden Phänotyp zu charakterisieren. Das Genom der Tiere wird dabei per Definition mit Hilfe gentechnologischer Methoden so verändert, dass eine oder mehrere Mutationen an die Nachkommen weitergegeben werden (Hermey *et al.*, 2011). Bei dieser Definition werden alle künstlich Gen-modifizierten Tiere als Transgene bezeichnet. Im wissenschaftlichen Sprachgebrauch wird eine genauere Unterscheidung anhand der Art der Modifikation getroffen (Hermey *et al.*, 2011). Tiere, denen ein fremdes Gen an einem zufälligen Ort eingebaut wurde, werden dabei als Transgene bezeichnet. Tiere, bei denen gezielt ein Gen eingebaut oder ausgeschaltet wurde, sind als *Knockin* oder *Knockout* mittels Gen-*Targeting* bekannt.

Aktuell gibt es mehrere Methoden transgene Organismen zu erzeugen. Frühere Anwendungen verwendeten Methoden wie die ionisierende Strahlung oder die chemische Behandlung, um eine zufällige Genzerstörung oder -mutation in somatischen Zellen zu erreichen (Urlaub und Chasin, 1980; Urlaub *et al.*, 1981). Bei Mäusen wird die chemische Mutagenese durch Ethylnitrosoharnstoff (ENU) eingesetzt (Justice *et al.*, 1999). Außerdem kann man transgene Tiere durch den effizienteren Virus-vermittelten Gentransfer herstellen, bei dem die Länge der zur Integration bestimmten DNA-Fragmente jedoch auf eine geringe Größe begrenzt ist (Hermey *et al.*, 2011). Transgene Mäuse mit einzelnen Genkopien können zum Einen mit Hilfe von Retroviren (Lois *et al.*, 2002) und zum Anderen mit dem Transposon-vermittelten Transfer (Ding *et al.*, 2005; Mátés *et al.*, 2009) erzeugt werden. Eine weitere Methode der transgenen Säugetier-Produktion beruht auf der direkten Mikroinjektion der DNA in den *Pronukleus* einer Zygote, resultierend in der zufälligen genomischen Integration der DNA (Gordon und Scangos, 1980; Gordon, 1981; Brinster *et al.*, 1981). Als *Pronuklei* oder Vorkerne bezeichnet man die Zellkerne einer Zygote zum Zeitpunkt der Befruchtung, nachdem das Spermium in die Eizelle eingedrungen ist, aber bevor die beiden Kerne miteinander verschmelzen (Hermey *et al.*, 2011). Die Mikroinjektion von Nukleinsäuren ist gut etabliert, weit verbreitet und mit Anpassungen auf fast jede Spezies anwendbar. Die Effizienz der Zygotenproduktion hängt vom Mausstamm, Alter und Gewicht der Mäuse und dem Zeitpunkt der Injektion ab. Für neurowissenschaftliche Arbeiten wird bevorzugt der Mausstamm C57BL/6J verwendet. Dieser Inzuchtstamm reproduziert sich aber verhältnismäßig schlecht und eignet sich aufgrund der kleinen Vorkerne kaum für die Pronukleus-Injektion. Bei dieser Methode ist deshalb der FVB-Inzuchtstamm, welcher sich durch besonders große Pronuklei auszeichnet, besser geeignet (Hermey *et al.*, 2011).

Die vorher erläuterten Technologien sind durch die Zufälligkeit der Integration alle nur begrenzt einsatzfähig. In den resultierenden transgenen Tieren werden die Expressionsmengen und -muster der integrierten Gene von kontextabhängigen Faktoren (regulatorische und bakterielle Elemente des Integrationskonstruktes, Position der Integration, Anzahl der integrierten Konstrukte) beeinflusst, die schwer zu kontrollieren sind (Hollis *et al.*, 2003). Die zufällige Inte-

gration der DNA in verschiedene chromosomale Loci kann zusätzlich die Funktion endogener Gene durch unerwünschte Mutationen zerstören. Außerdem wird häufig beobachtet, dass der Einbau von mehreren Kopien des Transgens zum Ausschalten des neu eingebrachten Gens (*gene silencing*) führt. All diese nachteiligen Merkmale der zufälligen Integration eines exogenen DNA-Fragmentes machen die Suche nach funktionsfähigen und für das Experiment sinnvollen Zuchtlinien mit einer vorhersagbaren Genexpression arbeitsintensiv und zeitaufwändig. Somit ist es bis jetzt nur möglich Organismen mit Zufallsintegrationen herzustellen.
Die Herstellung von genetisch modifizierten Tieren oder Pflanzen mit gezielten Deletionen, Insertionen oder Integrationen würde ein sehr nützliches Werkzeug zur genauen Analyse der Genfunktion, zur Untersuchung von humanen Erkrankungen in Modellorganismen oder zur Produktion von Organismen von biotechnologischem Interesse darstellen. Die beste Lösung dafür wäre eine Methode, die effizient spezifische Modifikationen an ausgewählten Orten im Genom erzeugt. Verschiedene Methoden wie das Gen-*Targeting*, das Gen-*Trapping* oder die RNA-Interferenz können dabei heute schon in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) verwendet werden, um mutierte Allele zu erzeugen. Die ersten beiden Techniken basieren dabei hauptsächlich auf der homologen Rekombination (HR) zwischen einem exogen eingebrachten *Targeting*-Vektor und einem definierten Genlocus in den Zellen, die anschließend in Blastozysten eingebracht werden. Die Voraussetzung für diese Experimente wurde durch die Entdeckung der HR in Säugerzellen und die Isolation und Kultivierung von ES-Zellen der Maus geschaffen, wobei erste Erfolge bereits in den 80er Jahren durch Capecchi, Smithies und Evens (Nobelpreis für Medizin 2007) erzielt wurden (Hermey *et al.*, 2011). Ein typischer Vektor hat dabei einen kurzen Homologiearm von 1 bis 2 kb Länge und einen langen Homologiearm von 4 bis 6 kb Länge, zwischen denen sich das zu integrierende Fragment befindet. Die Frequenz der HR an verschiedenen Loci in ES-Zellen liegt dabei ohne Selektion zwischen 10^{-5} bis 10^{-7} und mit Selektion bei 10^{-2} bis 10^{-5} (Brinster *et al.*, 1989; Ellis *et al.*, 2012), wobei ein linearer DNA-Donor von der Maschinerie der HR effizienter verwendet werden kann als ein zirkuläres Plasmid (Carroll, 2011).

Soll eine ubiquitäre Expression erreicht werden, so stellt der *Rosa26*-Locus einen interessanten Ort dar. Dieser Locus wurde durch Zufall bei einem Gen-*Trap*-Ansatz auf Chromosom 6 der Maus identifiziert (Soriano, 1999). Er besitzt drei Exons, aber keinen bisher identifizierten Leserahmen, und die homozygote Mutation dieses Locus hat keinen bekannten Phänotyp (Hermey *et al.*, 2011). Er wurde deshalb in einigen Studien verwendet, um eine gleichmäßige und konstante Expression zu erreichen. Bei dieser Methode bleibt jedoch häufig ein Antibiotikum-Resistenzmarker in der endgültigen Zelle zurück, und der mögliche Weg eines solchen Resistenzgens in die Umwelt sowie seine potentielle Aufnahme in den Nahrungskreislauf erhöhen das gesellschaftliche Interesse an solchen Experimenten. In einigen Organismen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora* und *Dictyostelium*, ist die HR üblich, wohingegen in anderen Organismen, wie der *Drosophila melanogaster* und der Maus, die nicht homologe, zufällige Integration die Regel ist (Brinster *et al.*, 1989). In den Organismen, bei denen die zufällige Integration überwiegt, benötigt man somit effektive Selektionsmechanismen zur Identifizierung der Tiere mit einer gezielten HR.

Daher würden neue Technologien, die es den Forschern ermöglichen routiniert und effizient das Genom jeder Spezies durch direkte Mutationen in einer gezielten Weise zu bearbeiten, das Verständnis der grundlegenden Biologie sehr fördern und möglicherweise zu neuen Wegen der Behandlung von verschiedenen Krankheiten bei Menschen führen.

1.1.1 Der *phiC31*-Integrase vermittelte Kassettenaustausch

Sequenzspezifische Rekombinase-Systeme in Bakterien und Hefen, die für das gezielte Gen-*Targeting* verwendet werden können, wurden identifiziert. Diese Rekombination findet an spezifischen Sequenzen statt. Sie beinhaltet den Schnitt und die Wiedervereinigung der DNA zur Integration, Deletion oder Inversion eines DNA-Fragmentes ohne das Hinzufügen oder den Verlust von Nukleotiden. Für die Verwendung in der ES-Zellkultur wurden diese bakteriellen Systeme angepasst und schon seit längerer Zeit zur Erhöhung der Frequenz einer gezielten Integration exogener DNA verwendet.

Ein Mechanismus, der unter dem Namen des Rekombinase-vermittelten Kassettenaustauschs (*recombinase mediated cassette exchange*; RMCE) bekannt ist, nimmt die Integrase des phiC31-Phagen zu Hilfe (Hitz *et al.*, 2007; Branda und Dymecki, 2004). Die speziell verwendete *phiC31*-Integrase des Phagen *Streptomyces lividans* ist ein Mitglied der Serin-Rekombinase-Unterfamilie (Thyagarajan *et al.*, 2001; Raymond und Soriano, 2007). Es wird geschätzt, dass 30 Mitglieder zu dieser Familie gehören (Smith und Thorpe, 2002). Diese Integrase besitzt eine konservierte, ungefähr 140 Aminosäuren lange, N-terminale Domäne, welche die katalytische Aktivität für das Schneiden der DNA, den Strangaustausch und die Protein-Protein-Interaktion liefert (Brown *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2008). Die 300 bis 500 Aminosäuren große C-terminale Domäne wird für die DNA-Bindung benötigt (Brown *et al.*, 2011; Rowley *et al.*, 2008). Die genaue Kristallstruktur ist bisher noch nicht verfügbar. Die Wildtyp-Sequenz der *phiC31*-Integrase wurde für die Verwendung in Mauszellen codon-optimiert (Raymond und Soriano, 2007) und mit einem C-terminalen Kernlokalisationssignal (*nuclear localisation signal* NLS) ausgestattet. Sollten sich die zwei Erkennungssequenzen allerdings auf dem selben DNA-Molekül befinden, sind zwei Endergebnisse möglich: Wenn die *attachment site phage-* (*attP-*) und die *attachment site bacteria-* (*attB-*) Sequenzen die selbe Orientierung aufweisen, kommt es zur Deletion; Wenn die zwei Sequenzen in entgegengesetzter Orientierung vorhanden sind, kommt es zur Inversion (Hollis *et al.*, 2003). Zur Anwendung des RMCE wurden in den universellen *Rosa26*-Locus auf Chromosom 6 zwei *attP*-Erkennungssequenzen eingebracht. Dabei befand sich eine 50 bp lange Erkennungssequenz zwischen einem PGK-Promotor und der Sequenz des eingebrachten *Hygromycin* (Hygro)-Resistenzgens. Eine weitere lag in der selben Orientierung am Ende der *Hygro-bpA*-Region (Hitz *et al.*, 2007). Somit ist dieses Akzeptor-Allel so konstruiert, dass das *attP*-flankierte Segment durch ein *attB*-flankiertes Konstrukt (34 bp lang) auf dem verwendeten Donor-Plasmid mit Hilfe der *phiC31*-Integrase vermittelten Rekombination ersetzt werden kann, wozu keine Helferproteine benötigt werden. Beide Erkennungsstellen teilen sich dabei eine identische, 3 bp lange, zentrale TTG-Sequenz, an der das *Crossover* stattfindet. Während dieser Rekombination werden die *attP-* und *attB*-Erkennungssequenzen in der Mitte dieser Sequenz geteilt und neu miteinander verbunden. Es entstehen dabei Hybrid-Sequenzen, die mit *attL* bzw. *attR* bezeichnet werden. Die nach der Rekombination der Zielsequenzen erzeugten hybriden *attL-* und *attR*-Sequenzen stehen der Rekombination nicht weiter als Substrat zur Verfügung (Raymond und Soriano, 2007). Es bietet sich dadurch die Möglichkeit der unidirektionalen Integration einer gewünschten Gensequenz, da keine Rekombination zwischen *attB/attB*, *attP/attP*, *attL/attR* oder irgendeiner anderen Kombination von *attB* oder *attP* mit *attL* oder *attR* beobachtet werden konnte (Thorpe und Smith, 1998).

Die modifizierten ES-Zellen (bekannt als IDG26.10 ES-Zellen) werden verwendet, um spezifische Gensequenzen in das Mausgenom einzubringen. Damit wurde die aufwändige und bis dahin ineffiziente HR in ES-Zellen für die Mausproduktion umgangen, ohne dabei die Nachteile einer Zufallsintegration in Kauf nehmen zu müssen. Da die Frequenz, mit der diese Rekombination im Mausgenom auftrat, ohne die Anwendung einer vorhergehenden Selektion immer noch relativ gering war, wurde zur zusätzlichen Selektion häufig ein *Neomycin- (Neo-)*Resistenzgen zwischen den *attB*-Erkennungssequenzen des Plasmids eingefügt. Damit erhöhte sich die Frequenz der korrekt rekombinierten ES-Zellklone nach der Selektion von ungefähr 1 % bei der HR am *Rosa26*-Locus auf 40 bis 60 % bei der *RMCE* am selben Locus (Hitz *et al.*, 2007). Die *phiC31*-Integrase hat somit bereits bewiesen, dass sie in humanen und murinen ES-Zellen die chromosomalen Integrationen von exogener DNA katalysieren kann.

1.1.2 Gen-*Targeting* mit Hilfe verschiedener sequenzspezifischer Nukleasen

Verschiedene Forscher verbinden mit dem Begriff des Gen-*Targeting* unterschiedliche Arten der Gen-Manipulation. In dieser Arbeit wird der Begriff für den Prozess der Einbringung von gezielten Veränderungen unter Verwendung der HR oder des *non homologous end joining* (NHEJ) verwendet. Seit 1988 ist man nicht länger von der zufälligen Mutagenese abhängig. Durch das bei Capecchi (1989) beschriebene Gen-*Targeting* in ES-Zellen von Mäusen existiert die Möglichkeit, Mäuse mit einem bestimmten Genotyp herzustellen, wobei der Forscher nun sowohl den Locus als auch die Art der Mutation spezifisch auswählen kann.

Diese Methode beinhaltet als erstes die Verwendung von Standard-Klonierungstechniken, um die gewünschte Mutation in die homologe DNA-Sequenz des ausgewählten Locus einzubringen. Die homologe Sequenz wird dann mit Hilfe der HR in das Genom von ES-Zellen übertragen. Die Mikroinjektion der mutierten ES-Zellen in Maus-Blastozysten wird anschließend dazu verwendet, um Keimbahn-Chimäre herzustellen. Letztendlich gehen aus der Verpaarung von heterozygoten Geschwistern Tiere hervor, die homozygot für die gewünschte Modifikation sind. Die Frequenz der korrekt eingebauten DNA-Moleküle in diesen ersten Experimenten ist fast proportional zum Gehalt der Homologie zwischen den Sequenzen (Capecchi, 1989). Es existierte ab diesem Zeitpunkt die Möglichkeit jedes Gen einer Spezies, bei der ES-Zellen vorhanden waren, spezifisch zu modifizieren. Der Weg zum genetisch modifizierten Organismus über die ES-Zellkultur, die auch noch nicht für alle Tierarten etabliert ist, ist sehr lang und zeitaufwendig. Deshalb werden Verfahren gesucht, die die Zeit bis zum genetisch modifizierten Tier verkürzen und die Arbeit erleichtern.

Aktuelle Gen-*Targeting*-Strategien verwenden deshalb die Einbringung eines Doppelstrangbruchs (DSB) an einem genomischen Locus, um die Effizienz der HR mit einer exogen eingebrachten DNA-Reparaturvorlage zu verstärken. DSB können die Effizienz dabei um einen Faktor von mehreren Tausend erhöhen (Turan *et al.*, 2011). Der Prototyp für den Beweis, dass ein DSB die Frequenz des Gen-*Targeting* erhöht, war das Restriktionsenzym I-SceI. Es hat eine 18 bp lange Erkennungssequenz (Carroll, 2011). Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ist für die Erhaltung der Lebensfähigkeit in allen bekannten Organismen essentiell.
Es wurden deshalb in der Natur zwei genetisch unterschiedliche Wege zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen entwickelt (Abb. 1.1): die HR, welche entweder einen homologen

Chromosomenbereich oder ein Schwesterchromatid als Vorlage nimmt, um die zerschnittenen Enden zu verbinden, und das NHEJ, das den DSB durch einfache Ligation der beiden Enden repariert, wobei es zu zufälligen Deletionen oder Insertionen kommen kann.

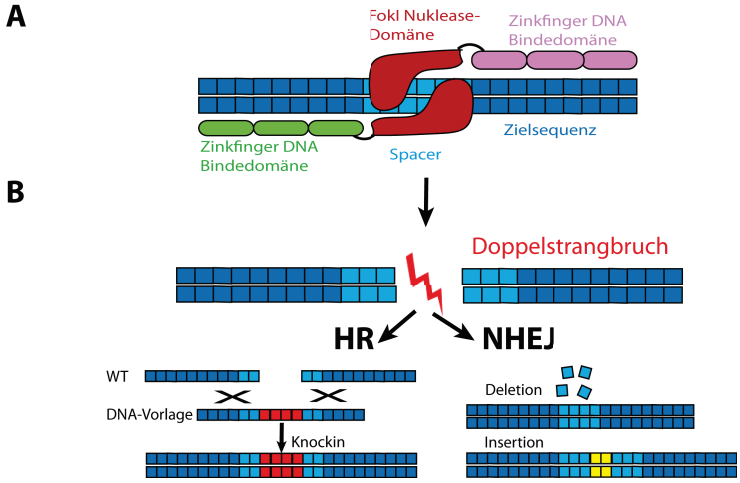


Abb. 1.1: Reparaturergebnisse eines genomischen DSB. (A) Ein Paar an Nukleasen ist in Assoziation mit einem Zielgen dargestellt. (B) Wenn eine homologe Donor-DNA vorhanden ist, kann die Reparatur durch die HR unter der Verwendung des Donors als Vorlage durchgeführt werden. Alternativ kann der Bruch durch das NHEJ repariert werden, was zu Mutationen an der Schnittstelle führen kann. Dies können Deletionen oder Insertionen sein. (Meyer *et al.* (2011) Mit freundlicher Genehmigung des Verlages.)

Wenn der DSB innerhalb einer codierenden Region entstanden ist, resultieren diese kleinen Fehler bei der Reparatur in einer Verschiebung des Leserasters und dem Verlust der Funktion dieses Gens. In Bakterien und niedrigeren Eukaryoten dominiert der Weg der HR, wohingegen in höheren Eukaryoten und speziell in Säugetieren das NHEJ der bevorzugte Weg der Reparatur in Zellen ist (Fattah *et al.*, 2010).

Das NHEJ ist ein schneller und effizienter Weg der DSB-Reparatur. Es besteht aus zwei genetisch und biochemisch unterschiedlichen Wegen, die zur Reparatur eines zufällig entstandenen oder gezielt erzeugten DNA-Doppelstrangbruchs verwendet werden können: dem klassischen Weg (C-NHEJ) und dem alternativen Weg (A-NHEJ) (Fattah *et al.*, 2010). Beim Weg über das C-NHEJ werden mindestens sieben bis jetzt identifizierte Proteine benötigt: Ku70, Ku80, die katalytische Untereinheit der DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK_{CS}), Artemis, *X-ray cross complementing 4* (XRCCA), *XRCC4-like factor* (XLF) und die DNA-Ligase IV (Fattah *et al.*, 2010). Auf den genauen Mechanismus des NHEJ soll hier nicht mehr eingegangen werden, da er bereits in zahlreichen Publikationen genau beschrieben worden ist. Im Gegensatz zum C-NHEJ ist der Mechanismus des A-NHEJ weniger gut erforscht. Es wurde außerdem herausgefunden, dass das C-NHEJ der dominierende NHEJ-Weg ist (Fattah *et al.*, 2010).

Bei der HR werden die DNA-Enden zu einem einzelsträngigen 3'-Überhang weiterverarbeitet. Diese Enden werden anschließend einer RAD51-abhängigen Invasion des homologen Duplex unterzogen, gefolgt von einer Vorlagen-abhängigen Synthese (Fung und Weinstock, 2011). Eine genaue Beschreibung der Vorgänge bei der HR findet sich in dem Artikel von Krogh und Symington (2004). Sie ist ein Mechanismus, durch den genaue Änderungen an definierten genomischen

Sequenzen eingebracht werden können. Die Reparatur mittels der HR erfordert jedoch das Vorliegen einer DNA-Matrize mit homologen Bereichen zum entsprechenden Locus, um die genetische Information ohne Fehler wiederherzustellen. Die HR liefert somit eine hohe Spezifität für die Art der Modifikation, aber sie ereignet sich ohne vorherigen DSB in einer zu geringen Frequenz in Säugetieren, um aktuell das optimale Werkzeug für die genetische Manipulation von multizellulären Organismen darzustellen.

Jeder der beiden bekannten Reparaturwege scheint hauptsächlich in einer bestimmten Phase des Zellzyklus aktiv zu sein. Die HR ist am aktivsten während der späten S- und der G2-Phase, wenn das Schwesterchromatid als Reparaturvorlage verfügbar ist. Das NHEJ herrscht in der G0- und G1-Phase vor, wenn die HR den Verlust der Heterozygotie fördern würde (Fung und Weinstock, 2011). Das NHEJ bleibt aber normalerweise während dem ganzen Zellzyklus über immer leicht aktiv. In nicht manipulierten Säugerzellen, wie z.B. den *Chinese Hamster Ovary*-Zellen (CHO-Zellen), ist das Verhältnis der HR zum NHEJ 9:13 (Santiago *et al.*, 2008).

Grundlegende Arbeiten haben gezeigt, dass der DSB durch Sequenz-spezifische Endonukleasen die Effizienz des Gen-*Targeting* auf das 100- bis 5000-fache erhöhen kann. Dabei handelt es sich dann um eine Frequenz, die eine klinische Relevanz für die Verwendung bei der Gentherapie hätte (Ellis *et al.*, 2012). Die Korrektur eines krankhaft mutierten Gens durch die DSB-vermittelte HR am endogenen Locus wäre somit eine zukunftsweisende Strategie der Gentherapie. Durch die Verwendung dieser Art des Gen-*Targeting* bleibt die Kopienzahl des betroffenen Gens erhalten, die endogene Genregulation ist sichergestellt und es kommt zu keiner Aktivierung eines Onkogens, da die zufällige Integration an unerwünschten Stellen im Genom verhindert wird. Die gewünschte Zielsequenz sollte dabei allerdings einzigartig im Genom sein, um sogenannte unerwünschte *Off-Target* Effekte an anderen Stellen zu verhindern.

In *Drosophila melanogaster* wurde die HR und das NHEJ mit Hilfe der direkten Embryo-Injektion einer spezifischen Endonuklease in bis zu 10 % der Nachkommen erreicht, wobei die HR durch die Verwendung einer zirkulären Donor-DNA effektiver war als bei einem linearen DNA-Fragment (Beumer *et al.*, 2008). Auch erhöhte des Fehlen der *DNA-Ligase IV* die Frequenz der HR dramatisch, da dadurch die Reparatur über das NHEJ nicht verwendet werden kann (Beumer *et al.*, 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Frequenz der HR signifikant sinkt, sobald die Fliegen homozygot für Mutationen im *spnA* (*Rad51*) oder dem *okr* (*Rad54*) Gen waren (Bozas *et al.*, 2009). Der Knockout der *DNA-Ligase IV* und des *Rad51*-Gens ist jedoch bei Mäusen in der Embryonalentwicklung lethal, die Abwesenheit des *Rad54* wäre tolerierbar (Bozas *et al.*, 2009).

Um für die spezifische Genom-Manipulation nützlich zu sein, muss eine Nutzer-spezifisch konstruierte Endonuklease eine Kombination von zwei Fähigkeiten aufweisen: Sie muss lange Zielsequenzen spezifisch erkennen und eine ausreichende Anpassungsfähigkeit an gewünschte Sequenzen besitzen. Deshalb sollten folgende Schlüssel-Parameter für die erfolgreiche Konstruktion von spezifischen Nukleasen eingehalten werden: (i) Die Nuklease sollte eine veränderbare DNA-Bindedomäne beinhalten, (ii) die DNA-Bindedomänen sollten zusammen mindestens 18 bp erkennen, um eine einzigartige Stelle im Genom zu spezifizieren, und (iii) die Schneideaktivität sollte nur nach der Bindung an die DNA-Zielsequenz ausgelöst werden (Rahman *et al.*, 2011).

Aktuell gibt es drei grundlegende Klassen an konstruierten Nukleasen: Meganukleasen, Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) und *Transcription Aktivator-like Effector*-Nukleasen (TALEN). Meganukleasen sind eine Untergruppe der *Homing Endonukleasen*, die im mikrobiellen Genom weit verbreitet sind. Sie schneiden die DNA mit einer sehr hohen Spezifität an sehr langen (12 bis 40 bp) genomischen Zielsequenzen (de Souza, 2011). Wenn natürlich vorkommende Enzyme dieser Klasse verwendet werden sollen, müssen die Zielsequenzen erst an den Ort von Interesse eingebracht werden. Die Anwendung der Meganukleasen an spezifischen, endogenen Genen erfordert die Entwicklung verschiedener, Sequenz-spezifischer Meganukleasen, was bereits in einigen Fällen erreicht werden konnte (Ashworth *et al.*, 2006; Pâques und Duchateau, 2007). Die ZFN und TALEN werden in den nächsten Kapiteln ausführlicher erläutert.

Die meisten künstlich erzeugten Nukleasen werden durch die Kombination eines spezifischen DNA-Bindemoduls mit einem unspezifischen DNA-Schneidemodul hergestellt, resultierend in einem Werkzeug, dass die DNA an einer spezifischen Stelle schneidet. Als Schneidemodul wurde die katalytische Domäne der *FokI*-Restriktionsendonuklease etabliert. Die *FokI* wurde anfangs aus dem Bakterium *Flavobakterium okeanokoites* isoliert (Li *et al.*, 2011a). Natürlich vorkommende Endonukleasen bestehen aus einer N-terminalen DNA-Erkennungsdomäne, die den Kontakt mit der Zielsequenz herstellt, und einer C-terminalen katalytischen Domäne mit einem aktiven Zentrum, durch das die DNA unspezifisch geschnitten wird (Halford *et al.*, 2011). TypII-Restriktionsendonukleasen, wie die *FokI*, erkennen spezifische DNA-Sequenzen, die typischerweise 4 bis 8 bp lang sind, und schneiden unter Verwendung von Mg^{2+}-Ionen als Co-Faktoren beide DNA-Stränge an festen Positionen in Bezug auf die Erkennungssequenz (Halford *et al.*, 2011). Zum Beispiel erkennt das natürlich vorkommende TypIIS Restriktionsenzym FokI die folgende Sequenz (Abb. 1.2).

5′-**GGATGNNNNNNNNN NNNNN**-3′
3′-**CCTACNNNNNNNNNNNNN N**-5′

Abb. 1.2: Erkennungssequenz der natürlichen *FokI*-Endonuklease wobei jedes „N“ jeweils eine beliebige Base darstellt.

Sie liegt in Lösung als inaktives Monomer vor und wird nach der Bindung an ihre Ziel-DNA ein aktives Dimer (Li *et al.*, 2011a). Wenn die konstruierte DNA-Bindedomäne an die ursprüngliche *FokI-WT*-Domäne gebunden wird, können auch Homodimere gebildet werden. Es wurden mehrere *FokI*-Varianten entwickelt, die eine geringe Zytotoxizität aufweisen. Bei der Entwicklung dieser Varianten wurde sichergestellt, dass die Nukleasedomäne erst bei der Bildung von Heterodimeren katalytisch aktiv wird. Durch sehr strenge Tests erzeugten z.B. die Forscher um Miller *et al.* (2007) ein *FokI*-Domänenpaar mit einer Doppelmutation gegenüber der *FokI-WT*-Domäne (Q486E/I449L und E490K/I538K, auch bekannt als EL/KK), die die Heterodimer-Bildung fördert. Diese neue *FokEL/KK*-Variante zeigte eine reduzierte Zytotoxizität im Vergleich zur *FokI-WT*-Domäne und wurde in dieser Arbeit ebenfalls verwendet.

Zusätzlich wurden von anderen Forschergruppen andere Mutationen in die Nukleasedomäne der *FokI*-Endonuklease eingebaut, um die Zytotoxizität weiter zu verringern (D483R/Q486E/I499L und R487D/E490K/I538K (Ramalingam *et al.*, 2011), D483R/Q486E und R487D/E490K (Szczepek *et al.*, 2007)) oder die Aktivität zu erhöhen (*Sharkey*-Mutationen S418P/K441E (Guo *et al.*, 2010)). Da diese Mutationen jedoch in dieser Arbeit nicht verwendet und getestet worden sind, sollen sie hier auch nicht näher erläutert werden und können in dem jeweiligen Artikel nachgelesen werden.

1.1.2.1 Zinkfinger-Nukleasen

Die Zinkfinger des Transkriptionsfaktors IIIA (TFIIIA) wurden 1985 erstmals beschrieben, wobei die Autoren innerhalb der TFIIIA-Sequenz Wiederholungen von 30 Aminosäuren Länge (nun bekannt als Zinkfinger) entdeckten und folgerten, dass diese Motive als unabhängig gefaltete DNA-Bindedomäne dienen und die Bindeeigenschaften der häufigsten Klasse der Transkriptionsfaktoren bestimmen (Miller *et al.*, 1985). Diese 30 Aminosäuren sind in einer $\beta\ \alpha$-Struktur gefaltet, die durch die Komplexbildung mit einem einzelnen Zn^{2+}-Ion an die konservierten Cys_2His_2-Reste stabilisiert wird (Pavletich und Pabo, 1991). Das Verständnis der Art und Weise, wie Zinkfinger mit der DNA interagieren, wurde durch die Kristallstruktur des DNA-Protein-Komplexes des Zif268-Proteins sehr gefördert (Elrod-Erickson *et al.*, 1996). Das Zif268 besteht aus drei Zinkfinger-Domänen. Jeder Finger besteht aus einem kurzen, anti-parallelen β-Faltblatt und einer α-Helix, die gefaltet werden, um eine kompakte, globulare Struktur zu bilden. Diese Struktur wird durch einen kleinen hydrophoben Kern und ein Zn^{2+}-Ion zusammen gehalten. Das Zn^{2+}-Ion wird von vier konservierten Resten gebunden, nämlich von zwei Cysteinen des β-Faltblattes und zwei Histidinen der α-Helix. Die drei Finger des Zif268 winden sich um die DNA, wobei die α-Helix jedes Fingers in die „große Furche“ der DNA passt. Die Reste des N-terminalen Teils der α-Helices kontaktieren dabei mit Hilfe von Wasserstoff-Brückenbindungen die Basen und jeder Finger macht seine primären Kontakte innerhalb einer 3 bp Sequenz. Diese Struktur zeigt, dass im Allgemeinen alle Zinkfinger mit der DNA auf eine sehr ähnliche Weise interagieren.

Die ersten Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) wurden von Kim *et al.* (1996) konstruiert und seitdem immer weiter optimiert. ZFN sind künstlich zusammengebaute Proteine, bei denen der C-terminale Bereich der Sequenz-spezifischen Zinkfinger-DNA-Bindedomäne mittels einer Verbindungssequenz, dem *Linker*, mit der unspezifischen Nuklease-Domäne der *FokI* verbunden ist. Die Nuklease stammt, wie oben bereits erwähnt, von den Type IIS Endonukleasen ab. Die Zinkfinger-Domäne besteht dabei meistens aus drei oder vier Zinkfingern, da kürzlich von Isalan (2012) berichtet wurde, dass diese besser funktionieren als ZFN mit fünf oder sechs Zinkfingern. Bei drei oder vier Zinkfingern ist die Zielsequenz lang genug, um im Genom einzigartig zu sein. Es gibt mehrere, frei verfügbare, web-basierte Programme, um mögliche ZFN-Zielsequenzen innerhalb eines Gens zu identifizieren (www.zincfingertools.org; bind-r.gdcb.iastate.edu/ZiFiT/; http://bindr.gdcb.iastate.edu:8080/ZiFDB/) (Leong *et al.*, 2011). Es ist jedoch für kleinere Forschergruppen sehr schwierig funktionierende ZFN für spezielle Ziele im Genom selber zu konstruieren. Erfolgreiche Projekte wurden entweder mit von Sigma-Aldrich gekauften ZFN durchgeführt (Meyer *et al.*, 2010) oder kollaborierten mit größeren akademischen Gruppen unter Verwendung des quell-offenen Werkzeugs des Zinkfinger Konsortiums. Unter das Zinkfinger Konsortium fallen Projekte wie *Modular Assembly* (Wright *et al.*, 2006), OPEN (*Oligomerized*

Pool Engineering (Maeder *et al.*, 2008)) oder CoDA (*context-dependent assembly* (Sander *et al.*, 2011a)). Dabei gibt es jedoch starke Qualitätsunterschiede bei den entstandenen ZFN.

Die traditionelle Methode des *Modular Assembly* involviert eine einfache Aneinanderreihung von vorher ausgewählten Zinkfingern ohne die Beachtung der mittlerweile entdeckten Kontext-Abhängigkeit (Beerli und Barbas, 2002), da man früher dachte, dass die Zinkfinger unabhängig voneinander an die DNA binden. Diese Zinkfinger können aus einem öffentlich verfügbaren Archiv an Plasmiden ausgewählt werden, die für mehr als 140 einzelne, gut charakterisierte Zinkfinger-Module codieren (Wright *et al.*, 2006). Durch die einfache Anordnung der Zinkfinger bietet diese Methode einen leicht zugänglichen Ansatz zur schnellen Herstellung vieler ZFN-Paare. Verschiedene Protokolle zur Konstruktion von ZFN nach dieser Methode wurden bereits beschrieben (Wright *et al.*, 2006). Diese ZFN wurden dabei erfolgreich in verschiedenen Systemen (Säugerzellen, *C. elegans*, *D. melanogaster*, Tabak und *A. thaliana*) angewandt, wobei die berichteten Erfolgsraten dieser ZFN dabei im Bereich von 6 bis 30 % variieren, abhängig von der Studie, die man analysiert (Kim und Kim, 2011). Es wird vermutet, dass der wahrscheinlichste Grund, warum die ZFN nach der *Modular Assembly*-Methode nicht immer funktionieren, darin begründet liegt, dass Kontext-abhängige Effekte bei der Konstruktion der ZFN nicht beachtet werden (Wright *et al.*, 2006). Deshalb sollten diese ZFN vor der Anwendung im eigentlichen Organsimus immer in einem geeigneten Reportersystem in Zellkultur auf ihre Aktivität hin getestet werden (Sander *et al.*, 2011b). Der Vorteil dieses Ansatzes ist seine leichte Durchführbarkeit. Komplette Reihen können in weniger als einer Woche konstruiert werden. Die Fehlerrate dieser Methode für die Konstruktion an drei Finger langen Paaren ist mit über 94 % sehr hoch (Kim *et al.*, 2009; Ramirez *et al.*, 2008). Zusätzlich haben diese ZFN gezeigt, dass sie eine geringe Affinität, Spezifität und Aktivität in Zellen haben (Cornu *et al.*, 2008; Ramirez *et al.*, 2008).

Bei der zweiten, häufig verwendeten Methode handelt es sich um die OPEN-Methode. Die Methode beruht auf der Herstellung kombinatorischer Bibliotheken von Reihen mit mehreren Fingern, die von einer Sammlung an vorher ausgesuchten Fingern für die einzelnen 3 bp langen Untereinheiten abstammen. Anschließend wird ein bakterielles Selektionssystem verwendet um spezifische Mitglieder zu identifizieren, die an eine Zielsequenz von Interesse binden. Ein detailliertes Protokoll zur Durchführung dieser Methode wurde in Maeder *et al.* (2009) beschrieben. Diese Methode wurde als robust und effizient beschrieben, ist jedoch sowohl arbeitsintensiv als auch zeitaufwändig, da mehrere Selektionsschritte benötigt werden, um spezifisch funktionierende ZFN herzustellen. Man benötigt ca. zwei Monate bis zur Fertigstellung von ZFN, der eine hohe Zeitinvestition vorangeht (normalerweise sechs bis zwölf Monate), um die Methode erfolgreich zu beherrschen. Außerdem limitiert die Erfahrung, die benötigt wird, um die kombinatorischen Bibliotheken zu durchsuchen, ihre breitere Anwendung (Sander *et al.*, 2011a). Diese ZFN wurden jedoch schon zur erfolgreichen Genom-Modifikation in der humanen Zellkultur, im Zebrafisch, im Tabak und der *A. thaliana* verwendet (Kim und Kim, 2011; Townsend *et al.*, 2009). Die OPEN-Methode betrachtet somit explizit die Kontext-abhängige Aktivität einzelner Zinkfinger in einer Reihe (Maeder *et al.*, 2008, 2009).

Als neueste Methode wurde das CoDA etabliert. Die Einfachheit und Wirksamkeit von CoDA sollte die breite Anwendung der ZFN-Technologie und *large scale*-Projekte ermöglichen. Es handelt sich dabei um eine öffentlich verfügbare Plattform an Reagenzien und Software, die einfach anzuwenden ist und eine hohe Erfolgsrate der ZFN bietet (Sander *et al.*, 2011a). Bei dieser Methode werden die einzelnen Finger nicht unabhängig von einander betrachtet, sondern in eine Kontext-Abhängigkeit gebracht. Mit CoDA werden Reihen durch die Anordnung von drei Fingern konstruiert, die sich nicht gegenseitig behindern. Es wird dabei ein N-terminaler Finger (F1) mit einem bestimmten mittleren Finger (F2) verbunden, von denen bekannt ist, dass sie gut zusammen funktionieren. Ein dritter, C-terminaler Finger (F3) wird anschließend hinzugefügt, von dem ebenfalls bekannt ist, dass er gut mit dem Finger F2 zusammenarbeitet. Die resultierende Reihe wird am Ende unter Verwendung eines bakteriellen Ansatzes auf ihre DNA-Bindeaktivität hin untersucht (Sander *et al.*, 2011a). Diese Methode ist genauso einfach anzuwenden wie das *Modular Assembly*, aber trotzdem mit einer Erfolgsrate von 50 % der konstruierten ZFN-Paare hocheffizient (Sander *et al.*, 2011a). Mit CoDA erzeugte ZFN induzierten gezielte Deletionen und Insertionen mit einer hohen Effizienz von bis zu 16,7 % in Zebrafischen und von bis zu 8,4 % in *A. thaliana* und Sojabohnen (Sander *et al.*, 2011a).

Die proprietäre Methode von Sigma-Aldrich basiert auf einem ähnlichen System wie das *Modular Assembly*, wobei ein Archiv von validierten Modulen aus zwei Fingern verwendet wird. Es sind jedoch keine detaillierten Informationen zur Konstruktion dieser ZFN bekannt. Für Forscher, die auf das aufwendige ZFN-Design und die Testphase verzichten wollen, bietet Sigma-Aldrich den CompoZr-Service, der Benutzer-spezifische ZFN für ausgesuchte Ziele in einem Organismus herstellt. Dieser Service liefert zur Verwendung fertige ZFN-Plasmide oder die mRNA der ZFN.

Der am stärksten limitierende Faktor ist die Beschränkung in der Wahl der DNA-Sequenz aufgrund der Kontext-Abhängigkeit der Zinkfinger. Es werden von den Zinkfingern hauptsächliche „G“-reiche DNA-Sequenzen bevorzugt (Isalan, 2012).

Die Anwendung der ZFN, bei der Stimulation des Gen-*Targeting*, involviert folgende Schritte (Porteus, 2008):
1) Zwei komplette ZFN-Bindestellen müssen mit dem entsprechenden Abstand innerhalb des Gens von Interesse gefunden werden.
2) Das ZFN-Paar muss konstruiert, angeordnet und seine Aktivität durch die Verwendung eines Reporteransatzes getestet werden.
3) Im Fall der HR muss ein Gen-*Targeting*-Vektor, der die gewünschte genomische Modifikation erzeugt, konstruiert werden.
4) Die Manipulation des endogenen Locus muss durch die gemeinsame Einbringung der ZFN mit dem DNA-Donor gestartet werden.

Für die Genom-Modifikation unter Verwendung der ZFN bindet ein Paar von diesen mit Hilfe der Zinkfinger-Bindedomäne in der spezifischen Orientierung an ihre spezifischen Erkennungssequenzen. Durch diese Bindung kann die Nuklease-Domäne dimerisieren und enzymatisch einen DNA-Doppelstrangbruch mit einem 4 bp langen Überhang erzeugen (Beumer *et al.*, 2008). Dies geschieht nur, wenn sich zwischen den beiden ZFN-Bindestellen genau 6 bp einer beliebigen Sequenz befinden, die als *Spacer* bezeichnet werden. Der erzeugte DSB wird dann in Eukaryoten in den häufigsten Fällen durch das zelleigene NHEJ repariert, was zur schnellen Herstellung

von Knockout-Tieren führt (*D. melanogaster* (Beumer *et al.*, 2008), Zebrafisch (Doyon *et al.*, 2008), Ratte (Geurts *et al.*, 2009)). Außerdem kann der DSB in seltenen Fällen auch durch die HR repariert werden. Die Verwendung dieser Technik in der Zellkultur mit einer Frequenz von bis zu 50 % ermöglichte es Forschern einzelne Zellen mit dem Knockout des gewünschten Gens zu isolieren, ohne dafür Selektionsmarker in die Zellen einbringen zu müssen (Kim und Kim, 2011). Dieser Prozess war damit so effizient, dass es einer Gruppe an Forschern sogar gelang, ohne die Verwendung eines Selektionsmechanismus drei verschiedene Gene in CHO-Zellen mit einer Frequenz von mehr als 1 % auszuschalten (Liu *et al.*, 2010).

Die erste Anwendung der ZFN am endogenen Locus in kultivierten humanen Zellen (K562-Zellen) war die Korrektur von Mutationen im humanen *IL2RG*-Gen mit einer Frequenz von mehr als 18 % ohne vorherige Selektion (Urnov *et al.*, 2005). In dieser Studie wurde außerdem die Aktivität der ZFN in humanen $CD4^+$ T-Zellen beschrieben. Mittlerweile wurde die Aktivität der ZFN an verschiedenen anderen Loci in humanen ES- und induzierten, pluripotenten Stamm-Zellen (iPS-Zellen) bewiesen (Zou *et al.*, 2009; Hockemeyer *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Connelly *et al.* (2010) zeigten, dass die Frequenz des ZFN-vermittelten Gen-*Targeting* in verschiedenen Maus-Zelllinien (ES-Zellen ohne Selektion; primäre embryonale Fibroblasten; primäre Astrozyten) zwischen 0,17 % und 6 % lag. Die maximale Rate an positiven Zellen wurde erreicht, wenn die Transfektions-Mischung aus 90 % Donorplasmid und 10 % ZFN-Expressionsplasmid bestand. Ohne die ZFN erreichten sie in ES-Zellen ohne Selektion nur eine absolute Rate von unter 0,001 %. Die gleichzeitige Erzeugung von zwei DSB auf dem selben Chromosom führte bei Versuchen von mehreren Forschergruppen mit einer Frequenz von 10^{-3} bis 10^{-1} zu einer Deletion des gesamten, dazwischen liegenden Bereichs, bis zu einer Größe von bis zu 15 Megabasen (Lee *et al.*, 2012; Söllü *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010).

Eine mögliche Nebenwirkung der Anwendung von ZFN ist die Toxizität aufgrund der Bindung an unerwünschten Stellen. Dies kann durch eine ungenügende Spezifität der ZFN-DNA-Bindung oder eine zu früh einsetzende Nuklease-Aktivität ohne korrekte Bindung an die DNA hervorgerufen werden (Cornu und Cathomen, 2010). Aufgrund dieser unerwünschten Effekte wurden im Laufe der Zeit Ansätze zur Bewertung und Quantifizierung der ZFN-Aktivität und der assoziierten Toxizität entwickelt. Cornu und Cathomen (2010) etablierten dabei zwei verschiedene Ansätze: den Zytotoxizitäts-Ansatz und den Genotoxizitäts-Ansatz. Erstere kann verwendet werden, um zu bestimmen, wie die ektopische Expression der ZFN das Überleben der Zellen beeinflusst. Der zweite Ansatz basiert auf der Bildung von nuklearen Reparatur-Schwerpunkten und der damit verbundenen Phosphorylierung der Histone H2AX, die durch den DNA-Doppelstrangbruch induziert ist. Für Organismen, bei denen die komplette Genomsequenz bekannt ist, können bioinformatische Werkzeuge verwendet werden, um das Genom nach möglichen *Off-Target* Sequenzen zu scannen, die mit der vorhergesagten Bindestelle ungefähr übereinstimmen (Whyte und Prather, 2012).

Es gibt zwei mögliche Wege der Expression der ZFN in Zellen: einmal den Weg über die Plasmid-DNA oder über die *in vitro* transkribierte mRNA der ZFN. Der erste Ansatz verwendet in der Regel zirkuläre oder lineare Plasmide, wodurch die Möglichkeit der permanenten Expression der ZFN als Ergebnis der zufälligen Integration der Plasmid-DNA in das Wirtsgenom gegeben ist. Solche Integrationen erhöhen verstärkt das Risiko für *Off-Target* Effekte, wobei zirkuläre Plasmide seltener in das Wirtsgenom integrieren als Plasmide, die zuvor linearisiert wurden (Clark

et al., 2008). Alternativ werden mit der ZFN-codierenden mRNA diese Probleme vermieden. Die Verwendung der ZFN benötigt außerdem keine vorherige Integration der Zielsequenz in das Genom und erlaubt somit die präzise Manipulation der endogenen genomischen Sequenz von Tier- und Pflanzenzellen.

Die neu entwickelte ZFN-Technologie brachte neue Möglichkeiten für die angewandte Forschung und die Grundlagenforschung mit sich. Die breite Anwendung dieser Technologie wird jedoch im Moment noch durch die Schwierigkeiten bei der Herstellung der ZFN verhindert, da eine hohe Spezifität und Affinität erreicht werden muss.

1.1.2.2 *Transcription activator-like effector nucleases*

Da die Konstruktion von spezifischen ZFN sehr arbeitsintensiv und zeitaufwendig und mit hohen Fehlerraten assoziiert ist, wird ständig nach neuen Bindeproteinen für spezifische DNA-Sequenzen gesucht. Außerdem ist die Brauchbarkeit der ZFN durch die Zahl und die Orte von möglichen Zielsequenzen innerhalb eines Genoms limitiert. Vor kurzem wurden bei dieser Suche die *Transcription activator-like effectors* (TALE) identifiziert. TALE werden von phytopathogenen Bakterien des Stammes *Xanthomonas* abgesondert, die Krankheiten in Pflanzen wie Reis und Baumwolle verursachen (Boch *et al.*, 2009). Die identifizierten Mitglieder dieser Familie sind eine Gruppe gram-negativer, bakterieller Pflanzenpathogene, die zusammen mehr als 200 verschiedene Pflanzenfamilien infizieren können (Boch und Bonas, 2010). Die unterschiedlichen TALE sind in ihrer Sequenz stark konserviert und unterscheiden sich nur an zwei Positionen der Aminosäure-Sequenz der Finger und in der Anzahl der Finger (Boch *et al.*, 2009). Sie werden durch ein TypIII Sekretionssystem über die natürlichen Öffnungen (z.B. Stomata) in die Pflanzenzelle injiziert und beeinträchtigen durch die transkriptionelle Aktivierung von spezifischen Zielgenen im Genom der Pflanze die zellulären Aktivitäten. Einmal in der Pflanzenzelle angekommen, gelangen sie durch das NLS in den Zellkern, binden dort an eine spezifische DNA-Sequenz und schalten die nachfolgenden Gene an. Diese Bindung erfolgt dadurch, dass sie die DNA-Sequenz anhand einer zentralen Domäne von sich wiederholenden Fingern erkennen. Jeder Finger besteht aus 35 hoch konservierten Aminosäuren und zielt mit zwei variablen Resten (bekannt als *repeat variable diresidue* (RVD)) an Position 12 und 13 der Aminosäuresequenz auf ein spezifisches Basenpaar ab (Boch *et al.*, 2009). Der letzte, C-terminale Finger (Finger x,5) weist dabei nur in den ersten zwanzig Aminosäuren eine Ähnlichkeit auf und wird deshalb als *Half Repeat* bezeichnet (Boch *et al.*, 2009). Die zentrale DNA-Bindedomäne der natürlich vorkommenden TALE besteht dabei aus 1,5 bis 33,5 hintereinander liegenden Fingern, wobei erst ab einer Anzahl von mindestens 6,5 Fingern eine Aktivierung von Genen nachgewiesen wurde (Boch *et al.*, 2009).



Abb. 1.3: Aufbau eines in der Natur vorkommenden TALE mit der Fingerdomäne, 2 Kernlokalisationssignalen (NLS) und einer azidischen Aktivierungsdomäne (AD)

Die Finger sind dabei im natürlich vorkommenden TALE-Protein zentral zwischen den N-terminalen Sequenzen für die bakterielle TypIII-Sekretion und den C-terminalen Sequenzen für die Kernlokalisation (2x NLS) und der azidischen Aktivierungsdomäne (AD) zu finden (Abb. 1.3) (Boch *et al.*, 2009). Interessanterweise ist die DNA-Bindedomäne der TALE am 5'-Ende eine Base (Thymidin) länger als die durch die Finger identifizierbare Region. Es wird vermutet, dass der Teil des Proteins, der sich unmittelbar vor der Finger-Region befindet, mit dem „T" interagiert und dieses spezifiziert, da dieser Bereich einige Ähnlichkeiten in der Sekundärstruktur zu einem Finger aufweist, obwohl er keine erkennbare RVD beinhaltet (Bogdanove und Voytas, 2011).

Der Code der DNA-Erkennung durch die RVD wurde sowohl durch experimentelle als auch Computer-basierte Anwendungen herausgefunden. Die am häufigsten vorkommenden RVD His/Asp („HD"), Asn/Gly („NG"), Asn/Ile („NI") und Asn/Asn („NN") erkennen Cytosin, Thymidin, Adenin und Guanin, wobei „NN" auch Adenin erkennt, aber eindeutig eine Präferenz für Guanin zeigt (Boch *et al.*, 2009). Somit kann die Reihenfolge der RVD-Aminosäuren verwendet werden, um mit einer hohen Genauigkeit die Sequenz der korrespondierenden Ziel-DNA vorherzusagen.

Deng *et al.* (2012) und Mak *et al.* (2012) haben erst kürzlich die Kristallstruktur eines TAL-Fingers untersucht. Dabei haben sie herausgefunden, dass jeder TAL-Finger aus zwei α-Helices (Reste 3-11 und Reste 15-33) besteht, die durch eine kurze, die RVD-beinhaltende Schleife verbunden sind. Die zweite α-Helix eines TAL-Fingers ist an der Position 27, einem konservierten Prolin, geknickt, was für die Assoziation von mehreren Fingern mit der DNA-Doppelhelix wichtig zu sein scheint (Bradley, 2012; Mak *et al.*, 2012). Die Aneinanderreihung der Finger bildet eine rechtsgedrehte, superhelikale Struktur, die entlang dem *Sense*-Strang der DNA folgt. Die superhelikale Struktur hat dabei einen Außendurchmesser von 60 Å. Mit den Aminosäuren der RVD nimmt sie dabei Kontakt mit der „großen Furche" der DNA-Superhelix auf. Die Aminosäure 12 stabilisiert die RVD-Schleife und kontaktiert dabei nicht die DNA. Nur der 13. Rest stellt einen Basen-spezifischen Kontakt mit der DNA her. Die gesamte Dimension des Protein-DNA-Komplexes beträgt ungefähr 60 Å x 60 Å x 90 Å (Mak *et al.*, 2012). Im Fall des RVD „HD" in Kombination mit der Base „C" stellt das Carboxy-Sauerstoffatom des Asp13 eine Wasserstoff-Brückenbindungen mit dem N4-Atom des Cytosin her. Zusätzlich können Van-der-Waals-Kräfte beobachtet werden (Deng *et al.*, 2012; Mak *et al.*, 2012). Bei dem RVD „NG" hat die Aminosäure Gly an Position 13 genug Platz um die 5-Methylgruppe des Thymidin zu erfassen (Deng *et al.*, 2012). Der zweite Asparaginrest in dem „NN"-RVD ist so platziert, dass eine Wasserstoff-Brückenbindung mit dem N7-Atom eines gegenüberliegenden Guanins hergestellt werden kann (Mak *et al.*, 2012). Damit unterscheiden sich sowohl die Struktur als auch die Art der DNA-Bindung der TALE von denen anderer bekannter DNA-Bindedomänen, wie den Zinkfingern.

Die Anordnung der einzelnen Finger eines TALE erfolgt nach dem Baukastenprinzip. Da ein TALE jedoch aus einer großen Anzahl in der Sequenz gleichen Fingern (bis auf zwei Aminosäuren) besteht, ist es schwierig neue Reihen zu konstruieren. Es wurden jedoch bereits mehrere Protokolle zur einfachen Klonierung eines TALE veröffentlicht (Zhang *et al.*, 2011; Morbitzer *et al.*, 2011; Cermak *et al.*, 2011; Weber *et al.*, 2011). Außerdem wurde eine öffentlich nutzbare Website (http://boglab.plp.iastate.edu/TALENT/) zur einfachen Suche einer passenden Binde-

stelle programmiert (Cermak *et al.*, 2011). Anstatt sich TALE selber zu bauen, kann man sie auch einfach bei *„Life Technologies“*, „Cellectis“ oder „Addgene“ bestellen. Außerdem wurde vor kurzem von einer Methode berichtet, dem sogenannten *FLASH assembly*, das TALE im Hochdurchsatz herstellen kann (Reyon *et al.*, 2012). Dabei wurden insgesamt 144 Paare getestet, wobei 132 Paare ihre Aufgaben im humanen Genom effizient erfüllten. Alle Reagenzien und Expressionsplasmide, die zur Verwendung von FLASH benötigt werden, werden auf Anfrage für akademische Forscher zur Verfügung gestellt (http://www.talenengineering.org).

Durch die Fusion eines TALE an die katalytische Domäne der *FokI*-Endonuklease entsteht eine neue Klasse von Sequenz-spezifischen Nukleasen, die TALE-Nukleasen (TALEN), wobei die meisten Studien bisher die *FokI-WT*-Endonuklease verwendet haben. Da die *FokI*-Endonuklease nur als Dimer funktioniert, werden die TALEN-Paare so konstruiert, dass sie an gegenüberliegende DNA-Zielsequenzen in einer „End-zu-End“ Orientierung binden, die wie bei den ZFN durch einen *Spacer* getrennt sind (Abb. 1.4).

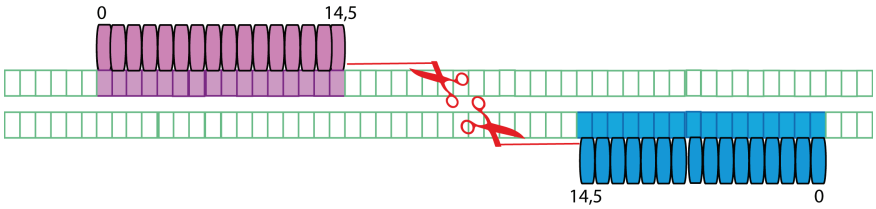


Abb. 1.4: Schema der Bindung von zwei TALEN (lila und blau) an die genomische DNA

Christian *et al.* (2010) zeigten als Erste, dass es möglich ist Benutzer-spezifische, gut funktionierende TALEN zu konstruieren, indem sie diese in einem Reporteransatz für die HR in Zellkultur auf ihre Aktivität testeten. Mahfouz *et al.* (2011) konnten ebenfalls zeigen, dass die *in vitro* konstruierten TALEN an ihre Zielsequenzen binden und einen DSB erzeugen können. Sie haben beide jedoch die *FokI*-Schneidedomäne an die komplette TALE-Sequenz samt Aktivierungsdomäne kloniert. Da sich dadurch eine lange Aminosäure-Sequenz zwischen den zwei Domänen befand, verwendeten sie einen 16 bp langen Spacer. Die Verwendung der kompletten TALE-Sequenz fügt jedoch eine große Menge an Überschuss-Peptiden zwischen den TALE-Fingern und der *FokI*-Schneidedomäne ein, welche die Aktivität beeinflussen könnten (Miller *et al.*, 2010). Es konnte jedoch sowohl von Christian *et al.* (2010) als auch von Wefers *et al.* (unveröffentlicht) gezeigt werden, dass die direkte Verbindung der TALE-Fingerdomäne mit der *FokI*-Endonuklease keine Aktivität mehr aufweist. Durch die Verkürzung der TALE-Sequenz auf 100 Aminosäuren N-terminal (Mussolino *et al.*, 2011) und 63 Aminosäuren C-terminal (Miller *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011) von der DNA-Bindedomäne aus bleibt die Aktivität im selben Maß bestehen, wie bei der Verwendung einer kompletten TALE-Sequenz, jedoch mit einer geringeren Gesamtlänge. Die TALE dieser Länge zeigten, sobald sie mit der katalytischen Domäne der *FokI*-Endonuklease verbunden wurden, bei einem *Spacer* von 12 bis 21 bp eine effiziente Aktivität bei der Erzeugung eines spezifischen DSB. Ein wichtiger Meilenstein wurde erreicht, als gezeigt wurde, dass TALEN die HR mit einer Effizienz von 25 % an endogenen chromosomalen Loci in kultivierten HEK-293-Zellen vermitteln (Miller *et al.*, 2010).

Li *et al.* (2011b) konstruierte zehn TALEN, die an spezifische Loci im nativen Genom der Hefe binden und den effizienten Austausch von mehreren Genen an verschiedenen chromosomalen Loci ermöglichen. Er konnte dabei hohe Frequenzen an NHEJ- und HR-Ereignissen (bis zu 34 %) feststellen. Hockemeyer *et al.* (2011) entwickelte TALEN gegen fünf verschiedene Loci in humanen ES- und iPS-Zellen, wobei alle erhaltene Zellklone die Integration trugen. Die Effizienz der HR lag dabei, abhängig von Locus, zwischen 6 % und 100 %, wobei die niedrigste Frequenz bei einem in pluripotenten Zellen nicht exprimierten Gen auftrat.

In Bezug auf Pflanzen konnte gezeigt werden, dass TALEN eine transient eingebrachte Zielsequenz in den Blättern des Tabaks schneiden (Mahfouz *et al.*, 2011) und außerdem einen endogenen Locus in *A. thaliana* Protoplasten mittels NHEJ reparieren können (Cermak *et al.*, 2011). In *C. elegans* und seinem Verwandten *C. briggsae* resultierte die Injektion von TALEN mRNA in die Gonaden an 3 bis 5 % der Nachkommen mit Mutationen im Genom (Wood *et al.*, 2011).

Gleichzeitig mit der Etablierung des TALE-Proteins als DNA-Bindeprotein wurde in einigen Studien die *Off-Target* Mutageneseaktivität der TALEN allein und im Vergleich zu den ZFN untersucht. In der Studie von Li *et al.* (2011b) wurde bei der Sequenzierung des gesamten Genoms von drei verschiedenen Hefe-Stämmen kein Beweis für eine *Off-Target* Mutagenese durch die TALEN gefunden. Mussolino *et al.* (2011) haben die Toxizität der TALEN mit den ZFN verglichen, wobei beide gegen das humane *CCR5*-Gen gerichtet waren. Dabei stellte sich heraus, dass die TALEN in diesem Fall sogar signifikant weniger toxisch waren als die ZFN. Dies lässt eine höhere Sequenzspezifität bei den TALEN vermuten. Die erfolgreiche Anwendung einer großen Anzahl an verschiedenen TALEN in der kurzen Zeit seit der Entdeckung der Einsatzmöglichkeit als DNA-Bindeprotein liefert jetzt schon einen starken Beweis für ein Kontext-unabhängiges Zusammenspiel der individuellen RVD mit den einzelnen Nukleotiden.

1.2 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Genom-Manipulation in der Maus hat sich für die Analyse der Genfunktionen oder die Verwendung der Maus als Modellsystem humaner Krankheiten als sehr nützlich erwiesen. Das Gen-*Targeting* hat dabei drei wichtige Vorteile gegenüber den anderen Verfahren bei der Einbringung von Modifikationen in das Genom. Erstens kann der Forscher den Locus, der modifiziert werden soll, frei bestimmen. Zweitens kann er alle Ressourcen, die ihm durch das Wissen über die Genomsequenz zur Verfügung stehen, voll ausnutzen, und drittens hat er die vollständige Kontrolle darüber, wie der ausgewählte Locus genau manipuliert werden soll. Letzterer bietet die Möglichkeit die Modifikationen so zu erzeugen, wie sie am besten zur gewählten Fragestellung passen (*Knockin*, *Knockout*, kompletter Austausch des endogenen Gens). Bis jetzt hatte die pronukleare Injektion von exogener DNA die Integration nur an zufälligen Stellen im Genom ermöglicht und die Sequenz-spezifische Modifikation stellte sich somit in Zygoten als extrem schwierig heraus. Das Zielen von fremder DNA auf spezielle chromosomale Regionen durch die HR in Zygoten würde ein außerordentlich nützliches Werkzeug für die Untersuchung der Genfunktion und die Korrektur von Gendefekten liefern. Wenn die Frequenz auf 1 % oder mehr angehoben werden könnte, würde die direkte Injektion von DNA in den männlichen Vorkern von Zygoten eine sinnvolle Alternative zur ES-Zell-Anwendung darstellen. In Brinster *et al.* (1989)

konnte bis jetzt nur gezeigt werden, dass das Ereignis der HR mit einer sehr niedrigen Frequenz in Maus-Zygoten auftritt. Es wurde dort eine Maus mit einer gezielten HR unter mehr als 1800 analysierten Mäusen identifiziert, wobei gleichzeitig ungefähr 500 transgene Tiere nachgewiesen wurden. Die Frequenz der HR wurde leider nicht berechnet, wobei man an den genannten Zahlen schon erkennen kann, dass sie für eine sinnvolle Verwendung noch zu niedrig ist. Diese Methode hätte den Vorteil, dass die Unsicherheit, ob das betroffene Gen in den Keimbahnzellen modifiziert ist und damit sofort auf die Nachkommen übertragen wird nur gering ist.

In dieser Arbeit soll die Vereinfachung und Beschleunigung der Herstellung genetisch modifizierter Mäuse durch den Einsatz zwei verschiedener Nukleasen und einer Integrase etabliert werden. Da der Weg über die ES-Zellkultur immer eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt, sollte in dieser Arbeit herausgefunden werden, ob die Rekombination auch direkt in Zygoten funktioniert. Damit könnte die Zeit bis zur ersten genetisch modifizierten Maus extrem verkürzt werden.

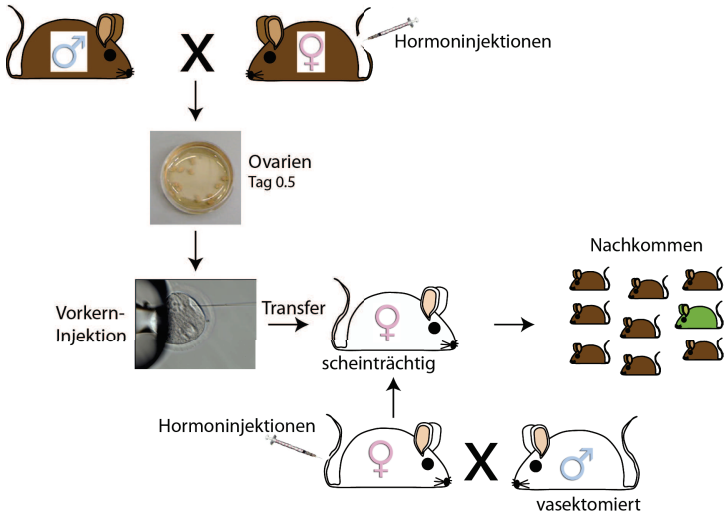


Abb. 1.5: Schema der Vorgehensweise bei der Pronukleus-Injektion

Diese Technologien würden die Geschwindigkeit, mit der genetisch modifizierte Organismen hergestellt werden können, stark erhöhen. Es wurden dabei verschiedene Gen-*Targeting*-Systeme anhand mehrerer Beispiele ausprobiert, basierend auf der Injektion von DNA-Donor-vektoren zusammen mit Sequenz-spezifischen mRNAs in den männlichen Pronukleus von Zygoten. Bei den mRNAs handelt es sich um die mRNA einer codon-optimierten phiC31 Integrase, die mRNAs Sequenz-spezifischer ZFN gegen den *Rosa26*- und den *Rab38*-Locus und TALEN gegen den *Rab38*-Locus. Bei den DNA-Vorlagen handelt es sich entweder um große DNA-Vektoren oder um kurze, einzelsträngige Oligonukleotide. Die Vektoren besaßen entweder spezifische DNA-Sequenzen (*attB*-Erkennungssequenzen) zum gezielten Genaustausch oder lange Homologiebereiche, zwischen denen sich jeweils das Reportergen befindet. Die Oligonukleotide sind 144 bp lang und zur Einbringung von einzelnen Punktmutationen gedacht.

Durch diesen direkten Weg über die Genom-Manipulation in Zygoten sollen die Zeit, die Arbeit und die Kosten bis zum fertigen Mausmodell reduziert werden. Außerdem sollte diese Methode, sobald sie in Maus-Zygoten praktikabel ist, auch in anderen Organismen anwendbar sein.

2 Ergebnisse

2.1 Gezielte Genom-Modifikation durch die *phiC31*-Integrase vermittelte Rekombination

Um eine Übertragung der Technik der phiC31 Integrase-vermittelten Rekombination von der ES-Zellkultur in Maus-Zygoten zu untersuchen wurden, aus den IDG26.10 ES-Zellen durch die Methode der Blastozysten-Injektion (Hermey *et al.*, 2011) Mäuse erzeugt (Mauslinie Rosa26.10), die dann auf Homozygotie des modifizierten *Rosa26*^{10}-Allels gezüchtet wurden. Bei diesem ersten Experiment wurde ein Gen-*Targeting*vektor verwendet, der ein *Venus*-Reportergen zwischen zwei attB-Erkennungssequenzen aufwies (Abb. 6.3.1.1). Außerdem wurde eine, auf das Mausgenom optimierte phiC31 Integrase (Raymond und Soriano, 2007) (Abb. 6.3.3.1) für die *in vitro* Transkription der mRNA als Vorlage benutzt. Von diesem Gen-*Targeting*vektor und der *in vitro* transkribierten phiC31 Integrase-mRNA wurden für die Pronukleus-Injektion drei Mischungen mit verschiedenen DNA- und RNA-Konzentrationen hergestellt (Tab. 2.1). Der Gen-*Targeting*vektor befand sich dabei entweder im zirkulären (sc.) oder durch den zuvor durchgeführten Restriktionsverdau mit BsaI im linearen (lin.) Zustand.

Tab. 2.1: Injektionsaliquots für die phiC31 Integrase-vermittelte Rekombination

Mischung	Vektorname	β(Vektor-DNA)	β(phiC31-mRNA)
D14R14	pBvenusB	15 ng/μl sc.	10 ng/μl
D22R22	pBvenusB	3 ng/μl sc.	48 ng/μl
D23R23	pBvenusB	3 ng/μl lin.	48 ng/μl

Diese Mischungen wurden in den männlichen Vorkern und das Zytoplasma der Zygoten injiziert, die aus der Verpaarung von FVB-Weibchen mit homozygoten *Rosa26*^{10}-Männchen stammen. Die injizierten Zygoten wurden anschließend mittels Embryotransfer in die pseudo-schwangeren Ammentiere eingebracht.

Die aus diesen Zygoten resultierenden Nachkommen wurden mittels *Southern Blot* Analyse auf die Integration der *Venus*-Gensequenz in den *Rosa26*-Locus hin untersucht. Dazu wurde die genomische DNA mit EcoRV verdaut (Tab. 5.2) und die Nylonmembran mit der *Rosa26* 5'-Sonde (Abb. 6.3.4.1) hybridisiert. Anhand des Bandenmusters, das sich auf dem für drei Tage exponierten Röntgenfilm zeigte, konnte der Genotyp jeder einzelnen Maus in Bezug auf den *Rosa26*-Locus analysiert werden (Abb. 2.1).

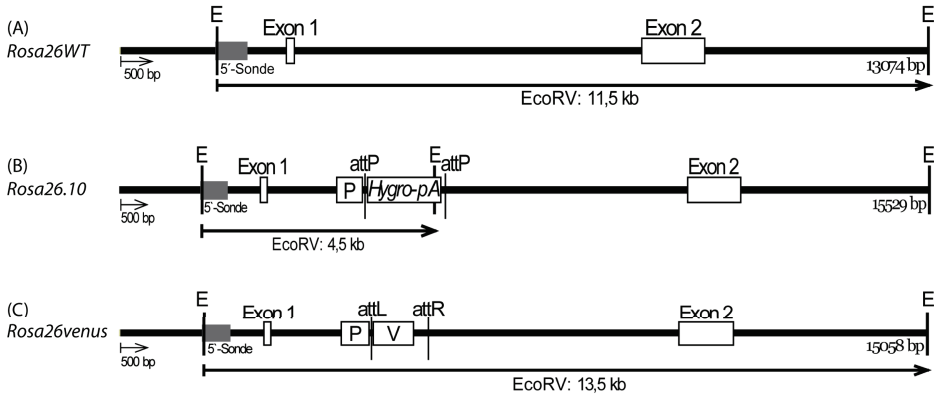


Abb. 2.1: Die drei verschiedenen *Rosa26*-Loci vor und nach der RMCE. **(A)** $Rosa26^{WT}$-Locus. Es ist der Bereich zwischen zwei EcoRV- (E-)Restriktionsschnittstellen dargestellt, in dem die beiden ersten Exons liegen. **(B)** $Rosa26^{10}$-Locus. Die Grafik zeigt den *Rosa26*-Locus nach der Integration eines PGK-Promotors (P) und zwei attP-Erkennungssequenzen (attP) zwischen denen sich ein *Hygromycin*-Resistenzgen (Hygro-pA) befindet. **(C)** $Rosa26^{Venus}$-Locus. Darstellung des *Rosa26*-Locus nach einer möglichen Rekombination zwischen dem $Rosa26^{10}$-Allel und dem exogen eingebrachten Plasmid *pBvenusB*. Der PGK-Promotor (P) bleibt dabei im Locus vorhanden. Das *Hygro*-Resistenzgen wird zusammen mit dem pA gegen das *Venus*-Reportergen (V) ausgetauscht. Jeweils eine Hälfte der attP- und attB-Erkennungsstellen verbinden sich zu attL und attR.

Die $Rosa26^{WT}$-DNA konnte nach dem EcoRV-Verdau anhand einer Bande bei 11,5 kb identifiziert werden. Das $Rosa26^{10}$-Allel wies eine Bande bei 4,5 kb auf. Die komplette Integration des *Venus*-Fragments zwischen den attB-Sequenzen ($Rosa26^{Venus}$) würde in einer 13,5 kb großen Bande resultieren. Es konnten jedoch, wie in dem *Southern Blot* in Abb. 2.2 beispielhaft gezeigt wurde, nur heterozygote $Rosa26^{10}/Rosa26^{WT}$-Mäuse, die aus der Verpaarung für die Zygotenproduktion stammen, identifiziert werden.

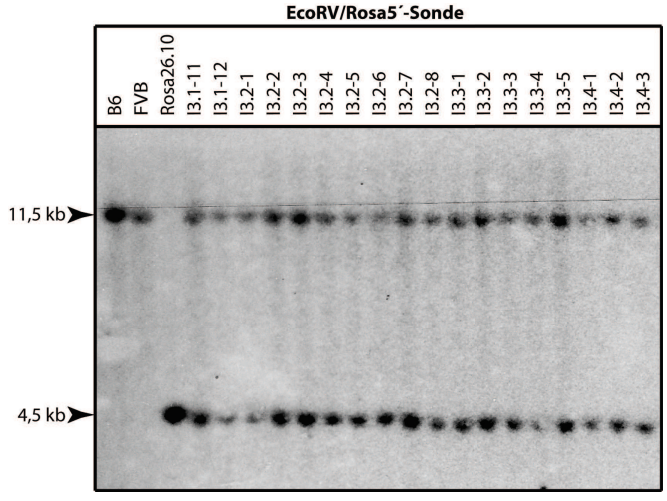


Abb. 2.2: *Southern Blot* einiger D14R14-Mäuse als Beispiel. Die $Rosa26^{WT}$-Bande befindet sich bei 11,5 kb und die $Rosa26^{10}$-Bande bei 4,5 kb. Alle auf diesem *Southern Blot* dargestellten Nachkommen der Pronukleus-Injektionen haben somit den Genotyp $Rosa26^{10}/Rosa26^{WT}$.

Insgesamt resultierten die Injektionen aller Mischungen zusammen in 160 Tieren, die analysiert wurden. Es konnten unter ihnen keine für die Integration des *Venus*-Reportergens positiven Mäuse gefunden werden (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Zusammenfassung der Ergebnisse der phiC31 Zygoten-Injektion

Mischung	β(DNA) β(RNA)	Gesamtzahl transferierter Zygoten	Gesamtzahl F0	Integrationen
D14R14	15 ng/μl sc. 10 ng/μl	377	99 (26,3 %)	0
D22R22	3 ng/μl sc. 48 ng/μl	142	28 (19,7 %)	0
D23R23	3 ng/μl lin. 48 ng/μl	186	33 (17,7 %)	0

Die Prozentangaben wurden aus dem Verhältnis der Gesamtzahl an analysierten Tieren (F0) zu der Gesamtzahl an transferierten Zygoten berechnet.

Zusammengenommen zeigte dieses Ergebnis, dass ein phiC31 Integrase-vermittelter Kassettenaustausch in Zygoten mit einer extrem geringen Frequenz erfolgen würde, da aus 160 Nachkommen kein positives Tier resultierte. Die in ES-Zellen mit Selektionsmarkern angewandte Methodik des RMCE stellt somit keine praktikable Methode zur Generierung genetisch veränderter Mäuse mittels Zygoten dar.

2.2 Genom-Modifikationen mittels ZFN

2.2.1 Genetische Manipulation des *Rosa26*-Locus

Als eine weitere, alternative Methode sollte untersucht werden, ob sich ZFN zusammen mit einem Gen-*Targeting*vektor zur genetischen Veränderung des Genoms in Zygoten eignen. Dafür wurde zu Beginn ebenfalls der in ES-Zellen etablierte *Rosa26*-Locus verwendet. ZFN, deren Zielsequenzen im ersten Intron des *Rosa26*-Gens oberhalb und unterhalb einer XbaI-Restriktionsschnittstelle liegen (Abb. 2.3), wurden von der Firma Sigma-Aldrich zur Verfügung gestellt. Es wurden in diesem Fall eine ZFN mit fünf Zinkfingern als Bindedomäne und eine ZFN mit 4 Zinkfingern verwendet. Der Abstand zwischen den beiden Bindestellen (auch *Spacer* genannt) beträgt 6 bp.



Abb. 2.3: Schema der ZFN-Bindung an den *Rosa26*-Locus. In blau und lila sind die zwei DNA-Bindedomänen der ZFN dargestellt. Die roten Scheren kennzeichnen jeweils eine Hälfte der *FokI*-Endonuklease (FokEL und FokKK). Die XbaI-Erkennungssequenz ist gelb eingefärbt.

2.2.1.1 Integration des β-*Gal*-Reportergens

Es wurde in dem ersten Versuchsteil, der die Integration des β-*Gal*-Reportergens umfasste, mit einem *in vitro* Testexperiment begonnen, bei dem IDG3.2 ES-Zellen mit unterschiedlichen Mengen (Tab. 2.3) an ZFN-Plasmiden (Abb. 6.3.3.2) und dem zuvor mit I-SceI linearisierten Gen-*Targeting*vektor pRosa26.5 (Abb. 6.3.1.2) transfiziert wurden. Nach der Transfektion wurden sich gleichmäßig auf jeweils eine 12-Well Platte ausgesät. Zur Visualisierung der HR und dem resultierenden *Knock-in* befand sich in dem Gen-*Targeting*vektor zwischen dem 5'- und 3'-Homologiearm zum *Rosa26*-Locus ein β-*Gal*-Reportergen. Wie in Tab. 2.3 und Abb. 6.4 ersichtlich konnten nach der β-*Gal*-Färbung vereinzelt positive (blau gefärbte) Kolonien gefunden werden. Man sollte bei der Betrachtung der Zahlenwerte jedoch bedenken, dass diese positiven Kolonien ohne Selektion identifiziert wurden. Die Effizienz der ZFN-vermittelten HR in ES-Zellen ist somit relativ hoch. Da die genaue Zellzahl pro Transfektion nicht bestimmt wurde, können an dieser Stelle keine absoluten Werte genannt werden.

Tab. 2.3: Verwendete DNA-Mengen und Resultate im ersten Testexperiment der Rosa26-ZFN in ES-Zellen

Platte	μg (Gen-*Targeting*-vektor)	μg (ZFN-Plasmid jeweils)	blaue Kolonien	Abbildung
1	25	3	120	
2	40	1	24	
3	40	5	10	
4	25	5	62	
5	15	1	14	

Nach diesen ersten positiven Resultaten in der Zellkultur wurden die ZFN als *in vitro* transkribierte mRNA zusammen mit dem, mit I-SceI linearisierten, *Targeting*vektor pRosa26$^{8\text{-}2}$ (Abb. 6.3.1.3) in den Pronukleus und das Zytoplasma von *Rosa26*^{WT}-Zygoten injiziert. Die dafür verwendeten Zygoten stammen aus der Verpaarung von C57BL/6J-Männchen mit FVB-Weibchen. Es wurden Injektionsaliquots mit 5 ng/μl Gen-*Targeting*vektor und jeweils 2,5 ng/μl ZFN-mRNA eingesetzt.

Es wurden unter den Zygoten beider Injektionstage blau eingefärbte Zellen gefunden, die somit das β-*Gal*-Reportergen exprimieren und damit X-Gal in Galactosidase und den blauen Farbstoff, der unter dem Mikroskop sichtbar ist, umwandeln. Es wurden in beiden Experimenten zusammen 91 Zellansammlungen analysiert, wobei 24 ganz blau eingefärbte, 7 teilweise eingefärbte und 60 komplett weiße Zellen gefunden werden konnten. Dabei waren die blau eingefärbten Zellen in allen bis zu diesem Zeitpunkt entwickelten Stadien vertreten. Eine genaue Auflistung der einzelnen Ergebnisse mit zwei Beispielabbildungen ist in Tab. 2.4 dargestellt.

Tab. 2.4: Resultate der β-Gal-Färbung der Zygoten

Nr.	injizierte Zygoten	blau	teilweise blau	weiß	verloren gegangen	Beispiel-abbildung
Z.1	38	7	3	37	24	
Z.2	33	17	4	23	26	

Nachdem die zwei *in vitro* Experimente zeigten, dass die ZFN sowohl in ES-Zellen als auch in Zygoten aktiv sind, wurden die injizierten Zygoten direkt nach der Injektion in Ammentiere transferiert, die Embryonen am Tag E18 präpariert und auf eine Genom-Modifikation hin untersucht. Dies geschah zum Einen durch die Expressionsanalyse der β-*Gal*-Färbung in dem halben Embryo und zum Anderen durch die Untersuchung der Gen-Modifikationen (HR oder NHEJ) auf DNA-Ebene anhand der *Southern Blot*- und PCR-Analyse mit nachfolgender Sequenzierung der PCR-Fragmente.

Tab. 2.5: Injektionsaliquots für die Vorkern-Injektion mit dem Gen-*Targeting*vektor pRosa26.8-2

Mischung	Vektorname	β(Vektor-DNA)	β(ZFN-mRNA) jeweils
Lot. 1	pRosa26.8-2	5 ng/μl sc.	2,5 ng/μl
Lot. 2	pRosa26.8-2	10 ng/μl sc.	12,5 ng/μl

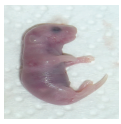
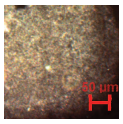
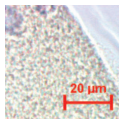
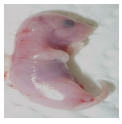
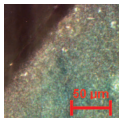
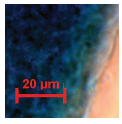
Es wurden in dieser Versuchsreihe zwei verschiedene Mischungen (Tab. 2.5) vorbereitet. Beide Mischungen wurden in *Rosa26*^{WT}-Zygoten, die aus der Verpaarung von C57BL/6J-Männchen mit FVB-Weibchen stammen, injiziert und die injizierten Zygoten anschließend in die Ammentiere transferiert. Am Embryonaltag E18 wurden die Embryonen entnommen, getötet und für die Färbung und die DNA-Extraktion vorbereitet. Alle Embryonen waren normal entwickelt (Abb. 2.4).



Abb. 2.4: Normal entwickelter Embryo am Tag E18.

Zuerst wurde die Färbung der einzelnen Embryonen untersucht. Dafür wurde eine Hälfte dem Protokoll folgend eingefärbt und anschließend unter dem Mikroskop analysiert. In Tab. 2.6 ist der ganze, ungefärbte Körper, die Leber nach der Färbung und ein vergrößerter Ausschnitt dieser Leber eines *Rosa26*^{WT}-Embryos und eines Embryos nach der Integration des β-*Gal*-Reportergens in den *Rosa26*-Locus dargestellt.

Tab. 2.6: Darstellung der Resultate der β-*Gal*-Färbung in den Embryonen

Genotyp	Embryo	Leber	Vergrößerung der Leber
WT/WT			
WT/HR			

Die Färbung zeigte jedoch häufig falsch-positive Ergebnisse, weswegen alle Tiere zusätzlich in *Southern Blots* und die dabei identifizierten Tiere mit einer Modifikation im *Rosa26*-Locus mit Hilfe einer speziell etablierten PCR-Strategie mit anschließender Sequenzierung analysiert wurden.

Die DNA der Tiere wurde dafür aus einem Sechstel des Embryos isoliert und für die *Southern Blot*-Analyse in drei verschiedenen Ansätzen mit EcoRV, XbaI oder EcoRV/SwaI (Tab. 5.2) verdaut. Die *Southern Blot*-Membranen wurden mit der *Rosa26* 5'-Sonde (Abb. 6.3.4.1), der *Rosa26* 3'-Sonde (Abb. 6.3.4.2) oder der β-*Gal*-Sonde (Abb. 6.3.4.2.1) hybridisiert und für ein bis drei Tage auf Röntgenfilmen exponiert. Anhand der resultierenden Banden konnte der Genotyp der einzelnen Mäuse in Bezug auf den *Rosa26*-Locus analysiert werden. Es waren dabei auf den unterschiedlichen *Southern Blots* die drei verschiedenen Genotypen – *Rosa26*^{WT}, *Rosa26*$^{8\text{-}2}$, *Rosa26*^{NHEJ} – zu sehen (Abb. 2.5).

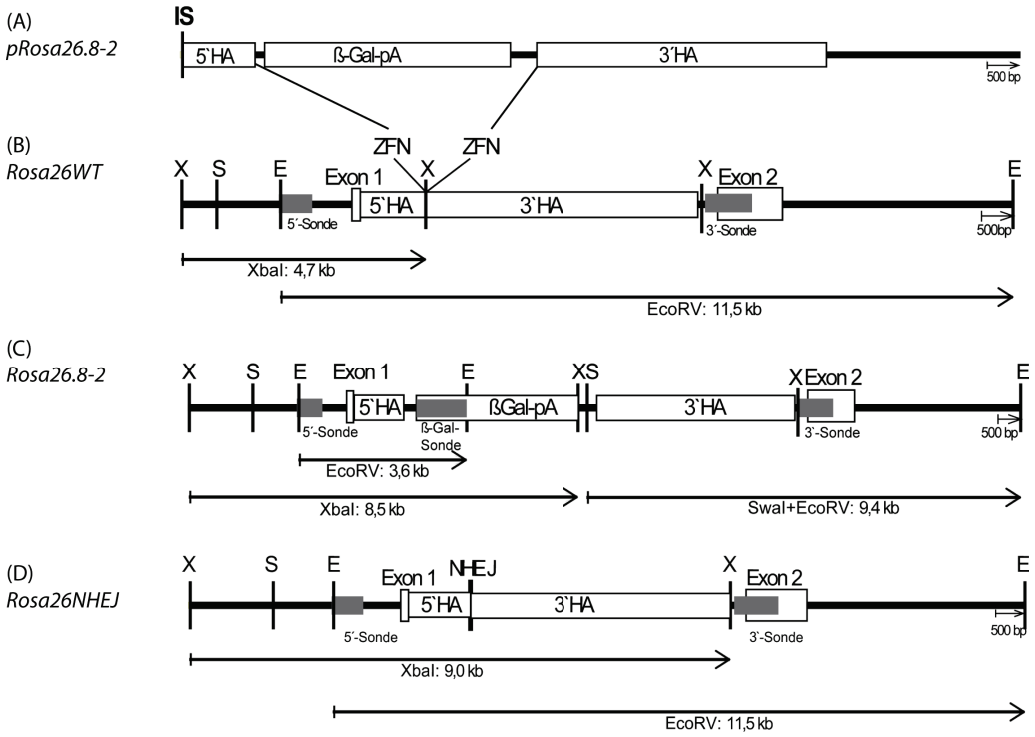


Abb. 2.5: Die drei verschiedenen *Rosa26*-Loci nach der Pronukleus-Injektion der Rosa26-ZFN-mRNA zusammen mit dem pRosa26.8-2 Gen-*Targeting*vektor. **(A)** Beim pRosa26.8-2 Gen-*Targeting*vektor befindet sich das β-*Gal*-Reportergen (β-Gal-pA) zwischen dem 5'- und dem 3'-Homologiearm (HA) des *Rosa26*-Locus. **(B)** Darstellung des *Rosa26*^{WT}-Locus mit den ZFN-Bindestellen rechts und links der XbaI-Erkennungsstelle (X) im ersten Intron des Locus. **(C)** *Rosa26*$^{8\text{-}2}$. Integration des β-*Gal*-Reportergens zwischen die 5'- und 3'-HA des *Rosa26*-Locus nach der Erzeugung eines DSB durch die ZFN. **(D)** *Rosa26*^{NHEJ}-Locus nach dem Auftreten eines NHEJ-Ereignisses aufgrund eines zuvor erzeugten DSB. Die Positionen der SwaI (S), EcoRV (E), XbaI (X) und I-SceI (IS) Erkennungsstellen, der *Southern Blot* Sonden (5'-Sonde, 3'-Sonde, β-*Gal*-Sonde) und der Exons sind dargestellt. Die Größen der einzelnen Fragmente sind gekennzeichnet.

Durch den EcoRV-Verdau und der Hybridisierung der DNA mit der *Rosa26* 5'-Sonde konnte ein Embryo (T4.3-1) mit einer kompletten Integration des Vektors identifiziert werden (Abb. 2.6A). Dieses Ergebnis wurde sowohl im *Southern Blot* mit dem XbaI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde (Abb. 2.6B), dem XbaI-Verdau nach der Hybridisierung mit der β-*Gal*-Sonde (Abb. 2.6C) als auch mit dem EcoRV/SwaI-Doppelverdau in Kombination mit der *Rosa26* 3'-Sonde bestätigt (Abb. 2.6D).

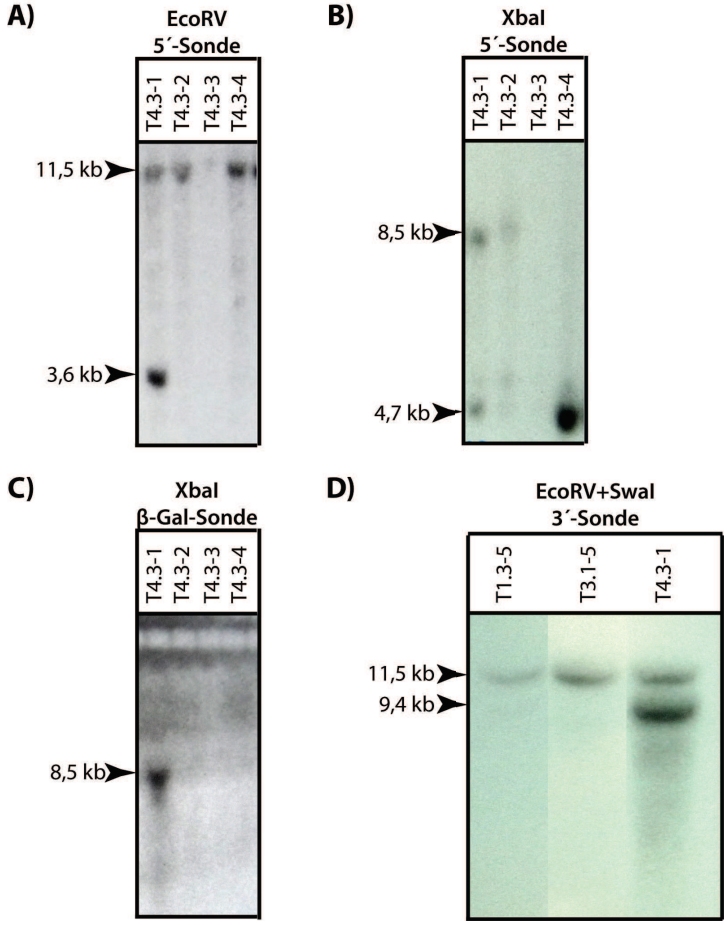


Abb. 2.6: *Southern Blots* mit der DNA von Embryo T4.3-1. **(A)** *Southern Blot* nach dem EcoRV-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde. Der *Rosa26*^{WT}-Locus ist durch eine Bande bei 11,5 kb zu erkennen und ein Tier mit einer kompletten Integration des 5'-HA des Gen-*Targeting*vektors weist eine Bande bei 3,6 kb auf. **(B)** *Southern Blot* nach dem XbaI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde. Den *Rosa26*^{WT}-Locus kann man anhand einer Bande bei 4,7 kb identifizieren und der Locus mit einer HR wird durch eine Bande der Größe von 8,5 kb dargestellt. **(C)** Die Rehybridisierung der DNA nach dem XbaI-Verdau mit der β-*Gal*-Sonde zeigt Tiere, die das β-*Gal*-Reportergen komplett und an der richtigen Stelle integriert haben, anhand einer 8,5 kb-Bande. **(D)** Nach dem EcoRV/SwaI-Doppelverdau und einer Expositionsdauer von einem Tag kann man den *Rosa26*^{WT}-Locus anhand einer Bande bei 11,5 kb und den Locus mit einer eingetretenen HR anhand einer Bande bei 9,4 kb identifizieren.

Außerdem wurde im EcoRV/SwaI-Doppelverdau und der Hybridisierung mit der *Rosa26* 3'-Sonde nach einer verlängerten Expositionsdauer auf drei Tage ein weiterer Embryo (T1.3-5) identifiziert, bei dem der 3'-HA des Gen-*Targeting*vektors in das Genom integriert wurde (Abb. 2.7A). Dies konnte durch eine Bande nach der Hybridisierung des XbaI *Southern Blots* mit der β-*Gal*-Sonde bestätigt werden (Abb. 2.7B). Bei der Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde konnte keine modifizierte Bande identifiziert werden. Somit fand die HR bei diesem Tier nur zwischen den Erkennungsstellen der β-*Gal*-Sonde und der *Rosa26* 3'-Sonde statt.

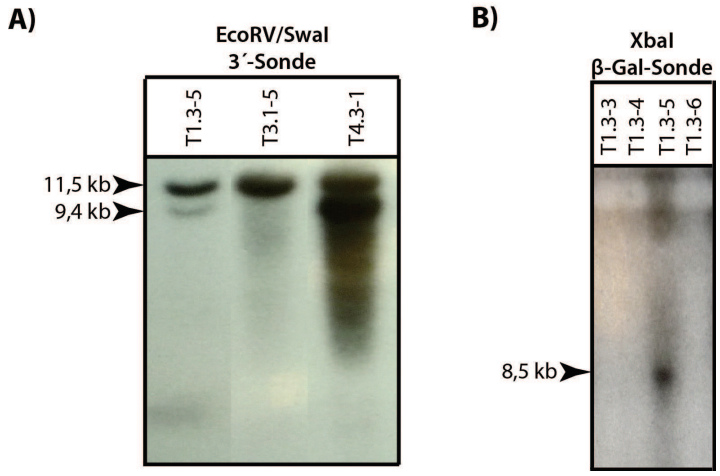


Abb. 2.7: *Southern Blots* der DNA von Embryo T1.3-5. **(A)** *Southern Blot* nach dem EcoRV/SwaI-Doppelverdau und der Hybridisierung mit der *Rosa26* 3'-Sonde. Nach einer verlängerten Expositionsdauer von drei Tagen konnte man den $Rosa26^{WT}$-Locus anhand einer Bande bei 11,5 kb erkennen. Embryo T1.3-5 wies zusätzlich eine für den $Rosa26^{8\text{-}2}$-Locus typische Bande bei 9,4 kb auf. **(B)** *Southern Blot* nach dem XbaI-Verdau und der Hybridisierung mit der β-*Gal*-Sonde. Bei Embryo T1.3-5 kann man die Integration des β-*Gal*-Reportergens anhand einer Bande bei 8,5 kb erkennen.

Weiterhin wurden nach dem XbaI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde zwölf Embryonen (T1.2-8; T1.2-9; T1.3-5; T1.3-6; T1.3-7; T3.1-3; T3.1-5; T4.3-2; T7.1-8; T8.1-2; T8.2-1; T8.3-2) identifiziert, die ein NHEJ-Ereignis durch den Verlust der XbaI-Erkennungsstelle aufwiesen, wobei bei vier Tieren (T1.3-5; T3.1-3; T3.1-5; T7.1-8; T8.3-2) der Verlust der XbaI-Stelle in beiden Allelen nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.8). Bei diesen NHEJ-Ereignissen kann es zur Deletion oder Insertion von Basenpaaren an der Stelle des DSB gekommen sein. Dies kann mit Hilfe der Sequenzierung des *Rosa26*-Locus dieser Tiere genauer analysiert werden.

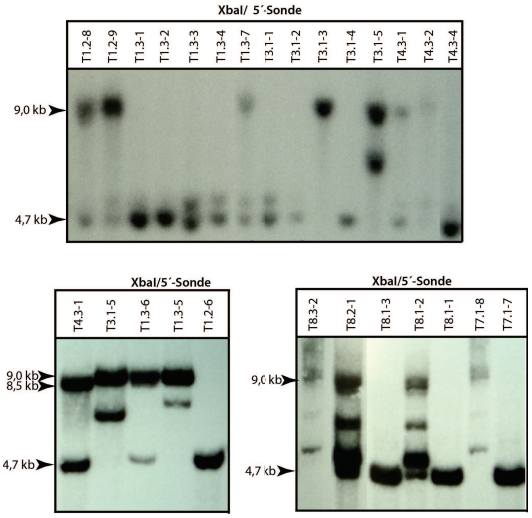


Abb. 2.8: *Southern Blot*-Analyse der Tiere nach dem XbaI-Verdau und der anschließenden Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde. Den *Rosa26*^{WT}-Locus erkennt man anhand einer Bande bei 4,7 kb. Der *Rosa26*^{NHEJ}-Locus weist bei kleineren Veränderungen eine Bande bei 9,0 kb auf, bei größeren Veränderungen, wie z.B. dem Verlust mehrerer Basen oder der teilweisen Integration des Reporterkonstruktes (T3.1-5; T1.3-5), kann es auch zu einer Bande jeder anderen Größe kommen. Tiere mit einer kompletten HR zwischen dem endogenen Locus und dem *Targeting*vektor weisen eine Bande bei 8,5 kb auf (T4.3-1).

Nach dem *Southern Blot* mit dem XbaI-Verdau und der Hybridisierung mit der internen β-*Gal*-Sonde konnten Zufallsintegrationen ausgeschlossen werden, da keine Fragmente einer anderen Bandengröße außer den erwarteten 8,5 kb zu sehen waren.

Als nächstes wurden die Genom-Modifikationen von sieben interessanten Kandidatenembryonen genauer untersucht. Dazu wurden drei PCR-Reaktionen mit verschiedenen Primerpaar-Kombinationen (5HA/SA1; pA2/3HA; 5HA/3HA;Abb. 2.9) durchgeführt und deren Ergebnis auf einem Gel (Abb. 2.10) und anhand der Sequenzierung des isolierten DNA-Fragmente analysiert .

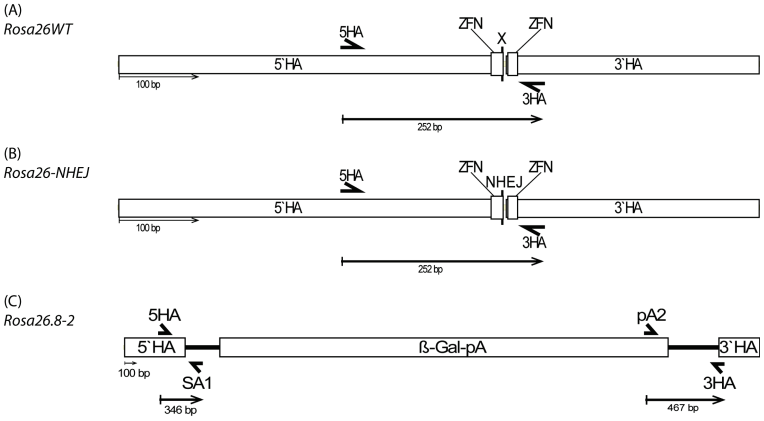


Abb. 2.9: Darstellung der Fragmentgrößen für die PCR-Analyse. **(A)** Im *Rosa26*^{WT}-Locus können nur die Primer 5HA und 3HA in den Homologiearmen binden. Bei der PCR-Amplifikation mit diesen Primern entsteht ein 252 bp großes Fragment. **(B)** Der *Rosa26*^{NHEJ}-Locus zeigt mit den 5HA und 3HA Primern ebenfalls ein Fragment von 252 bp. **(C)** An den *Rosa26*$^{8\text{-}2}$-Locus können alle vier Primer (5HA, SA1, pA2, 3HA) binden. Eine PCR mit dem Primerpaar 5HA/SA1 resultiert in einem 346 bp großen Fragment. Eine PCR mit dem Primerpaar pA2/3HA resultiert in einem 467 bp großen Fragment.

Bei der PCR-Amplifikation mit dem Primerpaar 5HA/SA1 zeigte nur Embryo T4.3-1 ein 346 bp großes Fragment. Bei der Amplifikation mit den Primern pA2 und 3HA konnte ein 467 bp großes Fragment in den Embryonen T3.1-5 und T4.3-1 nachgewiesen werden. Da bei der Primerkombination 5HA/3HA nicht zwischen dem *Rosa26*^{WT}-Allel und einem Allel mit einem NHEJ-Ereignis unterschieden werden konnte, wurden vier PCR-Fragmente (T1.2-9; T1.3-5; T3.1-3; T4.3-1) mit Hilfe des *StrataClone Blunt PCR Cloning Kits* in *E. colis* eingebracht. Die Plasmide mit den integrierten PCR-Fragmenten wurden isoliert und eine zufällige Auswahl wurde zusammen mit den PCR-Produkten der Primer 5HA/SA1 und pA2/3HA sequenziert. Bei der Sequenzierung konnte bestätigt werden, dass es zu verschiedenen Genom-Modifikationen durch das NHEJ-Ereignis und die HR in den ausgewählten Tieren kam.

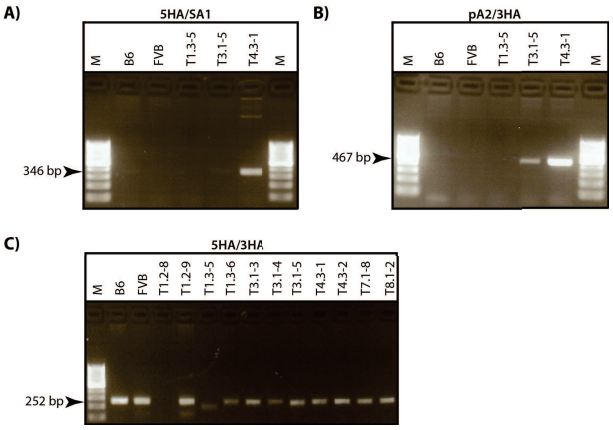


Abb. 2.10: PCR-Analyse ausgewählter Embryonen mit einer im *Southern Blot* identifizierten Genom-Modifikation im *Rosa26*-Locus. **(A)** PCR-Amplifikation eines 346 bp großen Fragmentes mit dem Primerpaar 5HA/SA1. **(B)** PCR-Amplifikation eines 467 bp großen Fragmentes mit dem Primerpaar pA2/3HA. **(C)** Amplifikation eines 252 bp-Fragmentes des *Rosa26*^{WT}- oder des *Rosa26*^{NHEJ}-Locus mit Hilfe des Primerpaares 5HA/3HA. Als Negativkontrolle diente die DNA einer C57BL/6J (B6) und einer FVB-Maus.

Beim Embryo T1.2-9 konnte die Deletion von 10 bp in dem einen Allel und von 18 bp in dem anderen Allel durch die Sequenzierung nachgewiesen werden (Abb. 2.11). Zu diesem Ereignis kam es, nachdem die ZFN in beiden Allelen einen DSB erzeugt hatten, der durch das NHEJ repariert wurde. Es kam dabei zum Verlust beider XbaI-Schnittstellen und damit war kein ursprüngliches *Rosa26*-Allel mehr vorhanden (Abb. 2.8).

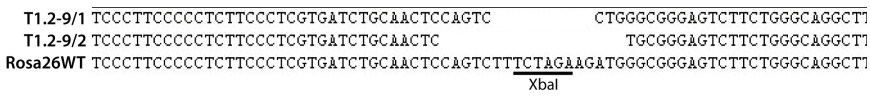


Abb. 2.11: Ergebnis des Sequenzanalyse von Embryo T1.2-9. Verlust von 10 bp in einem Allel (T1.2-9/1) und Deletion von 18 bp im anderen Allel (T1.2-9/2) im Vergleich zum *Rosa26*^{WT}-Allel mit eingezeichneter XbaI-Erkennungsstelle.

Embryo T1.3-5 wies nach der Sequenzierung des 5HA/3HA-Fragmentes in einem Allel einen Nukleotidverlust von 62 bp auf (T1.3-5/1) und in dem anderen Allel konnte durch die Sequenzierung des PCR-Fragmentes der Primer pA2/3HA die Integration des 3'-Bereiches des Gen-*Targeting*vektors bestätigt werden (T1.3-5/2) (Abb. 2.12). Somit konnte auch auch hier kein ursprüngliches *Rosa26*^{WT}-Allel mehr nachgewiesen werden (Abb. 2.8.)

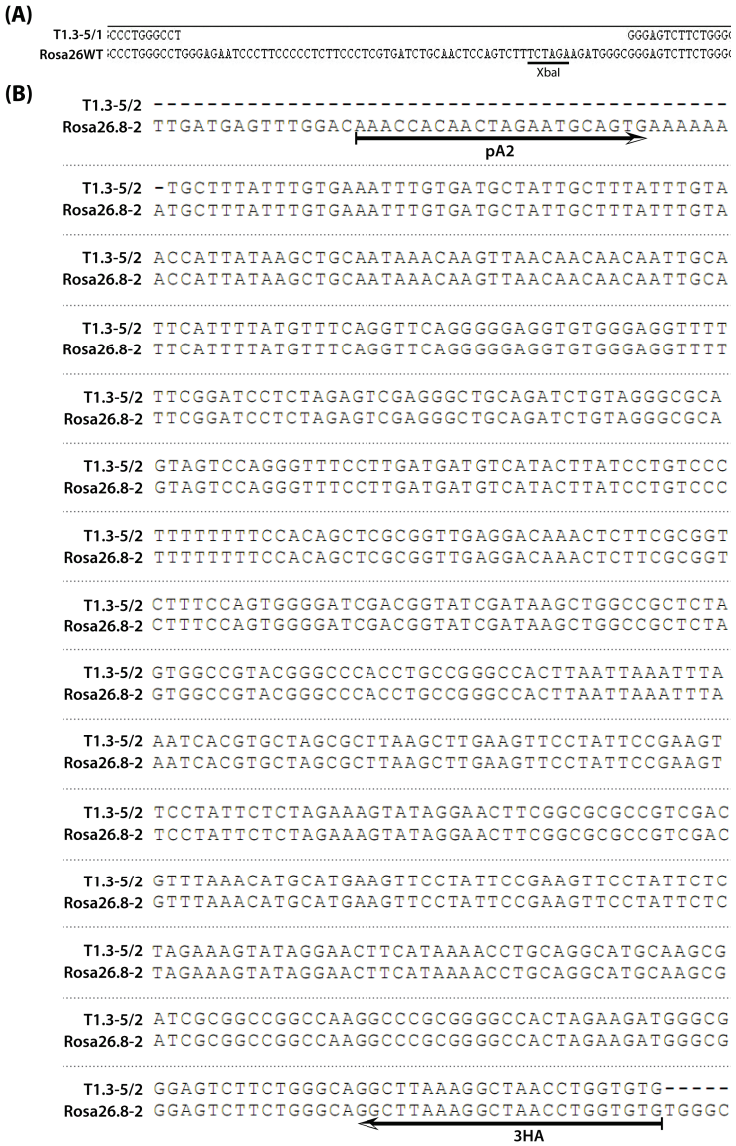


Abb. 2.12: Sequenzanalyse von Embryo T1.3-5. **(A)** Die Analyse des 252 bp großen Fragmentes aus der PCR-Amplifikation mit den Primern 5HA und 3HA ergab die Deletion von 62 bp in einem Allel (T1.3-5/1) des Embryos im Vergleich zum *Rosa26*^{WT}-Locus, was im Verlust der XbaI-Erkennungsstelle resultierte. **(B)** Die Analyse des 467 bp großen Fragmentes nach der PCR-Amplifikation der genomischen DNA mit der pA2/3HA-Primerkombination ergab die komplette Homologie dieses Teils des zweiten Allels (T1.3-5/2) mit der erwarteten *Rosa26*$^{8\text{-}2}$-Sequenz. Die Bindestellen der beiden Primer sind gekennzeichnet.

Bei Embryo T3.1-5 konnte durch die Sequenzierung des PCR-Fragmentes der Primer pA2/3HA eine Integration des 3'-Bereiches des Gen-*Targeting*vektors in einem Allel identifiziert werden (Abb. 2.13). Mehrere Sequenzierungsversuche des Fragmentes aus der 5HA/3HA PCR-Amplifikation konnten keine schlüssigen und verlässlichen Ergebnisse für das zweite Allel liefern. Es muss jedoch, wie in Abb. 2.8 ersichtlich, auch hier eine Modifikation des *Rosa26*-Locus stattgefunden haben, da hier ebenfalls die XbaI-Erkennungsstelle verloren gegangen ist.

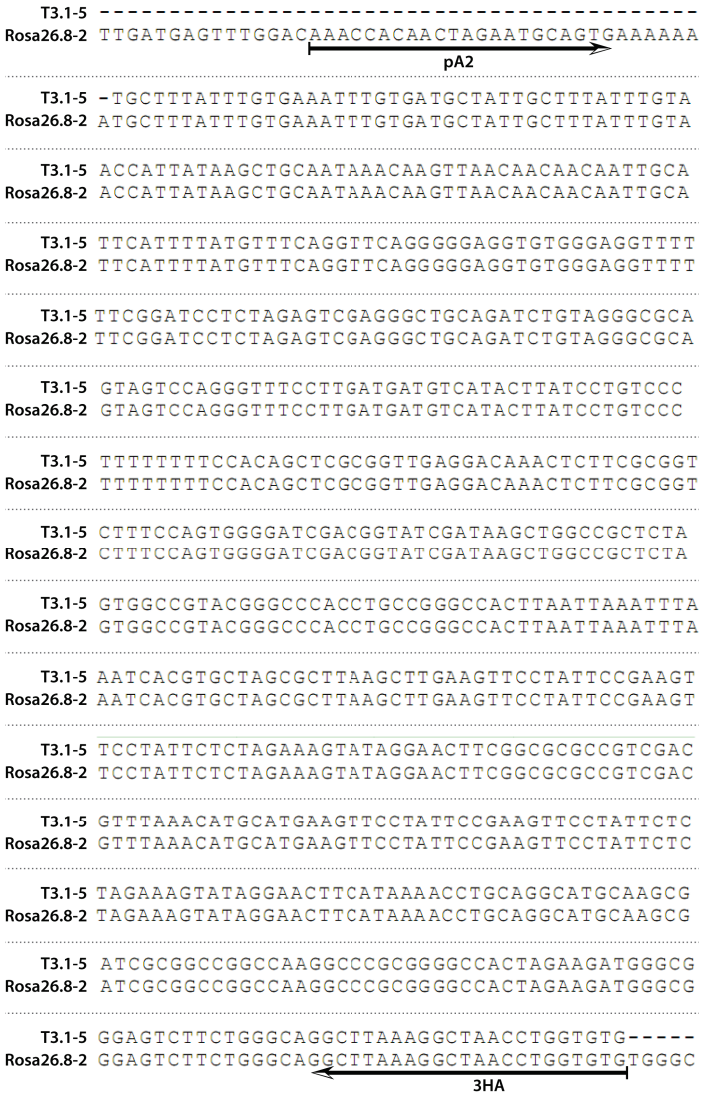


Abb. 2.13: Sequenzvergleich des PCR-Fragmentes von Embryo T3.1-5 nach der Amplifikation mit Hilfe der pA2 und 3HA Primer mit dem *Rosa26*$^{8\text{-}2}$-Locus. Es besteht eine komplette Homologie zwischen den beiden Sequenzen. Die Bindestellen der beiden Primer sind dargestellt.

Zum Schluss wurden auch die PCR-Fragmente des Embryos T4.3-1, der in den *Southern Blots* eine komplette Integration des Reportergens zeigte (Abb. 2.6), sequenziert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass beide Enden des Reporterkonstrukts komplett und ohne Mutationen an den Verbindungsstellen in ein Allel des *Rosa26*-Locus eingebaut wurden (Abb. 2.14). Das zweite Allel befand sich, wie aus Abb. 2.6 ersichtlich, im *Rosa26*^{WT}-Zustand.

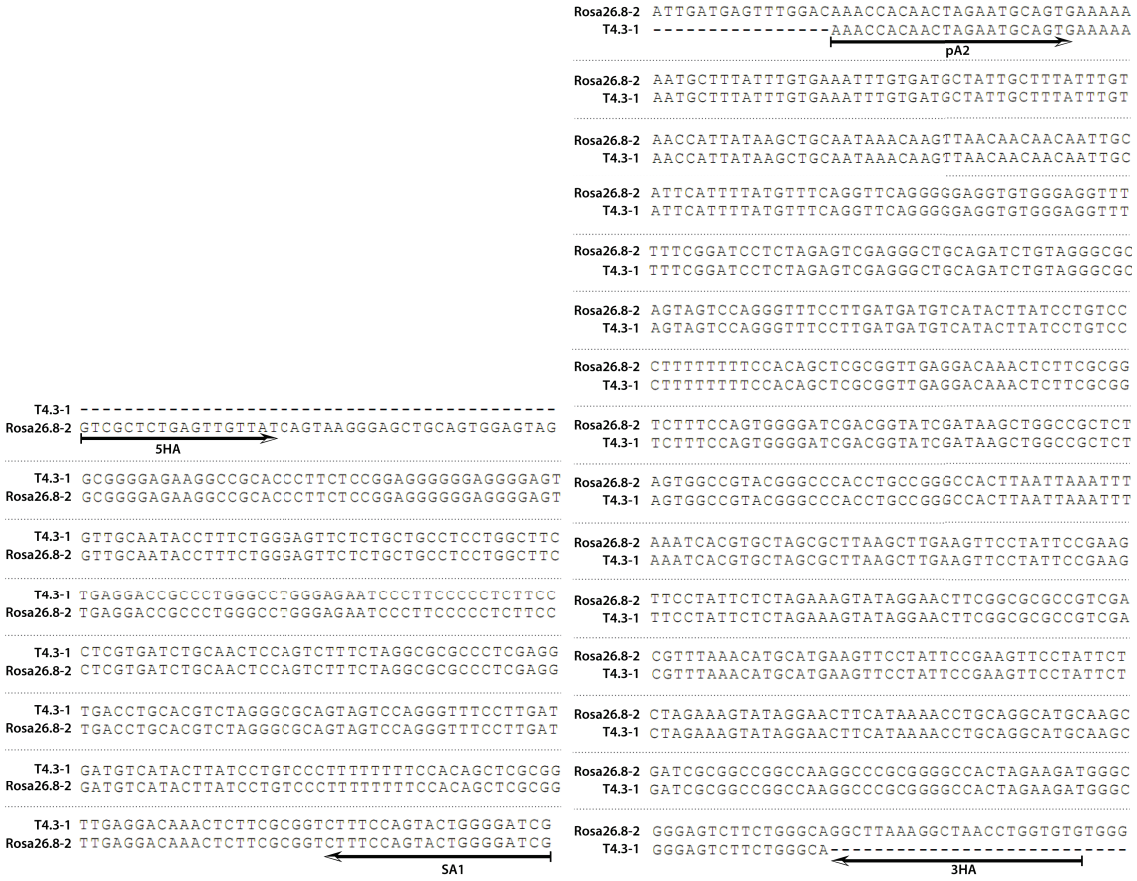


Abb. 2.14: Sequenzvergleich der PCR-Fragmente von Embryo T4.3-1 mit dem *Rosa26*$^{8\text{-}2}$-Locus. Amplifikation der PCR-Fragmente mit den Primerkombinationen 5HA/SA2 und pA2/3HA. Es existiert in beiden Analysen eine vollständige Homologie zwischen den Sequenzen der PCR-Fragmente und der vorhergesagten Sequenz des Locus nach der HR.

Es wurden in diesem ersten *in vivo* Experiment zwei verschiedene DNA/RNA-Mischungen analysiert (Tab. 2.7). Bei der Mischung Lot. 1 wurden 469 injizierte Zygoten transferiert, woraus 64 Embryonen für die Analyse resultierten. Unter diesen befanden sich zwölf mit einem eingetretenen NHEJ-Ereignis, zwei bei denen der Vektor halb integriert war und ein Tier bei dem es zur kompletten Integration des Vektors kam. Dies resultierte in einer Frequenz der HR in Bezug auf die Gesamtzahl der analysierten Embryonen von 1,6 %. Wenn man die zwei Tiere mit der halben Integration des Gen-*Targeting*vektors berücksichtigt, ergibt sich sogar eine Frequenz von 4,7 %. Das NHEJ, durch das es zu einem *Knockout* des betroffenen Gens kommt, trat mit einer Frequenz von 18,8 % in Bezug auf die Gesamtzahl der analysierten Embryonen auf. Bei der Mischung Lot. 2 wurden nur 89 Zygoten injiziert und transferiert, woraus zwölf Embryonen resultierten. Bei diesen wenigen Tieren konnte keine Gen-Modifikation nachgewiesen werden. Es wurden in beiden Experimenten keine Tiere mit einer Zufallsintegration des Reporterkonstruktes gefunden.

Tab. 2.7: Ergebnisse der Zygoten-Injektion mit dem β-*Gal*-Reporterkonstrukt

	β(DNA) β(RNA)	Gesamtzahl transferierter Zygoten	Gesamtzahl E18	NHEJ	HR	halbe HR	transgene Tiere
Lot. 1	5 ng/μl sc. 2,5 ng/μl	469	64 (13,8 %)	12 (2,6 %)	1 (0,2 %)	2 (0,4 %)	0
Lot. 2	10 ng/μl sc. 12,5 ng/μl	89	12 (13,5 %)	0	0	0	0

Die Prozentangaben beziehen sich hier auf das Verhältnis des entsprechenden Tabellenwertes zu der Gesamtzahl an transferierten Zygoten.

Es konnte somit in diesem ersten *in vivo* Experiment gezeigt werden, dass die HR mit einer effektiven Frequenz von 4,7 % in Zygoten auftritt, nachdem mit Hilfe der ZFN ein DSB im Genom erzeugt worden ist. Da die β-*Gal*-Färbung jedoch nicht sehr spezifisch war, und somit nicht sicher festgestellt werden konnte, ob das β-*Gal*-Reportergen wirklich funktionsfähig integriert war, wurde im Folgenden das Venus-Fluoreszenzprotein als Reportergen verwendet.

2.2.1.2 Integration des *Venus*-Reportergens

Wie hier bereits gezeigt werden konnte, erhöhen die von Sigma zur Verfügung gestellten ZFN gegen den *Rosa26*-Locus zusammen mit einem Gen-*Targeting*vektor, der ein β-*Gal*-Reportergen beinhaltet, die Frequenz der HR in Zygoten (4,7 %) gegenüber der Frequenz der HR in Zygoten, die nur mit einem Gen-*Targeting*vektor injiziert wurden. Nun sollte in diesem Teil herausgefunden werden, ob die Erhöhung der Frequenz auch eintritt, wenn ein anderes Reportergen verwendet wird. Außerdem sollte sicher festgestellt werden, ob das Reportergen nach der HR noch voll funktionstüchtig ist. Dazu wurde das *Venus*-Gen als Reporter verwendet, dessen Protein durch die Belichtung mit der entsprechenden Wellenlänge eine grüne Fluoreszenz im Gewebe zeigt.

Es wurden bei dem folgenden Experiment ebenfalls zuerst die Embryonen am Tag E18 entnommen und auf genomische Veränderungen hin analysiert, da die Tiere auch hier zu Beginn auf Zufallsintegrationen hin untersucht werden mussten. Die Embryonen stammen aus den durchgeführten Pronukleus-Injektion mit den Zygoten aus der Verpaarung von C57BL/6J-Männchen mit FVB-Weibchen. Diese Zygoten wurden jeweils mit einer von vier verschiedenen DNA/RNA-Mischungen injiziert (Tab. 2.8) und anschließend in Ammentiere transferiert. Zur Herstellung dieser Mischungen wurde diesmal ein Gen-*Targeting*vektor verwendet, der das oben erwähnte *Venus*-Reportergen zwischen dem 5'- und 3'-Homologiearm besaß (Abb. 6.3.1.4). Dieser Vektor wurde für drei Mischungen mit dem Restriktionsenzym I-SceI linearisiert.

Tab. 2.8: Injektionsaliquots für die Vorkern-Injektion des pRosa26.3-3

Mischung	Vektorname	β(Vektor-DNA)	β(ZFN-mRNA) jeweils
Lot. 3	pRosa26.3-3	10 ng/μl lin.	3 ng/μl
Lot. 4	pRosa26.3-3	15 ng/μl lin.	3 ng/μl
Lot. 5	pRosa26.3-3	20 ng/μl lin.	3 ng/μl
Lot. 6	pRosa26.3-3	15 ng/μl sc.	3 ng/μl

Diese Embryonen waren ebenfalls normal entwickelt (Abb. 2.15). Die Intaktheit des *Venus*-Reportergens sollte zu Beginn in den Embryonen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert werden. Die Expression des *Venus*-Reportergens war aber leider in den Embryonen so schwach, sodass es nicht möglich war ohne eine vorhandene Positiv-Kontrolle zwischen den Tieren mit einer möglichen HR und denen mit einem *Rosa26*^{WT}-Allel zu unterscheiden.



Abb. 2.15: Abbildung eines normal entwickelten Embryos nach der HR mit dem pRosa26.3-3 Vektor.

Deshalb wurde dazu übergegangen, die Tiere sofort in verschiedenen *Southern Blots* zu analysieren. Dazu wurde die DNA aus einem Sechstel jedes Embryos isoliert und mit BamHI, XbaI oder ApaI verdaut (Tab. 5.2). Die resultierenden Membranen wurden entweder mit der radioaktiv markierten *Rosa26* 5'-Sonde (Abb. 6.3.4.1), der *Rosa26* 3'-Sonde (Abb. 6.3.4.2) oder der *Venus*-Sonde (Abb. 6.3.4.2.2) hybridisiert und für ein bis vier Tage auf einen Röntgenfilm exponiert. Anhand des aufgetretenen Bandenmusters konnte jedem Embryo ein bestimmter Genotyp – *Rosa26*^{WT}, *Rosa26*$^{3\text{-}3}$, *Rosa26*^{NHEJ} – zugeordnet werden (Abb. 2.16).

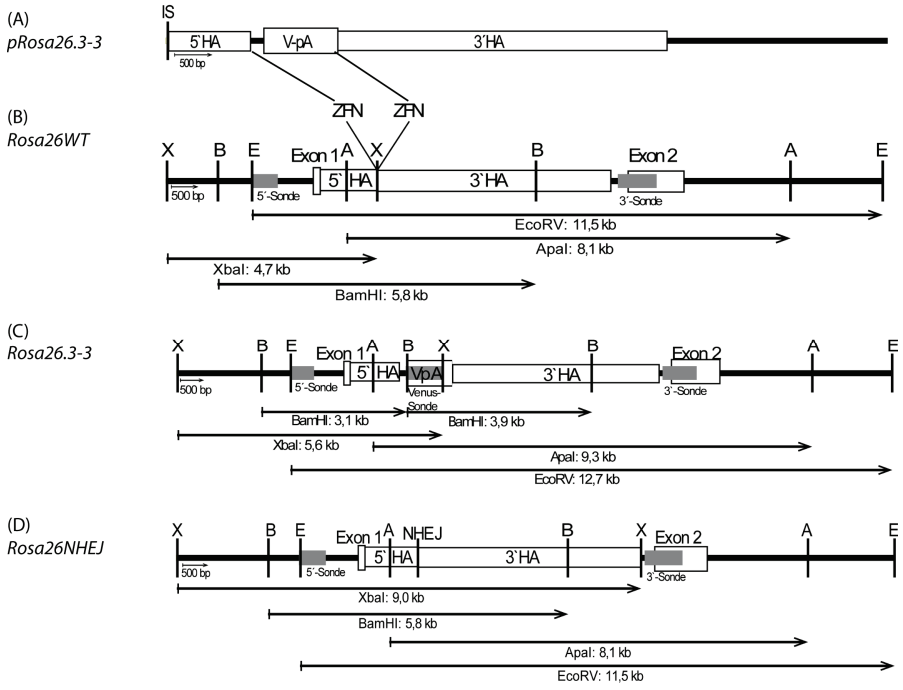


Abb. 2.16: Gen-*Targeting*vektor pRosa26.3-3 und die drei verschiedenen *Rosa26*-Loci. **(A)** Der Gen-*Targeting*vektor pRosa26.3-3 besteht aus dem 5'- und dem 3'-HA zum *Rosa26*-Locus, zwischen denen sich das *Venus*-Reportergen (V-pA) befand. Der Vektor konnte mit dem Restriktionsenzym I-SceI (IS) linearisiert werden. **(B)** Der *Rosa26*^{WT}-Locus mit dem ersten und zweiten Exon, zwischen denen sich die HA zum Gen-*Targeting*vektor und die ZFN-Bindestellen befinden. **(C)** Darstellung des *Rosa26*$^{3\text{-}3}$-Locus nach der erfolgreichen Integration des Gen-*Targeting*vektors. **(D)** Abbildung des *Rosa26*^{NHEJ}-Locus nach dem erfolgreichen DSB durch die ZFN und die Wiedervereinigung der DNA-Enden unter Deletion oder Insertion von Basenpaaren. Die Positionen der XbaI (X), BamHI (B), EcoRV (E) und ApaI (A) Restriktionsenzyme, der *Southern Blot*-Sonden (5'-Sonde, 3'-Sonde, *Venus*-Sonde) und die Größen der entsprechenden DNA-Fragmente sind abgebildet.

Durch den XbaI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde konnten 24 Embryonen (T12.2-18; T12.2-19; T13.1-2; T13.1-8; T13.1-9; T13.2-2; T13.2-4; T13.2-5; T13.2-6; T13.2-7; T17.1-4; T17.1-6; T17.1-8; T17.3-4; T17.3-5; T17.3-6; T17.3-8; T18.1-6; T18.2-5; T19.1-2; T19.2-2; T22.1-6; T22.1-7; T22.1-8) identifiziert werden, in denen ein NHEJ-Ereignis aufgetreten ist, wobei bei drei Embryonen (T18.1-6; T18.2-5; T19.2-2) kein *Rosa26*^{WT}-Allel mehr vorhanden war (Abb. 2.17). Bei Embryo T18.1-6 konnte auf diesem *Southern Blot* das Ereignis einer HR anhand einer Bande bei 5,6 kb nachgewiesen werden.

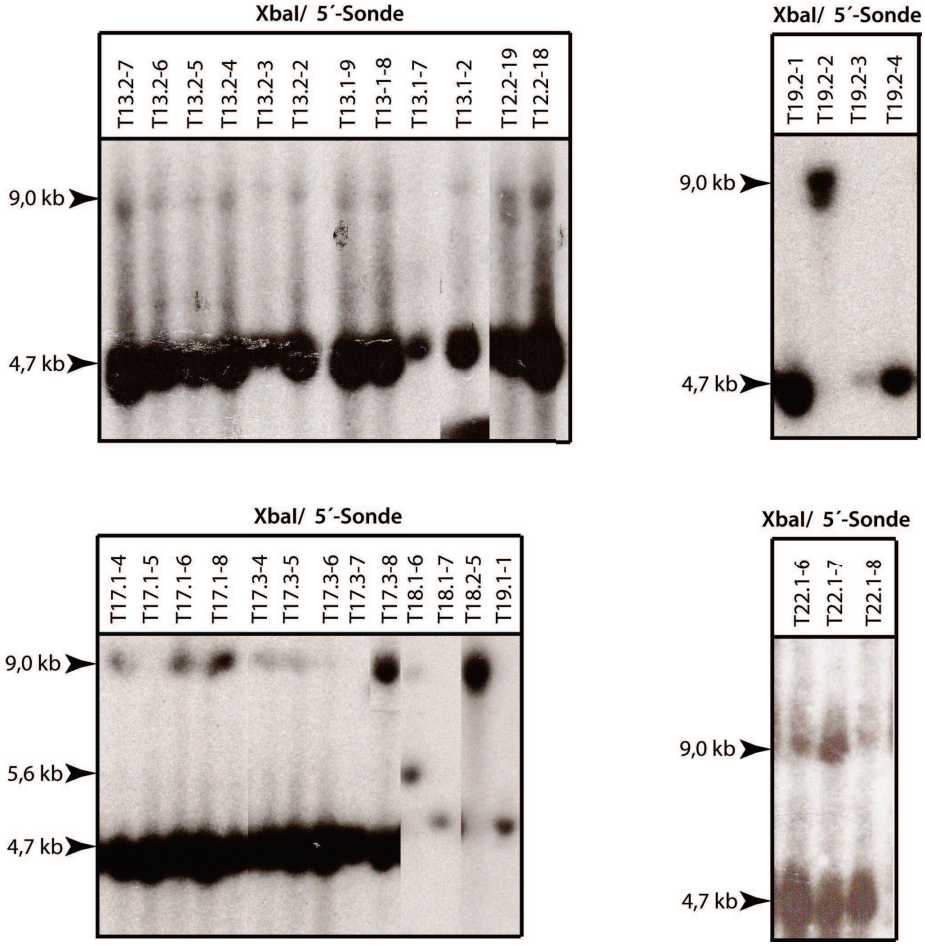


Abb. 2.17: Abbildung der *Southern Blots* nach dem XbaI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde. Das *Rosa26*^{WT}-Allel kann man anhand einer Bande bei 4,7 kb erkennen. Ein Allel mit einem Verlust der XbaI-Erkennungsstelle durch ein eingetretenes NHEJ-Ereignis weist eine Bande bei 9,0 kb auf. Ein Allel mit einer Integration des Reporterkonstruktes durch die HR kann man anhand einer Bande bei 5,6 kb erkennen.

Auf dem *Southern Blot* mit den DNA-Proben, die mit BamHI verdaut und mit der *Rosa26* 5'-Sonde hybridisiert wurden, konnte derselbe Embryo (T18.1-6) mit einer HR im *Rosa26*-Locus identifiziert werden (Abb. 2.18A). Dieses Ergebnis konnte sowohl im BamHI oder XbaI-Verdau nach der Hybridisierung mit der *Venus*-Sonde und im ApaI-Verdau nach der Hybridisierung mit der *Rosa26* 3'-Sonde bestätigt werden (Abb. 2.18B-D).

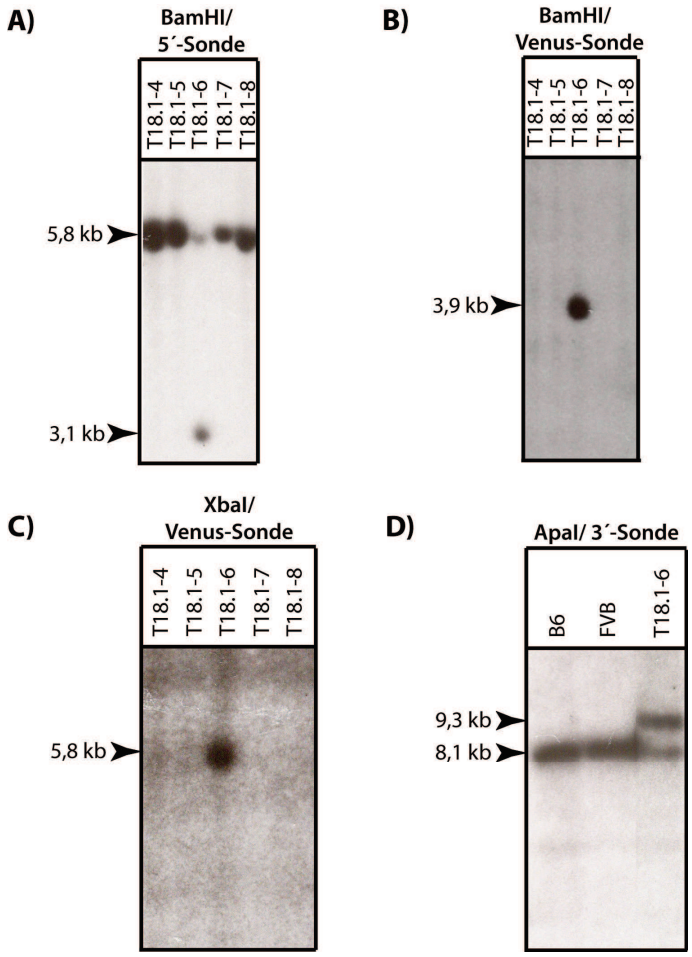


Abb. 2.18: *Southern Blot* Analyse von Embryo T18.1-6. **(A)** Resultate nach dem BamHI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde. Das $Rosa26^{WT}$-Allel ist anhand einer Bande bei 5,8 kb zu erkennen. Eine erfolgreiche Integration des *Venus*-Reportergens erkennt man anhand einer Bande bei 3,1 kb. **(B)** Rehybridiserung des *Southern Blots* nach dem BamHI-Verdau mit der *Venus*-Sonde. Eine Bande der erwarteten Größe von 3,9 kb kann nur bei korrekter Integration in den *Rosa26*-Locus identifiziert werden. Banden anderer Größen würden für eine Zufallsintegration des Gen-*Targeting*vektors sprechen. **(C)** *Southern Blot* nach dem XbaI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Venus*-Sonde. In diesem Fall weist die Bande bei einer korrekten Integration des *Venus*-Reportergens eine Größe von 5,8 kb auf. **(D)** Abbildung eines *Southern Blots* nach dem ApaI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rosa26* 3'-Sonde. Der $Rosa26^{WT}$-Locus ist anhand einer Bande bei 8,1 kb zu erkennen. Den $Rosa26^{3-3}$-Locus nach einer vollständigen Integration kann man anhand einer 9,3 kb-Bande identifizieren.

Die genomische DNA der Embryonen T17.3-8, T18.1-6, T18.2-5 und T19.2-2 wurde außerdem in einer PCR mit den Primern 5HA/3HA und pA2/3HA analysiert (Abb. 2.19, 2.20) und die zwei PCR-Fragmente des Embryos T18.1-6 nach der Amplifikation mit Hilfe des Primerpaars 5HA/3HA anschließend sequenziert.

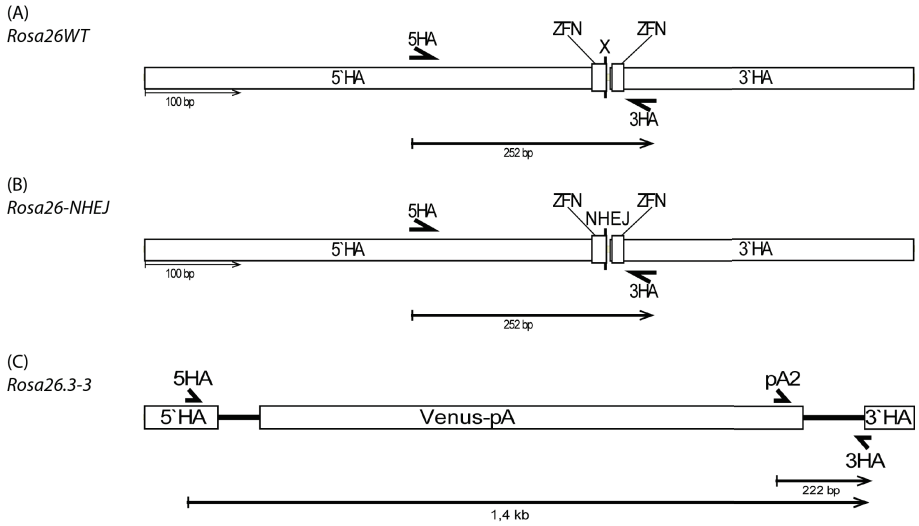


Abb. 2.19: Darstellung der *Rosa26*-Loci für die PCR-Analyse. **(A)** Im *Rosa26*^{WT}-Locus können nur die Primer 5HA und 3HA in den HA binden. Bei der PCR-Amplifikation mit diesen Primern entsteht ein 252 bp großes Fragment. **(B)** Der *Rosa26*^{NHEJ}-Locus zeigt mit den 5HA und 3HA Primern ebenfalls ein Fragment von 252 bp. **(C)** An den *Rosa26*$^{3-3}$-Locus können 3 Primer (5HA; pA2; 3HA) binden. Eine PCR mit dem Primerpaar 5HA/3HA resultiert in einem 1,4 kb großen Fragment. Eine PCR mit dem Primerpaar pA2/3HA resultiert in einem 222 bp großen Fragment.

Durch die Analyse der PCR-Fragmente ergab sich, dass der Embryo T18.1-6 das komplette Reporterkonstrukt in ein *Rosa26*-Allel integriert hatte, nachdem sowohl die PCR mit den Primern 5HA/3HA ein Fragment der erwarteten Größe von 1,4 kb zeigte, als auch die Kontrolle der 3'-Region durch die Primer pA2/3HA eine Bande von 222 bp ergab (Abb. 2.20). Nach der PCR-Analyse mit den Primern pA2 und 3HA konnte außerdem bei Embryo T17.3-8 ein schwaches, 222 bp großes Fragment identifiziert werden. Da bei der anderen PCR-Reaktion kein Fragment amplifiziert wurde, bedeutet das, dass nur das 3'-Ende des Vektors integriert wurde.

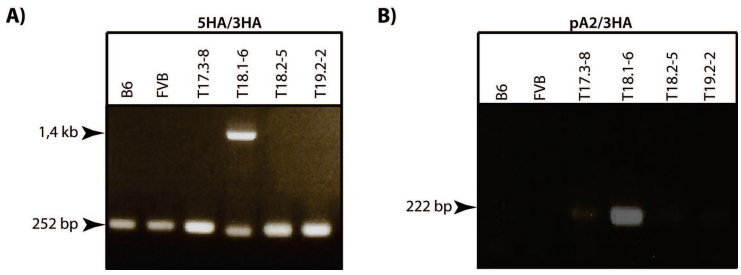


Abb. 2.20: PCR-Analyse des *Rosa26*-Locus der Embryonen aus der Pronukleus-Injektion. **(A)** Die Amplifikation der genomischen DNA mit dem 5HA/3HA-Primerpaar resultiert in einer 252 bp großen Bande für den *Rosa26*^{WT}-Locus und einer 1,4 kb großen Bande für den *Rosa26*$^{3-3}$-Locus nach der HR. **(B)** Eine Amplifikation mit dem Primerpaar pA2/3HA ist nur bei Tieren mit einer erfolgreichen Integration des Gen-*Targeting*vektors möglich und resultiert in einer 222 bp großen Bande.

Bei der Sequenzierung der Enden des 1,4 kb großen Fragmentes war zu erkennen, dass der Gen-*Targeting*vektor ohne die Erzeugung von Mutationen an den Bruchstellen korrekt rekombiniert ist (Abb. 2.21).

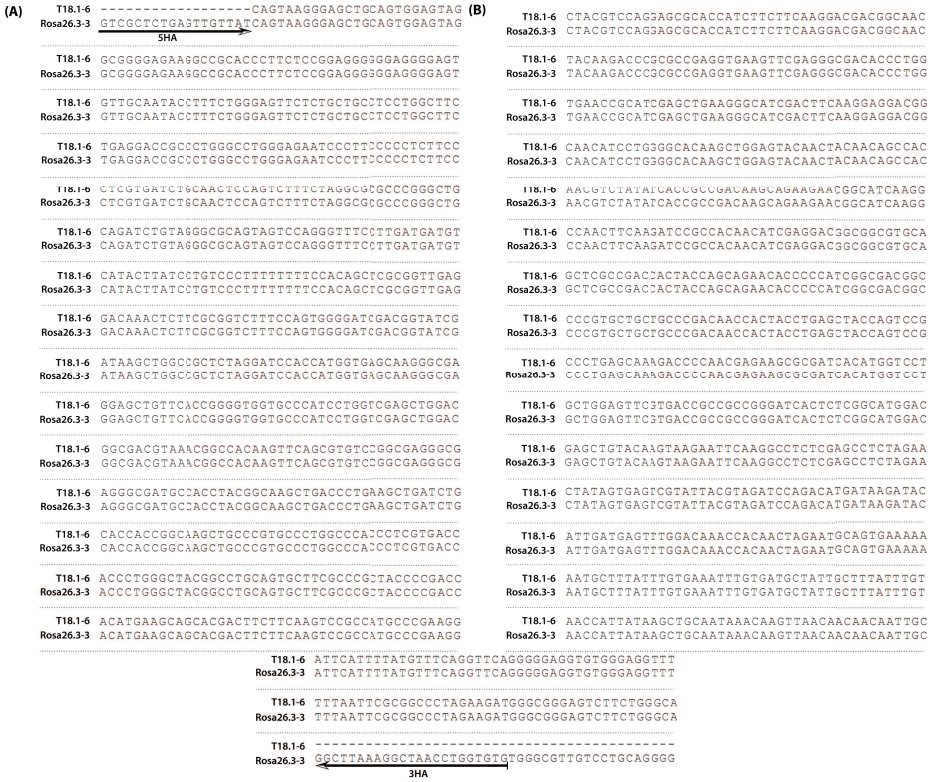


Abb. 2.21: Sequenzanalyse des 1,4 kb großen Fragmentes des Embryos T18.1-6 mit Hilfe der Primer 5HA und 3HA. Es traten keine Mutationen während der Integration des Gen-*Targeting*vektors auf.

Bei der Sequenzierung des zweiten PCR-Fragmentes des Embryos T18.1-6 mit einer Größe von 252 bp stellte sich heraus, dass auch im zweiten Allel des *Rosa26*-Locus eine Modifikation stattgefunden hat, die sich im *Southern Blot* schon angedeutet hatte: Es kam zum NHEJ und dem damit verbundenen Verlust von 26 bp (Abb. 2.22).

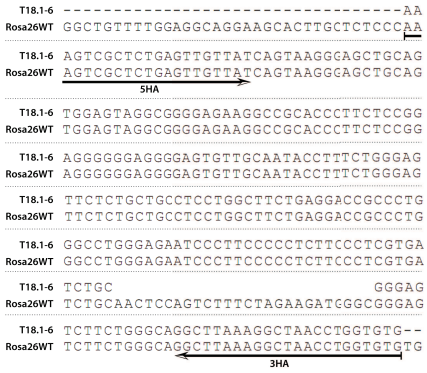


Abb. 2.22: Sequenzvergleich zwischen dem *Rosa26*^{WT}-Allel und dem zweiten Allel des Embryos T18.1-6. Es wurde dabei eine Deletion von 26 bp identifziert.

Bei diesem Experiment wurden in allen vier Mischungen zusammen insgesamt 784 Zygoten injiziert, woraus 166 Embryonen gewonnen werden konnten (Tab. 2.9). Die genauen Ergebnisse sollten nach Mischungen aufgeteilt betrachtet werden, da jeweils unterschiedliche Konzentrationen an DNA und RNA verwendet wurden. Nach der Injektion von Mischung Lot. 3 konnten zwei Tiere identifiziert werden, die ein NHEJ-Ereignis zeigten, was einer Frequenz von 7,4 % in Bezug auf die Gesamtzahl der Embryonen entspricht. Unter den Embryonen der Mischung Lot. 4 befanden sich 17 Tiere, die ein NHEJ-Ereignis aufwiesen. Es wurde damit eine Frequenz von 25,0 % in Bezug auf die Gesamtzahl der Embryonen erzielt. Außerdem befindet sich unter den Embryonen dieser Mischung einer, der das 3'-Ende des Vektors integriert hatte (Frequenz 1,5 %). In Mischung Lot. 5 konnten drei Tiere mit einem NHEJ-Ereignis nachgewiesen werden (6,0 % der analysierten Embryonen). Bei den Tieren, die aus der Mischung Lot. 6 resultierten, wurden zwei Tiere mit einem NHEJ-Ereignis gefunden (9,5 % der Embryonen). Außerdem befand sich unter den Embryonen dieser Mischung ein Tier mit einer kompletten Integration des Reporterkonstruktes in dem einen Allel und einer Deletion von 26 bp in dem anderen Allel. Bei der Frequenz der HR führte dieses eine Tier zu einer Frequenz von 4,8 % in Bezug auf die Zahl der analysierten Embryonen.

Tab. 2.9: Zusammenfassung der Resultate in den Embryonen der Zygoten-Injektion von Rosa26-ZFN-mRNA zusammen mit dem Vektor pRosa26.3-3

	β(DNA) β(RNA)	Gesamtzahl transferierter Zygoten	Gesamtzahl E18	NHEJ	HR	halbe HR	transgene Tiere
Lot. 3	10 ng/μl lin. 3 ng/μl	124	27 (21,8 %)	2 (1,6 %)	0	0	0
Lot. 4	15 ng/μl lin. 3 ng/μl	288	68 (23,6 %)	17 (5,9 %)	1 (0,3 %)	0	0
Lot. 5	20 ng/μl lin. 3 ng/μl	252	50 (20,0 %)	3 (1,2 %)	0	0	0
Lot. 6	15 ng/μl sc. 3 ng/μl	120	21 (17,5 %)	2 (1,7 %)	1 (0,8 %)	0	0
		784	166 (21,2 %)	24 (3,1 %)	2 (0,3 %)	0	0

Die Prozentangaben beziehen sich auf das Verhältnis des jeweiligen Tabellenwertes zu der Gesamtzahl an transferierten Zygoten.

Da in diesem Teilexperiment wiederum keine Embryonen mit Zufallsintegrationen des Reporterkonstruktes durch die Hybridisierung mit der *Venus*-Sonde als interne Kontrolle identifiziert werden konnten, wurde die Analyse von Embryonen auf adulte Tiere umgestellt, um die Expression des Proteins später im Gewebe und die Weitergabe des integrierten Reportergens über die Keimbahn analysieren zu können.

Bei dem zweiten Teilexperiment wurde ebenfalls mit der Injektion mehrerer verschiedener Mischungen begonnen (Tab. 2.10), um herauszufinden, welche Mischung letztendlich zur höchsten Frequenz für die HR führt. Außerdem wurden diesmal auch zwei Mischungen hergestellt, bei denen nur der DNA-Vektor verwendet wurde, um zu sehen, ob es auch ohne ZFN zu einer Integration des Reportergens kommen würde.

Tab. 2.10: Injektionsaliquots für die Pronukleus-Injektion mit dem Gen-*Targeting*vektor pRosa26.3-3 und der Rosa26-ZFN-mRNA für die Untersuchung adulter Mäuse

Mischung	Vektorname	β(Vektor-DNA)	β(ZFN-mRNA) jeweils
D1R1	pRosa26.3-3	20 ng/μl lin.	2,5 ng/μl
D1R3	pRosa26.3-3	20 ng/μl lin.	7,5 ng/μl
D3R1	pRosa26.3-3	40 ng/μl lin.	2,5 ng/μl
D6R1	pRosa26.3-3	30 ng/μl sc.	2,5 ng/μl
D6R3	pRosa26.3-3	30 ng/μl sc.	7,5 ng/μl
D6R5	pRosa26.3-3	30 ng/μl sc.	15 ng/μl
D7R9	pRosa26.3-3	15 ng/μl sc.	3 ng/μl
D10	pRosa26.3-3	15 ng/μl sc.	
D6	pRosa26.3-3	30 ng/μl sc.	

Die einzelnen Mischungen wurden wieder in den Pronukleus und das Zytoplasma von Zygoten aus Verpaarungen von C57BL/6J-Männchen mit FVB-Weibchen injiziert und die so behandelten Zygoten anschließend in Ammentiere transferiert. Die Tiere wurden auf natürlichem Weg geboren. Die DNA wurde aus den Schwanzspitzen der acht Wochen alten Mäuse isoliert und mit BamHI, XbaI oder ApaI für die *Southern Blot* Analysen verdaut (Tab. 5.2). Die Membranen wurden mit der *Rosa26* 5'-Sonde, *Rosa26* 3'-Sonde oder der *Venus*-Sonde hybridisiert. Es ergab sich dabei für jeden der möglichen Genotypen – *Rosa26^{WT}, Rosa26$^{3\text{-}3}$, Rosa26^{NHEJ}* – ebenfalls das typische Bandenmuster (Abb. 2.16).

Auf den *Southern Blots* mit dem XbaI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde konnten zehn Tiere (T29.2-4; T29.2-8; T30.1-1; T30.2-3; T30.3-1; T30.3-2; T30.3-7; T31.1-2; T31.1-4; T34.3-4) identifiziert werden, die eine Bande der für ein NHEJ-Ereignis sprechenden Größe von 9,0 kb aufwiesen (Abb. 2.23). Diese Bande war das Resultat der durch das NHEJ verloren gegangenen XbaI-Erkennungsstelle. Dieses Ereignis trat durch die Deletion oder Insertion von Basen am Ort des DSB auf. Nachdem auch in diesem Teilexperiment lebende Mäuse gefunden wurden, bei denen das Ereignis des NHEJ nachgewiesen werden konnte, wurde ab Mausnr. T32.1-1 das Auftreten des NHEJ-Ereignisses nicht weiter untersucht, da sich diese Arbeit hauptsächlich auf die Untersuchung das Gen-*Targeting* durch die HR beziehen sollte.

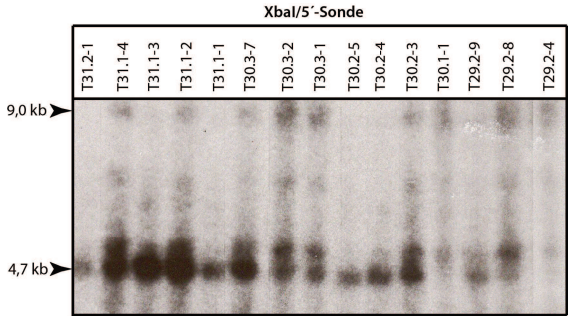


Abb. 2.23: Darstellung des *Southern Blots* nach dem XbaI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde. Der *Rosa26*^{WT}-Locus lässt sich anhand einer Bande bei 4,7 kb identifizieren. Der *Rosa26*^{NHEJ}-Locus weist eine Bande bei 9,0 kb auf.

Auf den *Southern Blots* nach dem BamHI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde konnten vier Mäuse identifiziert werden (T34.3-4; T43.3-2; T43.3-5; T51.5-6), die ein vom *Rosa26*^{WT}-Allel abweichendes Bandenmuster aufwiesen. Drei von diesen Mäusen (T43.3-2; T43.3-5; T51.5-6) zeigten eine Bande der Größe von 3,1 kb, was für eine aufgetretene HR sprach. Maus T43.3-2 zeigte dabei ein sehr auffälliges Bandenmuster, welches dafür sprach, dass kein *Rosa26*^{WT}-Allel mehr vorhanden war. Ferner handelt es sich wahrscheinlich um eine Mosaikmaus, deren Zellen zwar den gleichen genetischen Ursprung haben, aber durch die spätere Aktivität der ZFN einen unterschiedlichen Genotyp in Bezug auf den *Rosa26*-Locus aufweisen. So wies die Maus T43.3-2 in diesem *Southern Blot* drei verschiedene Allele des *Rosa26*-Locus auf (Abb. 2.24). Ein Allel zeigt eine Bande der Größe für ein eingetretenes Ereignis der HR (3,1 kb). Die anderen beiden Banden (zwischen 3,1 kb und 5,8 kb) können entweder jeweils für eine NHEJ-Ereignis sprechen oder aber für eine teilweise Integration des Gen-*Targeting*vektors, wie sie auch schon im vorherigen Versuch mit dem β-*Gal*-Reportergen aufgetreten ist. Die Mäuse T43.3-5 und T51.5-6 besaßen laut *Southern Blot* Analyse den eindeutigen Genotyp *Rosa26*^{WT}*/Rosa26*$^{3\text{-}3}$. In Maus T52.4-6 kam es wahrscheinlich ebenfalls zu einer teilweisen Integration des Reporterkonstruktes oder zum Verlust mehrerer Basen beim NHEJ.

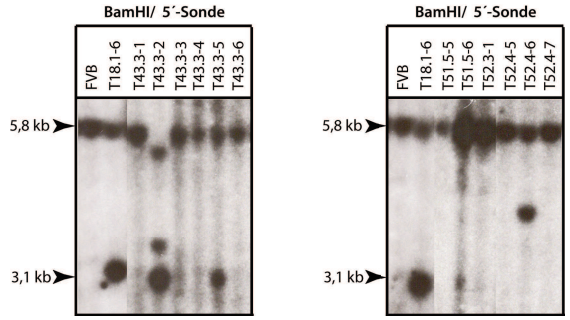


Abb. 2.24: Analyse der *Southern Blots* in Bezug auf eine HR nach dem BamHI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde. Das *Rosa26*^{WT}-Allel kann hier anhand einer Bande bei 5,8 kb identifiziert werden. Mäuse, bei denen eine HR stattgefunden hat, weisen eine Bande bei 3,1 kb auf. Die DNA des Embryos T18.1-6 dient dabei in beiden *Southern Blots* als Positiv-Kontrolle. Banden einer anderen Größe sprechen für ein stattgefundenes NHEJ-Ereignis oder eine teilweise Integration, deren Auftreten bereits während der Arbeit nachgewiesen wurde.

Drei der identifizierten Tiere (T43.3-2; T43.3-5; T51.5-6) konnten auf dem *Southern Blot* nach dem BamHI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Venus*-Sonde durch eine Bande bei 3,9 kb bestätigt werden (Abb. 2.25). Zwei dieser Tiere stammten aus der Mischung D6R5 und eins aus der Mischung D7R9, die somit beide aktiv sind.

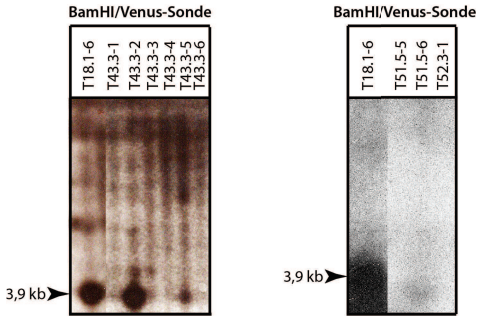


Abb. 2.25: Darstellung der *Southern Blots* nach dem BamHI-Verdau und der Rehybridisierung mit der *Venus*-Sonde. Eine Bande der erwarteten Größe von 3,9 kb ist nur nach erfolgreicher Integration des *Venus*-Reportergens sichtbar. Die DNA von Embryo T18.1-6 dient hier wieder als Positiv-Kontrolle.

Bei diesem Teilexperiment wurden in allen Mischungen zusammen insgesamt 2732 Zygoten transferiert, woraus 477 Tiere geboren wurden (Tab. 2.11). Alle adulten Tiere waren normal entwickelt. Die genauen Ergebnisse sollten auch dieses Mal wieder getrennt nach Mischungen betrachtet werden, da jeweils andere Konzentrationen an DNA und RNA verwendet wurden. Nach der Injektion von Mischung D3R1 konnten zwei Tiere identifiziert werden, die ein NHEJ-Ereignis zeigten. Dies ergab eine Frequenz von 11,8 % in Bezug auf die Gesamtzahl der analysierten Tiere. Unter den Tieren aus den Zygoten, die mit Mischung D1R3 injiziert wurden, wurden acht Tiere (12,9 % der analysierten Tiere) gefunden, bei denen ein NHEJ-Ereignis nach dem DNA-Doppelstrangbruch eintrat. Unter diesen Tieren befand sich außerdem eines, das zwar keine komplette HR zeigte, aber dafür eine größere Veränderung im *Rosa26*-Locus aufwies. Diese wurde jedoch in dieser Arbeit nicht genauer untersucht. In Mischung D6R5 wurde ein Tier identifiziert, dass einen heterozygoten Genotyp für die HR aufwies. Das zweite positive Tier aus dieser Mischung hatte in einem Allel des *Rosa26*-Locus eine komplette Integration des Reporterkonstruktes. Im zweiten Allel trat ein Zustand auf, bei dem verschiedene Zellen zwei unterschiedliche Allelformen aufwiesen. Einige Zellen hatten ein Allel mit einem NHEJ-Ereignis, andere Zellen wiederum ein Allel mit einer größeren Veränderung im *Rosa26*-Locus, aber keiner kompletten Integration des Reportergens. Es handelt sich bei diesem Tier demzufolge um eine Mosaikmaus, die unterschiedliche Genotypen in den einzelnen Zellen aufwies. Die Frequenz der HR liegt damit bei 5,0 % und des NHEJ bei 2,5 % in Bezug auf die analysierten Embryonen. In Mischung D7R9 wurde ebenfalls ein Tier mit einer homologen Integration des *Venus*-Reportergens gefunden (Frequenz 0,7 %). Außerdem wies ein Tier eine größere Veränderung in einem Allel des *Rosa26*-Locus auf, die nicht näher charakterisiert wurde. Diese größeren Veränderungen können entweder die Deletion einer größeren Anzahl an Basenpaaren durch das NHEJ oder eine teilweise Integration eines Teils des Gen-*Targeting*vektors darstellen (Frequenz des NHEJ bei 0,7 %). Die Tiere aus den beiden Mischungen D6 und D10, bei denen nur der DNA-Vektor in den Pronukleus injiziert wurde, wiesen wie erwartet keine Veränderungen im *Rosa26*-Locus auf.

Tab. 2.11: Ergebnisse der adulten Mäuse aus der Zygoten-Injektion mit dem Gen-*Targeting*vektor pRosa26.3-3

	β(DNA) β(RNA)	Gesamtzahl transferierter Zygoten	Gesamtzahl F0	NHEJ	HR	transgene Tiere
D1R1	20 ng/μl lin. 2,5 ng/μl	181	15 (8,3 %)	0	0	0
D3R1	40 ng/μl lin. 2,5 ng/μl	60	17 (28,3 %)	2 (3,3 %)	0	0
D1R3	20 ng/μl lin. 7,5 ng/μl	331	62 (18,7 %)	8 (2,4 %)	0	0
D6R1	30 ng/μl sc. 2,5 ng/μl	179	34 (19,0 %)	n.a.	0	0
D6R3	30 ng/μl sc. 7,5 ng/μl	565	107 (18,9 %)	n.a.	0	0
D6R5	30 ng/μl sc. 15 ng/μl	191	40 (20,9 %)	1 (0,5 %)	2 (1,0 %)	0
D6	30 ng/μl sc. (-)	120	42 (35,0 %)	n.a.	0	0
D7R9	15 ng/μl sc. 3 ng/μl	837	142 (17,0 %)	1 (0,1 %)	1 (0,1 %)	0
D10	15 ng/μl sc. (-)	268	18 (6,7 %)	n.a.	0	0
		2737	477 (17,6 %)	12 (0,4 %)	3 (0,1 %)	0

Die Prozentangaben berechnen sich aus den jeweiligen Tabellenwerten im Verhältnis zu der Gesamtzahl an transferierten Zygoten.

Es konnte somit gezeigt werden, dass sowohl die Pronukleus-Injektion mit 30 ng/μl sc. DNA und 15 ng/μl RNA als auch mit 15 ng/μl sc. DNA und 3 ng/μl RNA in ihrem Genom spezifisch modifizierte Mäuse hervorbrachte.

Die beiden Tiere mit einer aufgetretenen HR aus der Mischung D6R5 waren Männchen (T43.3-2, T43.3-5) und wurden mit CD1-Weibchen verpaart. Maus T43.3-2 war der Vater von insgesamt 24 Nachkommen. Maus 43.3-5 zeugte 13 Nachkommen. Die Nachkommen wurden ebenfalls im *Southern Blot* mit dem BamHI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde analysiert (Abb. 2.26).

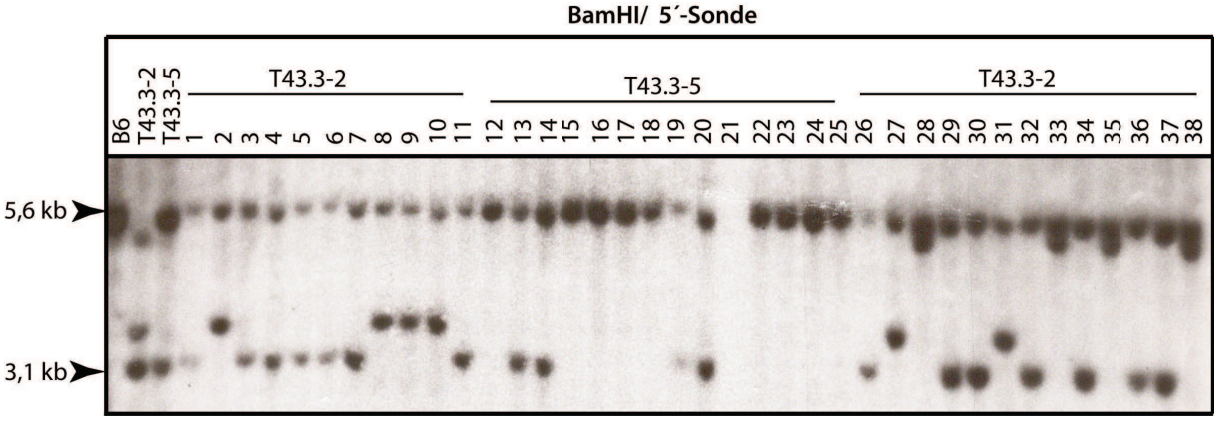


Abb. 2.26: *Southern Blot*-Analyse der Nachkommen der positiven Tiere aus der Zygoten-Injektion. Verdau der genomischen DNA mit BamHI und anschließender Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde. Der *Rosa26*^{WT}-Locus ist anhand einer Bande bei 5,6 kb zu erkennen. Der Locus mit einer stattgefundenen HR weist eine Bande bei 3,1 kb auf. Die Elterntiere T43.3-2 und T43.3-5 dienen als Positiv-Kontrolle und die DNA eines C57BL/6J-Tieres (B6) als Negativ-Kontrolle in diesem *Southern Blot*.

Durch diese *Southern Blot*-Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass beide Männchen das Reportergen an ihre Nachkommen vererbt haben (Tab. 2.12). Maus T43.3-2 gab das Allel mit der vollständigen HR an 14 Nachkommen (58,3 %), das Allel mit der größeren Veränderung im *Rosa26*-Locus an sechs Nachkommen (25,0 %) und das Allel mit dem NHEJ an vier Nachkommen (16,7 %) weiter. Somit hat das Tier T43.3-2 jeweils ein modifiziertes Allel an alle seine Nachkommen weitergegeben. Maus T43.3-5 hatte das Allel mit der HR an vier Nachkommen (30,8 %) weitergegeben. Die restlichen neun Nachkommen dieser Maus wiesen in beiden Allelen den *Rosa26*^{WT}-Locus auf.

Tab. 2.12: Zusammenfassung der *Southern Blot*-Ergebnisse der F1-Nachkommen

Ursprüngliche Mischung	Vater	Gesamtzahl F1	positive Keimbahn-Übertragung
D6R5	T43.3-2	24	24 (100 %)
D6R5	T43.3-5	13	4 (30,8 %)

Die Prozentangaben berechnen sich aus dem Verhältnis der Tiere mit einer positiven Keimbahntransmission zu der Gesamtzahl an F1-Nachkommen.

Zusätzlich wurde bei einigen Nachkommen die Expression des *Venus*-Reportergens im Vergleich zu *Rosa26*^{WT}-Geschwistern *post mortem* in verschiedenen Organen untersucht (Abb. 2.27). Es konnte hierbei gezeigt werden, dass in allen untersuchten Organen der Nachkommen mit einer Integration des *Venus*-Reportergens, dieses aktiv ist, indem eine grüne Fluoreszenz in unterschiedlichen Intensitäten vorhanden war. Eine Übersicht der Fluoreszenzstärken in den einzelnen Organen der unterschiedliche Tiere befindet sich im Anhang in Abb. 6.31, 6.32.

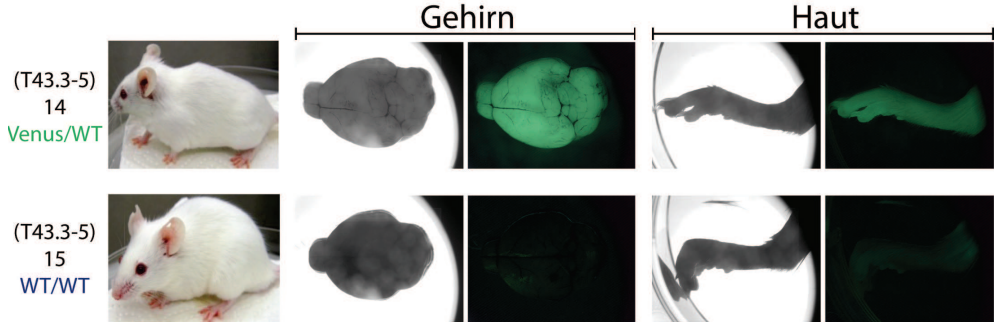


Abb. 2.27: Vergleich der Fluoreszenz-Expression zwischen einem Tier mit einem *Rosa26*$^{3\text{-}3}$-Allel und einem Tier mit zwei *Rosa26*^{WT}-Allelen. Dargestellt ist jeweils eine Abbildung der lebenden Maus, eine Weißlicht- und eine Fluoreszenz-Aufnahme des Gehirns und einer Pfote als Beispiel für die Haut. Es ist eine klare Fluoreszenz in den beiden Organen der Maus 14 (Genotyp *Rosa26*$^{3\text{-}3}$/*Rosa26*^{WT}) im Vergleich zu den Organen des Geschwistertieres 15 (Genotyp *Rosa26*^{WT}/*Rosa26*^{WT}) zu erkennen.

Nachdem nun sowohl die Funktionsfähigkeit des integrierten Reportergens bei den Nachkommen von zwei Mäusen mit einer HR als auch die Übertragung des Reportergens auf die Nachkommen nachgewiesen werden konnte, wurde das Spermium von jeweils einem männlichen Nachkommen beider Gründertiere und der Gründertiere selbst für eine mögliche spätere Verwendung eingefroren und die restlichen Tiere der Linie getötet.
Es konnte nun, nach dem zuvor gelieferten Beweis der HR mit dem β-*Gal*-Gen-Targetingvektor und den ZFN, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse am *Rosa26*-Locus mit einem zweiten Vektor und vor allem die Keimbahntransmission des veränderten Allels nachgewiesen werden. Die ZFN-Technik ist somit eine aussichtsreiche Methode zur Genom-Manipulation direkt in Zygoten. Als nächstes sollte die Frage untersucht werden, ob diese Technik auch an einem anderen Gen-Locus reproduzierbar ist.

2.2.2 ZFN-unterstützte Einbringung von Punktmutationen in das *Rab38*-Gen

Da nun in dieser Arbeit anhand des *Rosa26*-Locus bewiesen wurde, dass die Frequenz der HR in Zygoten durch das Verwenden von ZFN auf 5,0 % erhöht werden kann, sollte als nächstes herausgefunden werden, ob dies auch an einem anderen Genlocus möglich ist. Dazu wurde die in Geurts *et al.* (2009) veröffentlichte ZFN-Sequenz (linke Erkennungshelices der ZFN von N- nach C-terminal: DRSNLSS – RSHSLLR – RSDSLSA – TSGSLTR – QSGNLAR – QSGHLSR; rechte ZFN-Erkennungshelices vom N- zum C-Terminus: TSGHLSR – HKWQRNK – DRSVLRR – DSSTRKK – RSDHLSE – DKSNRKK) (Abb. 2.28) gegen den *Rab38*-Locus synthetisch hergestellt (Genscript, Piscataway, USA) und in das allgemein verwendete ZF-Grundgerüst basierend auf der Sequenz des ZIF268-Proteins eingebaut. Da die ZFN-Zielsequenz zwischen dem *Rab38*-Gen der Ratte und der Maus identisch ist (Loftus *et al.*, 2002), sollte es kein Problem darstellen, diese ZFN in Maus-Zygoten anstatt Ratten-Zygoten einzusetzen.



Abb. 2.28: Schema der ZFN-Bindung an den *Rab38*-Locus. In blau und lila sind die zwei DNA-Bindedomänen der ZFN dargestellt. Die roten Scheren kennzeichnen jeweils eine Hälfte der *FokI*-Endonuklease (FokEL und FokKK). Das Codon 19, in dem die sogenannten Cht-Mutation aufgetreten ist, ist in grün hervorgehoben.

2.2.2.1 Integration der IDGCht-Punktmutation durch Injektionen in Zygoten

Im ersten Teilexperiment sollte die in Geurts *et al.* (2009) beschriebene Punktmutation G146T (G19V) mittels eines Gen-*Targeting*vektors mit Homologiearmen zur endogenen *Rab38*-Sequenz rechts und links von dieser Punktmutation in den Locus eingebracht werden (Abb. 2.29, Abb. 6.3.1.5). Die Bindestellen der ZFN wurden im Vektor durch vier stille Mutationen so verändert, dass diese dort nach der Integration des Vektors in den endogenen Locus nicht mehr binden können.

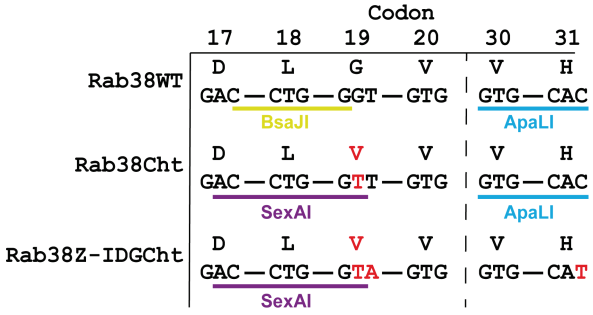


Abb. 2.29: Vergleich der RAB38-Codonsequenzen 17-20 und 30-31 des $Rab38^{WT}$-, des $Rab38^{Cht}$- und des $Rab38^{Z\text{-}IDGCht}$-Allels. Nukleotide und Aminosäuren, die sich von der $Rab38^{WT}$-Sequenz unterscheiden, sind in rot hervorgehoben. Durch die G zu T-Transversion in Nukleotid 146 verschwindet eine BsaJI-Erkennungsstelle und entsteht eine SexAI-Erkennungsstelle. Außerdem ist eine stille Mutation in den ZFN-Bindestellen in rot hervorgehoben, da durch diese eine ApaLI-Erkennungsstelle entfernt wird. Die restlichen stillen Mutationen sind in den jeweiligen Sequenzierungsresultaten gekennzeichnet.

Für diesen Zweck wurden zwei verschiedene DNA/RNA-Mischungen für die Injektion verwendet (Tab. 2.13), in die aus der Verpaarung von C57BL/6J-Männchen mit FVB-Weibchen entstandenen Zygoten injiziert, welche anschließend in pseudo-schwangere Mäuse transferiert wurden.

Tab. 2.13: Injektionsaliquots für die Zygoten-Injektion mit den Rab38-ZFNs

Mischung	Vektorname	β(Vektor-DNA)	β(ZFN-mRNA) jeweils
D11R11	pEF-5HA-cht-3HA	15 ng/μl sc.	3 ng/μl
D12R12	pEF-5HA-cht-3HA	15 ng/μl lin.	3 ng/μl

Der DNA-Vektor wurde für diese Mischungen einmal in zirkulärem Zustand und einmal im linearen Zustand verwendet. Für die Linearisation wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym SalI verdaut. Die daraus resultierenden Mäuse waren normal entwickelt. Sie wurden in diesen Experimenten mittels PCR und *Southern Blot* analysiert. Dafür wurde die DNA aus den Schwanzspitzen der Mäuse isoliert und als erstes anhand des folgenden Protokolls (Tab. 5.1) ein 213 bp großes Fragment des *Rab38*-Gens mit Hilfe der Primer Rab38_F und Rab38_R durch die PCR amplifiziert. Dieses Fragment wurde anschließend mit 5 U BsaJI für 2h bei 60 °C verdaut und auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel analysiert. Durch die mögliche HR zwischen dem endogenen *Rab38*-Locus und dem Gen-*Targeting*vektor, wird die G19V-Mutation in den Locus eingebracht, was zu einem Verlust der BsaJI-Erkennungsstelle führt (Abb. 2.30).

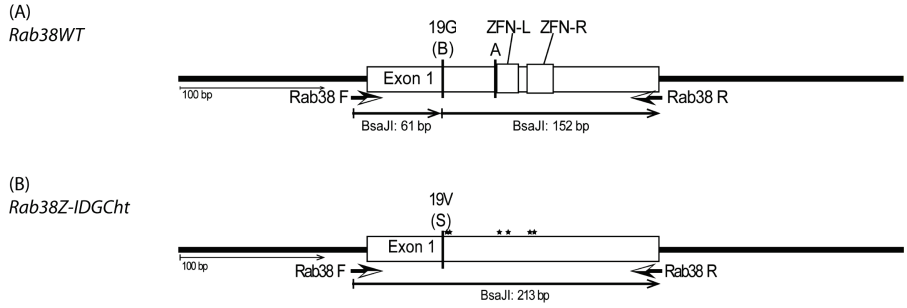


Abb. 2.30: Darstellung der *Rab38*-Loci für die Auswertung der Genotypisierungs-PCR mit anschließendem BsaJI-Verdau. **(A)** $Rab38^{WT}$-Locus im Bereich des ersten Exons. **(B)** $Rab38^{Z\text{-}IDGCht}$-Locus nach einer möglichen HR zwischen dem Gen-*Targeting*vektor und dem endogenen Locus. Die BsaJI (B), ApaLI (A) und SexAI (S) Erkennungsstellen, die linke (ZFN-L) und rechte (ZFN-R) Bindestelle für die ZFN, die Bindestellen für die PCR-Primer Rab38_F und Rab38_R, die Stellen der einzelnen Punktmutationen (*) und die Größen der resultierenden Fragmente sind dargestellt.

Damit kann man durch den BsaJI-Restriktionsverdau Mäuse, bei denen eine HR stattgefunden hat, anhand eines unverdauten, 213 bp großen Fragmentes erkennen, während der Verdau bei $Rab38^{WT}$-Mäusen in zwei kleineren Fragmenten, 152 bp und 61 bp, resultiert. Durch diese PCR-Analyse wurden drei Tiere (R1.1-1; R3.3-5; R3.3-9) identifiziert, bei denen die Punktmutationen durch die HR in den *Rab38*-Locus integriert wurden (siehe Abb. 2.31).

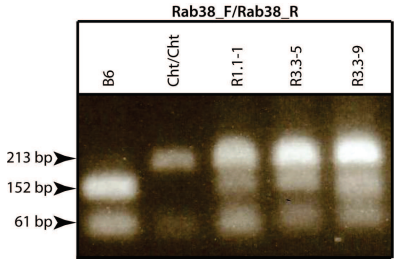


Abb. 2.31: Auftrennung der PCR-Fragmente nach dem BsaJI-Verdau. Die DNA mit zwei *Rab38*^{WT}-Allelen kann man anhand zweier Banden bei 152 bp und 61 bp erkennen. Ein Tier, das homozygot für den *Rab38*^{Cht}-Locus ist, kann man anhand einer Bande bei 213 bp identifizieren. Heterozygote Tiere weisen Banden aller drei Größen auf. Die DNA von C57BL/6J-Tieren wurde als Negativ-Kontrolle und die DNA eines homozygoten *Rab38*^{Cht}-Tieres als Positiv-Kontrolle verwendet.

Das Ergebnis dieser drei Tiere wurde anhand der *Southern Blot*-Analyse kontrolliert. Dazu wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym SexAI verdaut (Tab. 5.2) und die Membranen mit der radioaktiv markierten *Rab38* 5'-Sonde hybridisiert. Auf den Röntgenfilmen konnten die Allele der Tiere – *Rab38*^{WT}, *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$ – anhand der spezifischen Bandenmuster identifiziert werden (Abb. 2.32).

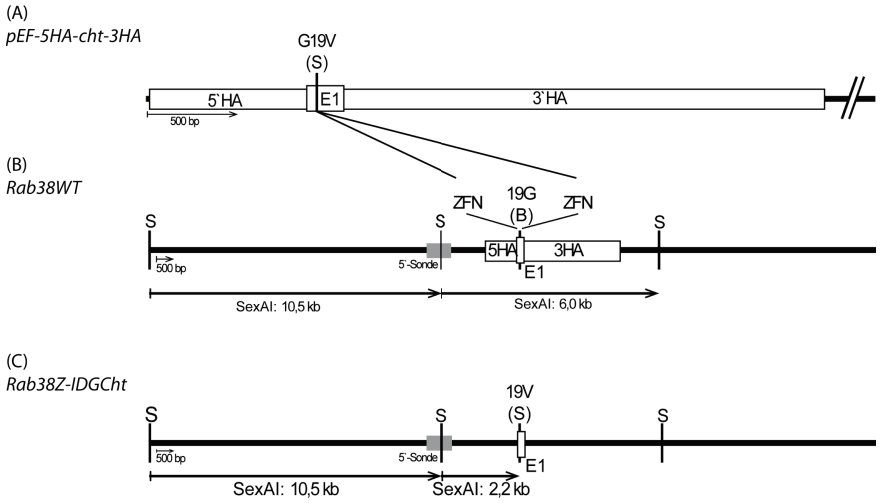


Abb. 2.32: Darstellung des Gen-*Targeting*vektors und der *Rab38*-Loci für die *Southern Blot*-Analyse. **(A)** Gen-*Targeting*vektor pEF-5HA-cht-3HA mit dem 5'- und 3'-Homologiearmen (HA) rechts und links von dem ersten Exon (E1) indem sich die G19V-Mutation befindet. **(B)** *Rab38*^{WT}-Locus mit den 5'- und 3'-HA zwischen denen sich die Bindestellen für die ZFN befinden. **(C)** *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Locus mit der durch die HR eingebrachte Aminosäuresubstitution in Codon 19 von Gly zu Val. Die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme SexAI (S) und BsaJI (B), die Bindestellen für die *Rab38* 5'-Sonde, die jeweilige Aminosäure im Codon 19 und die Größen der *Southern Blot* Fragmente sind eingezeichnet.

Die drei per PCR-Analyse identifizierten Tiere weisen auch im *Southern Blot* eindeutig das *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Allel mit einer Größe von 2,2 kb auf, was die eingetretene HR in diesen Tieren belegt (Abb. 2.33).

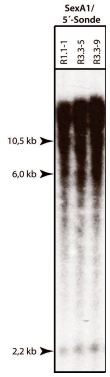


Abb. 2.33: *Southern Blot* Analyse der Tiere R1.1-1, R3.3-5 und R3.3-9 nach dem SexAI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Die *Rab38*^{WT}-Bande befindet sich bei 6,0 kb und die *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Bande hat eine Größe von 2,2 kb. Die 10,5 kb-Bande kann in beiden Allelen identifiziert werden.

Nachdem nun sowohl die PCR als auch der *Southern Blot* eindeutige Nachweise für eine HR lieferten, wurde das nach dem BsaJI-Verdau unverdaute PCR-Fragment der positiven Tiere aus dem Gel extrahiert und sequenziert. Die Sequenzierung lieferte für zwei der drei Tiere (R1.1-1; R3.3-5) den Beweis für eine vollständige HR zwischen dem *Rab38*-Locus und dem Gen-*Targeting*vektor. Im dritten Tier (R3.3-9) konnte durch die Sequenzierung festgestellt werden, dass die HR zwischen der linken und rechten ZFN-Bindestelle erfolgte, wobei die geplante IDGCht-Mutation in den endogenen *Rab38*-Locus durch die HR eingebracht wurde (siehe Abb. 2.34).



Abb. 2.34: Sequenzvergleich der drei Tiere mit einer HR (R1.1-1, R3.3-5; R3.3-9) mit dem *Rab38*^{WT}-Locus und der im PC konstruierten Sequenz nach einer eingetretenen HR. Die Aminosäure-Substitution in Codon 19, die ZFN-Bindestellen und die Punktmutationen (Pfeile) sind dargestellt.

Durch die drei identifizierten Tiere mit einer HR bei einer Gesamtzahl von 87 analysierten Mäusen in dieser Mischung (D11R11) ergab sich eine Rekombinationsfrequenz von 3,4 % (Tab. 2.14). Das NHEJ-Ereignis wurde in diesem Versuchsteil nicht genauer untersucht. Es konnte somit gezeigt werden, dass die ZFN gegen einen zweiten Locus im Genom der Maus ebenfalls helfen, die homologe Rekombination zwischen dem Locus und einem zirkulären Gen-*Targeting*vektor in Zygoten zu erhöhen.

Tab. 2.14: Zusammenfassung der Ergebnisse der Zygoten-Injektion der Rab38-ZFN-mRNA zusammen mit dem Vektor pEF-5HA-cht-3HA

Mischung	β(DNA) β(RNA)	Gesamtzahl transferierter Zygoten	Gesamtzahl F0	HR
D11R11	15 ng/μl sc. 3 ng/μl	427	87 (20,4 %)	3 (0,7 %)
D12R12	15 ng/μl lin. 3 ng/μl	495	110 (22,2 %)	0
		922	197 (21,4 %)	3 (0,3 %)

Die Prozentangaben sind anhand des Verhältnisses des jeweiligen Tabellenwertes zu der Gesamtzahl der injizierten Zygoten berechnet.

Die drei positiven Tiere wurden mit C57BL/6J-Tieren verpaart, um die Vererbung des rekombinierten Allels über die Keimbahn auf die nächste Generation (F1) zu beweisen. Die Nachkommen wurden ebenfalls mit Hilfe der PCR analysiert. Maus R1.1-1 bekam in dieser Verpaarung 22 Nachkommen, wobei bei 8 Nachkommen das *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Allel nachgewiesen werden konnte (36,4 % der analysierten Nachkommen; Abb. 2.35A). Maus R3.3-5 bekam 18 Nachkommen, wobei die Veränderung des *Rab38*-Locus auf 5 Nachkommen übertragen wurde (27,8 % der analysierten Nachkommen; Abb. 2.35B). Maus R3.3-9 vererbte bei der Verpaarung mit den C57BL/6J-Tieren die IDGCht-Mutationen auf 5 von 9 Nachkommen (55,0 % der analysierten Nachkommen; Abb. 2.35C).

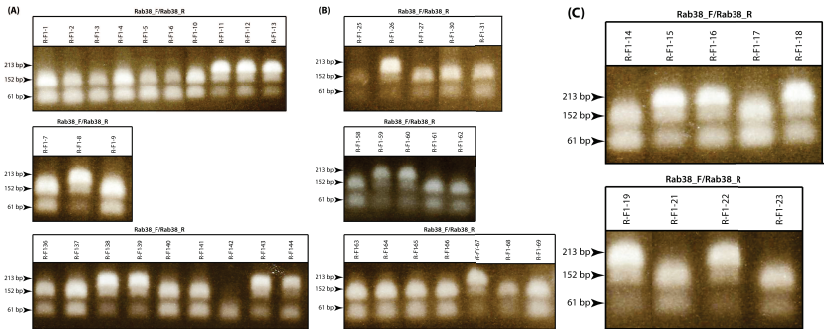


Abb. 2.35: Analyse der PCR-Ergebnisse nach dem BsaJI-Verdau der DNA der F1-Nachkommen. Das *Rab38*^{WT}-Allel wird von BsaJI in zwei Fragmente (152 bp und 61 bp) geteilt. Das *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Allel kann nicht geschnitten werden und wird durch eine Bande bei 213 bp sichtbar. Erben des *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Allels kann man somit anhand von drei Banden identifizieren. **(A)** Nachkommen der Maus R1.1-1, **(B)** der Maus R3.3-5 und **(C)** der Maus R3.3-9.

Nachdem die erstmalige Vererbung der rekombinierten Allele über die Keimbahn gezeigt wurde, wurden sowohl zwei der nicht verwandten Elterntiere (R1.1-1 und R3.3-9) als auch einige der nicht verwandten F1-Nachkommen miteinander verpaart um homozygote *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Tiere (F1 und F2) zu erhalten. Diese homozygoten Tiere sollten bereits anhand ihrer dunkelbraunen, Schokoladen-ähnlichen Fellfarbe identifizierbar sein (Abb. 2.36).

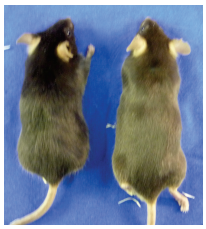


Abb. 2.36: Vergleich der Fellfarbe einer schwarzen C57BL/6J-Maus (links) und einer Schokoladenfarbenen, homozygoten *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Maus (rechts).

Da jedoch während der Vorkern-Injektion zur Herstellung der Zygoten auch Tiere mit einer weißen Fellfarbe mit C57BL/6J-Tieren verpaart worden waren, ergaben sich bei der Verpaarung der heterozygoten *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$/*Rab38*^{WT}-Tiere unterschiedliche Ausprägungen der dunkelbraunen Fellfarbe (Abb. 6.33). Aus diesem Grund wurden die Nachkommen der heterozygoten Verpaarungen zur Sicherheit ebenfalls wieder per PCR und *Southern Blot* analysiert. Bei der Verpaarung der F0-Tiere (R1.1-1 mit R3.3-9) wurden 28 Nachkommen geboren, von denen sechs Tiere homozygot für den *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Locus (21,4 %), vier Tiere homozygot für den *Rab38*^{WT}-Locus (14,3 %) und 18 Tiere heterozygot (64,3 %) waren (Abb. 2.37).

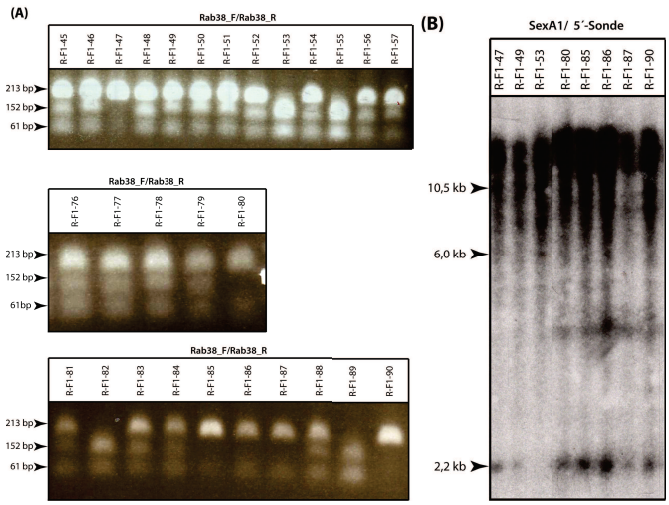


Abb. 2.37: PCR- und *Southern Blot*-Analyse der F1-Nachkommen aus der Verpaarung von R1.1-1 mit R3.3-9. **(A)** PCR-Resultate nach dem Verdau mit BsaJI. Homozygote *Rab38*^{WT}-Tiere weisen zwei Banden der Größe von 152 bp und 61 bp auf. Homozygote *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Mäuse weisen nur eine Bande bei 213 bp auf und heterozygote Tiere erkennt man anhand von drei Banden. **(B)** *Southern Blot*-Analyse ausgewählter Tiere nach dem SexAI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Die *Rab38*^{WT}-Bande erkennt man schwach bei 6,0 kb. Das *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Allel zeigt sich anhand einer Bande bei 2,2 kb. Die Bande bei 10,5 kb ist bei beiden Allel-Formen zu erkennen.

Bei allen Verpaarungen der F1-Tiere zusammen wurden 52 Tiere geboren, wobei 19 für das *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Allel homozygote Tiere (36,5 %), 21 heterozygote Tiere (40,4 %) und zwölf Tiere mit zwei *Rab38*^{WT}-Allelen (23,1 %) identifiziert wurden (Abb.2.38).

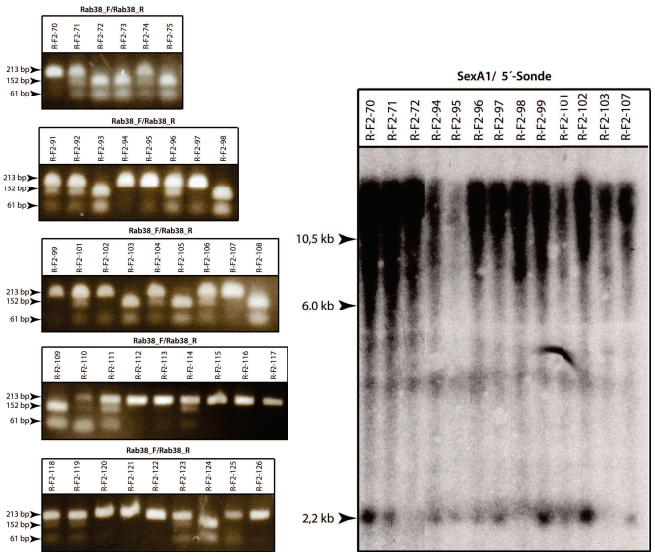


Abb. 2.38: PCR- und *Southern Blot*-Analyse der F2-Nachkommen aus der Verpaarung der F1-Nachkommen. **(A)** PCR-Resultate nach dem Verdau mit BsaJI. Homozygote *Rab38*^{WT}-Tiere weisen zwei Banden der Größe von 152 bp und 61 bp auf. Homozygote *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Mäuse weisen nur eine Bande bei 213 bp auf und heterozygote Tiere erkennt man anhand von drei Banden. **(B)** *Southern Blot*-Analyse ausgewählter Tiere nach dem SexAI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Die *Rab38*^{WT}-Bande erkennt man schwach bei 6,0 kb. Das *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Allel zeigt sich anhand einer Bande bei 2,2 kb. Die Bande bei 10,5 kb ist bei beiden Allel-Formen zu erkennen.

Eine Übersicht der Ergebnisse aus der Nachkommensanalyse befindet sich in Tab. 2.15.

Tab. 2.15: Zusammenfassung der Resultate der Heterozygoten-Verpaarungen

Vater	Mutter	Gesamtzahl	Mut/Mut	heterozygot	WT
R1.1-1	R3.3-9	28	6 (21,4 %)	18 (64,3 %)	4 (14,3 %)
R-F1-16	R-F1-12	11	5 (45,4 %)	3 (27,3 %)	3 (27,3 %)
R-F1-18	R-F1-13	12	6 (50,0 %)	4 (33,3 %)	2 (16,7 %)
R-F1-8	R-F1-22	20	5 (25,0 %)	11 (55,0 %)	4 (20,0 %)
R-F1-15	R-F1-11	9	3 (33,3 %)	3 (33,3 %)	3 (33,3 %)

Die Prozentangaben berechnen sich aus dem Verhältnis des jeweiligen Tabellenwertes zu der Gesamtzahl der analysierten Nachkommen.

2.2.2.2 Integration der IDGWT-Punktmutation durch die HR in das Genom von Zygoten

Nachdem im vorherigen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass die ZFN gegen den *Rab38*-Locus auch in Maus-Zygoten aktiv sind und damit die Frequenz der HR auf 3,4 % im Verhältnis zu den analysierten Tieren erhöht wurde, sollte nun festgestellt werden, ob sich eine vorhandene Punktmutation in einer relevanten Frequenz in Zygoten durch den Einsatz von ZFN korrigieren lässt. Dazu wurde dieses Mal sowohl ein Gen-*Targeting*vektor (Abb. 6.3.1.6) mit Homologiearmen rechterhand und linkerhand von der Mutation als auch ein einzelsträngiges Oligonukleotid (Abb. 6.3.2.1) mit einer Länge von 144 bp für die HR eingesetzt.

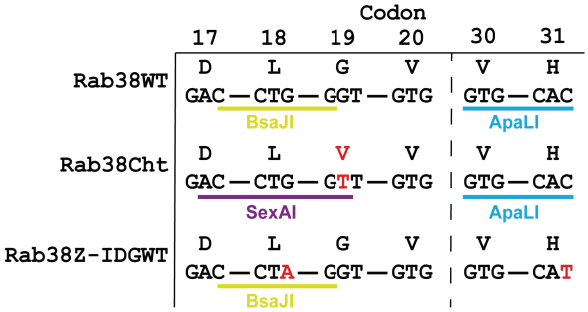


Abb. 2.39: Vergleich der RAB38-Codonsequenzen 17-20 und 30-31 des *Rab38*^{WT}-, des *Rab38*^{Cht}- und des *Rab38*$^{Z\text{-}IDGWT}$-Allels. Nukleotide und Aminosäuren, die sich von der *Rab38*^{WT}-Sequenz unterscheiden sind in rot dargestellt. Es werden zwei stille Mutationen, einmal in Codon 18 und das andere Mal in Codon 31 in rot hervorgehoben. Durch die zweite Mutation wird eine ApaLI-Erkennungsstelle entfernt. Die restlichen stillen Mutationen in den ZFN-Bindestellen sind in den jeweiligen Sequenzierungsresultaten gekennzeichnet.

Mit diesen zwei Konstrukten und der ZFN-mRNA wurden drei DNA/RNA-Mischungen für die Injektion hergestellt (Tab. 2.16). Die Zygoten für diese Injektionen stammen aus der Verpaarung von FVB-Weibchen mit C57BL/6J-Männchen, die einen homozygoten Genotyp für das *Rab38*^{Cht}-Allel aufwiesen. Diese Männchen wurden von M. Seabra zur Verfügung gestellt. Die injizierten Zygoten wurden anschließend in Ammentiere transferiert und die DNA der Nachkommen aus deren Schwanzspitzen isoliert.

Tab. 2.16: Injektionsaliquots aus Rab38-ZFN-mRNA mit Gen-*Targeting*vektor oder einzelsträngigem Oligonukleotid

Mischung	Vektorname	β(Vektor-DNA)	β(ZFN-mRNA) jeweils
D27R27	pEF-5HA-wt-3HA	30 ng/μl sc.	15 ng/μl
D30R30	pEF-5HA-wt-3HA	15 ng/μl sc.	7,5 ng/μl
D31R31	ZFNcht>IDGWT	15 ng/μl lin.	7,5 ng/μl

Für die Analyse der Nachkommen wurde das in Tab. 5.1 beschriebene PCR-Protokoll verwendet. In diesem Versuch wurden die PCR-Fragmente anschließend entweder mit BsaJI oder ApaLI verdaut. Nach dem BsaJI-Verdau kann das *Rab38*^{Cht}-Allel anhand einer 213 bp großen Bande identifiziert werden. Sowohl das *Rab38*^{WT}- als auch das *Rab38*$^{Z\text{-}IDGWT}$-Allel werden in zwei Fragmente der Größe von 152 bp und 61 bp zerteilt. Anhand des ApaLI-Verdaus kann zwischen Tieren mit einem nicht künstlich modifizierten *Rab38*-Locus (*Rab38*^{WT}*; Rab38*^{Cht}) und einem durch die ZFN modifizierten *Rab38*-Allel (*Rab38*$^{Z\text{-}IDGWT}$*; Rab38*^{NHEJ}) unterschieden werden, wobei die DNA ersterer von dem Enzym in zwei Fragmente (115 bp und 98 bp, auf dem Agarose-Gel nicht zu unterscheiden) geschnitten wird und die DNA letzterer unverdaut bleibt (213 bp) (Abb. 2.40).

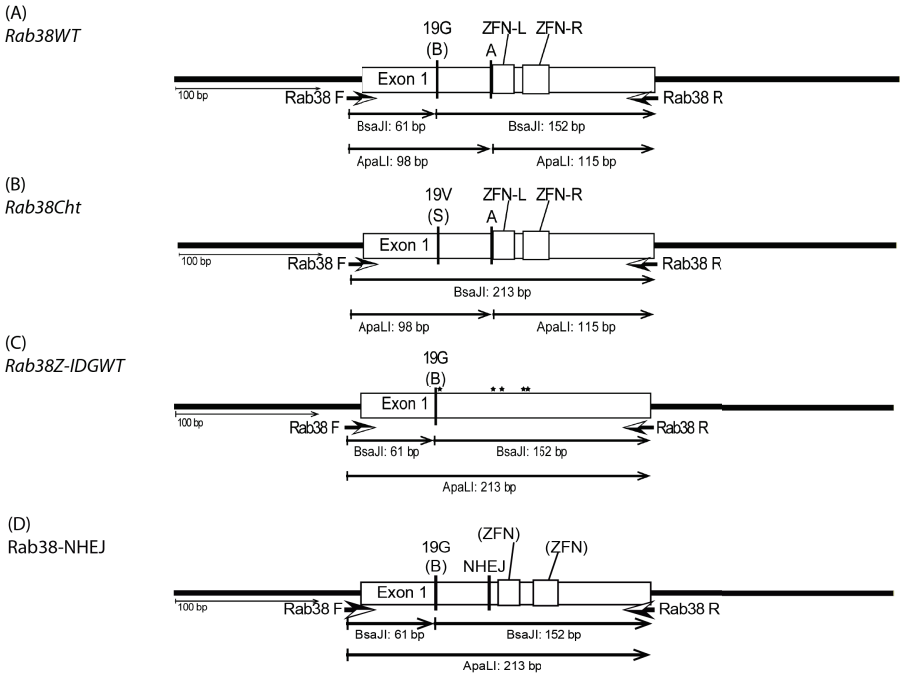


Abb. 2.40: Darstellung der vier möglichen *Rab38*-Loci nach der Pronukleus-Injektion für die PCR-Analyse. **(A)** *Rab38*^{WT}-Locus mit Kennzeichnung des ersten Exons, der beiden ZFN-Bindestellen (ZFN-L; ZFN-R), der Primer-Bindestellen (Rab38_F, Rab38_R) und der Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme BsaJI (B) und ApaLI (A). **(B)** *Rab38*^{Cht}-Locus mit der Aminosäure Val in Codon 19. Es kommt dadurch zu Entstehung einer SexAI (S) Erkennungsstelle. **(C)** *Rab38*$^{Z\text{-}IDGWT}$-Locus. Umkehrung der Aminosäure-Substitution in Codon 19 und damit Rückgewinnung der BsaJI-Erkennungsstelle. Zusätzliche Einbingung der stillen Punktmutationen (*) an den ZFN-Bindestellen. **(D)** *Rab38*^{NHEJ}-Locus nach dem DSB durch die ZFN und die Erzeugung von Deletionen oder Insertionen an der Verbindungsstelle.

Außerdem wurden die Tiere, die in der PCR ein auffälliges Bandenmuster zeigten, im *Southern Blot* analysiert. Dazu wurde die DNA nicht nur mit SexAI verdaut, sondern in einem zusätzlichen Ansatz das ApaLI-Restriktionsenzym verwendet. Die *Southern Blot* Sonde blieb gleich (*Rab38* 5'-Sonde) und die Genotypen der einzelnen Tiere – $Rab38^{WT}$, $Rab38^{Cht}$, $Rab38^{Z\text{-}IDGWT}$, $Rab38^{NHEJ}$ – konnte anhand der spezifischen Banden identifiziert werden (Abb. 2.41).

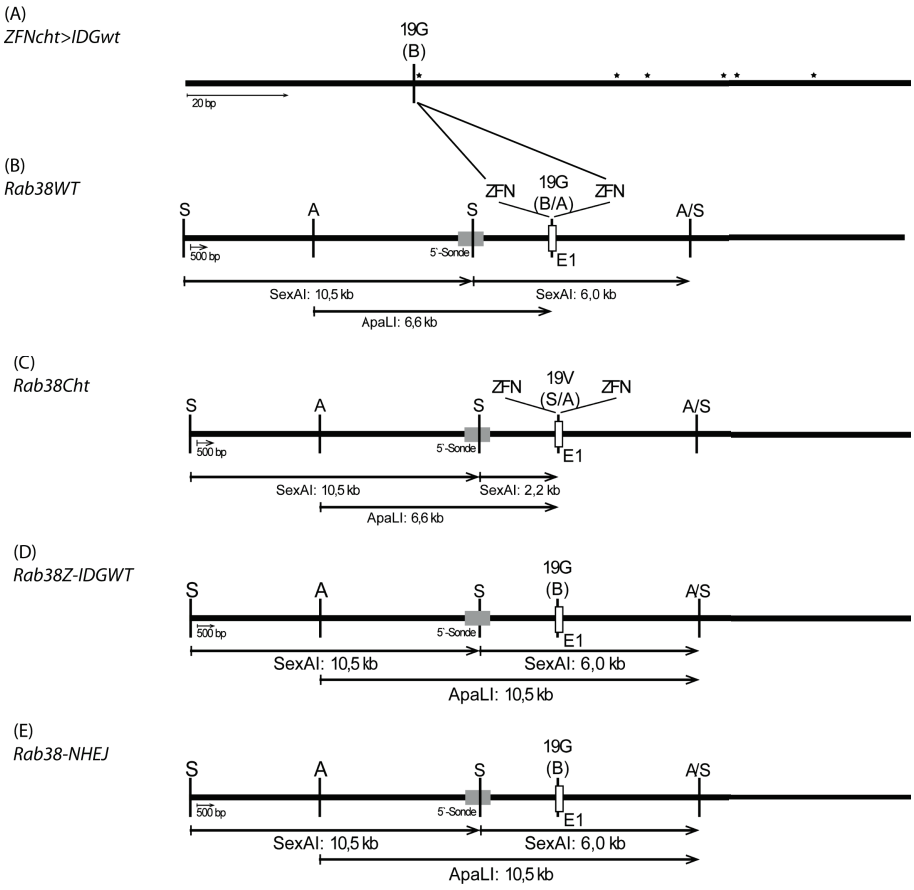


Abb. 2.41: Darstellung des *Targeting*-Oligonukleotids und der vier möglichen *Rab38*-Loci bei der *Southern Blot* Analyse. **(A)** *Targeting*-Oligonukleotid ZFNcht>IDGWT mit einer Länge von 144 bp. Kennzeichung der einzelnen Punktmutationen (*) und der Aminosäure Gly. **(B)** $Rab38^{WT}$-Locus mit den ZFN-Bindestellen im ersten Exon (E1) und der Aminosäure Gly an Position 19. **(C)** $Rab38^{Cht}$-Locus mit den ZFN-Bindestellen im E1 und der Aminosäure Val an Position 19. **(D)** $Rab38^{Z\text{-}IDGWT}$-Locus nach der gezielten Integration des Oligonukleotids und dem damit verbundenen Verlust der ZFN-Bindestellen. An Position 19 befindet sich bei diesem Locus die Aminosäure Gly. **(E)** $Rab38^{NHEJ}$-Locus nach der Deletion oder Insertion von Basen aufgrund des NHEJ an der Stelle des DSB. Die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme BsaJI (B), SexAI (S) und ApaLI (A), die Bindestelle der *Rab38* 5'-Sonde (5'-Sonde) für die *Southern Blot* Analyse und die Größen der nach dem Restriktionsverdau der genomischen DNA resultierenden Banden sind gekennzeichnet.

Die Ergebnisse der einzelnen Tiere werden nun nach Gen-*Targeting*konstrukt getrennt dargestellt. Zuerst werden die Ergebnisse der Tiere analysiert, deren Zygoten mit dem Gen-*Targeting*vektor injiziert wurden. Unter diesen Tieren wurde jedoch keines mit einer Integration der entsprechenden Mutationen gefunden (Tab. 2.17).

Tab. 2.17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Zygoten-Injektion der ZFN-mRNA zusammen mit dem Gen-*Targeting*vektor

Mischung	β(DNA) β(RNA)	Gesamtzahl transferierter Zygoten	Gesamtzahl F0	HR
D27R27	30 ng/μl sc. 15 ng/μl	292	62 (21,2 %)	0
D30R30	15 ng/μl sc. 7,5 ng/μl	457	79 (17,3 %)	0
		749	141 (18,8 %)	0

Die Prozentangaben wurden aus dem Verhältnis der einzelnen Tabellenwerte zur Gesamtzahl an transferierten Zygoten berechnet.

Zeitgleich wurden die Tiere, die aus der Zygoten-Injektion mit dem *Targeting*-Oligonukleotid stammen, analysiert. Unter den Nachkommen dieser Pronukleus-Injektionen wurden fünf Tiere identifiziert, die eine Modifikation im *Rab38*-Locus zeigten.

Maus C7.3-8 wies auf dem Agarose-Gel nach der PCR sowohl in den Proben nach dem BsaJI-Verdau als auch bei den Proben nach dem ApaLI-Verdau drei Banden auf (Abb. 2.42A,B). Dieses Muster spricht aufgrund der 213 bp-Bande im ApaLI-Verdau für die Modifikation eines Allels des *Rab38*-Locus an der Position der ZFN-Bindestellen, wobei im BsaJI-Verdau sowohl ein $Rab38^{Cht}$-Allel also auch ein *Rab38*-Allel mit der WT-Sequenz in Codon 19 erkennbar vorhanden waren. Durch die Sequenzierung des unverdauten Fragmentes nach dem ApaLI-Verdau stellte sich heraus, dass es sich bei der durch die PCR identifizierten WT-Sequenz um ein $Rab38^{Z\text{-}IDGWT}$-Allel handelte, bei dem sowohl die stille Mutation in Codon 18 als auch die stillen Mutationen der linken ZFN-Bindestelle durch die HR eingebracht wurden. (Abb. 2.42D). Die HR muss zwischen dem linken Teil des Oligonukeotids und dem maternalen $Rab38^{WT}$-Allel stattgefunden haben, da das paternale $Rab38^{Cht}$-Allel noch in dem Tier vorhanden war, was anhand des unverdauten PCR-Fragmentes nach dem BsaJI-Verdau zu erkennen war. Die Resultate konnten auch in den *Southern Blots* mit dem SexAI- und dem ApaLI-Verdau bestätigt werden. Im *Southern Blot* nach dem SexAI-Verdau konnte sowohl die Bande für ein $Rab38^{Z\text{-}IDGWT}$-Allel als auch die Bande für ein $Rab38^{Cht}$-Allel identifiziert werden (Abb. 2.42E). Auf dem *Southern Blot* nach dem ApaLI-Verdau wurde ein nicht modifiziertes Allel anhand einer Bande bei 6,6 kb und ein modifiziertes Allel anhand einer Bande bei 10,5 kb nachgewiesen (Abb. 2.42C).

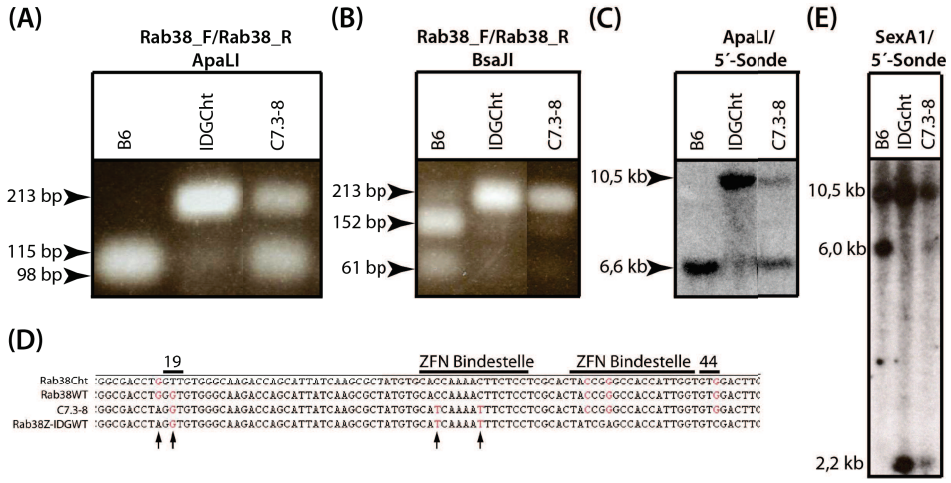


Abb. 2.42: Resultate aller Analysen von Maus C7.3-8. **(A)** PCR-Analyse nach dem ApaLI-Verdau. Tiere mit einem nicht modifizierten *Rab38*-Locus weisen zwei Banden bei 115 bp und 98 bp auf, die auf dem Foto nicht zu unterscheiden sind. Die Positiv-Kontrolle (IDGCht/IDGCht) zeigt die erwartete Bande der Größe von 213 bp. Maus C7.3-8 weist einen heterozygoten Genotyp in Bezug auf die Modifikation an der Position der ZFN-Bindestellen auf, da beide Zustände zu erkennen sind. **(B)** PCR-Analyse nach dem BsaJI-Verdau. Das $Rab38^{WT}$-Allel ist anhand zweier Banden der Größe von 152 bp und 61 bp zu identifizieren. Das $Rab38^{Cht}$-Allel kann man anhand einer Bande bei 213 bp erkennen. Die Kandidatenmaus zeigt alle drei Banden, was für einen heterozygoten Genotyp spricht. **(C)** *Southern Blot* nach dem ApaLI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Die unveränderten Allele besitzen eine Bande bei 6,6 kb. Ein durch die Aktivität der ZFN modifiziertes Allel weist eine Bande bei 10,5 kb auf, wie sie auch in dem Kandidatentier für die HR zu sehen ist. **(D)** Sequenzvergleich zwischen dem $Rab38^{Cht}$-, dem $Rab38^{WT}$-, dem $Rab38^{Z\text{-}IDGWT}$-Locus und dem Locus in der Kandidatenmaus C7.3-8. Codon 19, 44 und die beiden ZFN-Bindestellen sind dargestellt. Die eingefügten Mutationen sind durch Pfeile hervorgehoben. Die HR hat zwischen dem linken Teil des Oligonukleotids (bis zur zweiten ZFN-Bindestelle) und dem maternalen $Rab38^{WT}$-Locus stattgefunden. **(E)** *Southern Blot* nach dem SexAI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Das $Rab38^{WT}$-Allel erkennt man anhand einer Bande bei 6,0 kb, das $Rab38^{Cht}$-Allel anhand einer Bande bei 2,2 kb. Die 10,5 kb-Bande ist in beiden Allelen vorhanden. Die Maus C7.3-8 besitzt somit beide Allelformen. Sowohl in der PCR- als auch in der *Southern Blot* Analyse wurde die DNA eine C57BL/6J-Tieres (B6) als Negativkontrolle und die DNA eines $Rab38^{Z\text{-}IDGCht}$-Tieres (IDGCht) als Positivkontrolle verwendet.

Bei Maus C7.4-8 zeigte sich ein etwas anderer Genotyp. Nach dem Verdau des PCR-Fragmentes mit BsaJI befand sich auf dem Agarose-Gel keine unverdaute, 213bp große Bande mehr (Abb. 2.43B). Somit ist in dieser Maus kein $Rab38^{Cht}$-Allel mehr vorhanden. Der Verdau mit ApaLI zeigte, dass eine Veränderung im *Rab38*-Locus eines Allels stattgefunden hat, da dort eine unverdaute Bande sichtbar ist (Abb. 2.43A). Diese Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA extrahiert. Bei der anschließenden Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass es in einem $Rab38^{WT}$-Allel im Bereich der ZFN-Bindestellen zu einem NHEJ und dem damit verbundenen Verlust von 27 bp kam (Abb. 2.43D). Da auf dem Agarose-Gel nach dem Verdau der PCR-Fragmente mit BsaJI keine Bande mehr zu sehen war, die einem $Rab38^{Cht}$-Allel entspricht, ergibt sich der Schluss, dass es in dieser Maus erst zur HR zwischen dem endogenen $Rab38^{Cht}$-Allel und dem endogenen $Rab38^{WT}$-Allel kam, woraus eine Zygote mit zwei $Rab38^{WT}$-Allelen hervorging. Anschließend konnten die ZFN erneut binden und die *FokI*-Endonuklease den

DNA-Doppelstrang zum zweiten Mal an dieser Stelle schneiden, wobei es bei diesem Ereignis zu dem in der Sequenzierung beobachteten NHEJ und dem damit verbundenen Verlust der ApaLI-Erkennungsstelle kam. Diese Allelverteilung konnte auch in den *Southern Blots* nach dem Verdau mit SexAI oder ApaLI bestätigt werden (Abb. 2.43 C+E).

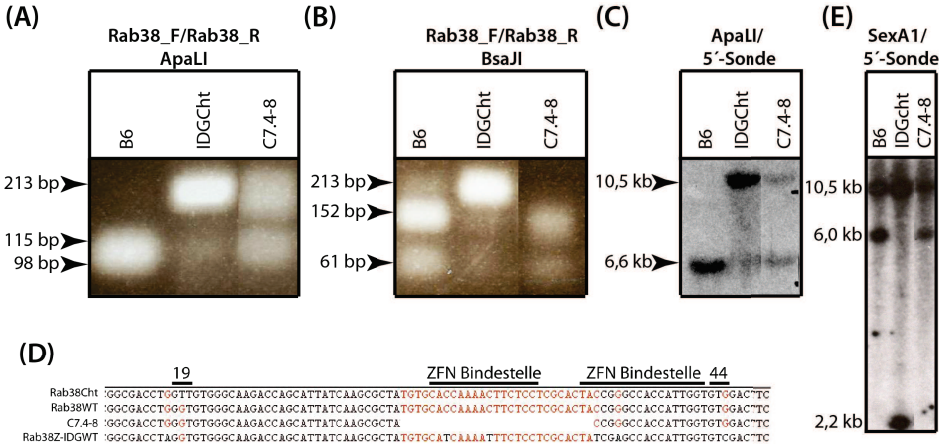


Abb. 2.43: Resultate aller Analysen mit der DNA der Maus C7.4-8. **(A)** PCR-Analyse nach dem Verdau mit ApaLI. Das nicht modifizierte Allel erkennt man anhand zweier, auf dem Gelfoto kaum zu unterscheidender Fragmente der Größen von 115 bp und 98 bp, ein modifiziertes Allel anhand einer Bande bei 213 bp. Die Kandidatenmaus C7.4-8 weist alle drei Banden auf. **(B)** PCR-Analyse nach dem BsaJI-Verdau. Das *Rab38*^{WT}-Allel kann man anhand zweier Banden bei 152 bp und 61 bp identifizieren. Das *Rab38*^{Cht}-Allel liefert nur eine Bande von 213 bp. Die Kandidatenmaus besitzt somit kein *Rab38*^{Cht}-Allel mehr. **(C)** *Southern Blot* Analyse nach dem ApaLI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Ein nicht modifiziertes *Rab38*-Allel weist eine Bande bei 6,6 kb auf. Ein durch den Einsatz der ZFN modifiziertes Allel zeigt sich anhand einer Bande bei 10,5 kb, wie sie auch bei Maus C7.4-8 sichtbar ist.**(D)** *Southern Blot*-Analyse nach dem SexAI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Das *Rab38*^{WT}-Allel erkennt man anhand einer Bande bei 6,0 kb und das *Rab38*^{Cht}-Allel anhand einer Bande bei 2,2 kb. Die Kandidatenmaus besitzt somit kein *Rab38*^{Cht}-Allel mehr. Die Bande bei 10,5 kb tritt bei beiden Genotypen auf. **(E)** Sequenzvergleich zwischen dem *Rab38*^{WT}-, dem *Rab38*^{Cht}-, dem *Rab38*$^{Z\text{-}IDGWT}$-Allel und einem Allel der Maus C7.4-8 nach der Sequenzierung. Es kam bei der Kandidatenmaus zum Verlust von 27 bp in Folge des NHEJ im *Rab38*^{WT}-Allel. Die ZFN-Bindestellen und die Codons 19 und 44 sind dargestellt. Sowohl in der PCR- als auch in der *Southern Blot* Analyse wurde die DNA eine C57BL/6J-Tieres (B6) als Negativkontrolle und die DNA eines *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Tieres (IDGCht) als Positivkontrolle verwendet.

Bei Maus C13.2-6 wurde durch den Verdau der PCR-Fragmente mit BsaJI festgestellt, dass nur noch zwei *Rab38*^{WT}-Allele vorhanden waren (Abb. 2.44A). Bei der Sequenzierung wurde danach nachgewiesen, dass es in einem *Rab38*^{WT}-Allel zu einem NHEJ mit dem Verlust von 10 bp kam (Abb. 2.44B). Die Ergebnisse wurden auch in den *Southern Blots* bestätigt. Im *Southern Blot* mit dem SexAI-Verdau konnte kein *Rab38*^{Cht}-Allel identifiziert werden. Dafür war eine Bande mit einer Größe zwischen 2,2 kb und 6,0 kb sichtbar (Abb. 2.44D). Auf dem Film des *Southern Blots* nach dem ApaLI-Verdau konnte ebenfalls eine Bande mit einer abweichenden Größe (zwischen 6,6 kb und 10,5 kb) identifiziert werden (Abb. 2.44C). Die gesammelten Resultate sprechen für eine Modifikation des *Rab38*^{WT}-Allels nach der zuvor erfolgten HR zwischen dem *Rab38*^{WT}- und dem *Rab38*^{Cht}-Allel.

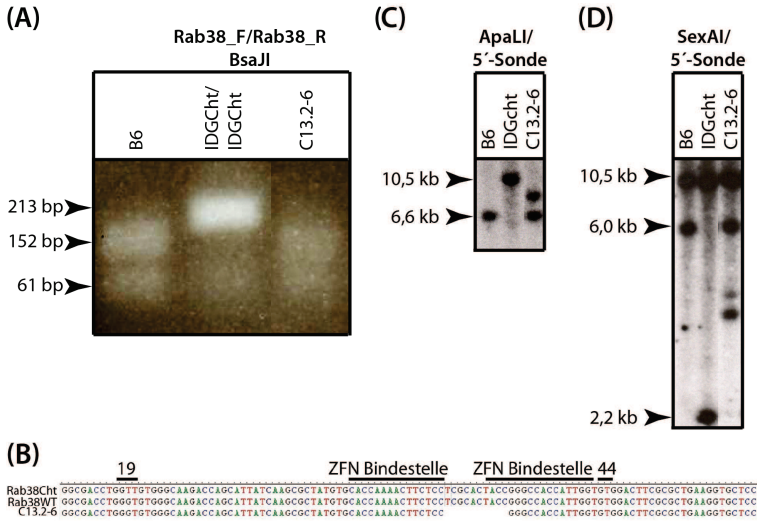


Abb. 2.44: Analysen der Maus C13.2-6. **(A)** PCR-Analyse nach dem BsaJI-Verdau. Den *Rab38*^{WT}-Locus kann man anhand zweier Banden bei 152 bp und 61 bp identifzieren, das *Rab38*^{Cht}-Allel anhand einer Bande bei 213 bp. Maus C13.2-6 besitzt somit kein *Rab38*^{Cht}-Allel mehr. **(B)** Sequenzvergleich der *Rab38*^{WT}- und *Rab38*^{Cht}-Loci mit dem isolierten PCR-Fragment von Maus C13.2-6. Es kam bei diesem Tier zu einem Nukleotidverlust von 10 bp in einem *Rab38*^{WT}-Allel. Codon 19, Codon 44 und die Bindestellen für die ZFN sind gekennzeichnet. **(C)** *Southern Blot* Analyse nach dem ApaLI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Ein ursprüngliches *Rab38*-Allel zeigt sich anhand einer Bande bei 6,6 kb, ein durch die ZFN modifiziertes Allel durch eine Bande bei 10,5 kb. Maus C13.2-6 hat eine Bande bei 6,6 kb, welche für ein nicht modifiziertes Allel spricht, und eine Bande zwischen 6,6 kb und 10,5 kb die eine Modifikation in einem *Rab38*-Allel anzeigt. **(D)** *Southern Blot* Analyse nach dem SexAI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Ein *Rab38*^{WT}-Allel besitzt eine Bande bei 6,0 kb und ein *Rab38*^{Cht}-Allel eine Bande bei 2,2 kb. Die 10,5 kb-Bande ist in beiden Loci vorhanden. Da die Maus C13.2-6 keine Bande bei 2,2 kb aufweist, muss es sich um ein Tier mit einem homozygoten *Rab38*^{WT}-Genotyp handeln. Als *Rab38*^{WT}-Kontrolle wurde die DNA einer C57BL/6J-Maus (B6) verwendet. Die DNA einer homozygoten *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Maus (IDGCht) wurde als Kontrolle für das *Rab38*^{Cht}-Allel und als Kontrolle für ein durch die ZFN modifiziertes Allel verwendet.

Maus C13.5-5 zeigte bei der Analyse des Bandenmusters nach dem BsaJI-Verdau der PCR-Fragmente das typische Muster für eine im *Rab38*-Locus heterozygote Maus (Abb. 2.45A). Es war sowohl ein *Rab38*^{WT}-Allel als auch ein *Rab38*^{Cht}-Allel vorhanden. Um diese Veränderung genauer zu untersuchen wurden die unverdauten Fragmente aus dem Gel isoliert und sequenziert. Bei der Analyse dieser Sequenzen konnte festgestellt werden, dass es bei dieser Maus zur HR zwischen dem *Rab38*^{WT}-Allel und dem *targeting*-Oligonukleotid kam (Abb. 2.45B). Dieses Ereignis fand jedoch erst nach dem Codon 19 statt, da dieses dem unveränderten *Rab38*^{WT}-Codon entspricht. Somit wurden nur die stillen Punktmutationen der ZFN-Bindestellen und im Codon 44 eingebracht. Im *Southern Blot* nach dem SexAI-Verdau konnte der heterozygote Genotyp dieser Maus im *Rab38*-Locus bestätigt werden (Abb. 2.45D). Weiterhin wurde im *Southern Blot* mit den durch ApaLI verdauten DNA-Proben die Veränderung der Erkennungsstelle durch eine Bande der Größe von 10,5 kb nachgewiesen (Abb. 2.45C). Dieses Tier zählt somit zu den positiven Tieren für des Ereignis einer HR, da ein Teil des Oligonukleotids ohne sonstige Fehlreparaturen in den *Rab38*^{WT}-Locus eingebracht wurde.

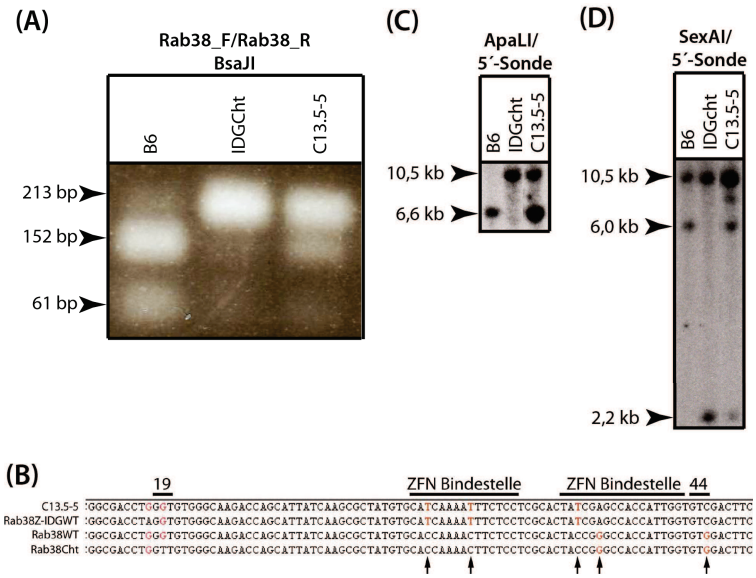


Abb. 2.45: Resultate der verschiedenen Analysen mit der DNA von Maus C13.5-5. **(A)** Ergebnisse der PCR-Analyse nach dem BsaJI-Verdau. Das *Rab38*^{WT}-Allel zeigt sich nach dem Verdau durch zwei Fragmente der Größe von 152 bp und 61 bp, das *Rab38*^{Cht}-Allel besitzt eine unverdaute Bande bei 213 bp. Bei Maus C13.5-5 lässt sich somit ein heterozygoter Genotyp identifizieren. **(B)** Sequenzvergleich der drei möglichen Loci mit der DNA von Maus C13.5-5. Es kam zur Integration aller stillen Mutationen der ZFN-Bindestellen und des Codons 44 in das *Rab38*^{WT}-Allel. **(C)** Darstellung des *Southern Blots* nach dem ApaLI-Verdau und der anschließenden Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Ein nicht modifiziertes *Rab38*-Allel kann durch eine Bande bei 6,6 kb nachgewiesen werden. Fragmente einer Größe von 10,5 kb, wie bei Maus C13.5-5, sprechen für eine Modifikation des *Rab38*-Locus. **(D)** *Southern Blot* Analyse nach dem SexAI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Das *Rab38*^{WT}-Allel erkennt man anhand einer Bande bei 6,0 kb, das *Rab38*^{Cht}-Allel weist eine Bande bei 2,2 kb auf und die Bande bei 10,5 kb ist in beiden Allelen vorhanden. Maus C13.5-5 besitzt somit einen heterozygoten Genotyp. Als *Rab38*^{WT}-Kontrolle wurde die DNA einer C57BL/6J-Maus (B6) verwendet. Die DNA einer homozygoten *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Maus (IDGCht) wurde als Kontrolle für das *Rab38*^{Cht}-Allel und als Kontrolle für ein durch die ZFN modifiziertes Allel verwendet.

Sowohl die PCR-Analyse nach dem ApaLI-Verdau also auch der *Southern Blot* nach diesem Verdau ergaben für die Maus C15.1-5 eine Veränderung in einem *Rab38*-Allel (Abb. 2.46A+C). Bei der PCR-Analyse nach dem BsaJI-Verdau wurde festgestellt, dass sowohl das *Rab38*^{WT}-Allel als auch das *Rab38*^{Cht}-Allel noch vorhanden waren (Abb. 2.46B). Bei der Sequenzierung der unverdauten PCR-Fragmente wurde in Maus C15.1-5 eine HR zwischen dem rechten Teil des *Targeting*-Oligonukleotids und dem *Rab38*^{Cht}-Allel identifiziert. Durch diese HR wurden die stillen Mutationen der ZFN-Bindestellen und die zusätzliche stille Mutation im Codon 44 integriert (Abb. 2.46D).

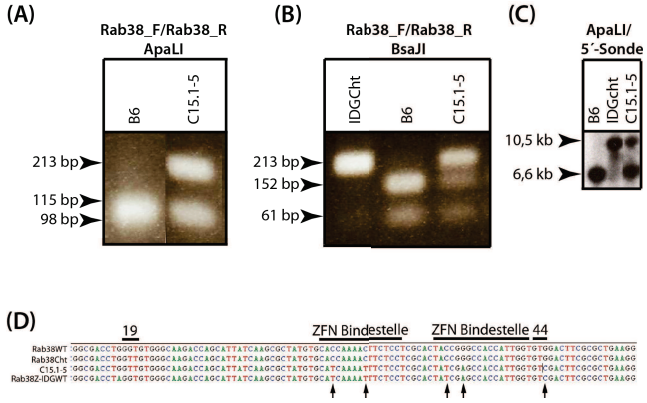


Abb. 2.46: Zusammenfassung der Resultate von Maus C15.1-5. **(A)** PCR-Analyse nach dem ApaLI-Verdau. Einen nicht modifizierten Locus erkennt man anhand zweier Banden bei 115 bp und 98 bp. Maus C15.1-5 zeigt jedoch zusätzlich ein Fragment der Größe von 213 bp, das für eine Modifikation in einem Allel spricht. **(B)** Darstellung der PCR-Fragmente nach dem Verdau mit BsaJI. Ein Tier mit einem homozygoten *Rab38*^{WT}-Genotyp erkennt man anhand der verdauten Banden mit einer Größe von 152 bp und 62 bp. Tiere, die homozygot für den *Rab38*^{Cht}-Locus sind, weisen nur eine Bande bei 213 bp auf. Maus C15.1-5 besitzt somit einen heterozygoten Genotyp, da sich in der PCR-Analyse drei Fragmente zeigen. **(C)** Darstellung der *Southern Blot*-Analyse nach dem ApaLI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Ein Tier mit zwei nicht modifizierten *Rab38*-Loci weist nur eine Bande bei 6,6 kb auf. Im Gegensatz dazu, zeigt sich ein Tier mit zwei modifizierten Loci anhand einer Bande bei 10,5 kb. Maus C15.1-5 besitzt somit sowohl ein nicht modifiziertes als auch ein modifiziertes *Rab38*-Allel. **(D)** Sequenzanalyse des veränderten *Rab38*-Locus von Maus C15.1-5 im Vergleich zu den möglicherweise vorhandenen Loci. Es zeigt sich dabei, dass die stillen Mutationen an den Positionen der ZFN-Bindestellen und im Codon 44 in den *Rab38*^{Cht}-Locus integriert wurden. Als *Rab38*^{WT}-Kontrolle wurde die DNA einer C57BL/6J-Maus (B6) verwendet. Die DNA einer homozygoten *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Maus (IDGCht) wurde als Kontrolle für das *Rab38*^{Cht}-Allel und als Kontrolle für ein durch die ZFN modifiziertes Allel verwendet.

Somit wurden bei diesem Teilexperiment mit der Pronukleus-Injektion des *Targeting*-Oligos zusammenfassend fünf Tiere mit einer Modifikation des *Rab38*-Locus identifiziert, wobei es bei drei Tieren (2,5 % der analysierten Mäuse) zu einer HR zwischen dem Oligonukleotid und dem endogenen Locus kam, und bei zwei Tieren (1,7 % der analysierten Mäuse) zu einer HR zwischen den beiden endogenen Loci. Bei diesen zwei Tieren folgte im Anschluss an die HR ein erneuter DSB und eine Deletion von Basenpaaren durch die NHEJ-Reparatur (Tab. 2.18).

Tab. 2.18: Zusammenfassung der Ergebnisse der Zygoten-Injektion eines *targeting*-Oligonukleotids mit der Rab38-ZFN-mRNA

	β(DNA) β(RNA)	Gesamtzahl transferierter Zygoten	Gesamtzahl F0	HR (Oligo)	HR (endogen)	NHEJ
D31R31	15 ng/μl sc. 7,5 ng/μl	455	120 (27,0 %)	3 (0,6 %)	2 (0,4 %)	2 (0,4 %)

Die Prozentangaben berechnen sich aus den jeweiligen Tabellenwerten im Verhältnis zu der Gesamtzahl an transferierten Zygoten.

Alle Tiere mit einem modifizierten *Rab38*-Locus wurden mit C57BL/6J-Mäusen verpaart und die daraus resultierenden Nachkommen ebenfalls analysiert. Die Maus C7.3-8 wurde insgesamt

dreimal verpaart. Aus diesen Verpaarungen resultierten in der Gesamtzahl 42 Nachkommen, wobei 25 Tiere (59,5 % der Nachkommen) den heterozygoten Genotyp *Rab38*^{WT}/*Rab38*^{Cht}, acht Tiere (19,0 % der Nachkommen) den homozygoten Genotyp *Rab38*^{WT}/*Rab38*^{WT} und zehn Tiere (23,8 % der Nachkommen) den gesuchten Genotyp *Rab38*$^{Z\text{-}IDGWT}$/*Rab38*^{Cht} aufwiesen (Abb. 2.47). Dieses Ergebnis zeigt, dass bei dem Elterntier in einigen Zellen der Keimbahn der Genotyp *Rab38*$^{Z\text{-}IDGWT}$/*Rab38*^{Cht} und in den anderen Zellen noch der ursprüngliche Genotyp der Zygote (*Rab38*^{WT}/*Rab38*^{Cht}) vorlag. Somit handelt es sich bei der Maus C7.3-8 bezüglich des *Rab38*-Genotyps in den Keimbahnzellen um eine Mosaikmaus.

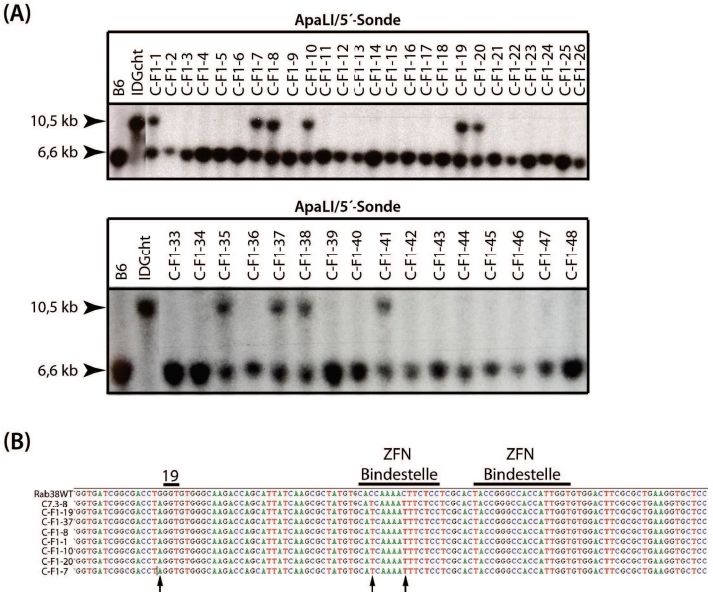


Abb. 2.47: Zusammenfassung der Resultate der F1-Nachkommen von Maus C7.3-8. **(A)** *Southern Blot* Analyse der Nachkommen nach dem ApaLI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Nachkommen C-F1-1, C-F1-7, C-F1-8, C-F1-10, C-F1-19, C-F1-20, C-F1-32, C-F1-35, C-F1-37, C-F1-38 umd C-F1-41 zeigen alle die für ein modifiziertes Allel sprechende Bande bei 10,5 kb. Die restlichen Nachkommen weisen nur eine Bande bei 6,6 kb auf, die einem nicht modifizierten Allel entspricht. **(B)** Sequenzvergleich zwischen dem Elterntier C7.3-8 und einigen F1-Nachkommen dieses Tieres. Alle Nachkommen haben den veränderten *Rab38*-Locus vererbt bekommen.

Maus C13.5-5 wurde ebenfalls mit C57BL/6J-Männchen verpaart. Bei der Anfertigung dieser Arbeit wurden bereits sechs Nachkommen geboren, die alle das veränderte *Rab38*^{Cht}-Allel mit den integrierten stillen Mutationen der Mutter aufwiesen (Abb. 2.48). Dies würde im Moment für eine Frequenz von 100 % bei der Keimbahnübertragung sprechen. Um jedoch genauere Aussagen machen zu können, ob die Allele nach den Mendelschen Vererbungslehrern weitergegeben werden, werden noch mehr Nachkommen benötigt.

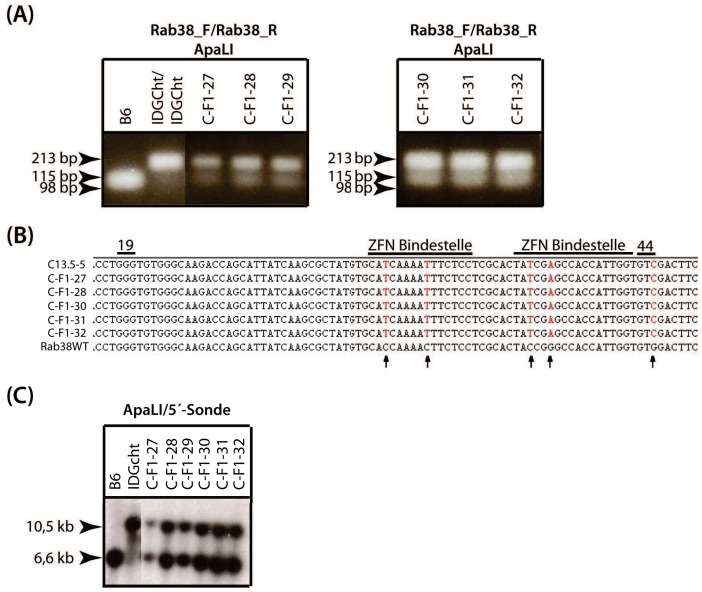


Abb. 2.48: Darstellung aller Resultate der Nachkommen von Maus C13.5-5. **(A)** PCR-Analyse nach dem ApaLI-Verdau. Das nicht modifizierte *Rab38*-Allel erkennt man daran, dass auf dem Gel zwei Fragmente der Größe von 115 bp und 61 bp vorhanden sind, die man jedoch auf dem Gel nicht unterscheiden kann. Ein modifiziertes *Rab38*-Allel weist ein Fragment der Größe von 213 bp auf.**(B)** Sequenzvergleich der F1-Nachkommen zum Muttertier. Es wurden alle Mutationen an die Nachkommen weitergegeben. **(C)** *Southern Blot* Analyse nach dem ApaLI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Ein nicht modifiziertes *Rab38*-Allel zeigt sich anhand einer Bande bei 6,6 kb. Das modifizierte *Rab38*-Allel weist eine Bande bei 10,5 kb auf.

Maus C13.2-6 wurde ebenfalls mit C57BL/6J-Tieren verpaart. Aus dieser Verpaarung entstanden 22 Nachkommen. Durch die Analyse der Ergebnisse wurde festgestellt, dass sieben Nachkommen (70,0 % der Tiere) ein mutiertes Allel vererbt bekommen haben (Abb. 2.49). Die Mutationen wurden somit über die Keimbahn an die Nachkommen weitergegeben.

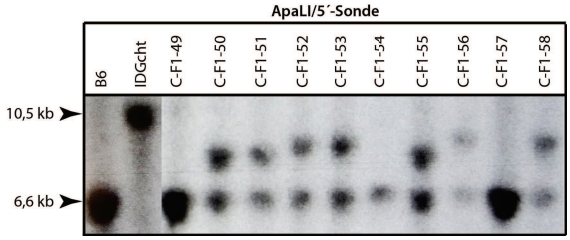


Abb. 2.49: Darstellung der Nachkommen von Maus C13.2-6 im *Southern Blot* nach dem ApaLI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Ein nicht modifiziertes *Rab38*-Allel zeigt sich anhand einer Bande bei 6,6 kb. Jedes modifizierte *Rab38*-Allel weist eine Bande einer anderen Größe auf. Sollte dabei nur die ApaLI-Schnittstelle verloren gegangen sein, kann eine Bande der genauen Größe von 10,5 kb identifiziert werden. sieben der zehn Nachkommen haben das modifizierte Allel der Mutter geerbt (Abb. 2.44).

Maus C15.1-5 wurde ebenfalls mit C57BL/6J-Männchen verpaart. Im Zeitraum dieser Arbeit konnten elf Nachkommen analysiert werden. Es wurden unter diesen Nachkommen vier Tiere (36,4 % der analysierten Nachkommen) identifiziert, die alle das Allel mit den nach der HR integrierten Mutationen aufweisen (Abb. 2.50).



Abb. 2.50: Darstellung der Nachkommen von Maus C15.1-5 nach der Sequenzierung der PCR-Fragmente.

Es konnte somit in diesem Versuchsteil ebenfalls bewiesen werden, dass die Frequenz der HR in Zygoten durch den Einsatz von ZFN auf 2,5 % erhöht wird. Außerdem wurde gezeigt, dass *Targeting*-Oligonukleotide einer Länge von 144 bp zur Einbringung von Punktmutationen mit Hilfe der HR ausreichen und in diesem Fall keine großen Vektoren mit langen Homologiearmen benötigt werden.

2.3 *TALEN*-vermittelte Genom-Manipulation

Nachdem in den vorhergehenden Abschnitten anhand zweier Gene gezeigt werden konnte, dass ZFN sowohl zusammen mit einem Gen-*Targeting*vektor mit langen Homologiearmen als auch mit einem 144 bp langen *targeting*-Oligonukleotid die Frequenz der HR erhöhen, sollte nun getestet werden, ob dies mit der *FokI*-Endonuklease auch noch möglich ist, wenn sie an ein anderes DNA-Bindeprotein gekoppelt ist. Dazu wurde in diesem Teil der Arbeit das TALE-Protein verwendet. Die TALEN wurden von Dr. Benedikt Wefers mit Hilfe des von ihm etablierten TALEN-Konstruktions*kits* hergestellt (unveröffentlicht) und von ihm und Regina Kneuttinger in Zellkultur getestet, bevor sie in den Pronukleus-Injektionen eingesetzt wurden. Da es in dieser Arbeit hauptsächlich um die Genom-Modifikationen in Zygoten geht, sollen hier neben den Resultaten der Vorkern-Injektionen nur kurz die RVD-Sequenz der TALEN, der Ort der Bindestelle im Genom, der Ablauf und das endgültige Ergebnis der Zellkultur erläutert werden.

2.3.1 Modifikation des *Rab38*-Locus durch die Vorkern-Injektion von TALEN

In diesem Experiment wurden TALEN gegen den *Rab38*-Locus konstruiert, da bei diesem die positiven Ergebnisse der ZFN als Vorbild und Kontrolle dienen konnten. Die TALE-Proteine wurden ebenfalls so geplant, dass sie in der Nähe der Position der Cht-Mutation im *Rab38*-Gen binden. Diese Mutation wurde bereits in den vorherigen Experimenten mit den ZFN eingesetzt. Jede TALE-Bindedomäne bestand aus 14 Fingern, einem so genannten Finger 0 am Anfang jeder Domäne und einem so genannten halben Finger 14,5 an deren Ende (Abb. 2.51).

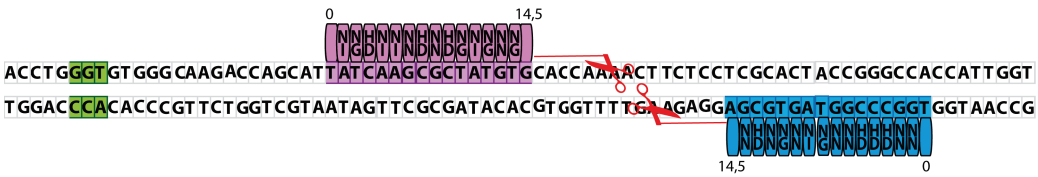


Abb. 2.51: Schema der TALEN-Bindung an den *Rab38*-Locus. In blau und rosa sind die zwei DNA-Bindedomänen der TALEN dargestellt. Die roten Scheren kennzeichnen jeweils eine Hälfte der *FokI-WT*-Endonuklease. Das Codon 19, bei dem die Cht-Mutation identifiziert wurde, ist in grün hervorgehoben. Die Aminosäure-Sequenz der einzelnen Teilstücke ist bis auf Aminosäure 12 und 13 hoch konserviert, somit werden hier nur die zwei Aminosäuren der RVD angegeben, um die verwendeten Finger zu kennzeichnen.

Die TALE-Bindeproteine wurden nach ihrer Konstruktion in einen Expressionsvektor kloniert (Abb. 6.3.3.6, Abb. 6.3.3.7), in dem sich auch die *FokI-WT*-Endonuklease-Sequenz befand. Anschließend wurden sie für die Zellkultur-Experimente als Plasmid und für die Experimente in der Zygote als *in vitro*-transkribierte mRNA verwendet. In der Zellkultur wurden die TALEN in einem transienten Versuchsansatz zur Messung der β-*Gal*-Expression in HEK293-Zellen verwendet. Dazu wurden sie durch die Elektroporation zusammen mit einem von Benedikt Wefers speziell dafür entwickelten Reporterplasmid in die Zellen eingebracht und die Expressionstärke des β-Gal nach zwei Tagen durch die Messung am Luminometer bestimmt.

Die Werte wurden dann mit Hilfe der Luciferase-Kontrolle, die auf jedem Plasmid integriert war, normalisiert. Als Positivkontrolle dienten Zellen, in die nur ein β-*Gal*-Expressionsplasmid eingebracht wurde, und als Negativkontrolle Zellen, die nur den Reporter besaßen. Die Auswertung der Ergebnisse (Abb. 2.52) zeigte, dass die TALEN gegen den *Rab38*-Locus eine dreifache β-*Gal*-Expressionsstärke gegenüber den ZFN gegen den selben Locus aufwiesen. Sie funktionierten sogar doppelt so gut wie der interne Standard für die Zellkultur-Experimente. Die Reporter alleine zeigten keine β -Gal-Aktivität, wodurch bewiesen wurde, dass die β-*Gal*-Expression in den anderen Proben wirklich durch einen von den TALEN oder ZFN erzeugten DSB mit anschließender HR hervorgerufen wurde.

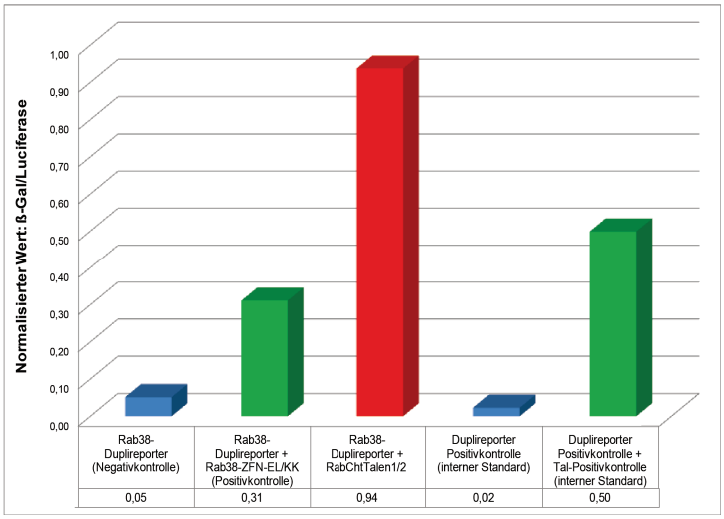


Abb. 2.52: Ergebnisse des Aktivitätsnachweises der *Rab38*-spezifischen TALEN. Es wurden die normalisierten β-*Gal*/Luciferase Werte für folgende Transfektionen verglichen: *Rab38*-Duplireporter allein; *Rab38*-Duplireporter plus *Rab38*-ZFN; *Rab38*-Duplireporter plus *Rab38*-TALEN; Duplireporter für den internen Standard alleine; Duplireporter für den internen Standard plus dem entsprechenden TALEN. Es zeigte sich eindeutig in den Zellen, die mit dem Duplireporter plus den Rab38-TALEN transfiziert wurden, mit 0,94 die höchste β-Gal-Expression. Die β-*Gal* Positivkontrolle für das Zellkultur-Experiment ist in diesem Diagramm nicht dargestellt. Sie erreichte einen Wert von 5,38.

2.3.1.1 Integration der IDGCht-Punktmutation in das Genom von *Rab38*^{WT}-Zygoten

Zunächst wurde in diesem Versuchsteil begonnen, die IDGCht-Punktmutation in den *Rab38*-Locus einzubringen. Dafür wurden in diesem Fall sowohl ein Gen-*Targeting*vektor mit langen Homologiearmen (Abb. 6.3.1.7) als auch ein Gen-*Targeting*-Oligonukleotid (Abb. 6.3.2.2) verwendet. Beide besaßen zusätzlich zu der G-zu-T-Transversion an der zweiten Position des Codon 19 mehrere stille Punktmutationen, um den Bereich der korrekten Integration bei der Sequenzierung der PCR-Fragmente zu identifizieren und eine mögliche zweite Bindung der TALEN zu unterbinden. Die für eine erste Analyse wichtigen Mutationen sind in Abb. 2.53 dargestellt. Die übrigen eingebrachten Mutationen sind in den einzelnen Sequenzierungsanalysen ersichtlich.

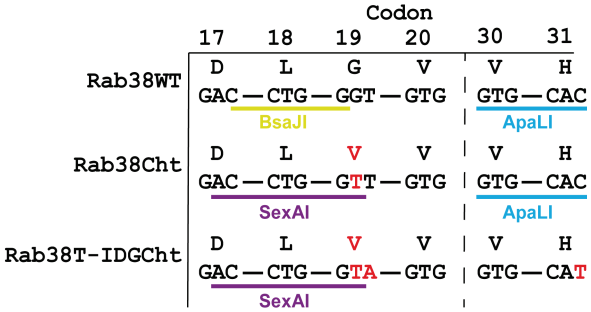


Abb. 2.53: Vergleich der entscheidenden Rab38-Codons 17-20 und 30-31 des *Rab38*^{WT}-, des *Rab38*^{Cht}- und des *Rab38*$^{T\text{-}IDGCht}$-Locus. Nukleotide und Aminosöuren, die sich vom *Rab38*^{WT}-Allel unterscheiden, sind in rot dargestellt. Durch die G-zu-V-Substitution in Codon 19 verschwindet eine BsaJI-Erkennungsstelle und es entsteht eine SexAI-Erkennungssequenz. Durch die stille Mutation an der dritten Position von Codon 31 wird eine ApaLI-Erkennungssequenz entfernt.

Aus den beiden *in vitro* transkribierten TALEN-mRNAs und dem jeweiligen Gen-*Targeting*-Konstrukt wurden zwei DNA/RNA-Mischungen für die Pronukleus-Injektionen hergestellt (Tab. 2.19). Diese Mischungen wurden in den männlichen Pronukleus und das Zytoplasma von *Rab38*^{WT}-Zygoten injiziert, die aus der Verpaarung von BDF-1-Männchen mit FVB-Weibchen stammen. Diese injizierten Zygoten wurden in pseudo-schwangere CD1-Weibchen transferiert und die DNA der Nachkommen mit PCR- und *Southern Blot* Analysen auf eine mögliche HR hin untersucht.

Tab. 2.19: Eingesetzte Konzentrationen bei den Pronukleus-Injektionen für die Einbringung der *Rab38*$^{T\text{-}IDGCht}$-Mutation

Mischung	Vektorname	β(Vektor-DNA)	β(TALEN-mRNA) jeweils
D36R36	pEF-5HA-TALcht-3HA	15 ng/μl sc.	10 ng/μl
D37R37	TALENwt>IDGCht	15 ng/μl	10 ng/μl

Die Genotypisierungs-PCR wurde bei diesem Experiment nach dem schon etablierten Protokoll (Tab. 5.1) mit den Primern Rab38_F und Rab38_R durchgeführt und die PCR-Fragmente anschließend mit den Restrikionsenzymen ApaLI oder BsaJI verdaut. Durch die HR zwischen dem endogenen *Rab38*-Locus und dem jeweiligen Gen-*Targeting*-Konstrukt kam es zum Verlust einer BsaJI- und ApaLI-Erkennungsstelle, wodurch die entsprechenden *Rab38*-Loci jeweils anhand eines bestimmten Bandenmusters identifiziert werden konnten (Abb. 2.54).

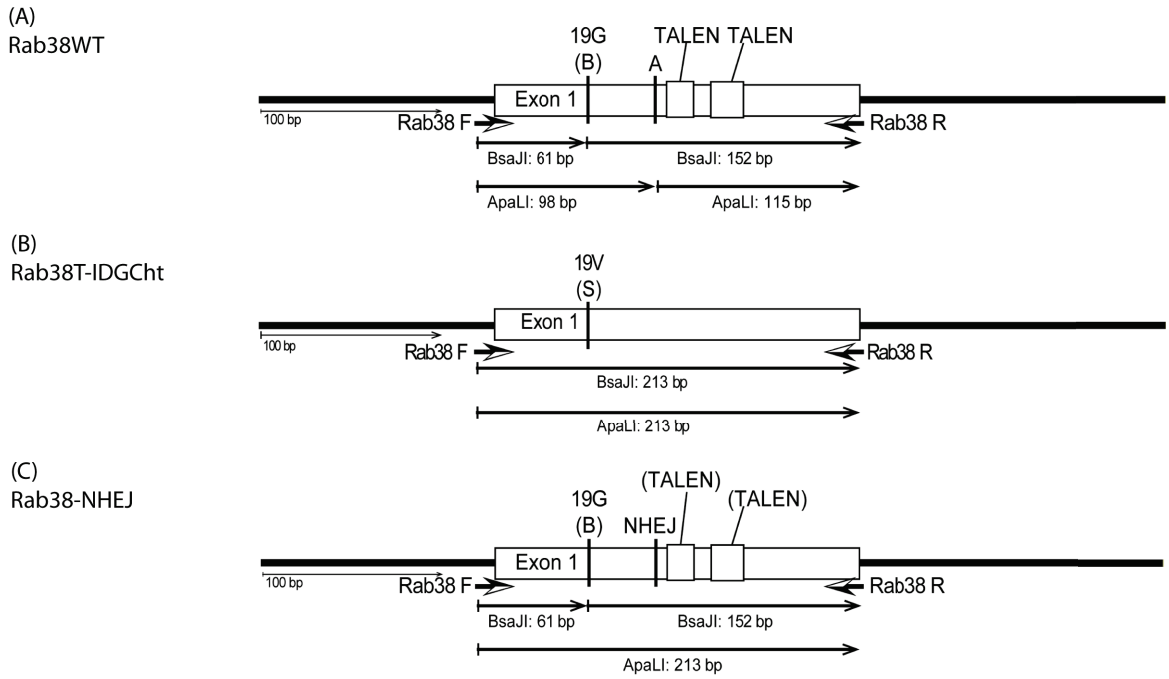


Abb. 2.54: Darstellung der *Rab38*-Loci für die PCR-Analyse. **(A)** $Rab38^{WT}$-Locus mit den Bindestellen für die TALEN im ersten Exon und der Aminosäure G an Position 19. **(B)** $Rab38^{T\text{-}IDGCht}$-Locus im Bereich des ersten Exons. Die TALEN können an diesen Locus nicht mehr binden und in Codon 19 befindet sich jetzt die Aminosäure V. **(C)** $Rab38^{NHEJ}$-Locus nach einer stattgefundenen Deletion oder Insertion von Basen. Je nach Ausdehnung der Deletion sind einzelne Teilstücke (ApaLI-Erkennungsstelle, TALEN-Bindestellen) nicht mehr vorhanden. Die Restriktionsenzyme ApaLI (A), BsaJI (B) und SexAI (S), die Primer-Bindestellen Rab38_F und Rab38_R und die Größen der verdauten PCR-Fragmente sind dargestellt.

Die DNA für den *Southern Blot* wurde sowohl mit SexAI als auch mit ApaLI (Tab. 5.2) verdaut und die Nylonmembran mit der radioaktiv markierten *Rab38* 5'-Sonde hybridisiert. Ein Röntgenfilm wurde für drei Tage exponiert. Anhand des erhaltenen Bandenmusters konnten nun die einzelnen Genotypen – *Rab38*^{WT}, *Rab38*$^{T\text{-}IDGCht}$, *Rab38*^{NHEJ} – bestimmt werden (Abb. 2.55).

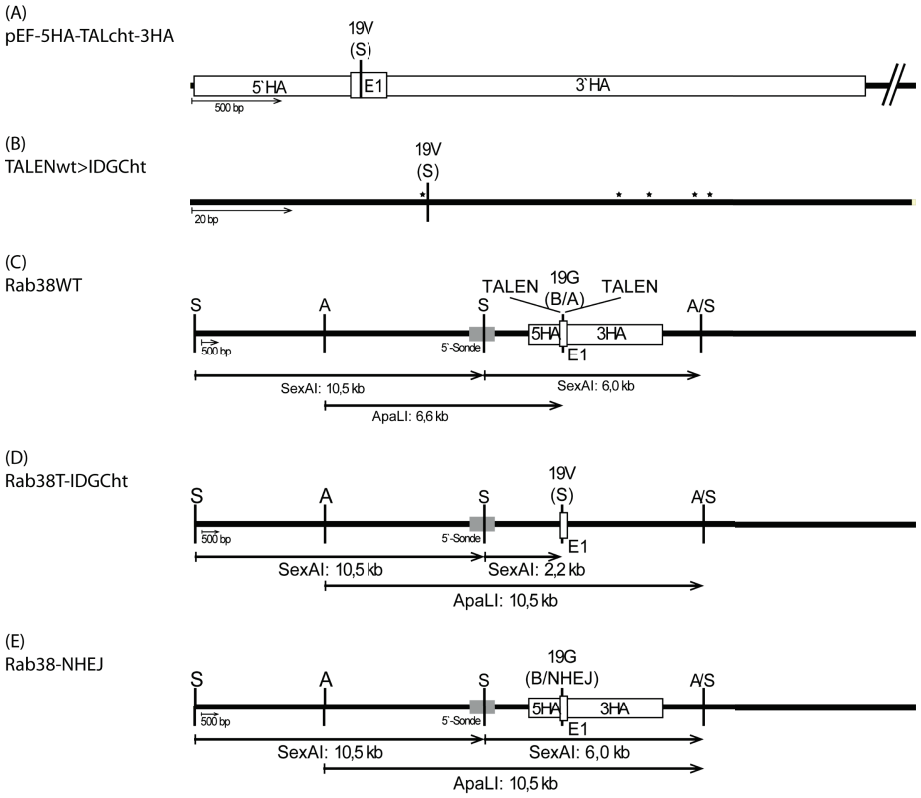


Abb. 2.55: Darstellung der Gen-*Targeting*-Konstrukte und der *Rab38*-Loci für die *Southern Blot* Analyse. **(A)** *Targeting*-Vektor pEF-5HA-TALcht-3HA mit den 5'- und 3'-Homologiearmen (HA) und dem ersten Exon (E1), in dem sich die IDGCht-Mutation befindet. **(B)** Gen-*Targeting*-Oligonukleotid TALENwt>IDGCht mit einer Länge von 144 bp und insgesamt fünf stillen Mutationen (*) zusätzlich zur IDGCht-Mutation. **(C)** *Rab38*^{WT}-Locus mit den HA und den TALEN-Bindestellen im E1. **(D)** *Rab38*$^{T\text{-}IDGCht}$-Locus nach der HR mit dem Gen-*Targeting*-Konstrukt. **(E)** *Rab38*^{NHEJ}-Locus nach einer möglichen Deletion von mehreren Basenpaaren. Die Bindestellen der Restriktionsenzyme ApaLI (A), BsaJI (B) und SexAI (S), die Erkennungssequenzen der *Rab38* 5'-Sonde (5'-Sonde) und die Größen der entsprechenden Banden auf dem *Southern Blot* sind dargestellt.

Die Ergebnisse dieses Versuchsteils werden nun nach Gen-*Targeting*-Konstrukt getrennt betrachtet; Begonnen wird dabei mit Nachkommen der Zygoten-Injektion mit dem Gen-*Targeting*vektor. Bei der Analyse der PCR-Fragmente nach dem ApaLI-Verdau wurden vier Tiere (F3.3-8; F3.5-4; F3.6-1; F11.1-3) identifiziert, die ein modifiziertes *Rab38*-Allel aufwiesen, wobei sich nur bei einem Tier (F3.5-4) nach dem BsaJI-Verdau ein unverdautes Fragment zeigte. Die unverdauten Fragmente dieser Analyse wurden aus dem Gel extrahiert und sequenziert, wodurch die einzelnen Modifikationen genauer untersucht werden konnten. Bei Maus F3.3-8 konnte dabei ein Nukleotidverlust von 34 bp im *Rab38*^{WT}-Allel identifiziert werden (Abb. 2.56A). Maus F3.5-4 zeigte im Sequenzvergleich eine komplette HR eines *Rab38*^{WT}-Allels mit dem Gen-*Targeting*vektor (Abb. 2.56B), wodurch alle Mutationen eingebracht wurden. Bei Maus F3.6-1 konnte durch den Sequenzvergleich eine Deletion von 7 bp festgestellt werden (Abb. 2.56C). Die unverdaute

Bande bei Maus F11.1-3 konnte nicht sequenziert werden, da es sich hierbei um einen Mischklon handelt, wie sich im anschließenden *Southern Blot* herausgestellt hat (Abb. 2.57). Man konnte allerdings davon ausgehen, dass zumindest die IDGCht-Mutation nicht in den Locus integriert wurde, da man sonst ein unverdautes Fragment bei dem BsaJI-Verdau analysieren hätte können.

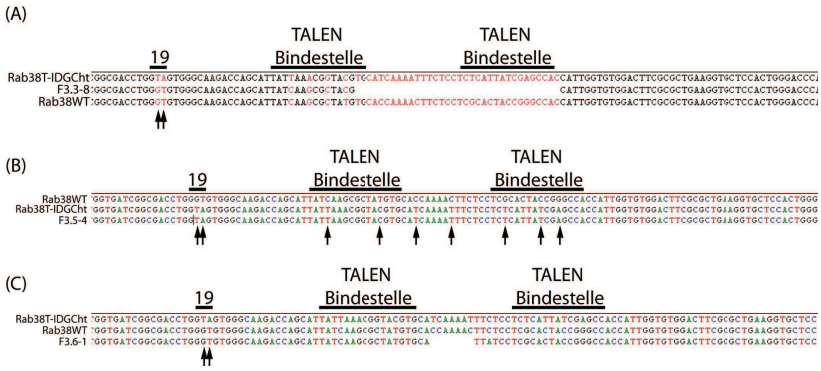


Abb. 2.56: Sequenzanalyse der Kandidatenmäuse für die Integration von Mutationen. **(A)** Analyse der DNA-Sequenz von Maus F3.3-8. Es kam hier nach dem DSB im *Rab38*^{WT}-Allel zu einem NHEJ mit einer Deletion von 34 bp. **(B)** Darstellung der Sequenzvergleiche der Maus F3.5-4 mit der *Rab38*^{WT}Sequenz und dem theoretischen Locus nach einer erfolgreichen HR. Es wurde die komplette Sequenz mit allen stillen Mutationen integriert. **(C)** Die Sequenzanalyse der Maus F3.6-1 zeigte eine Deletion von 7 bp im *Rab38*^{WT}-Allel. Das Codon 19, die Bindestellen der TALEN und die Punktmutationen sind jeweils gekennzeichnet.

Zusätzlich zur PCR-Analyse und der darauf folgenden Sequenzierung wurden die Tiere mit einer zuvor identifizierten Modifikation in einem *Rab38*-Allel in den *Southern Blots* mit dem SexAI- und ApaLI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde untersucht (Abb. 2.57). Dabei zeigte sich im *Southern Blot* mit dem SexAI-Verdau, dass nur die Maus F3.5-4 einen heterozygoten Genotyp (*Rab38*^{WT}/*Rab38*$^{T\text{-}IDGCht}$) aufweist. Die anderen Mäuse waren homozygot für das *Rab38*^{WT}-Codon an Position 19. Anhand des *Southern Blots* nach dem ApaLI-Verdau konnte gezeigt werden, dass bei Maus F3.5-4 kein nicht modifiziertes *Rab38*^{WT}-Allel mit einer Größe von 6,6 kb mehr vorhanden war. Die Modifikation in dem *Rab38*$^{T\text{-}IDGCht}$-Allel konnte durch die Sequenzierung des unverdauten BsaJI-PCR-Fragmentes bestimmt werden. Für die Bestimmung der Sequenz des anderen Allels müssen die F1-Nachkommen dieser Maus genauer analysiert werden, da nur dort die beiden modifizierten Allele getrennt voneinander untersucht werden können. Maus F11.1-3 wies ebenfalls einen für die Modifikation homozygoten Genotyp auf, weswegen sich auch hier die sofortige Sequenzanalyse als schwierig herausstellte und auf die F1-Nachkommen zurückgegriffen werden muss. Die restlichen Mäuse (F3.3-8; F3.6-1) wiesen einen heterozygoten Genotyp in Bezug auf eine Modifikation des *Rab38*-Allels auf und die genauen Details dieser Modifikation wurde bereits durch die Sequenzierung analysiert.

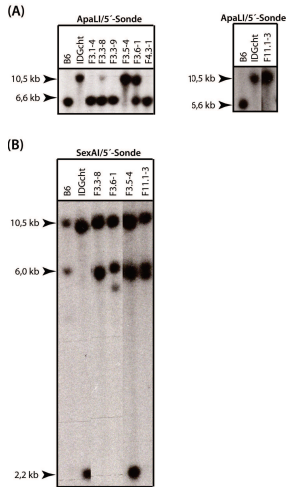


Abb. 2.57: *Southern Blot* Analyse der Nachkommen der Zygoten-Injektionen. **(A)** Abbildung des *Southern Blots* nach dem ApaLI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Das nicht modifizierte *Rab38*^{WT}-Allel weist eine Bande bei 6,6 kb auf. Das Allel mit einer Modifikation im Locus erkennt man anhand einer Bande bei 10,5 kb. **(B)** Darstellung des *Southern Blots* nach dem SexAI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Das *Rab38*^{WT}-Allel zeigt sich anhand einer Bande bei 6,0 kb. Ein *Rab38*$^{T\text{-}IDGCht}$-Allel hat eine Bandengröße nach dem Verdau von 2,2 kb. Die 10,5 kb-Bande ist in allen Genotypen vorhanden. Als Negativkontrolle wurde die DNA einer C57BL/6J-Maus (B6) und als Positivkontrolle die DNA einer homozygoten *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Maus (IDGCht) verwendet.

Somit kam es mit einer Frequenz von 1,1 % im Verhältnis zu den analysierten Nachkommen zu einer HR und mit einer Frequenz von 4,2 % zu einem NHEJ.

Anschließend wurden die Tiere aus der Zygoten-Injektion mit dem Gen-*Targeting*-Oligonukleotid untersucht. In der PCR-Analyse nach dem ApaLI-Verdau konnten sieben Tiere (F2.4-2; F4.2-4; F4.3-1; F6.1-3; F6.1-4; F6.2-5; F8.6-6) identifiziert werden, die anhand einer unverdauten Bande eine Veränderung im *Rab38*-Allel zeigten. Maus F6.1-4 zeigte auf dem Gel sogar gar keine Banden mehr, die einem nicht modifiziertem Allel entsprochen hätten. Sie weist somit einen homozygoten Genotyp für die Veränderung des *Rab38*-Allels auf. Aus diesem Grund konnte auch die Sequenzierung der DNA-Fragmente dieses Tieres keine Ergebnisse liefern. Mit der genauen Analyse der beiden Allele muss dementsprechend auf die Nachkommen gewartet werden. Die unverdauten PCR-Fragmente der restlichen Tiere wurden aus dem Gel extrahiert und sequenziert. Dabei wurde bei einem Tier (F2.4-2) eine HR zwischen dem Gen-*Targeting*-Oligonukleotid und einem *Rab38*^{WT}-Allel nachgewiesen, wobei das ganze Oligonukleotid mit allen sechs Punktmutationen integriert wurde (Abb. 2.58A). Dies entspricht einer Frequenz von 1,7 % im Verhältnis zur Gesamtzahl der analysierten Mäuse für die HR in diesem Versuchsteil. Bei den restlichen fünf Tieren (F4.2-4; F4.3-1; F6.1-3; F6.2-5; F8.6-6) konnte ein erfolgtes NHEJ durch die Sequenzierung nachgewiesen werden, das bei jedem Tier zu einer Deletion von mehreren Basen geführt hat (F4.2-4 > 19 bp; F4.3-1 > 16 bp; F6.1-3 > 18 bp; F6.2-5 > 27 bp; F8.6-6 > 60 bp) (Abb. 2.58B). Somit trat das NHEJ mit einer Frequenz von 5,1 % unter den analysierten Tieren auf.

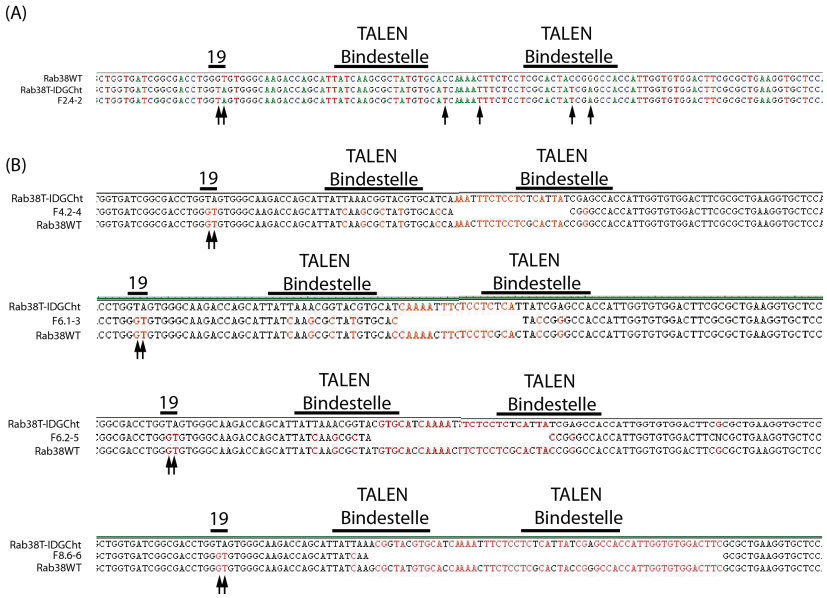


Abb. 2.58: Sequenzvergleich der Nachkommen mit einer Modifikation im *Rab38*-Allel. **(A)** Maus F2.4-2 zeigt eine komplette Integration des Gen-*Targeting*-Oligonukleotids mit allen stillen Punktmutationen und vor allem der IDGCht-Mutation. **(B)** Mäuse mit einem identifizierten NHEJ-Ereignis und einer damit verbundenen Deletion von unterschiedlich vielen Basenpaaren. Das Codon 19, die TALEN-Bindestellen und die Punktmutationen sind gekennzeichnet.

Diese Ergebnisse wurde durch die *Southern Blot* Analyse nach dem SexAI- und ApaLI-Verdau mit anschließender Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde bestätigt (Abb. 2.59). Dabei konnte nach dem SexAI-Verdau gezeigt werden, dass nur in Maus F2.4-2 ein $Rab38^{Cht}$-Allel vorhanden war. Durch die Sequenzierung wurde bestätigt, dass es sich dabei um das $Rab38^{T\text{-}IDGCht}$-Allel handelte. Alle anderen Mäuse zeigten ein Bandenmuster, das einem homozygoten $Rab38^{WT}$-Tier entspricht. Der *Southern Blot* nach dem ApaLI-Verdau zeigte ebenfalls, dass es sich bei Maus F6.1-4 um ein Tier handelte, dass vermutlich eine Modifikation in beiden *Rab38*-Allelen aufwies, da es keine Bande der für ein $Rab38^{WT}$-Allel sprechenden Größe besaß. Daher konnte man auch nach der Sequenzierung der PCR-Fragmente dieses Tieres keine Aussage über das Aussehen der beiden Allele treffen, sondern kann erst die Nachkommen dieser Maus genauer analysieren, da dort die zwei modifizierten Allele getrennt voneinander weitervererbt werden. Bei allen anderen in der PCR-Analyse identifizierten Mäusen konnte ein heterozygoter Genotyp für den modifizierten *Rab38*-Locus nachgewiesen werden.

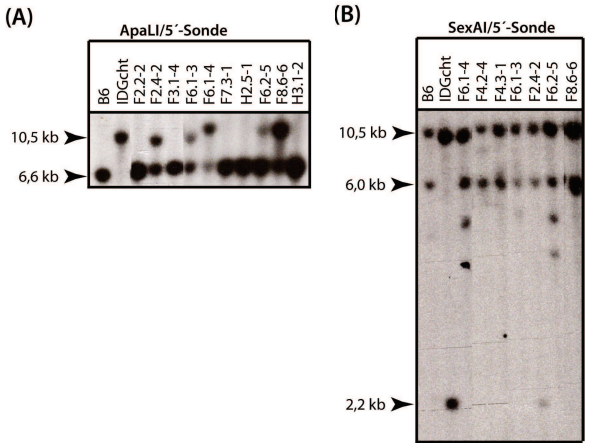


Abb. 2.59: Darstellung der *Southern Blot* Analyse der Tiere aus der Zygoten-Injektion mit dem TALENwt>IDGCht-Oligonukelotid. **(A)** Analyse der DNA nach dem ApaLI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Das nicht modifizierte $Rab38^{WT}$-Allel zeigt sich anhand einer Bande bei 6,6 kb. Die Tiere mit einem modifizierten *Rab38*-Allel weisen eine Bande bei 10,5 kb auf. **(B)** Das Bandenmuster auf dem *Southern Blot* nach dem SexAI-Verdau und der Hybridisierung mit der Rab38 5'-Sonde. Das $Rab38^{WT}$-Allel weist eine Bande bei 6,0 kb und das $Rab38^{T\text{-}IDGCht}$-Allel eine Bande bei 2,2 kb auf. Die Bande bei 10,5 kb ist in beiden Genotypen vorhanden. Als Negativkontrolle wurde die DNA eines C57BL/6J-Tieres (B6) und als Positivkontrolle die DNA eines homozygoten $Rab38^{Z\text{-}IDGCht}$-Tieres (IDGCht) verwendet.

Somit kam es in diesem Teilexperiment unter Verwendung des Gen-*Targeting*vektors bei einem Tier zur HR (1,1 % der analysierten Tiere) und bei vier Tieren (4,2 % der analysierten Tiere) zu einem Nukleotidverlust durch die NHEJ-Reparatur. Nach der Injektion des Gen-*Targeting*-Oligonukleotids konnten zwei Tiere (1,7 % der analysierten Tiere) mit einer HR und sechs Tiere (5,1 % der analysierten Tiere) mit einem NHEJ-Ereignis identifiziert werden (Tab. 2.20).

Tab. 2.20: Zusammenfassung der Resultate der Integration der IDGCht-Punktmutation

	β(DNA) β(RNA)	Gesamtzahl transferierter Zygoten	Gesamtzahl F0	HR	NHEJ
D36R36	15 ng/μl sc. 10 ng/μl	582	95 (16,3 %)	1 (0,2 %)	4 (0,7 %)
D37R37	15 ng/μl 10 ng/μl	515	118 (22,9 %)	2 (0,4 %)	6 (1,2 %)

Die Prozentangaben wurden aus dem Verhältnis der jeweiligen Tabellenwerte zur Gesamtzahl an transferierten Zygoten berechnet.

Alle Tiere mit einer Modifikation im *Rab38*-Locus wurden mit C57BL/6J-Mäusen verpaart und die Nachkommen auf eine stattgefundene Keimbahnübertragung des modifizierten Locus hin untersucht. Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden von Dr. Benedikt Wefers in einem ersten, vorläufigen *Southern Blot* einige Nachkommen aus den Verpaarungen der Gründermäuse mit C57BL/6J analysiert. Maus F2.4-2 zeugte fünf Nachkommen von denen zwei die Modifikation zeigten (40,0 % der analysierten Nachkommen). Maus F3.5-4 zeugte elf Nachkommen, von denen alle die Veränderung im *Rab38*-Locus aufwiesen (100,0 % der analysierten Nachkommen). Maus F3.6-1 zeugte 16 Nachkommen, wobei sich bei elf die Genom-Modifikation darstellen ließ (68,8 % der analysierten Nachkommen). Maus F8.6-6 zeugte fünf Nachkommen, wovon bei drei Nachkommen eine Veränderung im Genom nachgewiesen werden konnte (60,0 % der analysierten Nachkommen). Es konnte somit bei allen Gründermäusen, die bis zum jetzigen Zeitpunkt Nachkommen hatten, eine Keimbahntransmission festgestellt werden.

Somit wurde in diesen ersten beiden Teilexperimenen bereits bewiesen, dass die TALEN sowohl in Kombination mit einem Gen-*Targeting*vektor als auch mit einem Gen-*Targeting*-Oligonukleotid die Frequenz der HR erhöhen. Außerdem konnte in einem ersten Experiment gezeigt werden, dass die im Genom erzeugten Modifikationen an die Nachkommen weitergegeben werden. Trotzdem wurden die Versuche noch vervollständigt, indem versucht wurde, die Cht-Mutation wieder in ein $Rab38^{T\text{-}IDGWT}$-Allel umzuwandeln.

2.3.1.2 Integration der IDGWT-Punktmutation in den *Rab38*-Locus durch die Verwendung von TALEN in Zygoten

Im zweiten Versuchsteil der Experimente mit den *Rab38*-TALEN sollte die IDGWT-Punktmutation in das *Rab38*-Gen integriert werden. Es wurden auch hierfür sowohl ein Gen-*Targeting*-Oligonukleotid (Abb. 6.3.2.2.1) als auch ein Gen-*Targeting*vektor (Abb. 6.3.1.8) für die Zygoten-Injektion verwendet. Beide besaßen in Codon 19 die Aminosäure G des $Rab38^{WT}$-Allels, in Codon 18 wurde jedoch an Position 3 ein A anstelle eines G eingeplant, um das $Rab38^{T\text{-}IDGWT}$-Allel bei der Sequenzierung vom $Rab38^{WT}$-Allel unterscheiden zu können. Die für die erste PCR-Analyse wichtigen Mutationen sind in Abb. 2.60 dargestellt. Alle zusätzlichen stillen Punktmutationen, die eingebracht wurden, sind bei den jeweiligen Sequenzierungen gekennzeichnet.

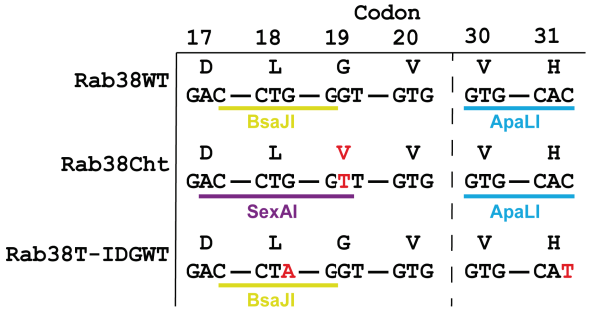


Abb. 2.60: Vergleich der Codon-Sequenzen 17-20 und 30-31 zwischen dem $Rab38^{WT}$-, dem $Rab38^{Cht}$- und dem $Rab38^{T\text{-}IDGWT}$-Allel. Alle in Bezug auf den $Rab38^{WT}$ veränderten Nukleotide und Aminosäuren sind in rot hervorgehoben. Außerdem sind die vorhandenen Restriktionsschnittstellen gekennzeichnet.

Aus den für die Injektionen vorgesehenen Gen-*Targeting*-Konstrukten wurden zusammen mit der *in vitro* transkribierten mRNA der TALEN zwei verschiedene Mischungen hergestellt (Tab. 2.21).

Tab. 2.21: Veranschaulichung der eingesetzten Konzentrationen in den Injektionsaliquots für die Einbringung der $Rab38^{T\text{-}IDGWT}$-Mutationen

Mischung	Vektorname	β(Vektor-DNA)	β(TALEN-mRNA) jeweils
D38R38	pEF-5HA-TALwt-3HA	15 ng/μl sc.	7,5 ng/μl
D39R39	TALENcht>IDGWT	15 ng/μl	7,5 ng/μl

Diese beiden Mischungen wurden in Zygoten injiziert, die aus der Verpaarung von homozygoten $Rab38^{Cht}$-Männchen mit FVB-Weibchen stammen. Die injizierten Zygoten wurden anschließend in pseudo-schwangere CD1-Weibchen transferiert und die DNA der Nachkommen aus einer Schwanzbiopsie isoliert. Der Genotyp aller Nachkommen wurde mittels PCR- und *Southern Blot* Analyse bestimmt und durch die Sequenzierung bestätigt. Die Genotypisierungs-PCR wurde hier ebenfalls nach dem schon etablierten Protokoll (Tab. 5.1) mit den *forward* und *reverse* Primern für den *Rab38*-Locus durchgeführt und die entstandenen DNA-Fragmente anschließend mit den Enzymen ApaLI oder BsaJI verdaut. Die durch die Modifikationen erzeugten Allele am *Rab38*-Locus - $Rab38^{NHEJ}$, $Rab38^{T\text{-}IDGWT}$ – und die ursprünglichen Allele $Rab38^{WT}$, $Rab38^{Cht}$ – können anhand eines spezifischen Bandenmusters identifiziert werden (Abb. 2.61).

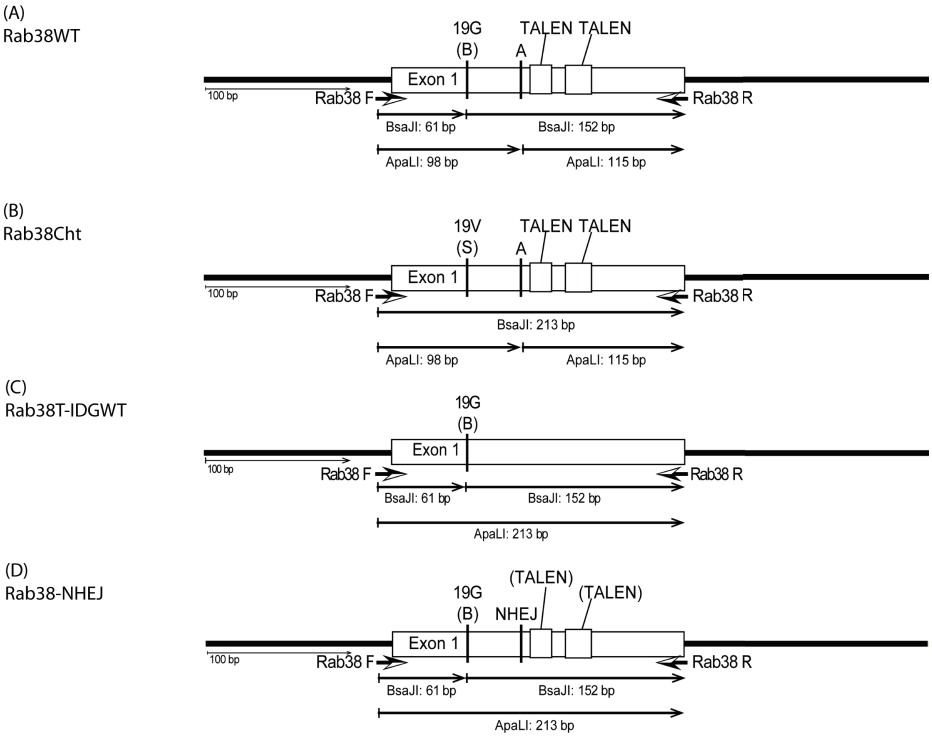


Abb. 2.61: Darstellung der *Rab38*-Loci für die Analyse der PCR-Fragmente. **(A)** $Rab38^{WT}$-Locus mit den TALEN-Bindestellen im ersten Exon und der Aminosäure G in Codon 19. **(B)** $Rab38^{Cht}$-Locus ebenfalls mit den TALEN-Bindestellen im ersten Exon, aber der Aminosäure V in Codon 19. **(C)** $Rab38^{T\text{-}IDGWT}$-Locus nach der erfolgreichen Integration des Gen-*Targeting*-Konstruktes. Die TALEN können nicht mehr an den Locus binden und die ApaLI-Erkennungssequenz wurde mutiert. **(D)** $Rab38^{NHEJ}$-Locus. Abhängig vom Ausmaß, das die Deletionen nach dem NHEJ-Ereignis annehmen, kann die Veränderung in der PCR und genauer noch bei der anschließenden Sequenzierung nachgewiesen werden. Die Restriktionsschnittstellen von ApaLI (A), BsaJI (B) und SexAI (S), die Bindestellen der Primer Rab38_F und Rab38_R und die Größen der PCR-Fragmente nach dem jeweiligen Verdau sind gekennzeichnet.

Die genomische DNA der in der PCR-Analyse identifizierten Tiere wurde sowohl mit SexAI als auch mit ApaLI (Tab. 5.2) für den *Southern Blot* verdaut und die Nylonmembranen wieder mit der radioaktiv markierten *Rab38* 5'-Sonde hybridisiert. Die Röntgenfilme wurden für drei Tage exponiert und die Genotypen – $Rab38^{NHEJ}$, $Rab38^{T\text{-}IDGWT}$, $Rab38^{WT}$, $Rab38^{Cht}$ – anhand eines spezifischen Bandenmusters identifziert (Abb. 2.62).

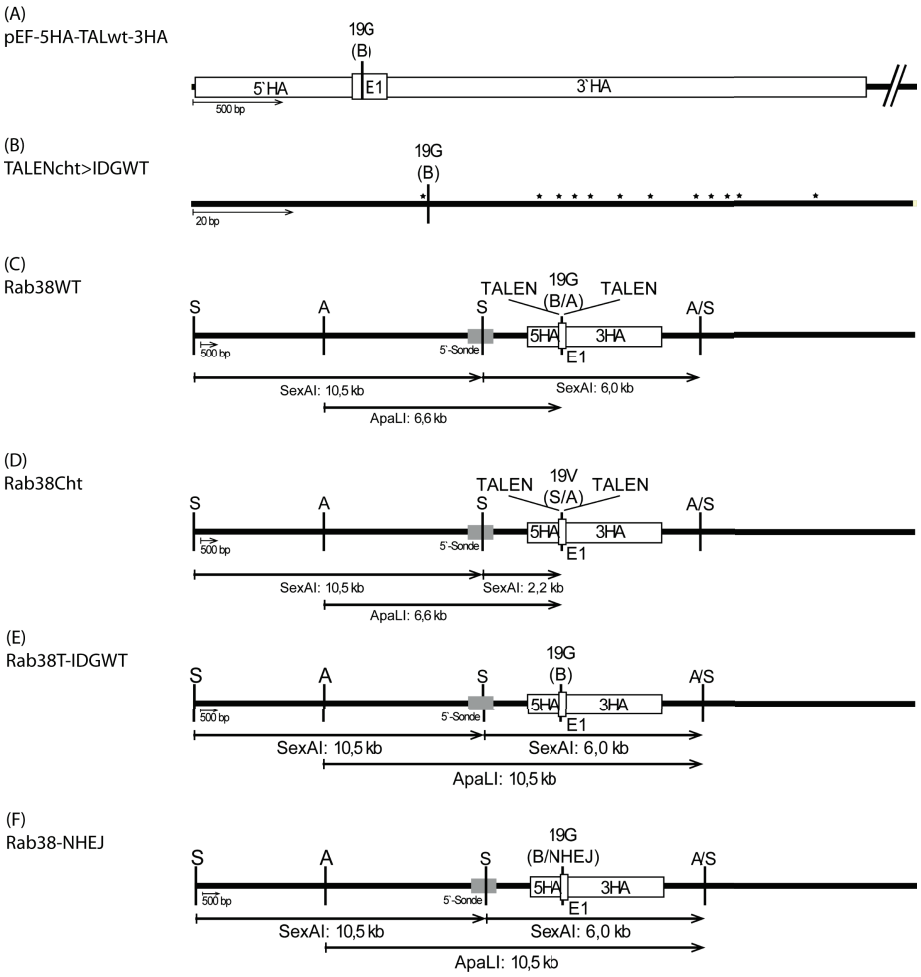


Abb. 2.62: Darstellung der Gen-*Targeting*-Konstrukte und der *Rab38*-Loci für die Auswertung der *Southern Blot* Analyse. **(A)** Gen-*Targeting*vektor pEF-5HA-TALwt-3HA mit den *Rab38* 5'- und 3'-Homologiearmen (HA), zwischen denen sich die Sequenz des ersten Exons (E1) befindet. **(B)** Gen-*Targeting*-Oligonukleotid TALENcht>IDGWT mit einer Gesamtlänge von 144 bp und insgesamt elf stillen Mutationen (*) zusätzlich zur IDGWT-Mutation. **(C,D)** $Rab38^{WT}$- bzw. $Rab38^{Cht}$-Locus mit den HA zwischen denen sich die TALEN-Bindestellen befinden. **(E)** $Rab38^{T\text{-}IDGWT}$-Locus nach einer erfolgreichen Integration aller Mutationen. Die TALEN können an diesen Locus nicht mehr binden und damit nicht erneut schneiden. **(F)** $Rab38^{NHEJ}$-Locus nach der Deletion mehrerer Basen. Die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme ApaLI (A), BsaJI (B) und SexAI (S), die Position der Bindung der *Rab38* 5'-Sonde sowie die Größe der jeweiligen Fragmente auf dem *Southern Blot* sind dargestellt.

Die Ergebnisse dieser Injektionen werden ebenfalls nach Mischungen getrennt betrachtet. Begonnen wird dabei mit den Nachkommen der Mischung D38R38, die den Gen-*Targeting*vektor enthielt. Die Tiere wurden zuerst in der PCR untersucht. Dabei konnten durch den ApaLI-Verdau zwei Mäuse (H5.3-3; H7.3-2) identifiziert werden, die eine Veränderung in einem Allel des *Rab38*-Locus aufwiesen. Diese wurden durch den *Southern Blot* mit dem ApaLI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde bestätigt (Abb. 2.63B). Dabei hat sich bei Maus H5.3-3 herausgestellt, dass beide *Rab38*-Allele von der Modifikation betroffen sind und somit die Sequenzierung dieser DNA keinen genauen Aufschluss über die Art der Modifikation geben kann. Ein eindeutiges Ergebnis über die genauen Veränderungen kann somit erst die Analyse der Nachkommen bringen. Der heterozygote Genotyp der Maus wurde durch den *Southern Blot* mit dem SexAI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde bestätigt (Abb. 2.63A). Bei Maus H7.3-2 konnten drei Banden im *Southern Blot* nach dem ApaLI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde identifiziert werden (Abb. 2.63B). Darunter befand sich ein nicht modifiziertes Allel und zwei Banden, die modifizierten Allelen zuzuordnen sind. Es handelt sich somit bei diesem Tier auf alle Fälle um eine Mosaik-Maus, deren genaue Allelsequenzen erst bei den Nachkommen bestimmt werden können. Im *Southern Blot* nach dem SexAI-Verdau wurde festgestellt, dass kein $Rab38^{Cht}$-Allel mehr bei diesem Tier vorhanden war. Es handelt sich somit entweder um $Rab38^{WT}$- oder $Rab38^{T\text{-}IDGWT}$-Allele. Dies kann jedoch, wie oben erläutert, erst bei den Nachkommen genauer untersucht werden. Es muss aber auf jeden Fall mindestens zu einem HR-Ereignis gekommen sein, da kein $Rab38^{Cht}$-Allel mehr vorhanden ist.

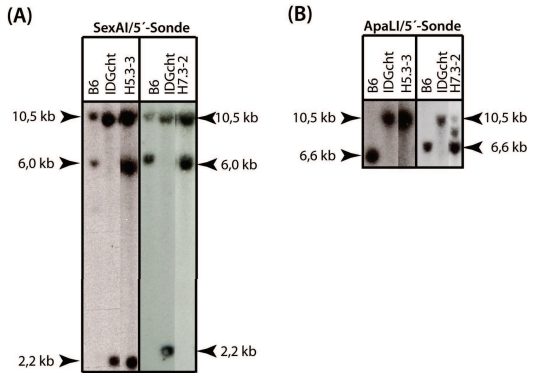


Abb. 2.63: Überblick über die Resultate von den Mäusen H5.3-3 und H7.3-2. **(A)** *Southern Blot*-Analyse nach dem SexAI-Verdau und der Hybridisierung mit der Rab38 5'-Sonde. Das $Rab38^{WT}$-Allel erkennt man anhand einer Bande bei 6,0 kb, das $Rab38^{Cht}$-Allel weist eine Bande bei 2,2 kb auf. **(B)** *Southern Blot* nach dem Verdau mit ApaLI und der Hybridisierung mit der Rab38 5'-Sonde. Ein nicht modifiziertes *Rab38*-Allel wird durch eine Bande bei 6,6 kb dargestellt. Ein *Rab38*-Allel mit einer Mutation zeigt sich anhand einer Bande bei 10,5 kb.

Somit kam es bei diesem Teilexperiment bei 50 analysierten Tieren mit einer Frequenz von 2,0 % zu einem HR-Ereignis und mit einer Frequenz von 4,0 % zu NHEJ-Ereignissen. Die Tiere mit einem modifizierten *Rab38*-Locus werden mit C57BL/6J-Mäusen verpaart und die F1-Nachkommen später auf ein mögliche Keimbahntransmission dieser Veränderung hin untersucht. Diese Analyse konnte jedoch nicht mehr innerhalb der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden.

Im zweiten Teil der Versuchsreihe wurden die Nachkommen der Zygoten-Injektion mit der Mischung D39R39, die das Oligonukleotid als Gen-*Targeting*-Konstrukt enthielt, untersucht. Dies geschah ebenfalls wieder mit Hilfe der PCR-Analyse. Dabei wurden drei Tiere identifiziert, bei denen es zu einer HR kam (Abb. 2.64A). Maus H4.3-5 wies den Resultaten der Sequenzierung der unverdauten Banden zufolge eine Integration eines großen Teil des Gen-*Targeting*-Oligonukleotids in das *Rab38*^{Cht}-Allel auf. Dabei wurden alle stillen Mutationen rechts von Codon 19 integriert, aber nicht die IDGWT-Mutation. Bei den Mäusen H4.3-7 und H4.4-5 konnte die Integration aller stiller Mutationen der rechten Hälfte des Oligonukleotids beobachtet werden, wobei die HR bei Maus H4.4-5 mit dem *Rab38*^{WT}-Allel und bei Maus H4.3-7 mit dem *Rab38*^{Cht}-Allel stattfand. Außerdem wurden nach dem ApaLI-Verdau vier Tiere identifiziert, bei denen es zum NHEJ kam (Abb. 2.64 B). Die Sequenzierung ergab jeweils eine Deletion von mehreren Basenpaaren (H2.5-2 > 4bp im *Rab38*^{Cht}-Allel; H4.2-1 > 9bp im *Rab38*^{Cht}-Allel; H4.3-2 > 23 bp im *Rab38*^{Cht}-Allel).

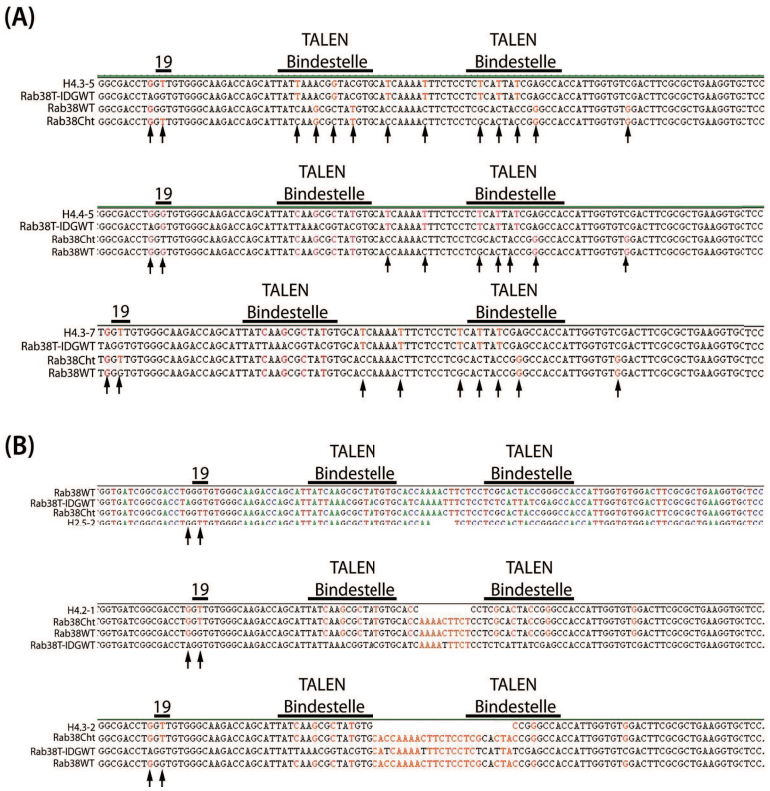


Abb. 2.64: Sequenzanalyse der unverdauten PCR-Fragmente mehrerer Kandidatenmäuse. **(A)** Mäuse H4.3-5, H4.4-5 und H4.3-7 wiesen eine homologe Integration eines Teils des Oligonukleotids auf. **(B)** Bei den Mäusen H2.5-2, H4.2-1 und H4.3-2 kam es zum NHEJ-Ereignis mit anschließendem Verlust von mehreren Basen an der Stelle des DSB. Codon 19, die TALEN-Bindestellen und die genauen Orte der Punktmutationen sind gekennzeichnet.

Diese Ergebnisse und die entsprechenden Genotypen der Mäuse konnten ebenfalls durch die *Southern Blot* Analyse bestätigt werden (Abb. 2.65). Maus H4.3-5 zeigte im ApaLI-Verdau einen heterozygoten Genotyp für eine Veränderung im *Rab38*-Allel und einen heterozygoten $Rab38^{WT}/Rab38^{Cht}$-Genotyp im SexAI-Verdau. Bei Maus H4.4-5 zeigte sich das gleiche Bild, ebenso wie bei Maus H4.3-7. Bei Maus H4.3-7 muss jedoch zusätzlich zu der HR im $Rab38^{Cht}$-Allel noch eine Veränderung im $Rab38^{WT}$-Allel aufgetreten sein, da diese Bande im *Southern Blot* nach dem SexAI-Verdau eine andere Größe als erwartet zeigte. Für eine genauere Analyse der entdeckten Veränderung müssen die F1-Nachkommen dieses Tieres untersucht werden. Der heterozygote Genotyp von Maus H4.3-2 konnte im *Southern Blot* nach dem SexAI-Verdau bestätigt werden. Außerdem wurde im *Southern Blot* nach dem ApaLI-Verdau herausgefunden, dass Maus H8.3-5 zwei modifizierte *Rab38*-Allele aufweist. Ein nicht modifiziertes Allel ist nicht mehr vorhanden. Im *Southern Blot* nach dem SexAI-Vedau wurde in Maus H8.3-5 ein heterozygoter $Rab38^{WT/Cht}$-Genotyp identifiziert. Somit kam es wahrscheinlich nur zu jeweils einem NHEJ-Ereignis in beiden Allelen. Die genaue Modifikation kann jedoch erst bei der Analyse der Nachkommen untersucht werden, da in dieser Maus mit zwei modifizierten Allelen die Sequenzierung kein eindeutiges Ergebnis zeigen würde.

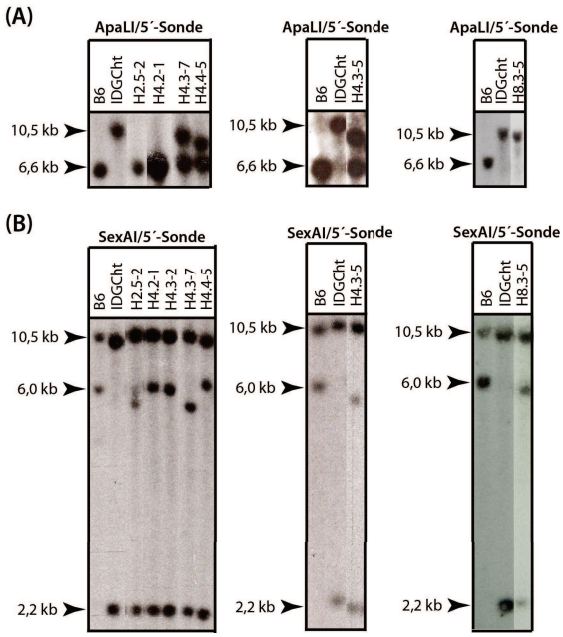


Abb. 2.65: Darstellung der *Southern Blot* Analyse. **(A)** Abbildung der *Southern Blots* nach dem ApaLI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Ein modifiziertes *Rab38*-Allel weist eine Bande bei 10,5 kb auf, und ein nicht modifiziertes Allel erkennt man anhand einer Bande bei 6,6 kb. **(B)** Analyse der *Southern Blots* nach dem SexAI-Verdau und der Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde. Das $Rab38^{Cht}$-Allel erkennt man anhand einer Bande bei 2,2 kb. Sowohl das $Rab38^{WT}$- als auch das $Rab38^{T\text{-}IDGWT}$-Allel weisen eine Bande bei 6,0 kb auf. Die 10,5 kb-Bande ist bei allen Genotypen vorhanden. Als homozygote $Rab38^{WT}$-Kontrolle wurde die DNA eines C57BL/6J-Tieres (B6) verwendet und als homozygote Kontrolle für die Modifikation des Locus die DNA eines $Rab38^{Z\text{-}IDGCht}$-Tieres (IDGCht).

Somit resultierte die Pronukleus-Injektion dieser Mischung in drei Tieren (6,7 % der analysierten Tiere) mit einer HR und in vier Tieren (8,9 % der analysierten Nachkommen) mit einem NHEJ (Tab. 2.22).

Tab. 2.22: Überblick über die Resultate der Pronukleus-Injektion in Zygoten mit einem Gen-*Targeting*-Konstrukt des *Rab38*$^{T\text{-}IDGWT}$-Genotyps

Mischung	β(DNA) β(RNA)	Gesamtzahl transferierter Zygoten	Gesamtzahl F0	HR	NHEJ
D38R38	15 ng/μl sc. 10 ng/μl	313	50 (16,0 %)	1 (0,3 %)	2 (0,6 %)
D39R39	15 ng/μl 10 ng/μl	255	45 (17,6 %)	3 (1,2 %)	4 (1,6 %)

Alle Prozentangaben wurden aus dem Verhältnis der jeweiligen Tabellenwerte zu der Gesamtzahl der transferierten Zygoten berechnet.

Die Tiere mit einem modifizierten *Rab38*-Locus werden ebenfalls mit C57BL/6J des entsprechenden Geschlechts verpaart. Es konnten die Nachkommen der positiven Tieren aus den TALEN-Injektionen im Zeitraum dieser Arbeit nicht mehr analysiert werden. Da jedoch die durch die Injektion von TALEN zusammen mit einem IDGCht-Konstrukt resultierenden Modifikationen an die Nachkommen weitergegeben wurden, wird ebenfalls ein positives Resultat angenommen.

Zusammengenommen konnte in allen Experimenten zusammen anhand des *Rab38*-Locus gezeigt werden, dass die TALEN gleichwertig zu den ZFN in Zygoten zur Erzeugung gezielter Gen-Modifikationen geeignet sind.

3 Diskussion

Die Erzeugung genetisch veränderter Tiere ist seit ihrer Entdeckung in den 80er Jahren ein weit verbreitetes Werkzeug zur Untersuchung der Genfunktionen und zur Analyse von Krankheitsursachen. Anfangs war nur die Erzeugung transgener Tiere möglich, bei denen die Mutationen durch ionisierende Strahlung oder chemische Wirkstoffe (z.B. ENU) hervorgerufen wurden. Eine weitere Methode, um z.B. eine längere exogene DNA-Sequenz in das Genom einzubringen, war lange Zeit der Virus-vermittelte Gentransfer mit Hilfe von Retroviren. Die Länge der exogenen DNA-Sequenz ist jedoch auch hier begrenzt.

Mit der Etablierung der Isolation und Kultivierung von ES-Zellen und der Entdeckung der HR in Säugerzellen durch Capecchi, Smithies und Evans in den 80er Jahren begann die Ära der gezielten genomischen Manipulation in ES-Zellen und der Herstellung von genetisch modifizierten Mäusen mit Hilfe dieser Methode. Da die Frequenz der HR in ES-Zellen ohne Selektion jedoch sehr gering ist (10^{-5}-10^{-7}), sucht man seither nach Möglichkeiten diese zu erhöhen und damit auch die genetische Modifikation von anderen Organismen, bei denen die Kultivierung von ES-Zellen nicht etabliert ist, zu ermöglichen.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden untersucht, die zu einer Erhöhung der Frequenz der HR führen und direkt in Zygoten der Maus angewendet werden können.

3.1 Integration exogener DNA-Sequenzen durch die *phiC31* Integrase-vermittelte Rekombination

Der RMCE wird seit einiger Zeit in ES-Zellen angewandt, um die Frequenz der gezielten Integration exogener DNA zu erhöhen. Dazu wird die Integrase des Phagen *phiC31* zu Hilfe genommen, die die Rekombination zwischen zwei spezifischen Sequenzen (*attB* und *attP*) fördert. Die eine der beiden Sequenzen (*attP*) wurde dazu mit Hilfe der ursprünglichen Methode der HR in den murinen *Rosa26*-Locus auf Chromosom 6 von ES-Zellen eingebracht (Hitz *et al.*, 2007). Durch die Anwendung des RMCE in ES-Zellen konnte die Frequenz der HR nach einer Selektion von ursprünglich 1 % auf 40 bis 60 % gesteigert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, ob man die Technik auch direkt in Zygoten von Mäusen und damit theoretisch in Zygoten von jedem Organismus anwenden kann. Es konnte dabei jedoch unter 160 Mäusen, die aus 705 transferierten Zygoten stammen, kein Tier gefunden werden, dass einen modifizierten *Rosa26*-Locus aufwies. Die Frequenz liegt somit weit unter 1 % und die Technik ist damit auch nicht auf andere Organismen übertragbar, bei denen weniger Zygoten zur Verfügung stehen als bei Mäusen.

Während der Durchführung dieser Experimente wurde von Tasic *et al.* (2011) ein Artikel zum selben Thema veröffentlicht. Dort wurde beschrieben, dass die Integration exogener DNA angeblich mit einer sehr hohen Effizienz von 40 % auch in Zygoten möglich sei. Es wurden dabei zwei Loci, der bisher unbekannte *Hipp11*-Locus auf Chromosom 11 und der *Rosa26*-Locus, verwendet, wobei die Ergebnisse bei lebenden Tieren nur durch Experimente am *Hipp11*-Locus gezeigt wurden. Bei diesen wurde die HR mit Frequenzen von 4,7 %, 10,3 % und 40,0 % in Bezug auf die untersuchten Mäuse gefunden. Jedoch wurden ebenfalls in hohen Frequenzen

(4,7 %, 2,7 % und 20,0 %) Tiere mit einer Zufallsintegration identifiziert. Für den *Rosa26*-Locus sind die Ergebnisse nur für E10- bzw. E11-Embryonen dargestellt. Die Frequenz hierbei betrug 9 % für die HR und ebenfalls 9 % für die Zufallsintegration.

Als die selben DNA- (3 ng/μl) und mRNA- (48 ng/μl) Massekonzentrationen hier verwendet wurden, ging die Prozentzahl der überlebenden Zygoten und damit der analysierbaren Tiere zurück. Dies könnte an einer möglicherweise toxischen Wirkung der mRNA-Mengen liegen, weshalb Tasic *et al.* (2011) vielleicht auch nur die Ergebnisse der Embryonen am *Rosa26*-Locus zeigen konnten. Außerdem spricht die Frequenz der Zufallsintegrationen nicht gerade für die Verwendung der Methode. Zusätzlich konnte schon in einem Experiment von 2003 unter Verwendung einer ähnlichen Methode gezeigt werden, dass die Frequenz der HR bei der Analyse von Embryonen am Tag E14 nur 2,6 % betrug (Hollis *et al.*, 2003) und nicht 40,0 %. Außerdem wurden auch hier keine Ergebnisse zu positiven, adulten Mäuse veröffentlicht.

Der RMCE eignet sich somit anhand der Daten der vorliegenden Arbeit nicht zur Anwendung in Zygoten, die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Tasic *et al.* (2011) konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden

3.2 ZFN-vermittelte Genom-Modifikation

Eine weitere Methode zur Erhöhung der Frequenz der HR ist die Verwendung von ZFN, mit deren Hilfe ein DSB erzeugt wird, um dadurch die endogenen Reparaturmechanismen einer Zelle zu aktivieren. Dazu wurden die ZFN zusammen mit der exogenen DNA-Sequenz in verschiedene Zelltypen eingebracht. Begonnen wurde dabei mit einem Zellkultur-Experiment mit ES-Zellen, bei dem elf der 34 analysierten Klone die gezielte Integration des Gen-*Targeting*vektors zeigten (Meyer *et al.*, 2010). Anschließend wurde die Frequenz der ZFN-vermittelten HR und des NHEJ in Embryonen und lebenden Mäusen analysiert.

Bei den Embryonen trat die HR am *Rosa26*-Locus mit einer Frequenz von bis zu 4,8 % in Bezug auf die analysierten Tiere auf, das NHEJ am *Rosa26*-Locus wurde mit einer Frequenz von 25,0 % erzielt.

Bei den adulten Tieren wurden zwei verschiedene Loci und zwei verschiedene Gen-*Targeting*-Konstrukte analysiert (Meyer *et al.*, 2012). Die genauen Frequenzen sind in nachfolgender Tabelle (Tab. 3.1) aufgeschlüsselt.

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Frequenzen der HR in adulten Mäuse nach der ZFN-Injektion

Locus	*Targeting*-Konstrukt	NHEJ	HR
Rosa26	Gen-*Targeting*vektor	12,9 %	5,0 %
Rab38	Gen-*Targeting*vektor	4,2 %	3,4 %
Rab38	Gen-*Targeting*oligonukleotid	5,1 %	2,5 %

Es sind bei diesen Experimenten unter anderem Tiere entstanden, die nur einen Teil des *Targeting*-Konstruktes integriert hatten. Dies könnte daraus resultieren, dass die Integrationskonstrukte zu Beginn der Experimente noch die Sequenz der ZFN-Bindestellen enthielten. Durch das Vorhandensein der Bindestellen können die ZFN nach einer erfolgreichen Integration möglicherweise erneut schneiden und das Resultat somit nochmals verändern. Einige der *Founder*-Tiere tragen außerdem mehr als ein modifiziertes Allel, was darauf schließen lässt, dass die Nukleasen nicht nur kurz nach der Injektion im Einzell-Stadium, sondern auch nach der ersten DNA-Replikation noch aktiv sind. Der Grad der Mosaikbildung korreliert dabei vermutlich mit der Dauer der Aktivität. Die Möglichkeit, gleichzeitig ein Spektrum an Mutationen in Mosaiktieren zu erzeugen, kann für verschiedene genetische Ziele zusätzlich zur spezifischen Modifikation von Vorteil sein.

Zwei Studien beschrieben genomweite Ansätze zur Beurteilung der Aktivität der ZFN in humanen Zellen und haben dabei festgestellt, dass die ZFN *Off-Target*-Schnitte an mehreren Loci erzeugen, die einen gewissen Grad an Homologie zur Zielsequenz aufweisen (Gabriel *et al.*, 2011; Pattanayak *et al.*, 2011). Bei einigen ZFN treten diese *Off-Target*-Schnitte trotz acht Fehlpaarungen bei der Bindung auf. Die Konsequenzen können dabei, je nach Zelltyp, verschieden sein. Viele verschiedene transfizierte Zelllinien zeigten z.B. einen Abbruch des Zellzyklus und gehen in die Apoptose über (Mussolino und Cathomen, 2012). Durch das Auftreten der Apoptose während der Entwicklung von Organismen würde wahrscheinlich ein großer Teil des Embryos Fehlentwicklungen zeigen oder sich überhaupt nicht entwickeln. Es konnten an den Tieren aus den Experimenten keine Fehlentwicklungen nachgewiesen werden. Die adulten Tiere waren lebensfähig, normal entwickelt und zeugungsfähig. Die Embryonen sahen ebenso normal entwickelt aus. Zusätzlich konnten wir auch keine Zufallsintegrationen des Gen-*Targeting*konstruktes anhand von *Southern Blots* nachweisen. Hauschild *et al.* (2011) untersuchten ebenfalls die *Off-Target*-Effekte der ZFN und konnten keine Veränderungen in zehn verschiedenen, zur der ZFN-Bindestelle homologen Loci feststellen.

Gen-*Targeting*vektoren wurden seit der Entdeckung der homologen Rekombination immer linearisiert und besaßen zwei lange Regionen an chromosomaler Sequenz, die für die Homologieabhängige DNA-Reparatur benötigt wurden. Es konnte, ebenfalls wie bei Whyte *et al.* (2011) gezeigt werden, dass die Verwendung der zirkulären Form der Gen-*Targeting*vektoren in Zygoten eine höhere Frequenz bei der HR erzielt als die Verwendung linearisierter Vektoren. Zusätzlich zu langen Gen-*Targeting*vektoren wurden außerdem in einigen Experimenten 144 Nukleotide umfassende, einzelsträngige Oligonukleotide zur Einbringung von Punktmutationen verwendet. Einzelsträngige Oligonukleotide bieten den Vorteil, dass sie in nur wenigen Tagen konstruiert und durch Firmen wie *MWG* oder *Metabion* synthetisiert werden können. Bei den Experimenten mit den Oligonukleotiden als Gen-*Targeting*-Konstrukt kam es sowohl zur HR als auch zum NHEJ. Radecke *et al.* (2010) konnten zeigen, dass ein 40 bp langer Homologiearm auf jeder Seite der einzubringenden Punktmutation ausreicht, um die HR zu ermöglichen. Chen *et al.* (2011a) setzten ebenfalls einzelsträngige DNA ein und kamen dabei zu drei eindeutigen Resultaten: (1) Gezielte Punktmutationen waren möglich, (2) gezielte genomische Deletionen von bis zu 100 kb konnten erreicht werden und (3) gezielte Insertionen von kleinen genetischen Elementen, begleitet von großen, genomischen Deletionen wurden identifiziert. Die Effizienz der Modifikationen reichte von 7 bis 57 % und war Zelltyp-abhängig.

Somit kann für die Anwendung der ZFN in Zygoten gesagt werden, dass bei der HR die höchste Frequenz von 5,0 % im Falle des Gen-*Targeting*vektors durch die Injektion von 30 ng/µl zirkulärer DNA und jeweils 15 ng/µl mRNA der ZFN erreicht wurde. Bei der Untersuchung des NHEJ wurde die höchste Frequenz von 12,9 % durch den Einsatz von jeweils 7,5 ng/µl mRNA erreicht. Im Falle des einzelsträngigen Oligonukleotids konnte eine Frequenz von 2,5 % für die HR durch eine verwendete DNA-Massekonzentration von 15 ng/µl und eine mRNA-Massekonzentration von jeweils 7,5 ng/µl erreicht werden. Die mRNA-Massekonzentration bei der die höchste Frequenz für das NHEJ erzielt wurde (2,5 %) betrug ebenfalls 7,5 ng/µl.

Doyon *et al.* (2010) konnten zeigen, dass eine transiente Hypothermie auf 30 °C die Häufigkeit der stabilen ZFN-induzierten Gendeletion in K562 und Hela-Zellen erhöht. Die Überlebensfähigkeit der so behandelten Zellen wurde dabei nicht beeinflusst. Dieser mögliche Ansatzpunkt der Steigerung der Aktivität der Nukleasen sollte in zukünftigen Experimenten genauer untersucht werden. Drei Studien haben bereits gezeigt, dass sie unter der Verwendung von zwei ZFN-Paaren (Lee *et al.*, 2010, 2012) oder der Verwendung von ZFN zusammen mit einem einzelsträngigen Oligonukleotid (Chen *et al.*, 2011b) sogar fähig sind, gezielte chromosomale Deletionen in humanen Zelllinien zu erzeugen.
Zusätzlich zu unseren Experimenten wurden seit Beginn dieser Arbeit mehrere Artikel zum Einsatz von ZFN in verschiedenen Organismen publiziert. Eine Auswahl befindet sich in Tab. 3.2.

Tab. 3.2: Eine Auswahl von publizierten Artikel zum Thema Gen-*Targeting* mit Hilfe von ZFN

Autor	Organismus	Gen	Beobachtungen
Doyon *et al.* (2008)	Zebrafisch	golden; notail	NHEJ (30 %)
Santiago *et al.* (2008)	CHO-Zellen	DHFR	bialleles NHEJ (1 %); ohne Selektion
Townsend *et al.* (2009)	Tabak	SuRA; SuRB	HR (2 %)
Shukla *et al.* (2009)	Mais		HR; Keimbahntransmission
Watanabe *et al.* (2010)	Schweinezellen	GFP	NHEJ (20,5 %)
Carbery *et al.* (2010)	Maus	Mdra1, Jag1, Notch3	NHEJ (20 bis 75 %)
Ochiai *et al.* (2010)	Seeigel		NHEJ
Lee *et al.* (2010)	HEK-293-Zellen	CCR5; CCR2	große Deletionen (23 %)
Mashimo *et al.* (2010)	Ratte	Interleukin 2 Rezeptor γ	NHEJ (20 %); Mosaiktiere; Keimbahntransmission
Young *et al.* (2011)	tropischer Krallenfrosch	GFP; noggin	NHEJ (47 %); Mosaiktiere; Keimbahntransmission
Flisikowska *et al.* (2011)	Kaninchen	IgM	NHEJ (30 %); HR (18 %)
Osiak *et al.* (2011)	murine ES-Zellen	GFP	NHEJ (8 %); ohne Selektion
Hauschild *et al.* (2011)	Schweine-fibroblasten	GGTA1	bialleler *Knockout* (1 %); ohne Selektion
Chu *et al.* (2012)	Ratte		NHEJ; zwei Mosaiktiere

Die hier vorgestellte Methode des Gen-*Targeting* mit Hilfe von ZFN hat gegenüber den ursprünglich verwendeten Ansätzen zur Erzeugung von genetisch modifizierten Mäusen mehrere Vorteile. Erstens ist das Expressionsmuster des spezifisch eingebrachten Gens, im Gegensatz zu Methoden, die auf Zufallsintegrationen basieren, vorhersagbar, reproduzierbar und über mehrere Generationen stabil. Zweitens erfordert die Methode der Manipulation in Zygoten keine zeitaufwändige ES-Zellmanipulation und Chimären-Verpaarung, sobald die modifizierten *Founder*-Mäuse nach der Pronukleus-Injektion identifiziert wurden. Durch das Umgehen der ES-Zellkultur ermöglichen die ZFN damit die Herstellung von heterozygoten Mäusen mit spezifischen Modifikationen

in wenigen Monaten. Dies ist außerdem ohne die Verwendung eines Selektionsmechanismus möglich, da die hohe Frequenz des Gen-*Targeting* die Identifikation von *Founder*-Tieren durch die Analyse einer relativ kleinen Zahl an Nachkommen ermöglicht. Zusätzlich sollte die Technik auf alle Organismen, in denen Zygoten *in vitro* manipuliert werden können, anwendbar sein und wäre somit nicht nur auf die wenigen Arten begrenzt, bei denen ES-Zellen *in vitro* kultiviert werden können.

3.3 TALEN-vermittelte Manipulation des Genoms

Da die Anfertigung von funktionierenden ZFN zeitaufwändig und kostspielig ist, sollte in dieser Arbeit noch die Funktionsfähigkeit von TALEN in Zygoten untersucht werden. Da ein TAL-Finger nur aus 33-35 Aminosäuren besteht und viele Protokolle zur Konstruktion von TALEN im Gesamten verfügbar sind, ist das Design von Nutzer-spezifischen Nukleasen mit einer bestimmten Anordnung der TAL-Finger im Gegensatz zu den ZFN leicht durchzuführen. Viele verschiedene Methoden zur Konstruktion von TALEN wurden bereits beschrieben (Cermak *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2010; Mussolino *et al.*, 2011), worunter sich auch verschiedene amino- und carboxy-terminale Verkürzungen der Sequenz und diverse Längen der TAL-*FokI*-Verbindung befinden. Es gibt bereits verschiedene etablierte *Kits* bei *Addgene* zu kaufen. Somit ist deren Herstellung in jedem molekular-biologisch ausgestattetem Labor mit überschaubaren Kosten in kürzester Zeit möglich. Die TALEN wurden bereits im Laufe dieser Arbeit in mehreren Organismen mit verschiedenen Fragestellungen erfolgreich angewandt.

Tab. 3.3: Auswahl einiger publizierten Artikel zum Thema TALEN

Autor	Organismus	Gen	Beobachtungen
Tesson *et al.* (2011)	Ratte	IgM	NHEJ (21 %); Mosaiktiere
Huang *et al.* (2011)	Zebrafisch	IgM	NHEJ
Sun *et al.* (2012)	humane Zellen	β-Globin	HR
Ma *et al.* (2012)	Seidenraupe	BmBlos2	NHEJ (22 % bzw. 46 %)
Bedell *et al.* (2012)	Zebrafisch	ponzr1, crhr1, msna, ppp1cab, cdh5	HR; NHEJ (71 %)
Lei *et al.* (2012)	tropischer Krallenfrosch	noggin, ptf1a/p48, ets1, hhex, vpp1, foxd3, sox9, grp78/bip	NHEJ (95,7 %); Keimbahntransmission
Carlson *et al.* (2012)	Rind, Schwein	LDLR, ACAN11, ACAN12, RELA, DMDE6, DMDE7.1	NHEJ (75 %)
Dahlem *et al.* (2012)	Zebrafisch	golden, ryr3, thx6, ryr1a	NHEJ; Keimbahntransmission

Wir haben die TALEN in dieser Arbeit erfolgreich gegen den *Rab38*-Locus der Maus getestet (Tab. 3.4) (Wefers *et al.*, 2013). Abschließend kamen für die Anwendung von TALEN in Zygoten folgende Massekonzentrationen für die höchsten Frequenzen zustande. Die höchste Frequenz von 2,0 % für die HR erreicht man bei der Verwendung eines Gen-*Targeting*vektors mit einer DNA-Massekonzentration von 15 $\mathrm{ng}/\mu\mathrm{l}$ und jeweils 7,5 $\mathrm{ng}/\mu\mathrm{l}$ an mRNA der TALEN. Die selben DNA- und mRNA-Massekonzentrationen sind bei der Verwendung des Gen-*Targeting*-Oligonukleotids für die HR zu empfehlen. Zum Erreichen der höchsten Frequenz für den Mechanismus des NHEJ sollten jeweils 10 $\mathrm{ng}/\mu\mathrm{l}$ an TALEN mRNA eingesetzt werden.

Tab. 3.4: Zusammenfassung der Frequenzen bei den untersuchten adulten Mäuse nach der Injektion von TALEN in Bezug auf die Zahl der analysierten Tiere

Locus	*Targeting*-Konstrukt	NHEJ	HR
Rab38	Gen-*Targeting*vektor	4,2 %	2,0 %
Rab38	Gen-*Targeting*oligonukleotid	8,9 %	6,7 %

Zusätzlich wurden während der Ausfertigung dieser Arbeit noch positive Resultate bei TALEN gegen den *Fus*- (Wefers *et al.*, 2013) und den *Pik3ca*-Locus der Maus beobachtet (unveröffentlicht).

Die Ergebnisse von Ma *et al.* (2012) zeigen, dass TALEN ebenfalls verwendet werden können, um größere chromosomale Deletionen durch das Einbringen von zwei DSB an zwei verschiedenen Loci auf einem Chromosom zu erzeugen. Im Gegensatz zu den ZFN, bei denen die Verwendung der heterodimeren *FokI*-Varianten (*FokI-EL/KK*) verpflichtend ist, wurden in den meisten Studien mit TALEN, wie auch in dieser Arbeit die *FokI-WT*-Variante verwendet. Mittlerweile konnte in mehreren Studien an unterschiedlichen Organismen eine Erhöhung der Frequenz des NHEJ auch bei der Verwendung von anderen FokI-Varianten (NEL/CKK, ELD/KKR, RR/DD) nachgewiesen werden (Ma *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2012; Dahlem *et al.*, 2012) .

3.4 Vergleich der ZFN mit den TALEN

Ein Vorteil für die Anwendung der ZFN war bisher die Verwendung der heterodimeren *FokI*-Nukleasevarianten (*FokI-EL/KK*). Diese verhindert die Homodimerisierung von zwei Nuklease-Molekülen mit der gleichen Bindesequenz, was bei der Verwendung der *FokI-WT*-Variante möglich wäre. Damit soll die Entstehung von DSB an *Off-Target*-Stellen verhindert werden. Jedoch konnten auch nach dem Einsatz von TALEN mit der *FokI-WT*-Variante keine nachteiligen Effekte festgestellt werden. Zusätzlich wurde kürzlich in mehreren Studien gezeigt, dass auch andere *FokI*-Varianten in Kombination mit den TAL-Fingern die Frequenz des NHEJ erhöhen.

Ein weiterer Vorteil ist, dass man sowohl bei den ZFN als auch bei den TALEN die zirkuläre Form der Plasmid-DNA verwenden kann und sich somit in beiden Fällen den Linearisierungsschritt vor der Aufreinigung spart.

Ein Vorteil der TALEN ist, dass man im Vergleich zu den ZFN weniger DNA des Gen-*Targeting*konstruktes in die Zygoten injizieren muss. Damit kommt es mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit zu einer Störung des gesamten Zellzyklus-Systems in der Zygote.

Außerdem ist die Konstruktion der TALEN weniger zeitaufwändig als die Herstellung von funktionsfähigen ZFN. Für das Design und die Herstellung von TALEN benötigt man ungefähr zwei Wochen, wohingegen das Design und die Konstruktion von funktionsfähigen ZFN mehrere Monate in Anspruch nimmt. Ein Grund für das komplizierte und zeitaufwändige Design ist die Kontext-Abhängigkeit der ZFN, so dass man die einzelnen Finger nicht einfach wie bei den TALEN nach dem Baukastenprinzip zusammenstecken kann. Will man gut funktionierende und spezifisch bindende ZFN verwenden, sollte man sie deshalb von Sigma anfertigen lassen, was

allerdings kostspielig ist und somit einen weiteren Nachteil der ZFN darstellt.

Ein Zinkfinger erkennt ein Nukleotid-Triplet, wohingegen jeder TAL-Finger ein einzelnes Nukleotid erkennen. Das bedeutet, dass man eigentlich weniger Zinkfinger kombinieren muss, um eine vergleichbare Spezifität zu erreichen. Jedoch sind ZFN mit einer Fingeranzahl von mehr als vier Fingern (korrespondierend zu einer >12 bp langen Bindesequenz) nur noch schwach aktiv. Die verwendbare Sequenz der Ziel-DNA bei den TALEN ist somit länger und damit wird das Vorhandensein der Bindestelle wieder spezifischer. Außerdem hat man durch das Nukleotid-Triplet bei den Zinkfingern weniger Flexibilität in der DNA-Sequenz.

Ein weiterer Nachteil der ZFN gegenüber den TALEN ist, dass die Zinkfinger einen beachtlichen, zeitintensiven Optimierungsaufwand in Testexperimenten benötigen, um ein spezifisches *Targeting* zu erreichen, wohingegen die TALEN sofort gut zu funktionieren scheinen. Im Vergleich zu den früher etablierten ZFN scheinen die TALEN genau so effizient bei dem Einbringen von DSB zu sein. Einige Studien haben gezeigt, dass sie trotzdem weniger zytotoxisch sind. Zum Beispiel haben TALEN gegen den *IL2R*-Locus eine geringere Toxizität im Vergleich zu den korrespondierenden ZFN und weisen trotzdem ungefähr 30 bis 50 % der Aktivität bei der gezielten Gen-Modifikation auf (Mussolino *et al.*, 2011).

Die TALEN-Konstruktion ist somit einfacher, möglicherweise verlässlicher und in den wenigen untersuchten Fällen zeigten sich auch weniger *Off-Target* Effekte als bei den korrespondierenden ZFN. Außerdem wurden mehrere bioinformatische Programme und *in vitro* Anwendungen in der letzten Zeit entwickelt um die Natur der *Off-Target*-Effekte genauer zu charakterisieren (Gabriel *et al.*, 2011; Pattanayak *et al.*, 2011). Um dieses Thema abschließend zu klären, müsste man wahrscheinlich im Einzelfall das Genom des entsprechenden *Founder*-Tieres, mit dem weitergearbeitet werden soll, sequenzieren lassen. Sollten diese Sequenzierungen vermehrt *Off-Target*-Mutationen aufweisen, müsste man über die Verwendung von TALEN mit heterodimeren Nukleasen nachdenken.

3.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden somit verschiedene Methoden zur spezifischen, genetischen Modifikation von Mäusen etabliert. Dabei wurden zwei Nutzer-spezifische Nukleasen, ZFN und TALEN, in Zygoten zur Erzeugung von DSB eingebracht. Zusätzlich zu den Nukleasen wurde noch exogene DNA durch die Injektion eingebracht, um spezifisch modifizierte Tiere direkt aus der behandelten Zygote zu erzeugen. Die Vor- und Nachteile beider Nukleasen wurden oben bereits erläutert. Mit den beiden Techniken wurde die Frequenz des NHEJ und der HR stark erhöht, wobei sich anhand der vorliegenden Arbeit eine deutliche Präferenz für die Verwendung der TALEN zeigte, da die modulare Struktur der einzelnen Finger die Flexibilität des Designs und die Länge der Zielsequenz positiv fördert. Die Technologie kann außerdem bei Mäusen mit jedem beliebigen genetischen Hintergrund angewandt werden. Man ist somit nicht mehr auf den genetischen Hintergrund gut etablierter ES-Zellen angewiesen und eliminiert dadurch die Notwendigkeit der Rückkreuzung über mindestens zehn Generationen, was normalerweise zwei bis drei Jahre in Anspruch nimmt. Außerdem werden heterozygote Individuen in der ersten Generation erreicht.

Die Einfachheit des Designs und der Reagenzien und die hohe Effizienz der TALEN liefern eine Möglichkeit für anspruchsvolle Genom-Modifikationen wie Deletionen oder Inversionen von langen chromosomalen Regionen, die Einbringung von spezifischen Punktmutationen oder den einfachen *Knockout* ohne Einfügen eines Selektionsmarkers. Außerdem können all diese Mutationen in Gene eingebracht werden, die im Stadium der Zygote noch gar nicht exprimiert werden.

Die Anwendung der beiden Nuklease-Technologien zur gezielten Genom-Modifikation in Organismen, in denen ES-Zellen oder Kern-Transfer-Technologien nicht verfügbar sind ist eine entscheidende Verbesserung der Molekularbiologie um grundlegende Fragen zu beantworten oder Modelle von ökonomischem Interesse herzustellen. Außerdem ermöglicht die Verwendung dieser Tiere bei Technologieanwendungen diese Strategien bei Groß- und Nutztieren eine Verbesserung der Eigenschaften für die Xenotransplantation und als biomedizinische Produkte.

Nutzer-spezifische Nukleasen haben sich somit zu einer Plattform entwickelt, um das komplexe Genom verschiedener Organismen für die Grundlagenforschung, die Biotechnologie, die synthetische Biologie oder die humane Gentherapie spezifisch zu verändern. Die Technologie wäre damit eine neue Strategie, um Krankheits-spezifische Mutationen in Patientenzellen zu korrigieren, was die Notwendigkeit der bisher verwendeten viralen Integration eliminieren und die Sicherheit der Gentherapie drastisch erhöhen würde. Im Wesentlichen lässt die Art der Korrektur den endogenen Promoter und die regulatorische Kontrolle des Gens intakt, wodurch vermutlich die Entstehung von Therapie-bezogenen Tumorerkrankungen verringert würde. Die nächsten Versuche sollten sich somit auf das Einbringen der Nuleasen in primäre, Patienten-spezifische Zelltypen, die Demonstration der Wirksamkeit und die Sicherheit durch die genomweite Sequenzierung nach einem Gen-*Targeting* und der Etablierung der Nuklease-vermittelten Gentherapie fokusieren. Im Großen und Ganzen kann man somit ab sofort für die Genom-Manipulation in verschiedenen Organismen auf die Verwendung von TALEN zurückgreifen, da sie gegenüber den ursprünglichen Methoden Zeit und Geld spart.

4 Material

4.1 Verwendete Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammern	MWG Biotech; Peqlab
Autoklav	Aigner, Typ 667-1ST
Autoradiographie-Kassette	Amersham, Hypercassette
Digitalkamera	Panasonic, Lumix DMC-FS5
Drucker (Geldokumentationsanlage)	Mitsubishi, CP770DW
Drucker (Photometer)	Thermal, Printer DPU-414
Eismaschine	Scotsman, AF 30
Elektrophorese-Netzgeräte	Consort, E443; Thermo, EC250-90, EC3000-90
Elektroporationsgerät	BioRad, Gene Pulser XCell
Entwicklermaschine für Röntgenfilme	AGFA, Curix 60
Flüssigstickstofftank	MVE Crygenics, XLC230
Gefrierschrank (−20 °C)	Liebherr
Gefrierschrank (−80 °C)	Heraeus HFU 686 Basic, New Brunswick scientific, U725-86
Geldokumentationsanlage	Herolab, E.A.S.Y. 440K
Glashomogenisator	Sigma
Glaspipetten	Hirschmann
Glasware	Schott
Heizblock	VWR, Digital Heatblock
Hybridisierungsöfen	Memmert, UM 400; MWG-Biotech, Mini 10
Hybridisierungsflaschen	ThermoHybald
Inkubator (Bakterien)	New Brunswick Scientific, innova 4230
Inkubator (ES-Zellen)	Thermo Scientific, HERAcell 240i
Inkubator (HEK293-Zellen)	Binder
Inverses Mikroskop	Zeiss Axiovert 200
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr
Luminometer	Berthold Centro LB90
Magnetrührer/-heizer	IKA-Werke, KMO2 basic, RCT basic

Mikrowelle	Sharp R-937 IN
Neubauer verbesserte Zählkammer	Marienfeld
PCR-Maschinen	Eppendorf MasterCycler Gradient, Eppendorf MasterCycler Pro
pH-Meter	InoLab, pH Level 1
Photometer	Eppendorf, Biophotometer 6131
Pipetten	Gilson, Pipetman P10, P20, P200, P1000
Pipettierhilfe	Eppendorf, Easypet; Hirschmann, Pipettus akku
Präzisionswaagen	Sartorius LC220S, LC6200S
Reinstwasser-Aufbereitungsanlage	Millipore, Milli-Q biocel
Stereomikroskope	Zeiss, Stemi SV6; Hund Wetzlar; Leica, Labovert FS, DM IL
Sterilbänke (ES-Zellen)	Nunc; Thermo Scientific, HERAsafe KS
Sterilbänke (HEK293-Zellen)	Kojair, Biowizard Golden Line
Thermomixer	Eppendorf, Thermomixer comfort
UV-DNA/RNA-crosslinker	Stratagene, UV-Stratalinker 1800
UV-Flächenstrahler	Benda, N-36 LW366nm
Vortexer	Scientific Industries, Vortex Genie 2
Wärmeschränke	Memmert, UNB400
Wasserbäder	Lauda, AQUAline AL 12; Leica, HI1210; Memmert, WB7
Zentrifugen	Sorvall, Evolution RC; Eppendorf, 5415D, 5417R, 5702; Sigma, 4K15; Heraeus Varifuge 3.0R

4.2 Verbrauchsmaterialien

Petrischalen	Greiner; Nunc
Multiwell-Platten	Nunc
96-Well Messplatten (weißer Boden)	Thermo Science
Dialyse-Membranen	neolab
Einfrier-Röhrchen	Nalgene; Cryoware
Elektroporationsküvetten (0,2 cm)	Biorad

Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Greiner
Faltenfilter	Roth
Filterpapier	whatman 3MM
Gesichtshaube	Kolmi
Handschuhe	Kimberley-Clark Safeskin PFE; Safeskin, Nitril; Meditrade, Nitril NextGen
Haarhaube	Meditrade, Suavel
Microspin S-300	GE Healthcare
Nylontransfermembran	Amersham, Hybond N+
Parafilm M	Parafilm
Pasteurpipetten	Brand
PCR Reaktionsgefäßdeckel	Biozym
PCR Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym
PCR-Sealing Filme	Kisker
Pipettenspitzen, gestopft (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Art; Kisker; Starlab
Pipettenspitzen, ungestopft (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson; Starlab
Röntgenfilme	Kodak: Biomax MS, Biomax MR
Safe-Lock Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Skalpell	Braun
twin.tec PCR Platten 96, skirted	Eppendorf
Zellstoff	Rohde Clean GmbH

4.3 Chemikalien

5 Prime MasterMix	5 Prime
α-^{32}P-dCTP	Amersham
Agarose	Biozym, Sigma
Alkalinische Phosphatase (CIP)	NEB
amp	Sigma
Ampuwa Wasser	Fresenius

ATP	Roche
Autoradiographie-Emulsion (Typ NTB-2)	Kodak
Autoradiographie-Entwickler (D-19)	Kodak
Autoradiographie-Fixierer	Kodak
Baktoagar	Difco
Baktopepton	BD Biosciences
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Sigma
BSA (20mg/ml)	NEB, Sigma
Chloroform/Isoamylalkohol	Sigma
Chloroquin	VWR
Coenzym A	Sigma
DMEM (*high Glucose + NaPyruvate*)	Gibco
DMSO	Sigma
dNTP (100mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	Fermentas
DPBS	Gibco
DTT	Sigma
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
EtOH (absolut)	Merck
Ethidiumbromid	Fluka
FCS	PAN
Ficoll 400	Sigma
Formaldehyd	Sigma
Gelatine	Sigma
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Fermentas
Glycerol	Sigma
Glycylglycin	Sigma
hCG	Intervet
HCl	Merck

Hefeextrakt	Difco
Hepes	Gibco
Herculase II Fusion DNA Polymerase	Agilent technologies
Hyaluronidase	Sigma
Hygromycin	Calbiochem
HyperLadder I	Bioline
IPTG	Fermentas
Isopropanol	Merck
$K_3Fe(CN)_6$	Sigma
$K_4Fe(CN)_6 \bullet 3H_2O$	Sigma
K_2HPO_4	Roth
kan	Sigma
KCl	Merck
KH_2PO_4	Sigma
Klenow, DNA Polymerase I *large Fragment*	NEB
L-Glutamin 200mM	Gibco
LIF	Chemicon
Luciferin	Sigma
M2-Medium	Sigma
M16-Medium	Sigma
MassRuler Expr. Forw. Mix	Fermentas
MEM *Nonessential amino acid*	Gibco
Mercaptoethanol	Invitrogen
$MgCl_2$	Merck
$MgSO_4$	Sigma
NaAc	Merck, Sigma
NaCl	Merck
NaH_2PO_4	Sigma
Na_2HPO_4	Sigma
NaOH	Roth
Oligonukleotide	Metabion

Orange G	Sigma
PBS	Gibco
PFA	Sigma
Phenol:Chlorophorm:Isoamylalkohol	Fluka, Roth
Phusion DNA Polymerase	NEB
PMSG	Intervet
ProteinaseK	Roche
Restriktionsenzyme	NEB; Fermentas; Roche; Invitrogen
RNAse freies Wasser	Ambion
SDS	Merck
S.O.C.-Medium	Invitrogen
Salmon Sperm DNA	Fluka
SmartLadder DNA Marker	Eurogentec
spec	Fluka
Spermidin	Sigma
Synthetisierte DNA-Fragmente	GeneArt, GenScript
T4 DNA Ligase	NEB
Taq DNA Polymerase	QIAGEN
Tris-Base	Sigma
Tris-Säure (Trizma Hydrochloride)	Sigma
Triton X-100	Biorad
Trypsin/EDTA	Sigma
Tyrodes	Sigma
Wasser (Embryo getestet)	Sigma
X-Gal	Fermentas
Xylencyanol FF	Sigma

4.4 Kits

β-Gal Reporter *Gene Assay (chemiluminescent)*	Roche
GeneJet Gel Extraction Kit	Fermentas
High Prime DNA Labeling Kit	Roche
MEGAclear Kit	Ambion
mMessagemMachine T7 Ultra Kit	Ambion
NucleoSpin Plasmid (no Lid)	Macherey-Nagel
Poly(A) Tailing Kit	Ambion
QIAGEN Plasmid Maxi *Kit*	QIAGEN
QIAGEN Plasmid Plus Maxi *Kit*	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
StrataClone Blunt PCR Cloning Kit	Stratagene
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega

4.5 Oligonukleotide

4.5.1 Oligonukleotide für Genotypisierungs-PCRs

Primer	Sequenz	Bedingungen	Zyklen	Größe
Rab38_F	5'-GGC CTC CAG GAT GCA GAC ACC-3'	94 °C 40 s 58 °C 40 s	30x	213 bp
Rab38_R	5'-CCA GCA ATG TCC CAG AGC TGC-3'	72 °C 60 s		
Rosa_5HA	5'-AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT-3'	95 °C 30 s 59 °C 60 s	38x	WT: 252 bp
Rosa_3HA	5'-CAC ACC AGG TTA GCC TTT AAG CC-3'	72 °C 60 s		26.3: 1402 bp
Rosa_5HA	5'-AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT-3'	95 °C 30 s 59 °C 60 s	38x	26.8: 346 bp
Rosa_SA1	5'-CGA TCC CCA GTA CTG GAA AG-3'	72 °C 60 s		
Rosa_pA2	5'-AAA CCA CAA CTA GAA TGC AGT G-3'	95 °C 30 s 59 °C 60 s	38x	26.8: 625 bp
Rosa_3HA	5'-CAC ACC AGG TTA GCC TTT AAG CC-3'	72 °C 60 s		26.3: 222 bp

4.5.2 PCR zur Herstellung von *Southern Blot*-Sonden

Primer	Sequenz	Bedingungen	Zyklen	Größe
Rab38_5'_F	5'-CTG GAA ACT AAA ATT CAA GGT GTT ATA C-3'	95 °C 30 s 0 °C 30 s	35x	600 bp
Rab38_5'_R	5'-TAT TCA TTC ACT TAA CCA TTT GTT C-3'	72 °C 30 s		

4.6 Lösungen

6x Ladepuffer für Agarose-Gele	15 %	Ficoll 400
	1 bis 2 %	Bromphenolblau (bei 300 bp)
	1 bis 2 %	Xylencyanol FF (bei 4 kb)
Church Puffer	0,5 M	Na_2HPO_4
	0,5 M	NaH_2PO_4
	1 %	BSA
	7 %	SDS
	1 mM	EDTA pH 8,0
	0,1 mg/ml	textitSalmon Sperm DNA
Denaturierungslösung	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
Einfrier-Medium	10 %	DMSO
	10 %	FCS
		in DMEM
ES-Zellkulturmedium	500 ml	DMEM
	75 ml	FCS
	9 ml	L-Glutamin
	12 ml	Hepes
	6 ml	MEM *nonessential amino acids*
	1,2 ml	Mercaptoethanol
	90 μl	LIF

HEK293-Zellkulturmedium	500 ml	DMEM
	50 ml	FCS
	5 ml	L-Glutamin (200 mM)
IPTG-Lösung	20 mg/ml	IPTG
		in H_2O
lacZ-Färbelösung	5 mM	$K_3Fe(CN)_6$
vor Licht geschützt bei RT aufbewahren	5 mM	$K_4Fe(CN)_6 \bullet 3H_2O$
	2 mM	$MgCl_2$
	1 mg/ml	X-Gal
	in	PBS
lacZ Fixierlösung	4 %	PFA
lacZ/Chloroquin/Triton Lösung	0,2 %	Chloroquin 15 mg/ml
	0,2 %	Triton X-100
		pH 7,5
		in lacZ Färbelösung
LB-Medium	10 g	Baktopepton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	ad 1 l	H_2O
LB-Agar	98,5 %	LB-Medium
	1,5 %	Baktoagar
LB^{amp} Medium/Agar	100 µg/ml	amp
	ad 500 ml	LB-Medium/Agar
LB^{kan} Medium/Agar	50 µg/ml	kan
	ad 500 ml	LB-Medium/Agar
LB^{spec} Medium/Agar	25 µg/ml	spec
	ad 500 ml	LB-Medium/Agar

Luciferase-Substrat	25 mM	Gly-Gly
(Lagerung in Aliquots bei $-80\,^{\circ}\mathrm{C}$	15 mM	$MgSO_4$
pH 8,0)	4 mM	EGTA
	2 mM	ATP
	1 mM	DTT
	0,1 mM	CoenzymA
	75 μM	Luciferin
	15 mM	Phosphatpuffer
Lysispuffer (DNA)	50 mM	Tris-HCl pH 8,0
	100 mM	EDTA
	1 %	SDS
	8 μl/ml	ProteinaseK
	100 mM	NaCl
Neutralisierungslösung	0,1 M	Tris-HCl pH 7,5
	0,5 M	NaCl
PFA (4 %)	4 %	PFA w/v
	in	PBS
PBS (1x)	171 mM	NaCl
	3,4 mM	KCl
	10 mM	Na_2HPO_4
	1,8 mM	KH_2PO_4
		pH 7,0
Phosphatpuffer	9,4 ml	1 M K_2HPO_4
	0,6 ml	1 M KH_2PO_4
	ad 100 ml	H_2O
SSC (20x)	3 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat
		pH 7,0

stripping-Lösung	0,2x	SSC
	0,05 %	SDS
TAE (10x)	0,4 M	Tris-Base
	0,1 M	Acetat
	0,01 M	EDTA
TBE (10x)	0,89 M	Tris-Base
	0,89 M	Borsäure
	0,02 M	EDTA
TE	10 mM	Tris-HCl
	1 mM	EDTA
$T_{10}E_1$	10 mM	Tris
(steril filtriert	0,1 mM	EDTA pH 7,2
Aufbewahrung bei $-20\,°C$)	in	Wasser (Embryo getestet)
Tris-HCl	1 M	Tris-Base
		gewünschten pH einstellen
Waschlösung 1	2x	SSC
	0,5 %	SDS
Waschlösung 2	1x	SSC
	0,5 %	SDS
X-Gal Lösung	20 mg/ml	X-Gal
		in DMSO

4.7 Mauslinien

Mauslinie	Erklärung	Herkunftsort
BDF-1	Hybrid-Mauslinie, Kreuzung zwischen C57BL/6-Weibchen und DBA/2-Männchen, Fellfarbe: schwarz	Charles River
C57BL/6J	Inzucht-Mauslinie, Fellfarbe: schwarzer	interne Zucht, Charles River
CD1	Fellfarbe: albino	interne Zucht, Charles River
FVB	Inzucht-Mauslinie, Fellfarbe: albino	Charles River
Cht	Mauslinie mit der G19V Mutation im *Rab38*-Gen auf Chromosom 7, Fellfarbe: schokoladenbraun	von M. Seabra zur Verfügung gestellt
Rosa26.10	Integration eines *Hygromycin*-Resistenzgens zwischen zwei attP-Erkennungssequenzen im *Rosa26*-Locus (Chr. 6), C57BL/6J-Hintergrund, Fellfarbe: schwarz	interne Zucht
D16R16 D22R22 D23R23	mögliche Integration eines *Venus*-Reportergens in den *Rosa26*-Locus durch die phiC31 Integrase-vermittelte RMCE	Vorkern-Injektion
Lot. 1 Lot. 2	mögliche β-*Gal*-Integration im *Rosa26*-Locus durch die HR	Vorkern-Injektion, interne Zucht
Lot. 3 Lot. 4 Lot. 5 Lot. 6 D1R1 D3R1 D1R3 D6R1 D6R3 D6R5 D6 D7R9 D10	mögliche Integration des *Venus*-Reportergens in den *Rosa26*-Locus durch die ZFN-vermittelte HR	Vorkern-Injektion, interne Zucht
D11R11 D12R12	mögliche Integration der IDGCht-Mutationen in das *Rab38*-Gen durch die ZFN-vermittelte HR	Vorkern-Injektion, interne Zucht
D27R27 D30R30 D31R31	mögliche Integration der IDGWT-Mutationen in den *Rab38*-Locus durch die ZFN-vermittelte HR	Vorkern-Injektion, interne Zucht
D36R36 D37R37	mögliche Integration der IDGCht-Mutationen in das *Rab38*-Gen durch die TALEN-vermittelte HR	Vorkern-Injektion, interne Zucht
D38R38 D39R39	mögliche Integration der IDGWT-Mutationen in den *Rab38*-Locus durch die TALEN-vermittelte HR	Vorkern-Injektion, interne Zucht

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Für die Klonierung von Plasmid-DNA benötigt man elektrokompetente *Escherichia coli (E. coli)*-Bakterien des Stammes DH5α, bei denen die Zellwand durch eine spezielle Behandlung für DNA durchlässig ist. Die Herstellung elektrokompetenter DH5α geschah auf folgende Weise: Man pickte von einer über Nacht (üN) bei 37 °C inkubierten Bakterienkultur auf einer LB-Agarplatte ohne Antibiotikum eine einzelne Kolonie und impfte damit 5 ml LB-Medium an. Nach der erneuten Inkubation bei 37 °C üN wurden 4 ml der Bakterienvorkultur in 400 ml frisches, auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium transferiert und erneut für mehrere Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Absorption der Bakterienlösung wurde regelmäßig im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen bis diese eine optische Dichte (OD) von 0,5 erreichte. Sie sollte dabei eine OD von 0,65 nicht überschreiten. Als dieser Wert erreicht war, wurde die Bakterienlösung für zehn Minuten auf Eis abgekühlt und auf 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt. Diese wurden anschließend bei 4000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets vorsichtig in 25 ml eiskaltem 10 %igem Glycerol resuspendiert und jeweils zwei Aliquots in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vereint. Nach zweimaliger Wiederholung des Zentrifugationsschrittes und der jeweiligen Resuspendierung des Bakterienpellets, wurde es nach dem letzten Schritt in 1,5 ml 10%igem Glycerol resuspendiert. Diese Menge wurde anschließend in 50 μl Aliquots aufgeteilt, direkt in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und bei -80 °C für die weitere Verwendung aufbewahrt. Durch die Elektroporation von 10 pg pUC18 Kontrollplasmid (Abb. 6.3.4.3) wurde die Transformationseffizienz des kompetenten Bakterien überprüft.

5.1.2 Transformation von elektrokompetenten Bakterien

Für die Transformation wurde jeweils ein Aliquot der elektrokompetenten DH5α langsam auf Eis aufgetaut und 5 μl des Ligationsansatzes (ungefähr 25 ng Plasmid) hinzugefügt. Die Suspension wurde vorsichtig gemischt, in eine Elektroporationsküvette überführt und bis zur Elektroporation auf Eis aufbewahrt. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe des Biorad Elektroporationssystem nach den Herstellerhinweisen. Anschließend wurde die Zellsuspension unverzüglich in 1 ml S.O.C.-Medium überführt und bei 37 °C für max. 60 min inkubiert. Während dieser Zeit exprimierten die transformierten Bakterien das für die Selektion verwendete Antibiotikum-Resistenzgen des Plasmids. Danach konnten die Bakterien auf LB-Agarplatten, die mit dem benötigten Antibiotikum versetzt waren, ausplattiert und bei 37 °C üN inkubiert werden. Normalerweise wurde standardmäßig Ampicillin (100 μg/ml) für die Selektion verwendet. Wenn es durch die Klonierung in einen entsprechenden Vektor (siehe z.B. Abb. 6.3.4.4) möglich war ein darin vorhandenes *lacZ*-Gen zu unterbrechen, konnte zusätzlich eine Blau-Weiß-Selektion zur leichteren Auswahl der korrekt transformierten Kolonie durchgeführt werden.

5.1.3 Blau-Weiß-Selektion

Für die spätere Blau-Weiß-Selektion wurden 40 μl X-Gal (20 $\mathrm{mg/ml}$) und 40 μl IPTG (20 $\mathrm{mg/ml}$) auf einer LB-Agarplatte, die mit dem entsprechendem Antibiotikum versetzt war, verteilt. Auf diese Platte wurden anschließend die Bakterien, für die diese Selektion möglich war, ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden nur die weißen Kolonien gepickt, da diese sowohl die Antibiotikum-Resistenz des Vektors aufwiesen, als auch das Insert integriert hatten, da kein β-*Gal* mehr exprimiert wurde.

5.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde aus den zuvor elektroporierten Bakterien unter Verwendung von folgenden *Kits* isoliert, dem *Qiagen MiniPrep* und dem *NucleoSpin Plasmid (no Lid)* für die Auswahl eines richtig transformierten Klons nach der Ligation und dem *Qiagen Plasmid Maxi* als auch dem *Qiagen Plasmid Plus Maxi Kit* um eine größere Ausbeute an Plasmid-DNA mit einem höheren Reinheitsgrad zu erhalten.

Für die beiden zuerst erwähnten *Kits* mit der geringeren DNA-Ausbeute wurden 2 ml LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft, wobei beides vorher mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde. Diese 2 ml wurden üN bei 37 °C inkubiert und die Plasmid-DNA, den Herstellerhinweisen entsprechend, isoliert.

Für das *Plasmid Maxi Kit* wurden 100 μl der MiniPrep-Kultur in 100 ml LB-Medium mit Antibiotikum gegeben und bei 37 °C üN inkubiert. Nach Entnahme von 500 μl Bakteriensuspension für den Glycerolstock folgte die Isolierung der Plasmid-DNA gemäß den Herstelleranweisungen. Für das *Plasmid Plus Maxi Kit* wurden 50 μl der MiniPrep-Kultur in 100 ml LB-Medium mit Antibiotikum bei 37 °C nur 12 bis 16 h inkubiert und die Plasmid-DNA nach Entnahme der 500 μl Medium für den Glycerolstock dem *High Yield*-Protokoll des Herstellers folgend, isoliert. Nach der Isolierung der DNA wurde die Konzentration mit dem Photometer bestimmt. Die 500 μl des vor der Plasmid-Isolation entnommenem Mediums wurden in beiden Fällen mit 500 μl Glycerol vermischt und bei -80 °C weg gefroren.

5.1.5 Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Für den Verdau von Plasmid-DNA wurden 10 Einheiten (U) des ausgewählten Restriktionsenzyms pro μg DNA verwendet. Eine Einheit wird in der Theorie als die Menge des Enzyms, die 1 μg DNA in 1 h linearisiert, definiert. Die Reaktionsbedingungen wurden den Anweisungen des Herstellers des Enzyms entnommen. Der Restriktionsverdau inkubierte normalerweise für 1 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur.
Falls die Erzeugung kompatibler, kohäsiver Enden nicht möglich war, sollte die DNA zur Generierung stumpfer Enden nach dem Verdau mit 5 U des Klenow-Fragmentes der *E. coli* DNA-Polymerase I und 25 nM dNTPs für 20 min bei RT inkubiert werden. Dadurch kam es zur Entfernung der durch den Restriktionsverdau entstandenen 5'- und 3'-Überhänge. Anschließend wurde das Klenow-Fragment bei 75 °C für 20 min inaktiviert.
Um ungewollte Verbindungen der offenen Plasmid-Vektoren während der Ligation zu verhindern, wurden die endständigen Phosphate der Vektoren durch die 45-minütige Inkubation in 10 U

alkalinischer Phosphatase (CIP) bei 37 °C entfernt. Dadurch konnte die ungewünschte Religation verhindert werden. Das Enzym kann unmittelbar nach dem Verdau des Vektors zum Reaktionsansatz hinzugegeben werden, da es in allen handelsüblichen Restriktionspuffern enzymatisch aktiv ist und die Anwesenheit von Restriktionsenzymen die Dephosphorylierungsreaktion nicht stört. Die CIP musste durch die Aufreinigung über ein Agarose-Gel entfernt werden, weil sie durch Hitze nicht deaktiviert werden kann.

5.1.6 Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Größe kam die Agarose-Gelelektrophorese zum Einsatz. Für die allgemeinen Anwendungen (Auftrennung von 1 bis 10 kb langen DNA-Fragmenten) wurden 1 %ige Agarose/TAE-Gele und für eine bessere Auftrennung eng zusammenliegender Fragmente (<1 kb) 1,5 bis 2 %ige Gele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarosemenge entsprechend der gewünschten Prozentigkeit und dem benötigten Gesamtvolumen in 1x TAE-Laufpuffer eingewogen, in der Mikrowelle aufgekocht, mit Ethidiumbromid (EtBR) (10 μg/ml) versetzt und in die Gelkammern gefüllt. Die Taschen für das spätere Laden des Gels bildeten sich durch einen eingesetzten Kamm mit der gewünschten Taschenanzahl. Die zu trennenden DNA-Proben (PCR-Produkte, Restriktionsfragmente etc.) wurden mit 6x Ladepuffer versetzt (Endkonzentration 1x) und zusammen mit dem entsprechenden Längenstandard auf das abgekühlte Agarose-Gel geladen. Die Fragmente wurden bei 80 bis 120 V und einer maximalen Stromstärke von 500 mA für 30 bis 60 min, je nach Größe der DNA-Fragmente, in 1xTAE als Laufpuffer aufgetrennt, wobei die aufgrund ihrer Posphatreste negativ geladene DNA zur Anode wanderte. Je höher die Voltzahl ist, desto höher ist die Trennungsgeschwindigkeit und je kleiner die DNA-Fragmente sind umso schneller wandern sie zur positiv geladenen Anode.
Nach der Auftrennung wurde das Bandenmuster entweder mit Hilfe von kurzwelligem UV-Licht (254 nm) in der Geldokumentationsanlage photographiert (untere Nachweisgrenze 5 bis 10 ng DNA) oder durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (366 nm) zur Vermeidung von Schäden an der DNA auf einem UV-Flächenstrahler betrachtet. Dabei ermöglichte das verwendete EtBr die Visualisierung der DNA. Die Bande der gesuchten Größe konnten anschließend mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt werden. Das ausgeschnittene Gelstück wurde gewogen, die DNA unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction* oder des *GeneJet Gel Extraction Kits* aus dem Agarose-Gel isoliert und die Konzentration im Photometer bestimmt. Die Aufbewahrung der isolierten DNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei −20 °C.

5.1.7 Präzipitation von DNA

Zur Fällung von DNA wurden 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. 100 % EtOH zu der gelösten DNA hinzugefügt, kurz gemischt und für 1 h bei −20 °C inkubiert. Anschließend konnte das gebildete DNA-Pellet bei 13 500 rpm für 10 min abzentrifugiert und mit 70 % EtOH gewaschen werden. Danach wurde es, bis der komplette EtOH verdampft war, an der Luft getrocknet und in dem gewünschten Lösungsmittel (z.B. H_2O, TE, Tris-HCl oder PBS) erneut gelöst.

5.1.8 Bestimmung der Massenkonzentration von Nukleinsäuren

5.1.8.1 Bestimmung der Massenkonzentration in Photometer

Die Bestimmung der Massenkonzentration (Mortimer und Müller, 2003) erfolgte im Photometer, wobei die Extinktion der Proben bei verschiedenen Wellenlängen gemessen wurde. 2 μl der zu messenden Probe wurden mit 100 μl Ampuwa Wasser verdünnt. Ampuwa Wasser wurde außerdem zur Bestimmung des Leerwertes verwendet. Die Massenkonzentration der doppelsträngigen DNA oder der einzelsträngigen RNA wurde durch die Messung der OD im Photometer nach den jeweiligen Herstelleranweisungen bestimmt und durch die vorherige Angabe der Verdünnung automatisch vom Gerät in $\mu g/\mu l$ vor der Verdünnung umgerechnet.

Die Reinheit wurde durch das Verhältnis von OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Reine DNA hat ein OD_{260}/OD_{280}-Verhältnis von ungefähr 1,8, reine RNA ein Verhältnis von 2,0. Niedrigere Werte können durch Proteine oder Phenolkontaminationen verursacht werden. Außerdem wurde das Verhältnis von OD_{260}/OD_{230} berechnet, wodurch Verunreinigungen mit Salzen festgestellt werden konnten. Das Verhältnis sollte optimalerweise immer einen Wert größer als 1,5 aufweisen.

5.1.8.2 Bestimmung der DNA-Massenkonzentration mit Hilfe eines Agarose-Gels

Für die Bestimmung der DNA-Massenkonzentration mit Hilfe eines Agarose-Gels wurden 2 μl der DNA-Probe mit 18 μl Ampuwa-Wasser und 4 μl 6x Ladepuffer versetzt und zusammen mit jeweils 5 μl und 10 μl des DNA-Markers *MassRuler Expr. Forw. Mix* auf ein 1 %iges Agarose-Gel mit EtBr gegeben. Von dem Gel wurde nach einer angemessenen Zeit ein Foto gemacht und die ungefähre DNA-Menge anhand der Bandenintensität im Vergleich zum Marker nach den Herstellerangaben bestimmt. Anhand der bestimmten DNA-Menge in Bezug auf das geladene Volumen der DNA-Probe konnte die ungefähre DNA-Massenkonzentration berechnet werden.

5.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation eines kurzen Restriktionsfragmentes (*Insert*) mit einem zuvor linearisierten Plasmidfragment (Vektor) wurden die beiden Teile in einem molaren Verhältnis von ungefähr 1:3 gemischt. Eines der beiden Fragmente muss dabei an den Enden Phosphatgruppen tragen, um die Ligation zu ermöglichen. Es wurde normalerweise für die Ligation eine DNA-Gesamtmenge von 100 bis 200 ng verwendet. Die T4 DNA-Ligase und der entsprechende Puffer wurden zu der DNA-Mischung hinzugegeben und mit Ampuwa Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 μl aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde für die Ligation von kohäsiven Enden 2 h bei RT und für die Ligation von stumpfen Enden üN bei 16 °C inkubiert. Nach der erfolgreichen Ligation und vor der Transformation wurde der komplette Ligationsansatz dialysiert, indem er für 10 min auf eine Dialyse-Membran gegeben wurde, die auf ca. 5 ml MilliQ-Wasser schwamm. Die Dialyse entfernte alle Salze, die sonst bei der Elektroporation gestört hätten. Anschließend wurde ca. 1 μl des Ligationansatzes für die Transformation verwendet.

Für die Ligation von PCR-Fragmenten in einen Standardvektor (hier pSC-B-amp/kan, 6.3.4.4) wurde das *StrataClone Blunt PCR Cloning Kit* benutzt. Die Ligation und anschließende Transformation wurde dabei nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.1.10 Isolierung genomischer DNA

5.1.10.1 DNA-Isolierung aus Embryonen

Die genomische DNA aus Embryonen wurde unter Verwendung der Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert. Dazu musste der Embryo zu Beginn halbiert werden. Eine Hälfte wurde für die spätere β-Gal Färbung und ein Drittel der zweiten Hälfte zur Isolierung der genomischen DNA verwendet. Der Rest des Embryos wurde bei $-20\,^{\circ}\mathrm{C}$ eingefroren.

Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 13 500 rpm und RT durchgeführt. Zu einem Sechstel des Embryos wurden 700 μl DNA-Lysispuffer hinzugegeben und bei $55\,^{\circ}\mathrm{C}$ mehrere Stunden inkubiert, bis das Gewebe komplett gelöst war. Zu dieser Suspension wurden 500 μl Phenol/Chloroform gegeben, sehr gut gevortext, $10\,\mathrm{min}$ zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein neues $1{,}5\,\mathrm{ml}$-Reaktionsgefäß überführt. Zu dieser Lösung wurden 500 μl Chloroform/Isoamylalkohol gegeben, erneut sehr gut gevortext, wieder $10\,\mathrm{min}$ zentrifugiert und die obere Phase erneut in ein frisches $1{,}5\,\mathrm{ml}$-Reaktionsgefäß überführt. Diesmal wurden 500 μl Isopropanol hinzugegeben, gemischt, das entstandene DNA-Pellet $10\,\mathrm{min}$ abzentrifugiert, einmal mit 70 % EtOH gewaschen und an der Luft getrocknet. Nachdem die DNA getrocknet war, wurde sie in 150 μl 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) üN bei RT gelöst und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei $4\,^{\circ}\mathrm{C}$ aufbewahrt.

5.1.10.2 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen

Bei adulten Tieren erfolgte die Isolierung der genomischen DNA aus einem $0{,}5\,\mathrm{cm}$ langen Schwanzstück unter Verwendung des *Wizard Genomic DNA Purification Kits* nach den Anweisungen des Herstellers. Das erhaltene DNA-Pellet wurde in 100 μl 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) üN bei RT gelöst.

5.1.11 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten aus genomischer DNA oder Plasmid-DNA erfolgte standardmäßig mit Hilfde der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Die Reaktion kann in drei Phasen unterteilt werden: Denaturierung, Anlagerung (*Annealing*) und Verlängerung (*Elongation*). Bei der Denaturierung wird der DNA-Doppelstrang in die Einzelstränge geteilt. Anschließend können sich die Primer jeweils am 5'-Ende der Stränge an ihre komplementäre Sequenz anlagern und im folgenden Schritt mit Hilfe der DNA-Polymerase verlängert werden. Diese drei Phasen werden mehrmals bei einer PCR-Reaktion wiederholt, wodurch sich die DNA-Menge exponentiell vermehrt. Vor diesem Zyklus findet ein längerer Schritt der Denaturierung bei $95\,^{\circ}\mathrm{C}$ und am Ende ein längerer Schritt der Elongation bei $72\,^{\circ}\mathrm{C}$ statt. Nach dieser Zeit werden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei $10\,^{\circ}\mathrm{C}$ in der PCR-Maschine oder bei $4\,^{\circ}\mathrm{C}$ im Kühlschrank aufbewahrt. Die spezifischen Bedingungen (Primersequenzen, genaue Temperaturbedingungen, Zyklendauer und Fragmentgröße) wurden für jede PCR angepasst und können im Abschnit 4.5 nachgeschlagen werden. Um die Fragmentgröße der amplifizierten DNA-Fragmente zu bestimmten, wurden die PCR-Reaktionen im Anschluss auf ein Agarose-Gel geladen. Die verwendeten PCR-Ansätze sind in Tab. 5.1 dargestellt.

Tab. 5.1: Pipettieransätze für die Genotypisierungs-PCRs

0,7 µl	gDNA	1,0 µl	gDNA
2,5 µl	10x Quiagen Puffer	20,0 µl	5x Herculase Puffer
0,5 µl	10 pmol/µl Rab38_F	2,5 µl	10 pmol/µl Rosa_5HA
0,5 µl	10 pmol/µl Rab38_R	2,5 µl	10 pmol/µl Rosa_SA1
0,5 µl	10 mM dNTPs	2,0 µl	10 mM dNTPs
0,2 µl	Quiagen Taq-Polymerase	1,0 µl	Herculase
ad 25,0 µl	H_2O	ad 100,0 µl	H_2O

1,0 µl	gDNA	1,0 µl	gDNA
20,0 µl	5x Herculase Puffer	20,0 µl	5x Herculase Puffer
2,5 µl	10 pmol/µl Rosa_pA2	2,5 µl	10 pmol/µl Rosa_5HA
2,5 µl	10 pmol/µl Rosa_3HA	2,5 µl	10 pmol/µl Rosa_3HA
2,0 µl	10 mM dNTPs	2,0 µl	10 mM dNTPs
1,0 µl	Herculase	1,0 µl	Herculase
ad 100,0 µl	H_2O	ad 100,0 µl	H_2O

5.1.12 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, bei denen die Kontrolle auf dem Agarose-Gel eine spezifische Bande zeigte, wurden vor ihrer weiteren Verwendung mit dem *Qiaquick PCR Purification Kit* nach den Herstellerangaben aufgereinigt, um den PCR-spezifischen Puffer und die Primer zu entfernen.

5.1.13 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Um die Sequenz eines klonierten oder per PCR amplifizierten DNA-Fragmentes zu bestimmen, wurden Aliquots der DNA mit den speziell ausgesuchten Primern entweder zu SequiServe (Vaterstetten, Deutschland) oder GATC (Konstanz, Deutschland) geschickt. Die von dort erhaltenen DNA-Sequenzen wurden anschließend mit der VectorNTi Software (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) analysiert.

5.1.14 *Southern Blot* Analyse

Die Methode des *Southern Blots* basiert auf dem durch Kapillarkräfte vermittelten Transfer von verdauter, genomischer DNA auf eine Nylonmembran und der Immobilisierung der DNA auf dieser. Der genaue Ablauf der *Southern Blot*-Analyse wird im folgenden erklärt. Alle beschriebenen Arbeiten im Radioaktiv-Labor wurden von Dr. Ralf Kühn durchgeführt.

5.1.14.1 Restriktionsverdau und *Blotten* der genomischen DNA

Es wurden ca. 6 μg genomische DNA mit 100 U des entsprechenden Restriktionsenzyms in einem Gesamtvolumen von 30 μl üN bei der entsprechenden Temperatur verdaut (Tab. 5.2). Falls *fast digest (FD)* Restriktionsenzyme verwendet wurden, geschah dies unter Anwendung der Herstelleranweisungen.

Tab. 5.2: Pipettierschemata für die verschiedenen *Southern Blot*-Genotypisierungen

15,0 μl	gDNA	15,0 μl	gDNA	15,0 μl	gDNA
3,0 μl	10x NEB3	3,0 μl	10x NEB4	3,0 μl	10x NEB3
0,3 μl	100x BSA	0,3 μl	100x BSA	0,3 μl	100x BSA
100 U	EcoRV (NEB)	100 U	XbaI (NEB)	100 U	EcoRV (NEB)
				100 U	SwaI (NEB)
ad 30 μl	H_2O	ad 30 μl	H_2O	ad 30 μl	H_2O
15,0 μl	gDNA	15,0 μl	gDNA	15,0 μl	gDNA
3,0 μl	10x NEB4	3,0 μl	10x NEB3	3,0 μl	10x NEB4
0,3 μl	100x BSA	0,3 μl	100x BSA	0,3 μl	100x BSA
100 U	ApaI (NEB)	100 U	BamHI (NEB)	100 U	ApaLI (NEB)
ad 30 μl	H_2O	ad 30 μl	H_2O	ad 30 μl	H_2O
15,0 μl	gDNA				
3,0 μl	10x FD Green				
3,0 μl	SexA1 FD (Fermentas)				
ad 30 μl	H_2O				

Die verdaute DNA wurde am nächsten Tag auf ein 0,8 %igen Agarose/TBE-Gel mit TBE als Laufpuffer geladen und bei 50 bis 70 V, abhängig von der erwarteten Bandengröße, üN aufgetrennt. Am folgenden Tag wurde das Gel für 2 h unter ständigem schütteln in Denaturierungspuffer denaturiert, anschließend die Neutralisation durchgeführt, indem das Gel zwei Mal für 2 h in Neutralisationslösung geschüttelt und danach mit 2x SSC gewaschen wurde. Das so vorbehandelte Gel wurde mit den Öffnungen der Taschen nach unten auf *Whatman 3MM* Filterpapier gelegt, das über einer Plexiglasplatte lag und dessen Enden in 20x SSC eintauchten. Die nicht vom Gel bedeckten Ränder des Filterpapiers wurden mit Plastikfolie ausgelegt, um einen Pufferfluss außerhalb der Gelfläche zu vermeiden. Auf das Gel wurde eine mit 2x SSC angefeuchtete Hybond N^+ Nylonmembran und vier Lagen ebenfalls angefeuchtetes Filterpapier gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den Lagen keine Luftblasen befanden, die den Transfer stören würden. Abschließend folgten mehrere Lagen saugfähiger, trockener Zellstoff. Die DNA wurde während einer Transferzeit von zwei Tagen durch die kapillaren Kräfte unter Verwendung des 20x SSC als Fließmittel auf die Nylonmembran übertragen. Diese wurde direkt nach dem Abbau des *Blots* mit der übertragenen DNA durch UV-Bestrahlung im UV-DNA/RNA-*crosslinker* vernetzt, in Folie eingeschweißt und bis zur Hybridisierung bei $-20\,^{\circ}C$ aufbewahrt.

5.1.14.2 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Zur Herstellung der späteren *Southern Blot* Sonden wurden die entsprechenden Vektoren (6.3.4.1, 6.3.4.2, 6.3.4.2.1, 6.3.4.2.2) mit den korrespondierenden Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben verdaut und die Fragmente der korrekten Größe aus dem Gel isoliert. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei $-20\,^{\circ}\mathrm{C}$ eingefroren. Um die *Rab38*-Sonde zu gewinnen, wurde das entsprechende Fragment mit Hilfe der Primer Rab38_5'_F/Rab38_5'_R in einer PCR-Reaktion aus der genomischen DNA amplifiziert, aufgereinigt und anschließend bis zur weiteren VErwendung bei $-20\,^{\circ}\mathrm{C}$ eingefroren.

Für die spätere Hybridisierung wurden 50 bis 100 ng der ausgewählten DNA-Sonde (zwischen 144 bis 600 bp) mit α-^{32}P-dCTP (3000 Ci/mmol) unter Verwendung des *HighPrime DNA Labbeling Kits* nach Herstellerangaben radioaktiv markiert. Nicht eingebaute, radioaktive Nukleotide konnten durch die Zentrifugation in einer *Microspin S-300* Säule entfernt werden.

5.1.14.3 Hybridisierung

Vor der Hybridisierung wurde die Membran in einer Hybridisierungsflasche mit einer geeigneten Menge *Church*-Puffer für 1 h bei $67\,^{\circ}\mathrm{C}$ inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die radioaktiv markierte Sonde für 5 min bei $95\,^{\circ}\mathrm{C}$ denaturiert, auf Eis abgekühlt und anschließend zu dem bereits verwendeten *Church*-Puffer hinzugefügt. Die Membran wurde bei $65\,^{\circ}\mathrm{C}$ für längere DNA-Sonden üN hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal mit vorgewärmter Waschlösung I für 30 min bei $65\,^{\circ}\mathrm{C}$ gewaschen, um ungebundene und unspezifisch hybridisierte DNA-Sonden zu entfernen. Wenn nötig wurde ein dritter Waschschritt mit der Waschlösung II bei $65\,^{\circ}\mathrm{C}$ für 30 min hinzugefügt.
Falls die Membran nach der ersten Detektierung des radioaktiven Signals für eine zweite Sonde verwendet werden sollte, konnte die erste Sonde mit der *stripping*-Lösung weggewaschen werden. Dafür wurde die Membran für 5 bis 10 min in der *stripping*-Lösung gekocht und gründlich mit 2x SSC gewaschen bevor die nächste Hybridisierung gestartet wurde.

5.1.14.4 Autoradiographie

Die hybridisierte Membran wurde nach dem Waschen getrocknet, in Klarsichtfolie eingeschlagen und in eine Autoradiographie-Kassette geklebt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm eingelegt. Der Film wurde für 1-5 Tage, abhängig von der Signalintensität, bei $-80\,^{\circ}\mathrm{C}$ exponiert. Nach dieser Expositionsdauer wurde der Film in der Entwicklermaschine nach Herstellerangaben entwickelt, das Bandenmuster analysiert und der entwickelte Film zur späteren digitalen Verwendung eingescannt.

5.1.15 *In vitro* Transkription der RNA

Es wurden 20 μg Plasmid-DNA mit 100 U eines Restriktionsenzyms, das nur einmal am 3'-Ende der mRNA-kodierenden Region schneidet, in dem entsprechenden Puffer für 2 h bei $37\,^{\circ}\mathrm{C}$ verdaut. Anschließend wurden 0,1 Vol. 3 M NaAc und 2,5 Vol. 100 % EtOH hinzugegeben und die Lösung 1 h bei RT inkubiert. Das gebildete DNA-Pellet wurde bei 13 500 rpm abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet mit 70 % EtOH (hergestellt mit RNAse freiem Wasser) gewaschen. Nach dem Trocknen der DNA wurde sie in 20 μl RNAse freiem Wasser gelöst und

die Konzentration auf einem Gel bestimmt. Zur *in vitro*-Transkription wurde 1 μg der verdauten DNA mit 2 μl 10x Puffer, 10 μl 2x NTP/CAP, 2 μl Enzym-Mix vermischt, mit RNAse freiem Wasser auf 20 μl aufgefüllt und für 2 h bei 37 °C inkubiert (Verwendung des *mMessage mMachine T7 Ultra Kits*).
Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurden zum Reaktionsansatz 20 μl 5x EPAP-Puffer, 10 μl 25 mM $MnCl_2$, 10 μl 10mM ATP, 4 μl E-PAP-Mix hinzugefügt, mit RNAse freiem Wasser erneut auf 100 μl aufgefüllt und für 1 h bei 37 °C inkubiert (Verwendung des *Poly(A)Tailing Kits*).
Um die entstandene RNA aufzureinigen wurden 350 μl Bindepuffer und 250 μl 100 % EtOH zu dem Ansatz gegeben, gemischt und alles auf eine Säule des *MEGAclear Kits* geladen. Diese wurde für 1 min bei 13 500 rpm zentrifugiert, zweimal mit 500 μl Waschlösung aus dem *Kit* gewaschen und zum Schluss 30 s leer zentrifugiert, um die verbliebene Waschlösung komplett zu entfernen. Anschließend wurden 50 μl Elutionslösung auf die Säule gegeben, 10 min bei 70 °C inkubiert und für 1 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, um ein Gesamtvolumen von 100 μl zu erhalten. Danach wurden zu diesem Eluat 0,1 Vol. NH_4Ac und 2,5 Vol. 100 % EtOH gegeben, 30 min bei −20 °C inkubiert und das RNA-Pellet für 15 min bei 13 500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 μl 70 % EtOH (hergestellt mit RNAse-freiem Wasser) gewaschen, an der Luft getrocknet und anschließend im entsprechenden Lösungsmittel für die weitere Verwendung gelöst.

5.1.16 Herstellung der Injektionslösungen für die Vorkern-Injektion

Das RNA-Pellet wurde in diesem Fall in 50 μl $T_{10}E_1$-Injektionspuffer resuspendiert (Wefers *et al.*, 2012), 10 min zum Lösen auf Eis gestellt und 2 μl abgenommen um die Konzentration im Photometer zu bestimmen.
15 μg des gewünschten Integrations-Plasmids wurden mit 0,1 Vol. 3 M NaAc und 2,5 Vol. 100 % EtOH versetzt, 5 min bei RT inkubiert und 10 min bei 13 500 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 500 μl 70 % EtOH (hergestellt mit Embryo getestetem Wasser) gewaschen und an der Luft getrocknet. Die DNA wurde anschließend in 50 μl $T_{10}E_1$ Injektionspuffer für 15 min bei RT gelöst und die Konzentration auf einem Gel bestimmt.
Die DNA und RNA wurden so mit dem Injektionspuffer in einem Gesamtvolumen von 250 μl verdünnt, dass die gewünschten Konzentrationen an DNA und RNA für die Vorkern-Injektion erhalten wurden. Der Mix wurde anschließend für 15 min bei 13 500 rpm und 4 °C zentrifugiert und ein Überstand von 200 μl in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, um mögliche Partikelverunreinigungen zu entfernen. Die 200 μl wurden in 30 μl Aliquots aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung für die Vorkern-Injektion bei −80 °C aufbewahrt.

5.2 Histologie

5.2.1 lacZ-Färbung von Embryonen

Das β-*Gal*-Gen ist ein gebräuchlicher Reporter, der bereits in zahlreichen Anwendungen verwendet wurde. Sein Produkt, das bakterielle Enzym β-Galactosidase wandelt X-Gal in Galactosidase und einen nicht-löslichen blauen Farbstoff, 5,5-Dibromo-4,4-dichloro-indigo, um. Für die Detektierung seiner Expression und dem damit erfolgenden Nachweis der β-*Gal*-Aktivität in den Mäusen wurde folgendes Protokoll verwendet.

Die Haut eines halben Embryos wurde perforiert und dieser anschließend in 4 % PFA mit 0,2 % Glutaraldehyd für 60 bis 90 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde er viermal für jeweils 10 min mit PBS gewaschen. Während dieser Waschschritte wurde die lacZ/Chloroquin/Triton-Lösung frisch vorbereitet und der Embryo nach dem Waschen darin für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 0,025 Vol. X-Gal hinzugegeben und der Embryo für weitere 48 h bei 37 °C in dieser Lösung inkubiert. Nach dieser Zeitspanne wurde der Embryo erneut viermal für jeweils 10 min in PBS gewaschen und in PBS mit einigen Tropfen 4 % PFA bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

5.2.2 Analyse der β-*Gal*-Expression in ES-Zellen

Transient transfizierte ES-Zellen wurden vor der Analyse der β-*Gal*-Expression vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 4 %PFA pro Well für 10 min bei RT inkubiert. Das PFA wurde durch das erneute Waschen mit PBS wieder entfernt und die Zellen für 24 h bei 37 °C in 1,5 ml Färbelösung pro Well inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese Lösung durch erneutes Waschen mit PBS entfernt und die Anzahl der blauen Zellen unter dem Mikroskop bestimmt.

5.2.3 lacZ-Färbung von Zygoten zur β-*Gal*-Expressionanalyse

Nach der Pronukleus-Injektion wurden die Zygoten bei 37 °C gelagert bis sie das Morula-Stadium erreicht hatten. Zu diesem Zeitpunkt wurde durch die exakt 30 s lange Behandlung mit Tyrodes die *Zona pellucida* entfernt. Anschließend wurden sie zur sofortigen und gründlichen Entfernung des Tyrodes viermal mit M2-Medium und danach viermal mit PBS gewaschen, für 10 min in 4 % PFA/PBS inkubiert und danach wieder mit PBS gewaschen. Zum Schluss wurde die Schale komplett mit der lacZ-Färbelösung geflutet und die Morulas darin üN bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie herausgesammelt, erneut mit PBS gewaschen, um die Färbelösung gründlich zu entfernen, und die Färbung durch den blauen Farbstoff wurde unter dem Mikroskop analysiert.
Alle Transferschritte von einem Medium in das Nächste wurden jedes Mal mit Hilfe der Mundpipette durchgeführt.

5.3 Zellkultur

Alle Arbeiten in beiden Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

5.3.1 Arbeiten mit ES-Zellen

ES-Zellen stammen ursprünglich aus der inneren Zellmasse von Blastozysten. Ihre Pluripotenz ermöglicht es ihnen in verschiedene Zelltypen *in vitro* und auch *in vivo* zu differenzieren. Es ist aber ebenso gut möglich, ES-Zellen in einem undifferenzierten Stadium in Kultur zu halten. Dafür werden sie unter speziellen Bedingungen kultiviert. Das DMEM-Kulturmedium wird mit LIF versetzt, speziell getestetes FCS wird verwendet und die ES-Zellen wachsen auf Gelatine bei 37 °C und 5 % CO_2. Während der Expansionphase werden sie alle 2 Tage gesplittet, um eine Differenzierung in andere Zelltypen zu verhindern.
Die Maus-ES-Zelllinie IDG3.2, die hier verwendet wurde, stammt aus der F1-Generation einer Verpaarung von den Mausstämmen C57BL/6J und 129SvEv/Tac. Die ES-Zellen wurden zu Beginn dieser Arbeit zur anfänglichen Bestimmung der Effizienz der ZFN verwendet.

5.3.1.1 Splitten von ES-Zellen

Zur Expansion wurden die Zellen alle zwei Tage gesplittet. Zu diesem Zeitpunkt sollten die ES-Zellen einzelne, lichtbrechende Kolonien gebildet haben. Nachdem die Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert wurden, wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und danach für 5 min bei 37 °C mit 2 ml Trypsin behandelt, um sie vom Boden der Petrischale zu lösen. Die Reaktion wurde durch das Hinzufügen der gleichen Menge an Medium nach dieser Zeit gestoppt und die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Anschließend wurden sie in einen 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, für 4 min bei 1200 rpm zentrifugiert und in 2 ml frischem Medium resuspendiert. Für eine 1:8-Verdünnung, bei der die Dichte der Zellen nach zwei Tagen so hoch ist wie vor der Verdünnung, wurde zu 1 ml der resuspendierten Zellen 47 ml frisches Medium gegeben und je 12 ml anschließend auf eine 10 cm Schale pipettiert. Dafür wurden die Petrischalen, bevor die ES-Zellen ausplattiert wurden, mit 5 ml 1 %iger Gelatinelösung kurzzeitig inkubiert, um sie damit zu beschichten. Da die gesamte Prozedur die ES-Zellen schädigen kann, wurde sie immer so zügig aber vorsichtig wie möglich durchgeführt.

5.3.1.2 Einfrieren von ES-Zellen

ES-Zellen werden für kurze Zeit (max. 4 Monate) bei −80 °C oder für längere Zeit in flüssigem Stickstoff bei −170 °C aufbewahrt. Die Zellen wurden dafür trypsinisiert, zentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Einfrier-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde in einem Einfrier-Container bei −80 °C weggefroren. Aufgrund des Isopropanols im Container senkt sich die Temperatur im Inneren des Einfrier-Reaktionsgefäßes sehr langsam bis sie nach mehreren Stunden die endgültige Temperatur des Gefrierschranks erreicht. Für eine Langzeitlagerung wurden die Proben in flüssigen Stickstoff transferiert.

5.3.1.3 Auftauen von ES-Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad langsam aufgetaut und in 4 ml vorgewärmtes, frisches Medium überführt. Um das Mediumgemisch, das auch noch das Einfriermedium beinhaltet, zu entfernen, wurden die Zellen bei 1200 rpm für 4 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine angemessene Anzahl an Petrischalen mit Gelatine ausplattiert. Das Medium von frisch aufgetauten Zellen wurde bereits am nächsten Tag wieder gewechselt, um verbliebene Spuren an DMSO zu entfernen.

5.3.1.4 Elektroporation von ES-Zellen

Eine physikalische Methode um Fremd-DNA in ES-Zellen einzubringen ist die Elektroporation, bei der die Zellmembran kurzzeitig mit elektrischen Impulsen für die DNA durchlässig gemacht wird. Die Membran wird dadurch jedoch nicht zerstört. Zirkuläre Plasmide bleiben transient in der Zelle, wohingegen zuvor linearisierte Plasmide in das Genom integriert werden können. Auch ist eine gleichzeitige Co-Transfektion von mehreren Plasmiden möglich.
Bei der Elektroporation wurden für jede DNA-Probe 10^6-10^7 ES-Zellen verwendet. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsupsension in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und die lebenden ES-Zellen gezählt. Die Zellzahl eines Quadranten multipliziert mit 10000 entspricht der Zahl an Zellen in 1 ml Zellsuspension. Die Zellen wurden für die Elektroporation trypsinisiert, die Zellzahl bestimmt und entsprechend der Probenanzahl auf mehrere Falcon-Röhrchen verteilt. Die so aufgeteilten Zellen wurden bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 800 µl PBS resuspendiert. Dieses PBS enthielt bereits die zu elektroporierende DNA, die davor steril gefällt und auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt worden war. Für 10^7 Zellen wurden maximal 50 µg DNA-Gesamtmenge benutzt, für geringere Zellzahlen wurde die DNA-Menge entsprechend angepasst. Die Zell/DNA-Suspension wurde in eine 4 mm Elektroporationsküvette pipettiert und mit folgendem Programm elektroporiert, um bei der transienten Transfektion eine hohe Effizienz zu erreichen: Zeit konstant, 300 V, Küvette 4, TC 2.
Nach der Transfektion wurden die Zellen für 1 min in der Elektroporationsküvette bei RT stehen gelassen, bevor sie mit Medium verdünnt und auf 4-5 frische 10 cm Petrischalen mit Gelatine ausplatiert wurden. Die Zellen wurden für zwei Tage bei 37 °C kultiviert und anschließend für die weiteren Analysen verwendet.

5.3.2 Arbeiten mit HEK293-Zellen

Für einige Testexperimente wurden HEK-293-Zellen verwendet. Dies sind primäre, humane, embryonale Nierenepithelzellen, die mit DNA-Fragmenten des humanen Adenovirus Typ 5 transformiert wurden (Graham *et al.*, 1977). Diese Zellen werden gerne für Testexperimente verwendet, da sie leicht zu kultivieren sind

5.3.2.1 Kultivierung der Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad langsam aufgetaut, in 5 ml DMEM-Medium mit FCS und L-Glutamin überführt und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 12 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellen auf 10 cm Schalen ausgesät. Sie wurden einen Tag vor der Transfektion gesplittet. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Das Trypsin wurde durch die Zugabe von frischem Medium inaktiviert und durch einen zusätzlichen Waschschritt mit PBS entfernt. Die vereinzelten Zellen wurden anschließend in einer 1:4-Verdünnung auf 10 cm Schalen ausgesät und erneut bei 37 °C in einer 5 % CO_2-Atmosphäre kultiviert. Dadurch wurde erreicht, dass sich am Tag der Transfektion alle Zellen im gleichen Zellteilungsstadium befanden. Somit waren bei jedem Versuch einigermaßen gleiche Bedingungen vorhanden.

5.3.2.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Bei der transienten Transfektion von HEK293-Zellen wurde die DNA nicht stabil in das Genom der Zellen integriert, sondern bleibt als exogenes Plasmid erhalten. Es wurde die Methode der Elektroporation zur transienten Transfektion verwendet. Für jede Transfektion wurden 10^6 Zellen und 20 μg DNA-Gesamtmenge verwendet. Die Prozedur erfolgte nach folgendem Protokoll:
Die unter sterilen Bedingungen in PBS gelöste DNA (Konzentration jeweils 1 $\mu g/\mu l$) wurde entsprechend dem gewünschten Ansatz zusammengemischt und mit dem Füll-Vektor pBS (Abb. 6.3.4.4.1) auf die gleiche DNA-Gesamtmenge eingestellt. Am Ende wurde das Reaktionsvolumen mit pBS auf 100 μl aufgefüllt. Die Zellen wurden trypsinisiert und die Zellzahl anschließend im Trypsin-Medium-Gemisch bestimmt. Jeweils 10^6 Zellen wurden in ein 15 ml Falcon überführt, zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und das Zellpellet anschließend in der DNA/PBS-Mischung resuspendiert. Die Suspension wurde in eine Elektroporationsküvette überführt und am Elektroporator mit folgenden Programmeinstellungen transfiziert: Zeit konstant, 225 V, 2 ms, 2 mm Küvette. Die transfizierten Zellen wurden anschließend in 9 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert und auf drei Wells einer 12-Well Platte aufgeteilt. Die Zwischenräume zwischen den einzelnen Wells wurden mit PBS gefüllt, um sicherzustellen, dass in jedem Well die gleiche Temperatur herrscht. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und nach erneuten 24 h wurden die Zellen für die weitere Analyse am Luminometer verwendet.

5.3.2.3 Lysieren von Zellen

Zwei Tage nach der Transfektion wurde die Luciferase-Intensität der Zellen und die Menge an verbrauchtem β-Gal-Substrat gemessen. Dazu wurden 10 ml 5x Lysis-Puffer (*β-Gal Reporter Gene Assay*) mit 38 ml MilliQ-Wasser gemischt und bei −20 °C aufbewahrt. Eine Protease-Inhibitor Tablette wurde in 2 ml MilliQ-Wasser gelöst und ebenfalls bei −20 °C aufbewahrt. Kurz vor dem Lysieren wurden 0,04 Vol. Protease Inhibitor mit 1 Vol. Lysis-Puffer gemischt.
Die Zellen wurden sehr vorsichtig dreimal mit PBS gewaschen, da sie sich leicht vom Boden der Petrischale ablösen. Anschließend wurde pro voll bewachsenes Well ein angemessenes Volumen (ca. 500 bis 700 μl) Lysis-Puffer mit Protease-Inhibitor auf die Zellen gegeben und alles zusammen schüttelnd für 30 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde anschließend in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, 2 min bei 14 000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß auf Eis transferriert. Das Lysat wurde dann entweder bei −80 °C eingefroren oder sofort weiterverwendet.

5.3.2.4 β-Gal Aktivitätsmessung am Luminometer

Falls das Lysat aus der Zellen eingefroren war, wurde es langsam auf Eis aufgetaut und nach dem Auftauen gut gemischt. Von dem aufgetauten oder frisch hergestellten Lysat wurden jeweils 20 μl pro Probe in ein Well einer 96-Well Messplatte für die β-Gal-Messung pipettiert. Dieser Vorgang wurde mit einer zweiten 96-Well Messplatte für die Luciferase-Messung wiederholt. Bei der ersten Messplatte wurden pro Probe 0,4 μl β-Gal Substrat mit 39,6 μl *Assay*-Puffer (β-Gal Reporter *Gene Assay*) gemischt, zum Lysat gegeben und 30 bis 60 min bei RT im Dunkeln geschüttelt. Für die spätere Messung am Luminometer wurden zusätzlich pro Probe 20 μl Initiationsreagenz (plus 1,5 ml Sicherheitsvolumen) aus 1 Vol. *Enhancer* plus 5 Vol. Initiationslösung vorbereitet und im Dunkeln gelagert. Außerdem wurden 100 μl Luciferase-Substrat pro Well (plus 1,5 ml Sicherheitsvolumen) im Dunkeln bei RT auf einem Schüttler aufgetaut.
Nach der Inkubationszeit wurden die beiden Messungen am Luminometer, den Herstelleranweisungen folgend, durchgeführt. Dazu wurden die folgenden Parameter aus Tab. 5.3 in der Hersteller-eigenen Software eingestellt.

Tab. 5.3: Messparameter am Luminometer

		β-Gal-Messung	Luciferase-Messung
Verteilung der Reagenzien	Injektor	2	2
	Volumen	20	100
	Geschwindigkeit	mittel	mittel
	Messung	pro Well	pro Well
	Wiederholungen	ja	ja
Schütteln	Dauer	2.0	2.0
	Geschwindigkeit	schnell	schnell
	Durchmesser	0.1	0.1
	Art	kreisförmig	kreisförmig
	Messung	pro Well	pro Well
	Wiederholungen	ja	ja
Messung	Name	β-Gal	*Firefly*
	gemessene Zeit	5.0	5.0
	Messung	pro Well	pro Well

5.4 Die Arbeit mit Mäusen

5.4.1 Maushaltung

Alle Mäuse wurden nach den nationalen und internationalen Richtlinien gehalten und gezüchtet. Falls sie sich nicht in der Verpaarung befanden, wurden sie in gleichgeschlechtlichen, nicht nach Genotypen getrennten Gruppen mit maximal fünf Tieren in einzeln belüfteten Käfigen gehalten. Futter und Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung und ein 12 h Licht/Dunkel Zyklus wurde aufrecht erhalten. Die Temperatur im Tierhaus lag bei $22\pm2\,^{\circ}\mathrm{C}$ mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55\pm5\,\%$.
Für die Zucht wurde ein Männchen mit einem oder maximal zwei Weibchen verpaart und die Nachkommen in einem Alter von vier Wochen von der Mutter entwöhnt. Zu diesem Zeitpunkt wurden sie nach ihrem Geschlecht getrennt, Ohrlöcher zur eindeutigen Identifizierung gemacht und ein kurzes Stück vom Schwanz für die Genotypisierung abgeschnitten.

5.4.2 Vorkern-Injektion in Zygoten

Für die Gewinnung der Zygoten wurden die Weibchen hormonell superovuliert um die Zahl der Zygoten zu erhöhen. Die Superovulation wurde mit Analoga zu dem Gonadotropin Follikel stimulierendem Hormon (PHSG) und dem Luteinisierungshormon (hCG) erreicht. Dadurch erhielt man pro Weibchen mehr Zygoten als ohne Superovulation, wodurch die Anzahl der verwendeten Spendertiere minimiert wurde. Die Hormone wurden intraperitoneal injiziert, beginnend mit 7,5 U PMSG um 11 Uhr des ersten Tages, um die Reifung der Follikel zu induzieren. Zwei Tage später um 12 Uhr wurden 7,5 U hCG injiziert, welches die Ovulation der Oozyten einleitet. Nach der Injektion von hCG wurden jeweils ein Weibchen mit einem Männchen für eine Nacht verpaart. Am nächsten Morgen wurde überprüft, ob sich das Männchen mit dem Weibchen gepaart hat. Dies war anhand eines die Vagina verschließenden, weißlichen Pfropfens, dem geronnenem Sekret der beiden vorderen Prostataloben, zu erkennen. Die Ovidukte der schwangeren Weibchen wurden anschließend *post mortem* entnommen, die Zygoten mit M2-Medium aus der Ampulla herausgespült und kurz in M2-Medium mit Hyaluronidase inkubiert, um die Kumulus-Zellen zu entfernen. Eine isolierte Zygote wurde mit Hilfe der Haltekapillare des Mikromanipulators fixiert und mit einer zweiten Kapillare wurden die zu injizierenden Konstrukt-Mischungen von Susanne Weidemann , Adrianne Tasdemir , Peggy Kunath , Dr. Oskar Ortiz und Olena Yefremova in den vom Volumen her größeren, männlichen Vorkern und das Cytoplasma injiziert (Wefers *et al.*, 2012). Anschließend wurden sie bei $37\,^{\circ}\mathrm{C}$ in M2-Medium bis zum Embryotransfer aufbewahrt.

5.4.3 Embryonentransfer

Als Ammentiere für diese frühen Embryonen wurden pseudo-schwangere CD1-Weibchen verwendet. Die Pseudo-Schwangerschaft wurde durch die Verpaarung der Weibchen mit vasektomierten und damit sterilen CD1-Männchen erreicht. Es wurden nur solche Weibchen für den Transfer verwendet, die am Tag nach ihrer Verpaarung einen vaginalen Sekretpfropf ausgebildet hatten. Der Embryonen-Transfer wurde von Susanne Weidemann, Adrianne Tasdemir, und Adelheid Krause durchgeführt.
Für den Embryotransfer wurde unter Narkose (Dosierung abhängig vom Körpergewicht, normalerweise 0,25 ml 1 % Ketamin und 0,1 % Rompun in isotonischer Salzlösung) von lateral der retroperitoneale Hohlraum der Amme geöffnet und die Eierstöcke freigelegt. Die proximalen Seiten der Uteri wurden mit einer dünnen Kanüle perforiert und 10 manipulierte Zygoten pro Seite durch diese Öffnung in den Uterus eingeführt. Das Operationsfeld wurde geschlossen und die Weibchen bis zum Aufwachen auf eine Wärmeplatte gelegt. Um die Dehydrierung der Hornhaut in den Augen zu verhindern, die in einer Erblindung der Mäuse resultieren würde, wurden die Augen während der Operation mit 0,9 % NaCl befeuchtet.

Literaturverzeichnis

Ashworth, J., **Havranek, J.**, **Duarte, C.** und **Sussman, D.**: (2006). Computational redesign of endonuclease DNA binding and cleavage specificity. Nature *441*(2):656–659.

Bedell, V.M., **Wang, Y.**, **Campbell, J.M.**, **Poshusta, T.L.**, **Starker, C.G.**, **Krug Ii, R.G.**, **Tan, W.**, **Penheiter, S.G.**, **Ma, A.C.**, **Leung, A.Y.H.**, **Fahrenkrug, S.C.**, **Carlson, D.F.**, **Voytas, D.F.**, **Clark, K.J.**, **Essner, J.J.** und **Ekker, S.C.**: (2012). In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. Nature .

Beerli, R.R. und **Barbas, C.F.**: (2002). Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. Nature biotechnology *20*(2):135–41.

Beumer, K.J., **Trautman, J.K.**, **Bozas, A.**, **Liu, J.L.**, **Rutter, J.**, **Gall, J.G.** und **Carroll, D.**: (2008). Efficient gene targeting in Drosophila by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. PNAS *105*(50):19821–19826.

Boch, J. und **Bonas, U.**: (2010). Xanthomonas AvrBs3 Family-type III Effectors : Discovery and Function. Annual Review of Phytopathology (April):1–18.

Boch, J., **Scholze, H.**, **Schornack, S.**, **Landgraf, A.**, **Hahn, S.**, **Kay, S.**, **Lahaye, T.**, **Nickstadt, A.** und **Bonas, U.**: (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science (New York, NY) *326*(5959):1509–12.

Bogdanove, A.J. und **Voytas, D.F.**: (2011). TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. Science (New York, NY) *333*(6051):1843–6.

Bozas, A., **Beumer, K.J.**, **Trautman, J.K.** und **Carroll, D.**: (2009). Genetic Analysis of Zinc-Finger Nuclease-Induced Gene Targeting in Drosophila. Genetics :641–651.

Bradley, P.: (2012). Structural modeling of TAL effector-DNA interactions. Protein science : a publication of the Protein Society *000*:1–4.

Branda, C.S. und **Dymecki, S.M.**: (2004). Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. Developmental cell *6*(1):7–28.

Brinster, R.L., **Chen, H.Y.**, **Trumbauer, M.**, **Senear, a.W.**, **Warren, R.** und **Palmiter, R.D.**: (1981). Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. Biotechnology (Reading, Mass) *24*(November):411–9.

Brinster, R., **Braun, R.**, **Lo, D.**, **Avarbock, M.**, **Oram, F.** und **Palmiter, R.**: (1989). Targeted correction of a major histocompatibility class II E alpha gene by DNA microinjected into mouse eggs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *86*(18):7087.

Brown, W.R.a., **Lee, N.C.O.**, **Xu, Z.** und **Smith, M.C.M.**: (2011). Serine recombinases as tools for genome engineering. Methods (San Diego, Calif) *53*(4):372–9.

Capecchi, M.: (1989). The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. Trends in Genetics *5*(3).

Carbery, I.D., **Ji, D.**, **Harrington, A.**, **Brown, V.**, **Weinstein, E.J.**, **Liaw, L.** und **Cui, X.**: (2010). Targeted Genome Modification in Mice Using Zinc Finger Nucleases. Genetics .

Carlson, D.F., **Tan, W.**, **Lillico, S.G.**, **Stverakova, D.**, **Proudfoot, C.**, **Christian, M.**, **Voytas, D.F.**, **Long, C.R.**, **Whitelaw, C.B.a.** und **Fahrenkrug, S.C.**: (2012). Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*(43):17382–7.

Carroll, D.: (2011). Genome engineering with zinc-finger nucleases. Genetics *188*(4):773–82.

Cermak, T., **Doyle, E.L.**, **Christian, M.**, **Wang, L.**, **Zhang, Y.**, **Schmidt, C.**, **Baller, J.a.**, **Somia, N.V.**, **Bogdanove, A.J.** und **Voytas, D.F.**: (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic acids research *39*(12):e82.

Chen, C.m., **Krohn, J.**, **Bhattacharya, S.** und **Davies, B.**: (2011a). A comparison of exogenous promoter activity at the ROSA26 locus using a PhiC31 integrase mediated cassette exchange approach in mouse ES cells. PloS one *6*(8):e23376.

Chen, F., **Pruett-Miller, S.M.**, **Huang, Y.**, **Gjoka, M.**, **Duda, K.**, **Taunton, J.**, **Collingwood, T.N.**, **Frodin, M.** und **Davis, G.D.**: (2011b). High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. Nature methods (July):4–8.

Christian, M., **Cermak, T.**, **Doyle, E.L.**, **Schmidt, C.**, **Zhang, F.**, **Hummel, A.**, **Bogdanove, A.J.** und **Voytas, D.F.**: (2010). Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. Genetics :757–761.

Chu, X., **Zhang, Z.**, **Yabut, J.**, **Horwitz, S.**, **Levorse, J.**, **Li, X.q.**, **Zhu, L.**, **Lederman, H.**, **Ortiga, R.**, **Strauss, J.**, **Li, X.**, **Owens, K.a.**, **Dragovic, J.**, **Vogt, T.**, **Evers, R.** und **Shin, M.K.**: (2012). Characterization of multidrug resistance 1a/P-glycoprotein knockout rats generated by zinc finger nucleases. Molecular pharmacology *81*(2):220–7.

Clark, P.R., **Pober, J.S.** und **Kluger, M.S.**: (2008). Knockdown of TNFR1 by the sense strand of an ICAM-1 siRNA: dissection of an off-target effect. Nucleic acids research *36*(4):1081–97.

Connelly, J., **Barker, J.** und **Pruett-Miller, S.**: (2010). Gene correction by homologous recombination with zinc finger nucleases in primary cells from a mouse model of a generic recessive genetic disease. Molecular Therapy *18*(6):1103–1110.

Cornu, T.I., **Thibodeau-Beganny, S.**, **Guhl, E.**, **Alwin, S.**, **Eichtinger, M.**, **Joung, J.K.**, **Joung, J.K.** und **Cathomen, T.**: (2008). DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy *16*(2):352–8.

Cornu, T. und **Cathomen, T.**: (2010). Quantification of zinc finger nuclease-associated toxicity. Methods Mol Biol :237–245.

Dahlem, T.J., **Hoshijima, K.**, **Jurynec, M.J.**, **Gunther, D.**, **Starker, C.G.**, **Locke, A.S.**, **Weis, A.M.**, **Voytas, D.F.** und **Grunwald, D.J.**: (2012). Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome. PLoS genetics *8*(8):e1002861.

de Souza, N.: (2011). Primer: genome editing with engineered nucleases. Nature Methods *9*(1):27–27.

Deng, D., **Yan, C.**, **Pan, X.**, **Mahfouz, M.**, **Wang, J.**, **Zhu, J.K.**, **Shi, Y.** und **Yan, N.**: (2012). Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. Science (New York, NY) *335*(6069):720–3.

Ding, S., **Wu, X.**, **Li, G.**, **Han, M.**, **Zhuang, Y.** und **Xu, T.**: (2005). Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. Cell *122*(3):473–83.

Doyon, Y., **McCammon, J.**, **Miller, J.** und **Faraji, F.**: (2008). Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. Nature *26*(6):702–708.

Doyon, Y., **Choi, V.M.**, **Xia, D.F.**, **Vo, T.D.**, **Gregory, P.D.** und **Holmes, M.C.**: (2010). transient cold shock enhances zinc-finger nuclease – mediated gene disruption. Nature Methods :1–3.

Ellis, B.L., **Hirsch, M.L.**, **Porter, S.N.**, **Samulski, R.J.** und **Porteus, M.H.**: (2012). Zinc-finger nuclease-mediated gene correction using single AAV vector transduction and enhancement by Food and Drug Administration-approved drugs. Gene therapy (November 2011):1–8.

Elrod-Erickson, M., **Rould, M.a.**, **Nekludova, L.** und **Pabo, C.O.**: (1996). Zif268 protein-DNA complex refined at 1.6 A: a model system for understanding zinc finger-DNA interactions. Structure (London, England : 1993) *4*(10):1171–80.

Fattah, F., **Lee, E.**, **Weisensel, N.**, **Wang, Y.**, **Lichter, N.** und **Hendrickson, E.**: (2010). Ku regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells. PLoS genetics *6*(2):e1000855.

Flisikowska, T., **Thorey, I.S.**, **Offner, S.**, **Ros, F.**, **Lifke, V.**, **Zeitler, B.**, **Rottmann, O.**, **Vincent, A.**, **Zhang, L.**, **Jenkins, S.**, **Niersbach, H.**, **Kind, A.J.**, **Gregory, P.D.**, **Schnieke, A.E.** und **Platzer, J.**: (2011). Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases. PloS one *6*(6):e21045.

Fung, H. und **Weinstock, D.M.**: (2011). Repair at single targeted DNA double-strand breaks in pluripotent and differentiated human cells. PloS one *6*(5):e20514.

Gabriel, R., **Lombardo, A.**, **Arens, A.**, **Miller, J.C.**, **Genovese, P.**, **Kaeppel, C.**, **Nowrouzi, A.**, **Bartholomae, C.C.**, **Wang, J.**, **Friedman, G.**, **Holmes, M.C.**, **Gregory, P.D.**, **Glimm, H.**, **Schmidt, M.**, **Naldini, L.** und **von Kalle, C.**: (2011). An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. Nature biotechnology (August).

Geurts, A.M., **Cost, G.J.**, **Freyvert, Y.**, **Zeitler, B.**, **Miller, J.C.**, **Choi, V.M.**, **Jenkins, S.S.**, **Wood, A.**, **Cui, X.**, **Meng, X.**, **Vincent, A.**, **Lam, S.**, **Michalkiewicz, M.**, **Schilling, R.**, **Foeckler, J.**, **Kalloway, S.**, **Weiler, H.**, **Ménoret, S.**, **Anegon, I.**, **Davis, G.D.**, **Zhang, L.**, **Rebar, E.J.**, **Gregory, P.D.**, **Urnov, F.D.**, **Jacob, H.J.** und **Buelow, R.**: (2009). Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. Science (New York, NY) *325*(5939):433.

Gordon, J.: (1981). Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. Science *214*(December):1244–1246.

Gordon, J. und **Scangos, G.**: (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proceedings of the *77*(12):7380–7384.

Graham, F.L., **Smiley, J.**, **Russell, W.C.** und **Nairn, R.**: (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. The Journal of general virology *36*(1):59–74.

Guo, J., **Gaj, T.** und **Barbas III, C.**: (2010). Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for Zinc Finger Nucleases. Journal of Molecular Biology *400*(1):96–107.

Halford, S.E., **Catto, L.E.**, **Pernstich, C.**, **Rusling, D.a.** und **Sanders, K.L.**: (2011). The reaction mechanism of FokI excludes the possibility of targeting zinc finger nucleases to unique DNA sites. Biochemical Society transactions *39*(2):584–8.

Hauschild, J., **Petersen, B.**, **Santiago, Y.**, **Queisser, A.L.**, **Carnwath, J.W.**, **Lucas-Hahn, A.**, **Zhang, L.**, **Meng, X.**, **Gregory, P.D.**, **Schwinzer, R.**, **Cost, G.J.** und **Niemann, H.**: (2011). Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America .

Hermey, G., **Mahlke, C.**, **Schwake, M.** und **Sommer, T.**: Der Experimentator: Neurowissenschaften (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2011).

Hitz, C., **Wurst, W.** und **Kühn, R.**: (2007). Conditional brain-specific knockdown of MAPK using Cre/loxP regulated RNA interference. Nucleic acids research *35*(12):e90.

Hockemeyer, D., **Soldner, F.**, **Beard, C.**, **Gao, Q.**, **Mitalipova, M.**, **Dekelver, R.C.**, **Katibah, G.E.**, **Amora, R.**, **Boydston, E.A.**, **Zeitler, B.**, **Meng, X.**, **Miller, J.C.**, **Zhang, L.**, **Rebar, E.J.**, **Gregory, P.D.**, **Urnov, F.D.** und **Jaenisch, R.**: (2009). Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. Nature Biotechnology *27*(9):851–857.

Hockemeyer, D., **Wang, H.**, **Kiani, S.**, **Lai, C.S.**, **Gao, Q.**, **Cassady, J.P.**, **Cost, G.J.**, **Zhang, L.**, **Santiago, Y.**, **Miller, J.C.**, **Zeitler, B.**, **Cherone, J.M.**, **Meng, X.**, **Hinkley, S.J.**, **Rebar, E.J.**, **Gregory, P.D.**, **Urnov, F.D.** und **Jaenisch, R.**: (2011). Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. Nature biotechnology (July):2–5.

Hollis, R., **Stoll, S.** und **Sclimenti, C.**: (2003). Phage integrases for the construction and manipulation of transgenic mammals. Reprod Biol *11*:1–11.

Huang, P., **Xiao, A.**, **Zhou, M.**, **Zhu, Z.**, **Lin, S.** und **Zhang, B.**: (2011). Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. Nature Biotechnology *29*(8):699–700.

Isalan, M.: (2012). Zinc-finger nucleases: how to play two good hands. Nature methods *9*(1):32–4.

Justice, M.J., **Noveroske, J.K.**, **Weber, J.S.**, **Zheng, B.** und **Bradley, A.**: (1999). Mouse ENU mutagenesis. Human molecular genetics *8*(10):1955–63.

Kim, H.J., **Lee, H.J.**, **Kim, H.**, **Cho, S.W.** und **Kim, J.s.**: (2009). Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. Genome Research *19*(7):1279–1288.

Kim, S. und **Kim, J.S.**: (2011). Targeted genome engineering via zinc finger nucleases. Plant biotechnology reports *5*(1):9–17.

Kim, Y.G., **Cha, J.** und **Chandrasegaran, S.**: (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*(3):1156–60.

Krogh, B.O. und **Symington, L.S.**: (2004). Recombination proteins in yeast. Annual review of genetics *38*:233–71.

Lee, H.J., **Kim, E.** und **Kim, J.S.**: (2010). Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. Genome research *20*(1):81–9.

Lee, H.J., **Kweon, J.**, **Kim, E.**, **Kim, S.** und **Kim, J.S.**: (2012). Targeted chromosomal duplications and inversions in the human genome using zinc finger nucleases. Genome research *22*(3):539–48.

Lei, Y., **Guo, X.**, **Liu, Y.**, **Cao, Y.**, **Deng, Y.**, **Chen, X.**, **Cheng, C.H.K.**, **Dawid, I.B.**, **Chen, Y.** und **Zhao, H.**: (2012). Efficient targeted gene disruption in Xenopus embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*(43):17484–9.

Leong, I.U.S., **Lai, D.**, **Lan, C.C.**, **Johnson, R.** und **Love, D.R.**: (2011). Targeted mutagenesis of zebrafish: use of zinc finger nucleases. Birth defects research Part C, Embryo today : reviews *93*(3):249–55.

Li, T., **Huang, S.**, **Jiang, W.Z.**, **Wright, D.**, **Spalding, M.H.**, **Weeks, D.P.** und **Yang, B.**: (2011a). TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. Nucleic acids research *39*(1):359–72.

Li, T., **Huang, S.**, **Zhao, X.**, **Wright, D.a.**, **Carpenter, S.**, **Spalding, M.H.**, **Weeks, D.P.** und **Yang, B.**: (2011b). Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. Nucleic acids research :1–11.

Liu, P.q., **Chan, E.M.**, **Cost, G.J.**, **Zhang, L.**, **Wang, J.**, **Miller, J.C.**, **Guschin, D.Y.**, **Reik, A.**, **Holmes, M.C.**, **Mott, J.E.**, **Collingwood, T.N.** und **Gregory, P.D.**: (2010). Generation of a Triple-Gene Knockout Mammalian Cell Line Using Engineered Zinc-Finger Nucleases. Biotechnology Bioengineering :1–9.

Loftus, S.K., **Larson, D.M.**, **Baxter, L.L.**, **Antonellis, A.**, **Chen, Y.**, **Wu, X.**, **Jiang, Y.**, **Bittner, M.**, **Hammer, J.a.** und **Pavan, W.J.**: (2002). Mutation of melanosome protein RAB38 in chocolate mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*(7):4471–6.

Lois, C., **Hong, E.J.**, **Pease, S.**, **Brown, E.J.** und **Baltimore, D.**: (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. Science (New York, NY) *295*(5556):868–72.

Ma, S., **Zhang, S.**, **Wang, F.**, **Liu, Y.**, **Xu, H.** und **Liu, C.**: (2012). Highly Efficient and Specific Genome Editing in Silkworm Using Custom TALENs. PLOS ONE *7*(9):1–7.

Maeder, M., **Thibodeau-Beganny, S.** und **Osiak, A.**: (2008). Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. Molecular cell *31*(2):294–301.

Maeder, M.L., **Thibodeau-Beganny, S.**, **Sander, J.D.**, **Voytas, D.F.** und **Joung, J.K.**: (2009). Oligomerized pool engineering (OPEN): an 'open-source' protocol for making customized zinc-finger arrays. Nature protocols *4*(10):1471–501.

Mahfouz, M.M., **Li, L.**, **Shamimuzzaman, M.**, **Wibowo, A.**, **Fang, X.** und **Zhu, J.K.**: (2011). De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*(6):2623–8.

Mak, A.N.S., **Bradley, P.**, **Cernadas, R.a.**, **Bogdanove, A.J.** und **Stoddard, B.L.**: (2012). The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. Science (New York, NY) *335*(6069):716–9.

Mashimo, T., **Takizawa, A.**, **Voigt, B.**, **Yoshimi, K.** und **Hiai, H.**: (2010). Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. PLoS One *5*(1).

Mátés, L., **Chuah, M.K.L.**, **Belay, E.**, **Jerchow, B.**, **Manoj, N.**, **Acosta-Sanchez, A.**, **Grzela, D.P.**, **Schmitt, A.**, **Becker, K.**, **Matrai, J.**, **Ma, L.**, **Samara-Kuko, E.**, **Gysemans, C.**, **Pryputniewicz, D.**, **Miskey, C.**, **Fletcher, B.**, **VandenDriessche, T.**, **Ivics, Z.** und **Izsvák, Z.**: (2009). Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. Nature genetics *41*(6):753–61.

Meyer, M., **de Angelis, M.H.**, **Wurst, W.** und **Kühn, R.**: (2010). Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America :15022–6.

Meyer, M., **Ortiz, O.**, **de Angelis, M.H.**, **Wurst, W.** und **Kühn, R.**: (2012). Modeling disease mutations by gene targeting in one-cell mouse embryos. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America :9354–9.

Meyer, M., **Wefers, B.**, **Ortiz, O.**, **Wurst, W.** und **Kühn, R.**: (2011). Gezielte Manipulation des Genoms mit Zinkfingernukleasen. BIOspektrum *17*(5):537–540.

Miller, J.C., **Holmes, M.C.**, **Wang, J.**, **Guschin, D.Y.**, **Lee, Y.l.**, **Rupniewski, I.**, **Beausejour, C.M.**, **Waite, A.J.**, **Wang, N.S.**, **Kim, K.A.**, **Gregory, P.D.**, **Pabo, C.O.** und **Rebar, E.J.**: (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. Nature Biotechnology *25*(7):778–785.

Miller, J.C., **McLachlan, A.D.** und **Klug, A.**: (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes. The EMBO journal *4*(6):1609–1614.

Miller, J.C., **Tan, S.**, **Qiao, G.**, **Barlow, K.A.**, **Wang, J.**, **Xia, D.F.**, **Meng, X.**, **Paschon, D.E.**, **Leung, E.**, **Hinkley, S.J.**, **Dulay, G.P.**, **Hua, K.L.**, **Ankoudinova, I.**, **Cost, G.J.**, **Urnov, F.D.**, **Zhang, H.S.**, **Holmes, M.C.**, **Zhang, L.**, **Gregory, P.D.** und **Rebar, E.J.**: (2010). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. Nature Biotechnology (December).

Morbitzer, R., **Elsaesser, J.**, **Hausner, J.** und **Lahaye, T.**: (2011). Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning. Nucleic acids research *39*(13):5790–9.

Mortimer, C.E. und **Müller, U.**: Chemie - Das Basiswissen der Chemie (Georg Thieme Verlag, 2003), 8. Auflage.

Mussolino, C. und **Cathomen, T.**: (2012). TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. Current opinion in biotechnology :1–7.

Mussolino, C., **Morbitzer, R.**, **Lütge, F.**, **Dannemann, N.**, **Lahaye, T.** und **Cathomen, T.**: (2011). A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. Nucleic acids research *39*(21):9283–93.

Ochiai, H., **Fujita, K.**, **Suzuki, K.i.**, **Nishikawa, M.**, **Shibata, T.**, **Sakamoto, N.** und **Yamamoto, T.**: (2010). Targeted mutagenesis in the sea urchin embryo using zinc-finger nucleases. Genes to Cells :1–3.

Osiak, A., **Radecke, F.**, **Guhl, E.**, **Radecke, S.**, **Dannemann, N.**, **Lütge, F.**, **Glage, S.**, **Rudolph, C.**, **Cantz, T.**, **Schwarz, K.**, **Heilbronn, R.** und **Cathomen, T.**: (2011). Selection-independent generation of gene knockout mouse embryonic stem cells using zinc-finger nucleases. PloS one *6*(12):e28911.

Pâques, F. und **Duchateau, P.**: (2007). Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. Current gene therapy *7*(1):49–66.

Pattanayak, V., **Ramirez, C.L.**, **Joung, J.K.** und **Liu, D.R.**: (2011). Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. Nature methods *8*(9):765–70.

Pavletich, N. und **Pabo, C.**: (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 A. Science (May).

Porteus, M.: (2008). Design and testing of zinc finger nucleases for use in mammalian cells. METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY *435*:47–61.

Radecke, S., **Radecke, F.**, **Cathomen, T.** und **Schwarz, K.**: (2010). Zinc-finger nuclease-induced gene repair with oligodeoxynucleotides: wanted and unwanted target locus modifications. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy *18*(4):743–53.

Rahman, S.H., **Maeder, M.L.**, **Joung, J.K.** und **Cathomen, T.**: (2011). Zinc-finger nucleases for somatic gene therapy: the next frontier. Human gene therapy *22*(8):925–33.

Ramalingam, S., **Kandavelou, K.**, **Rajenderan, R.** und **Chandrasegaran, S.**: (2011). Creating designed zinc-finger nucleases with minimal cytotoxicity. Journal of molecular biology *405*(3):630–41.

Ramirez, C., **Foley, J.** und **Wright, D.**: (2008). Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. Nature methods *5*(5):374–375.

Raymond, C.S. und **Soriano, P.**: (2007). High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells. PloS one *2*(1):e162.

Reyon, D., **Tsai, S.Q.**, **Khayter, C.**, **Foden, J.a.**, **Sander, J.D.** und **Joung, J.K.**: (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. Nature Biotechnology (February).

Rowley, P.a., **Smith, M.C.a.**, **Younger, E.** und **Smith, M.C.M.**: (2008). A motif in the C-terminal domain of phiC31 integrase controls the directionality of recombination. Nucleic acids research *36*(12):3879–91.

Sander, J.D., **Dahlborg, E.J.**, **Goodwin, M.J.**, **Cade, L.**, **Zhang, F.**, **Cifuentes, D.**, **Curtin, S.J.**, **Blackburn, J.S.**, **Thibodeau-Beganny, S.**, **Qi, Y.**, **Pierick, C.J.**, **Hoffman, E.**, **Maeder, M.L.**, **Khayter, C.**, **Reyon, D.**, **Dobbs, D.**, **Langenau, D.M.**, **Stupar, R.M.**, **Giraldez, A.J.**, **Voytas, D.F.**, **Peterson, R.T.**, **Yeh, J.R.J.** und **Joung, J.K.**: (2011a). Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). Nature methods *8*(1):67–9.

Sander, J.D., **Maeder, M.L.** und **Joung, J.K.**: (2011b). Engineering designer nucleases with customized cleavage specificities. Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M Ausubel [et al] *Chapter 12*(October):Unit12.13.

Santiago, Y., **Chan, E.**, **Liu, P.**, **Orlando, S.**, **Zhang, L.**, **Urnov, F.**, **Holmes, M.**, **Guschin, D.**, **Waite, A.**, **Miller, J.** und **Others**: (2008). Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*(15):5809.

Shukla, V.K., **Doyon, Y.**, **Miller, J.C.**, **Dekelver, R.C.**, **Moehle, E.A.**, **Worden, S.E.**, **Mitchell, J.C.**, **Arnold, N.L.**, **Gopalan, S.**, **Meng, X.**, **Choi, V.M.**, **Rock, J.M.**, **Wu, Y.y.**, **Katibah, G.E.**, **Zhifang, G.**, **Mccaskill, D.**, **Simpson, M.A.**, **Blakeslee, B.**, **Greenwalt, S.A.**, **Butler, H.J.**, **Hinkley, S.J.**, **Zhang, L.**, **Rebar, E.J.**, **Gregory, P.D.** und **Urnov, F.D.**: (2009). Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases. Nature *459*(7245):437–441.

Smith, M.C.M. und **Thorpe, H.M.**: (2002). Diversity in the serine recombinases. Molecular microbiology *44*(2):299–307.

Söllü, C., **Pars, K.**, **Cornu, T.I.**, **Thibodeau-Beganny, S.**, **Maeder, M.L.**, **Joung, J.K.**, **Heilbronn, R.** und **Cathomen, T.**: (2010). Autonomous zinc-finger nuclease pairs for targeted chromosomal deletion. Nucleic acids research :1–8.

Soriano, P.: (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. Nature genetics *21*(january):70–71.

Sun, N., **Liang, J.**, **Abil, Z.** und **Zhao, H.**: (2012). Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease. Molecular bioSystems *8*(4):1255–63.

Szczepek, M., **Brondani, V.**, **Büchel, J.**, **Serrano, L.**, **Segal, D.J.** und **Cathomen, T.**: (2007). Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. Nature biotechnology *25*(7):786–93.

Tasic, B., **Hippenmeyer, S.**, **Wang, C.**, **Gamboa, M.**, **Zong, H.**, **Chen-tsai, Y.** und **Luo, L.**: (2011). Site-specific integrase-mediated transgenesis in mice via pronuclear injection. Proceedings of the National Academy of Science :1–6.

Tesson, L., **Usal, C.**, **Ménoret, S.**, **Leung, E.**, **Niles, B.J.**, **Remy, S.**, **Santiago, Y.**, **Vincent, A.I.**, **Meng, X.**, **Zhang, L.**, **Gregory, P.D.**, **Anegon, I.** und **Cost, G.J.**: (2011). Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. Nature biotechnology *29*(8):695–6.

Thorpe, H. und **Smith, M.**: (1998). In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. Proceedings of the National *95*(May):5505–5510.

Thyagarajan, B., **Olivares, E.C.**, **Hollis, R.P.**, **Ginsburg, D.S.** und **Calos, M.P.**: (2001). Site-Specific Genomic Integration in Mammalian Cells Mediated by Phage phiC31 Integrase. Molecular and Cellular Biology *21*(12):3926–3934.

Townsend, J., **Wright, D.**, **Winfrey, R.** und **Fu, F.**: (2009). High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. Nature *26*(6):702–708.

Turan, S., **Galla, M.**, **Ernst, E.**, **Qiao, J.**, **Voelkel, C.**, **Schiedlmeier, B.**, **Zehe, C.** und **Bode, J.**: (2011). Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges. Journal of molecular biology *407*(2):193–221.

Urlaub, G. und **Chasin, L.a.**: (1980). Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *77*(7):4216–20.

Urlaub, G., **Landzberg, M.** und **Chasin, L.a.**: (1981). Selective killing of methotrexate-resistant cells carrying amplified dihydrofolate reductase genes. Cancer research *41*(5):1594–601.

Urnov, F.D., **Miller, J.C.**, **Lee, Y.l.**, **Beausejour, C.M.**, **Rock, J.M.**, **Augustus, S.**, **Jamieson, A.C.**, **Porteus, M.H.**, **Gregory, P.D.** und **Holmes, M.C.**: (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. Nature *435*(7042):646–651.

Watanabe, M., **Umeyama, K.**, **Matsunari, H.**, **Takayanagi, S.** und **Haruyama, E.**: (2010). Knockout of exogenous EGFP gene in porcine somatic cells using zinc-finger nucleases. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS *402*(1):14–18.

Weber, E., **Gruetzner, R.**, **Werner, S.**, **Engler, C.** und **Marillonnet, S.**: (2011). Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning. PloS one *6*(5):e19722.

Wefers, B., **Meyer, M.** und **Hensler, S.**: (2012). Gene Editing in One-Cell Embryos by Zinc-Finger and TAL Nucleases. Current Protocols in . . . *2*(December):347–364.

Wefers, B., **Meyer, M.**, **Ortiz, O.**, **Hrabé de Angelis, M.**, **Hansen, J.**, **Wurst, W.** und **Kühn, R.**: (2013). Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America .

Whyte, J.J. und **Prather, R.S.**: (2012). CELL BIOLOGY SYMPOSIUM: Zinc finger nucleases to create custom-designed modifications in the swine (Sus scrofa) genome. Journal of animal science *90*(4):1111–7.

Whyte, J.J., **Zhao, J.**, **Wells, K.D.**, **Samuel, M.S.**, **Whitworth, K.M.**, **Walters, E.M.**, **Laughlin, H.M.** und **Prather, R.S.**: (2011). Gene Targeting With Zinc Finger Nucleases to Produce Cloned eGFP Knockout Pigs. Mol reprod Dev .

Wood, A.J., **Lo, T.W.**, **Zeitler, B.**, **Pickle, C.S.**, **Ralston, E.J.**, **Lee, A.H.**, **Amora, R.**, **Miller, J.C.**, **Leung, E.**, **Meng, X.**, **Zhang, L.**, **Rebar, E.J.**, **Gregory, P.D.**, **Urnov, F.D.** und **Meyer, B.J.**: (2011). Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. Science (New York, NY) *333*(6040):307.

Wright, D.a., **Thibodeau-Beganny, S.**, **Sander, J.D.**, **Winfrey, R.J.**, **Hirsh, A.S.**, **Eichtinger, M.**, **Fu, F.**, **Porteus, M.H.**, **Dobbs, D.**, **Voytas, D.F.** und **Joung, J.K.**: (2006). Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly. Nature protocols *1*(3):1637–52.

Young, J.J., **Cherone, J.M.**, **Doyon, Y.**, **Ankoudinova, I.**, **Faraji, F.M.**, **Lee, A.H.**, **Ngo, C.**, **Guschin, D.Y.**, **Paschon, D.E.**, **Miller, J.C.**, **Zhang, L.**, **Rebar, E.J.**, **Gregory, P.D.**, **Urnov, F.D.**, **Harland, R.M.** und **Zeitler, B.**: (2011). Efficient targeted gene disruption in the soma and germ line of the frog Xenopus tropicalis using engineered zinc-finger nucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*(17):7052–7.

Yuan, P., **Gupta, K.** und **Van Duyne, G.D.**: (2008). Tetrameric structure of a serine integrase catalytic domain. Structure *16*(8):1275–86.

Zhang, F., **Cong, L.**, **Lodato, S.**, **Kosuri, S.**, **Church, G.M.** und **Arlotta, P.**: (2011). Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. nature biotechnology (January):1–6.

Zou, J., **Maeder, M.L.**, **Pruett-miller, S.M.** und **Thibodeau-beganny, S.**: (2009). Gene Targeting of a Disease-Related Gene in Human Induced Pluripotent Stem and Embryonic Stem Cells. Cell Stem Cell *5*(1):97–110.

Abbildungsverzeichnis

1.1 Reparaturmöglichkeiten eines genomischen DSB 9
1.2 Erkennungssequenz der natürlichen *FokI*-Endonuklease 11
1.3 Aufbau eines in der Natur vorkommenden TALE 16
1.4 Schema der Bindung von zwei TALEN an die genomische DNA 18
1.5 Schema der Vorgehensweise bei der Pronukleus-Injektion 20

2.1 Die drei verschiedenen *Rosa26*-Loci vor und nach der RMCE 22
2.2 Beispiel-*Southern Blot* einiger D14R14-Mäuse 22
2.3 Schema der ZFN-Bindung an den *Rosa26*-Locus 24
2.4 Embryo am Tag E18 26
2.5 *Rosa26*-Loci nach der Injektion des *pRosa26*$^{8\text{-}2}$ Gen-*Targeting*vektors 27
2.6 *Southern Blots* der DNA von Embryo T4.3-1 28
2.7 *Southern Blots* der DNA von Embryo T1.3-5 29
2.8 *Southern Blot*-Analyse einiger Tiere nach dem XbaI-Verdau 30
2.9 Darstellung der Fragmentgrößen für die PCR-Analyse 30
2.10 PCR-Analyse der Embryonen mit einer Genom-Modifikation im *Rosa26*-Locus 31
2.11 Ergebnis des Sequenzanalyse von Embryo T1.2-9 31
2.12 Sequenzanalysen von Embryo T1.3-5 32
2.13 Sequenzvergleich von Embryo T3.1-5 mit dem *Rosa26*$^{8\text{-}2}$-Locus 33
2.14 Sequenzvergleich von Embryo T4.3-1 mit dem *Rosa26*$^{8\text{-}2}$-Locus 34
2.15 Abbildung eines normal entwickelten Embryos am Tag E18 36
2.16 Gen-*Targeting*vektor pRosa26.3-3 und die drei möglichen *Rosa26*-Loci 37
2.17 *Southern Blot* nach XbaI-Verdau und Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde 38
2.18 *Southern Blot* Analyse von Embryo T18.1-6 39
2.19 Darstellung der *Rosa26*-Loci für die PCR-Analyse 40
2.20 PCR-Analyse des *Rosa26*-Locus der Embryonen aus der Pronukleus-Injektion . 40
2.21 Sequenzanalyse des Embryos T18.1-6 41
2.22 Sequenzanalyse des zweiten Allels des Embryos T18.1-6 41
2.23 *Southern Blot* nach XbaI-Verdau und Hybridisierung mit der *Rosa26* 5'-Sonde 44
2.24 *Southern Blot* nach BamHI-Verdau und Hybridisierung der *Rosa26* 5'-Sonde . 44
2.25 *Southern Blot* nach BamHI-Verdau und Rehybridisierung mit der *Venus*-Sonde 45
2.26 *Southern Blot* der Nachkommen der positiven Tiere aus der Zygoten-Injektion . 47
2.27 Fluoreszenz-Expressionen eines *Rosa26*$^{3\text{-}3}$-Tieres und eines *Rosa26*^{WT}-Tieres . 48
2.28 Schema der ZFN-Bindung an den *Rab38*-Locus 49
2.29 Vergleich der RAB38-Codonsequenzen 17-20 und 30-31 49
2.30 *Rab38*-Loci der Genotypisierungs-PCR mit anschließendem BsaJI-Verdau . . . 50
2.31 Auftrennung der PCR-Fragmente nach dem BsaJI-Verdau 51
2.32 Gen-*Targeting*vektor und *Rab38*-Loci für die *Southern Blot*-Analyse 51
2.33 *Southern Blot* nach SexAI-Verdau und Hybridisierung mit der *Rab38* 5'-Sonde 52
2.34 Sequenzvergleich der drei Tiere mit einer HR 52
2.35 PCR-Ergebnisse nach dem BsaJI-Verdau der DNA der F1-Nachkommen 53
2.36 C57BL/6J-Maus (links) und homozygote *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Maus (rechts) 54
2.37 PCR- und *Southern Blot* der F1-Nachkommen von R1.1-1 und R3.3-9 54
2.38 PCR- und *Southern Blot* der F2-Nachkommen 55
2.39 Vergleich der RAB38-Codonsequenzen 17-20 und 30-31 56

2.40 *Rab38*-Loci nach der Pronukleus-Injektion für die PCR-Analyse 57
2.41 Gen-*Targeting*oligonukleotid und *Rab38*-Loci bei der *Southern Blot* Analyse . 58
2.42 Resultate aller Analysen von Maus C7.3-8 60
2.43 Resultate aller Analysen mit der DNA der Maus C7.4-8 61
2.44 Analysen der Maus C13.2-6 62
2.45 Resultate der verschiedenen Analysen mit der DNA von Maus C13.5-5 63
2.46 Zusammenfassung der Resultate von Maus C15.1-5 64
2.47 Zusammenfassung der Resultate der F1-Nachkommen von Maus C7.3-8 65
2.48 Darstellung aller Resultate der Nachkommen von Maus C13.5-5 66
2.49 Darstellung der Nachkommen von Maus C13.2-6 im *Southern Blot* 66
2.50 Sequenzierung der PCR-Fragmente der Nachkommen von Maus C15.1-5 . . . 67
2.51 Schema der TALEN-Bindung an den *Rab38*-Locus 68
2.52 Ergebnisse des Aktivitätsnachweises der *Rab38*-spezifischen TALEN 69
2.53 RAB38-Codons 17-20 und 30-31 der verschiedenen *Rab38*-Loci 70
2.54 Darstellung der *Rab38*-Loci für die PCR-Analyse 71
2.55 Gen-*Targeting*-Konstrukte und *Rab38*-Loci für die *Southern Blot* Analyse . . . 72
2.56 Sequenzanalyse der Kandidatenmäuse für die Integration von Mutationen . . . 73
2.57 *Southern Blot* Analyse der Nachkommen der Zygoten-Injektionen 74
2.58 Sequenzvergleich der Nachkommen mit einer Modifikation im *Rab38*-Allel . . 75
2.59 *Southern Blot* der Tiere mit dem TALENwt>IDGCht-Oligonukelotid 76
2.60 RAB38 Codon-Sequenzen 17-20 und 30-31 der verschiedenen *Rab38*-Loci . . 78
2.61 Darstellung der *Rab38*-Loci für die Analyse der PCR-Fragmente 79
2.62 Gen-*Targeting*-Konstrukte und *Rab38*-Loci für die *Southern Blots* 80
2.63 Überblick über die Resultate von den Mäusen H5.3-3 und H7.3-2 81
2.64 Sequenzanalyse der unverdauten PCR-Fragmente mehrerer Kandidatenmäuse . 82
2.65 Darstellung der *Southern Blot* Analyse 83

6.1 pBvenusB 144
6.2 pRosa26.5 144
6.3 pRosa26.8-2 144
6.4 pRosa26.3-3 144
6.5 pEF-5HA-cht-3HA 145
6.6 pEF-5HA-wt-3HA 145
6.7 pEF-5HA-TALcht-3HA 145
6.8 pEF-5HA-TALwt-3HA 145
6.9 ZFNcht>IDGWT 146
6.10 TALENwt>IDGCht 146
6.11 TALENcht>IDGWT 146
6.12 pphiC31 146
6.13 pRosaZFN-FokEL 147
6.14 pRosaZFN-FokKK 147
6.15 pRabZFN-FokKK 147
6.16 pRabZFN-FokEL 147
6.17 pRabTALEN1-FokWT 148
6.18 pRabTALEN2-FokWT 148
6.19 pCR-II-Rosa5'-Sonde 148

6.20 pCR-II-Rosa3'-Sonde 148
6.21 pCMVβ 149
6.22 pCS2-Venus 149
6.23 pUC18 149
6.24 pSC-B-amp/kan 150
6.25 pBS 150
6.26 β-*gal*-Expression der ES-Zellen von Platte 1 151
6.27 β-*gal*-Expression der ES-Zellen von Platte 2 151
6.28 β-*gal*-Expression der ES-Zellen von Platte 3 151
6.29 β-*gal*-Expression der ES-Zellen von Platte 4 151
6.30 β-*gal*-Expression der ES-Zellen von Platte 5 151
6.31 Vergleich der *Venus*-Expression 152
6.32 Vergleich der *Venus*-Expression 153
6.33 Analyse der verschiedenen Fellfarben von *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Nachkommen 154

Tabellenverzeichnis

2.1 Injektionsaliquots für die phiC31 Integrase-vermittelte Rekombination 21
2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der phiC31 Zygoten-Injektion 23
2.3 DNA-Mengen und Resultate des Experiments der Rosa26-ZFN in ES-Zellen . . 25
2.4 Resultate der β-Gal-Färbung der Zygoten 25
2.5 Injektionsaliquots für die Injektion des Gen-*Targeting*vektor pRosa26.8-2 . . . 26
2.6 Darstellung der Resultate der β-*Gal*-Färbung in den Embryonen 26
2.7 Ergebnisse der Zygoten-Injektion mit dem β-*Gal*-Reporterkonstrukt 35
2.8 Injektionsaliquots für die Vorkern-Injektion des pRosa26.3-3 36
2.9 Resultate der Embryonen der Injektion von Rosa26-ZFN mit pRosa26.3-3 . . . 42
2.10 Aliquots für die Injektion von pRosa26.3-3 und der Rosa26-ZFN-mRNA 43
2.11 Ergebnisse der Zygoten-Injektion mit dem Gen-*Targeting*vektor pRosa26.3-3 . 45
2.12 Zusammenfassung der *Southern Blot*-Ergebnisse der F1-Nachkommen 47
2.13 Injektionsaliquots für die Zygoten-Injektion mit den Rab38-ZFNs 50
2.14 Ergebnisse der Injektion der Rab38-ZFN-mRNA mit dem pEF-5HA-cht-3HA . 53
2.15 Zusammenfassung der Resultate der Heterozygoten-Verpaarungen 55
2.16 Injektionsaliquots der Rab38-ZFN-mRNA mit Vektor oder Oligonukleotid . . . 56
2.17 Ergebnisse der Injektion der Rab38-ZFN-mRNA mit dem Gen-*Targeting*vektor 58
2.18 Ergebnisse der Injektion des Oligonukleotids mit der Rab38-ZFN-mRNA . . . 64
2.19 Injektionsaliquots der Injektion für die Einbringung der $Rab38^{T\text{-}IDGCht}$-Mutation 70
2.20 Zusammenfassung der Resultate der Integration der IDGCht-Punktmutation . . 76
2.21 Injektionsaliquots für die Einbringung der $Rab38^{T\text{-}IDGWT}$-Mutationen 78
2.22 Resultate der Injektion mit einem Konstrukt des $Rab38^{T\text{-}IDGWT}$-Genotyps 84

3.1 Frequenzen der HR in adulten Mäuse nach der ZFN-Injektion 86
3.2 Publizierte Artikel zum Thema Gen-*Targeting* mit Hilfe von ZFN 88
3.3 Auswahl einiger publizierten Artikel zum Thema TALEN 89
3.4 Frequenzen der untersuchten adulten Mäuse nach der Injektion von TALEN . . 89

5.1 Pipettieransätze für die Genotypisierungs-PCRs 110
5.2 Pipettierschemata für die verschiedenen *Southern Blot*-Genotypisierungen . . . 111
5.3 Messparameter am Luminometer 118

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

A	
A	Adenin
A	Amper
A.K.	Adelheid Krause
A.T.	Adrianne Tasdemir
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AD	Aktivierungsdomäne
amp	Ampicilin
ATP	Adenosintriphosphat
attB	Anheftungsstelle Bakterien
attP	Anheftungsstelle Phagen
B	
β	Massenkonzentration (Mortimer und Müller, 2003)
B6	C57BL/6
β-Gal	*β-Galactosidase*-Gen
bp	Basenpaar
bpA	bovines Polyadenylierungs-Signal
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	
c	zenti (10^{-2})
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	zirca
CAG	*chicken β-actin promoter coupled with cytomegalovirus enhancer sequence*
cDNA	Kopie-DNA

Chr.	Chromosom
CIP	*calf intestinal phosphatase*
CMV	Promotor des Cytomegalovirus
CoA	Coenzym A
D	
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DH5α	*E.coli* Stamm DH5α
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	DL-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	
E	Embryonaltag
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-di-(β-aminoethyl-ether)N',N',N'-tetraacetsäure
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	*et alteri*
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	*et cetera*
EtOH	Ethanol
F	
F	Farat
F	*forward*-Primer
f	Weibchen
FCS	fetales Kälberserum

G	
g	Gramm
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
Gly-Gly	Glycylglycin
H	
h	Stunde
H_2O	Wasser
HA	Homologiearm
hc	hoch konzentriert
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
HR	homologe Rekombination
I	
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IVF	*in vitro* Fertilisation
J	
K	
k	kilo
kan	Kanamycin
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
$K_3Fe(CN)_6$	Kaliumferricyanid
$K_4Fe(CN)_6 \bullet 3H_2O$	Kaliumferrocyanid
K_2HPO_4	Dikaliumhydrogenphosphat
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
L	
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LIF	Leukämie inhibierender Faktor

lin.	linear
hLuc	Luciferase
M	
m	Männchen
m	Meter
μ	micro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
M	Molar
max.	maximal
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
MilliQ	Reinstwasser
min	Minute
mRNA	Boten-RNA
mut	mutant
N	
n	nano (10^{-9})
n.a.	nicht analysiert
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEB	New England Biolabs
neo	*Neomycin*-Gen
NHEJ	*non homologous end joining*
NLS	Kernlokalisationssignal
nt	Nukleotide
O	
O.O.	Dr. Oskar Ortiz
OD	optische Dichte

	ORF	offenes Leseraster
P		
	p	pico (10^{-12})
	P.K.	Peggy Kunath
	PBS	Phosphat gepufferte Saline
	PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
	PFA	Paraformaldehyd
	PGK	Promotor der Phosphoglyceratkinase 1
	PMSG	*Pragnant Mare's Serum Gonadotropin*
Q		
R		
	R	*reverse*-Primer
	RMCE	Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch
	RNA	Ribonukleinsäure
	rpm	Umdrehungen pro Minute
	RT	Raumtemperatur
	RVD	*repeat variable diresidue*
S		
	s	Sekunde(n)
	S.W.	Susanne Weidemann
	sc.	zirkulär, *supercoil*
	SDS	Natriumdodecylsulfat
	spec	Spectionomycin
	SSC	*saline sodium citrate*
	sw	Schwarz-weiß
T		
	T	Thymin
	Tab.	Tabelle
	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
	TALE	*transcription activator-like effector*

	TALEN	TALE *nuclease*
	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
	TE	Tris-EDTA
	temp	Temperatur
	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U		
	U	Einheit
	üN	über Nacht
	UV	ultraviolett
V		
	V	Volt
	Vol.	Volumen bzw. Volumenanteil
W		
	WT	Wildtyp
X		
	x	Symbol für die Verpaarung von Mauslinien
	X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-Galctopyranosid
Y		
Z		
	z.B.	zum Beispiel
	ZF	Zinkfinger
	ZFN	Zinkfinger-Nuklease

6.2 Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	**M**	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	**N**	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	**P**	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	**Q**	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	**R**	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	**S**	Ser	Serin
H	His	Histidin	**T**	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	**V**	Val	Valin
K	Lys	Lysin	**W**	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	**Y**	Tyr	Tyrosin

Lateinische und griechische Fachbegriffe des wissenschaftlichen Sprachgebrauchs werden in dieser Arbeit kursiv geschrieben. In vielen Fällen haben englische Fachbegriffe die, inzwischen unüblichen, deutschen Begriffe aus der Fachliteratur verdrängt und werden daher, ohne die nicht-gebräuchlichen Übersetzungen zu verwenden, ebenfalls in kursiver Schrift geschrieben. Gene wurden gemäß des *International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice* abgekürzt und kursiv geschrieben. Proteine wurden ebenso wie die entsprechenden Gene abgekürzt, in Großbuchstaben aber nicht kursiv geschrieben. Aminosäuren wurden im Ein-Buchstaben-Code angegeben, chemische Elemente und Verbindungen sowie Enzyme mit ihren üblichen Symbolen abgekürzt und nur im Abbkürzungsverzeichnis erläutert.

6.3 Vektoren und Oligonukleotide

6.3.1 Vektoren für die homologe Rekombination

6.3.1.1 pBvenusB

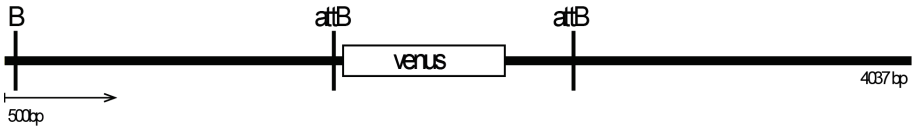


Abb. 6.1: Vektor *pBvenusB* für die *phiC31* Integrase-vermittelte Rekombination mit dem *Rosa26.10*-Lokus. Zwischen den zwei attB-Erkennungssequenzen (attB) befindet sich die Gensequenz des *Venus*-Reporters (venus). BsaI (B)

6.3.1.2 pRosa26.5

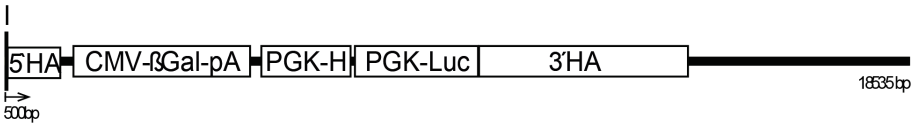


Abb. 6.2: Vektor *pRosa26.5* für die homologe Rekombination mit dem *Rosa26*-Locus in ES-Zellen zur Integration mehrerer Reporterkassetten zwischen den Homologiearmen (HA). *Hygromycin* (H); *Luciferase* (Luc); I-SceI (I)

6.3.1.3 pRosa 26.8-2

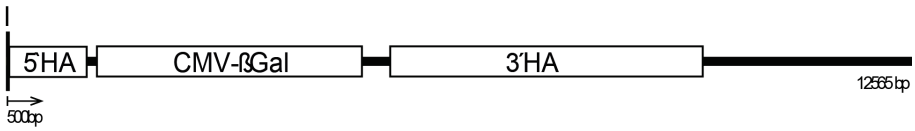


Abb. 6.3: Vektor *pRosa26.8-2* für doe homologe Rekombination mit dem *Rosa26*-Locus in Maus-Zygoten zur Integration einer Reporterkassette mit dem CMV-gesteuerten β-*Gal* zwischen den Homologiearmen (HA). I-SceI (I))

6.3.1.4 pRosa 26.3-3

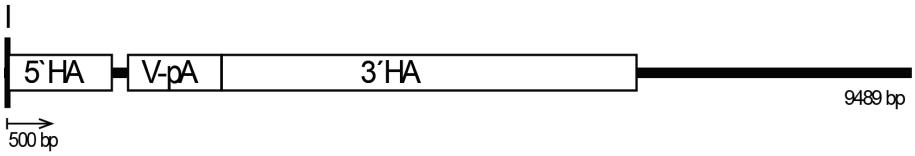


Abb. 6.4: Vektor *pRosa26.3-3* für die homologe Rekombination mit dem *Rosa26*-Locus in Maus-Zygoten zur Integration eines *Venus-pA* (venus-pA) Reporters zwischen den Homologiearmen (HA). I-SceI (I))

6.3.1.5 pEF-5HA-cht-3HA

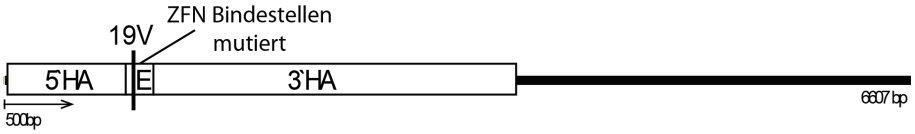


Abb. 6.5: Vektor *pEF-5HA-cht-3HA* für die homologe Rekombination mit dem *Rab38*-Locus in Maus-Zygoten zur Integration der IDGCht-Mutation (19V) zwischen den Homologiearmen (HA). Die Bindestellen der ZFN wurden furch stille Punktmutationen verändert.

6.3.1.6 pEF-5HA-wt-3HA

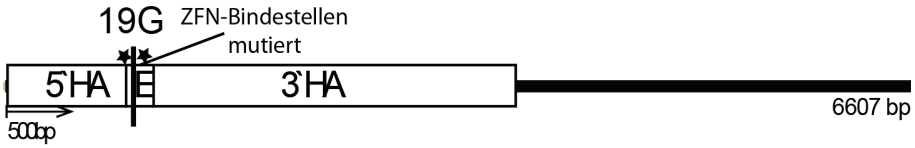


Abb. 6.6: Vektor *pEF-5HA-wt-3HA* für die homologe Rekombination mit dem *Rab38*-Locus in Maus-Zygoten zur Integration der IDGWT-Mutationen (19G) zwischen den Homologiearmen (HA). Die Bindestellen der ZFN wurden durch stille Punktmutationen verändert. * markieren Basen, die mutiert wurden ohne die Aminosäuresequenz zu verändern, um den IDGWT vom WT zu unterscheiden.

6.3.1.7 pEF-5HA-TALcht-3HA

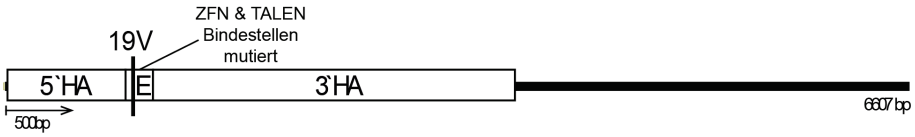


Abb. 6.7: Vektor *pEF-5HA-TALcht-3HA* für die homologe Rekombination mit dem *Rab38*-Locus in Maus-Zygoten zur Integration der IDGCht-Mutationen (19V) zwischen den Homologiearmen (HA). Sowohl die Bindestellen für die ZFN als auch für die TALEN wurden durch stille Punktmutationen verändert.

6.3.1.8 pEF-5HA-TALwt-3HA

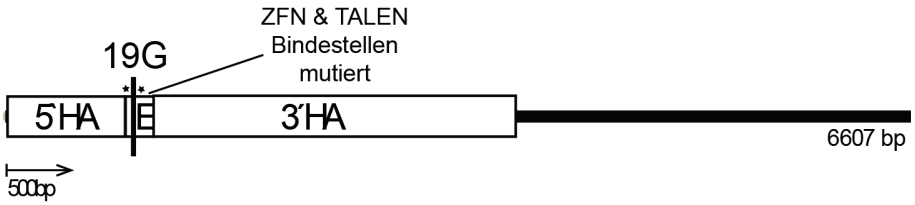


Abb. 6.8: Vektor *pEF-5HA-TALwt-3HA* für die homologe Rekombination mit dem *Rab38*-Locus in Maus-Zygoten zur Integration der IDGWT-Mutationen (19G) zwischen den Homologiearmen (HA). Sowohl die Bindestellen für die ZFN als auch für die TALEN wurden durch stille Punktmutationen verändert. * markieren Basen, die mutiert wurden ohne die Aminosäuresequenz zu verändern, um den IDGWT vom WT zu unterscheiden.

6.3.2 Oligonukleotide für die homologe Rekombination

6.3.2.1 ZFNcht>IDGWT



Abb. 6.9: Oligonukleotid *ZFNcht>IDGWT* zur Einbringung der IDGWT-Mutation (19G) mit Hilfe der homologen Rekombination in den *Rab38*-Locus. Die * zeigen Positionen von stillen Punktmutationen, um die erneute Bindung der ZFN zu verhindern und den IDGWT vom WT unterscheiden zu können.

6.3.2.2 TALENwt>IDGCht

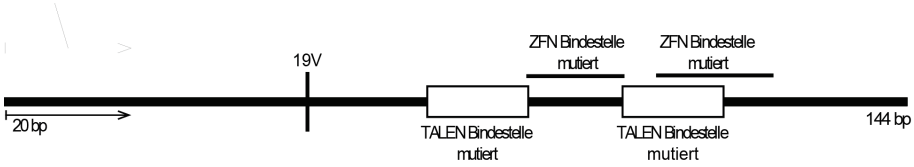


Abb. 6.10: Oligonukleotid *TALENwt>IDGCht* zur Einbringung der IDGCht-Mutation (19V) mit Hilfe der homologen Rekombination in den *Rab38*-Locus. Sowohl die ZFN- als auch die TALEN-Bindestellen wurden mit stillen Punktmutationen verändert, um eine erneute Bindung zu verhindern.

6.3.2.2.1 TALENcht>IDGWT

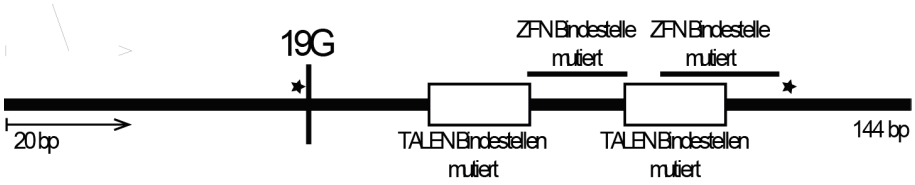


Abb. 6.11: Oligonukleotid TALENcht>IDGWT zur Einbringung der IDGWT-Mutation (19G) mit Hilfe der homologen Rekombination in den *Rab38*-Locus. Sowohl die Bindestellen für die ZFN als auch für die TALEN wurden durch stille Punktmutationen verändert. * markieren Basen, die mutiert wurden ohne die Aminosäuresequenz zu verändern, um den IDGWT vom WT zu unterscheiden.

6.3.3 Expressionsvektoren für ZFN und TALEN

6.3.3.1 pphiC31

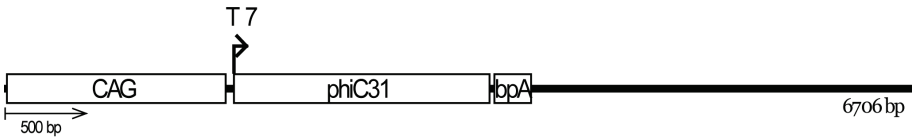


Abb. 6.12: Vektor zur Herstellung der *phiC31* Integrase mRNA. Es konnte die, für das Mausgenom Codon-optimierte phiC31 Integrase-Sequenz (phiC31) unter Verwendung des T7-Promotors (T7) in vitro transkribiert und mit Hilfe der bpA-Sequenz die entstandene mRNA stabilisiert werden. Der CAG-Promotor (CAG) wurde zur Verwendung der Plasmid-DNA in Zellen benötigt.

6.3.3.2 pRosaZFN-FokEL

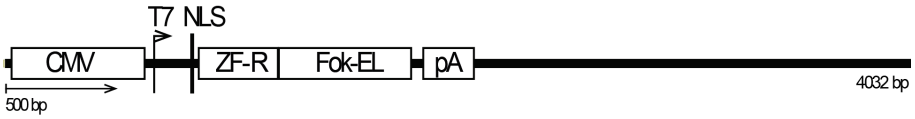


Abb. 6.13: Von Sigma zur Verfügung gestellter Vektor *pRosaZFN-FokEL* zur Herstellung der ZFN mRNA gegen den *Rosa26*-Locus. Es wurde die ZFN mRNA (ZF-R-FokEL) unter Verwendung des T7-Promotors (T7) *in vitro* transkribiert und mit Hilfe der polyA-Sequenz (pA) stabilisiert. Der CMV-Promotor (CMV) wurde zum Einsatz des Plasmids in Zellen benötigt. Kernlokalisationssignal (NLS)

6.3.3.3 pRosaZFN-FokKK

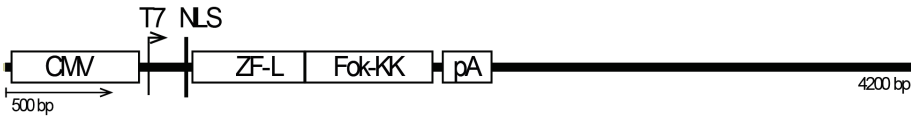


Abb. 6.14: Von Sigma zur Verfügung gestellter Vektor *pRosaZFN-FokKK* zur Herstellung der ZFN mRNA gegen den *Rosa26*-Locus. Es wurde die ZFN mRNA (ZF-L-FokKK) unter Verwendung des T7-Promotors (T7) *in vitro* transkribiert und mit Hilfe der polyA-Sequenz (pA) die entstandenen mRNA stabilisiert. Der CMV-Promotor (CMV) wurde zur Verwendung der Plasmid-DNA in Zellen benötigt. Kernlokalisationssignal (NLS)

6.3.3.4 pRabZFN-FokKK

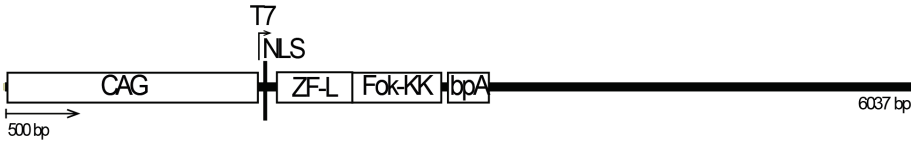


Abb. 6.15: Vektor *pRabZFN-FokKK* zur HErstellung der ZFN mRNA gegen den *Rab38*-Locus. Es wurde die ZFN mRNA (ZF-L-FokKK) unter Verwendung des T7-Promotors (T7) *in vitro* transkribiert und mit Hilfe der polyA-Sequenz (bpA) stabilisiert. Der CAG-Promotor (CAG) wurde zur Verwendung der DNA in Zellen benötigt. Kernlokalisationssignal (NLS)

6.3.3.5 pRabZFN-FokEL

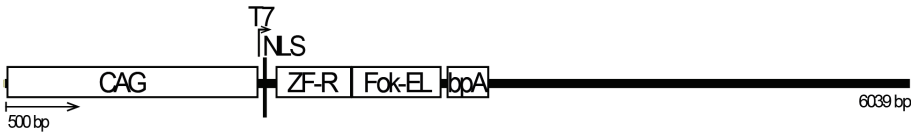


Abb. 6.16: Vektor *pRabZFN-FokEL* zur Herstellung der ZFN mRNA gegen den *Rab38*-Locus. Es wurde die mRNA (ZF-R-FokEL) unter Verwendung des T7-Promotors (T7) *in vitro* transkribiert und mit Hilfe der polyA-Sequenz (bpA) stabilisiert. Der CAG-Promotor (CAG) wurde zur Verwendung der DNA in Zellen benötigt. Kernlokalisationssignal (NLS)

6.3.3.6 pRabTALEN1-FokWT

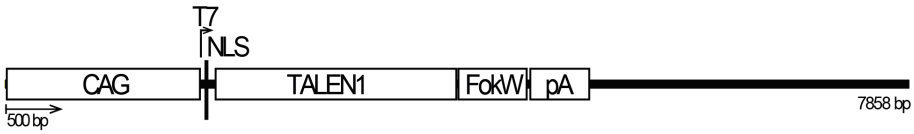


Abb. 6.17: Vektor *pRabTALEN1-FokWT* zur Herstellung der TALEN mRNA gegen den *Rab38*-Locus. Es wurde die mRNA (TALEN1-FokW) unter Verwendung des T7-Promotors (T7) *in vitro* transkribiert und mit Hilfe der polyA-Sequenz (bpA) stabilisiert. Der CAG-Promotor (CAG) wurde zum Test der TALEN in Zellen benötigt. Kernlokalisationssignal (NLS)

6.3.3.7 pRabTALEN2-FokWT

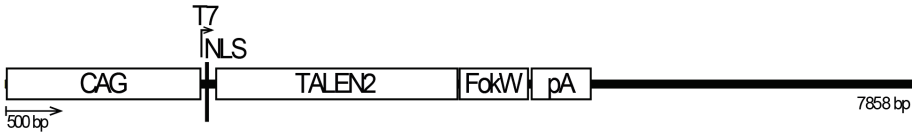


Abb. 6.18: Vektor *pRabTALEN2-FokWT* zur Herstellung der TALEN mRNA gegen den *Rab38*-Locus. Es wurde die mRNA (Talen2-FokW) unter Verwendung des T7-Promotors (T7) *in vitro* transkribiert und mit Hilfe der polyA-Sequenz (bpA) stabilisiert. Der CAG-Promotor (CAG) wurde zum Test der TALEN in Zellen benötigt. Kernlokalisationssignal (NLS)

6.3.4 sonstige Vektoren

6.3.4.1 pCR-II-Rosa5'-Sonde



Abb. 6.19: Vektor *pCR-II-Rosa5'-Sonde* zur Erzeugung der *Rosa5'*-Sonde (5'-Sonde) für die *Southern Blot* Analyse. Der Sequenzbereich der *Rosa5'*-Sonde wurde mit Hilfe des EcoRI-Verdaus (E) und anschließender Gelextraktion des kleineren Fragmentes isoliert.

6.3.4.2 pCR-II-Rosa3'-Sonde



Abb. 6.20: Vektor *pCR-II-Rosa3'-Sonde* zur Erzeugung der *Rosa3'*-Sonde (3'-Sonde) für die *Southern Blot* Analyse. Der Sequenzbereich der *Rosa3'*-Sonde wurde mit Hilfe des EcoRI-Verdaus (E) und anschließender Gelextraktion des kleineren Fragmentes isoliert.

6.3.4.2.1 pCMVβ



Abb. 6.21: Vektor *pCMVβ* zur Erzeugung der β-*gal*-Sonde (β-gal-Sonde) für die *Southern Blot* Analyse. Der Sequenzbereich der β-*gal*-Sonde wurde mit Hilfe des EcoRV (E) + SacII (S)-Doppelverdaus und anschließender Gelextraktion isoliert.

6.3.4.2.2 pCS2-Venus



Abb. 6.22: Vektor *pCS2-Venus* zur Erzeugung der *Venus*-Sonde (venus) für die *Southern Blot* Analyse. Der Sequenzbereich der *venus*-Sonde wurde mit Hilfe des BamH1 (B) + EcoRI (E)-Doppelverdaus und anschließender Gelextraktion isoliert.

6.3.4.3 pUC18

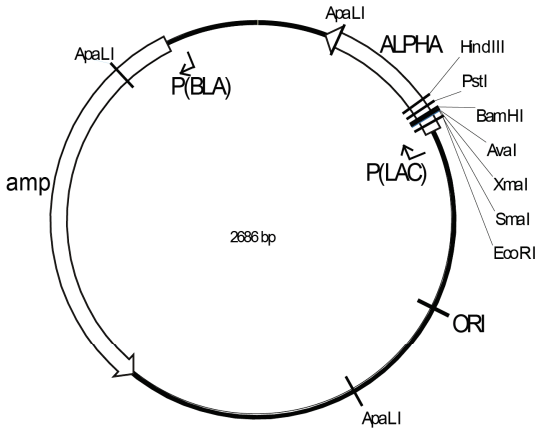


Abb. 6.23: Vektor *pUC18* vin Invitrogen zur Kontrolle der Transformationseffizient von elektrokompetenten *E.colis*.

6.3.4.4 pSC-B-amp/kan

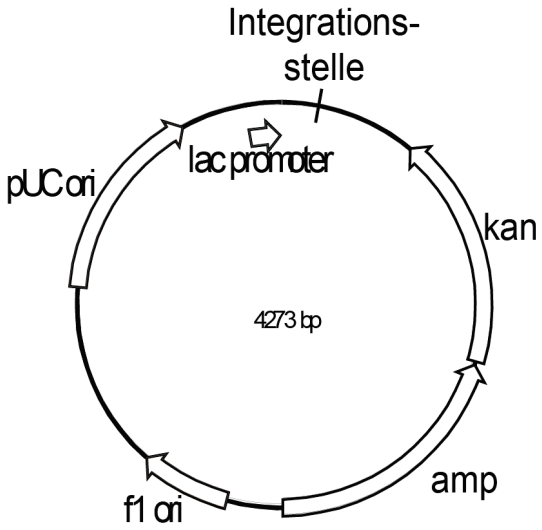


Abb. 6.24: Kommerzieller Vektor *pSC-B-amp/kan* von Stratagene zur Blau-Weiß-Selektion nach erfolgreicher Transformation des zu klonierenden PCR-Fragmentes.

6.3.4.4.1 pBS

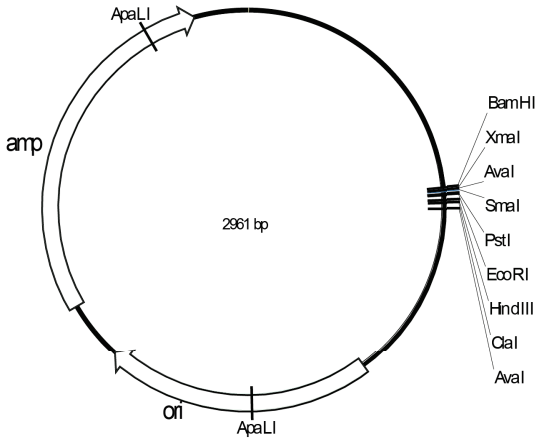


Abb. 6.25: Kommerzieller Vektor *pBS* zur Angleichung der DNA-Menge für den Zellkultur-Test der TALEN.

6.4 ES-Zellkultur Testexperiment mit den *Rosa26* ZFN

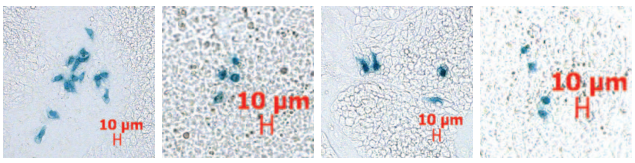


Abb. 6.26: Analyse der β-*gal*-Expression von Platte 1 nach der Elektroporation der ES-Zellen mit den beiden *Rosa26* ZFN-Plasmiden und dem *pRosa26.5* Gen-*Targeting*vektor

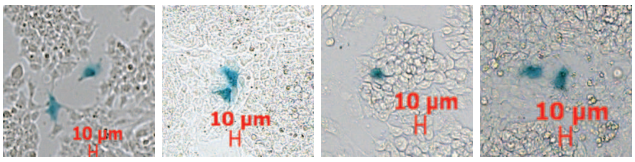


Abb. 6.27: Analyse der β-*gal*-Expression von Platte 2 nach der Elektroporation der ES-Zellen mit den beiden *Rosa26* ZFN-Plasmiden und dem *pRosa26.5* Gen-*Targeting*vektor

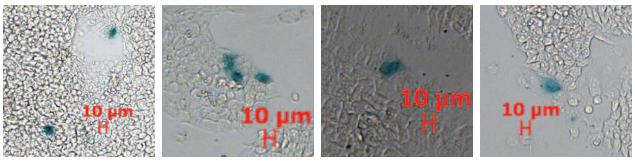


Abb. 6.28: Analyse der β-*gal*-Expression von Platte 3 nach der Elektroporation der ES-Zellen mit den beiden *Rosa26* ZFN-Plasmiden und dem *pRosa26.5* Gen-*Targeting*vektor

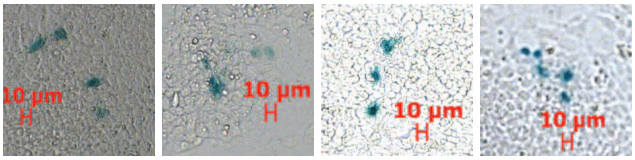


Abb. 6.29: Analyse der β-*gal*-Expression von Platte 4 nach der Elektroporation der ES-Zellen mit den beiden *Rosa26* ZFN-Plasmiden und dem *pRosa26.5* Gen-*Targeting*vektor

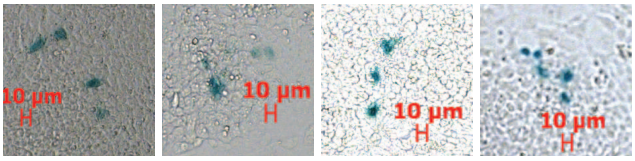


Abb. 6.30: Analyse der β-*gal*-Expression von Platte 5 nach der Elektroporation der ES-Zellen mit den beiden *Rosa26* ZFN-Plasmiden und dem *pRosa26.5* Gen-*Targeting*vektor

6.5 Expressionsanalyse des *Venus*-Reportergens in verschiedenen Organen

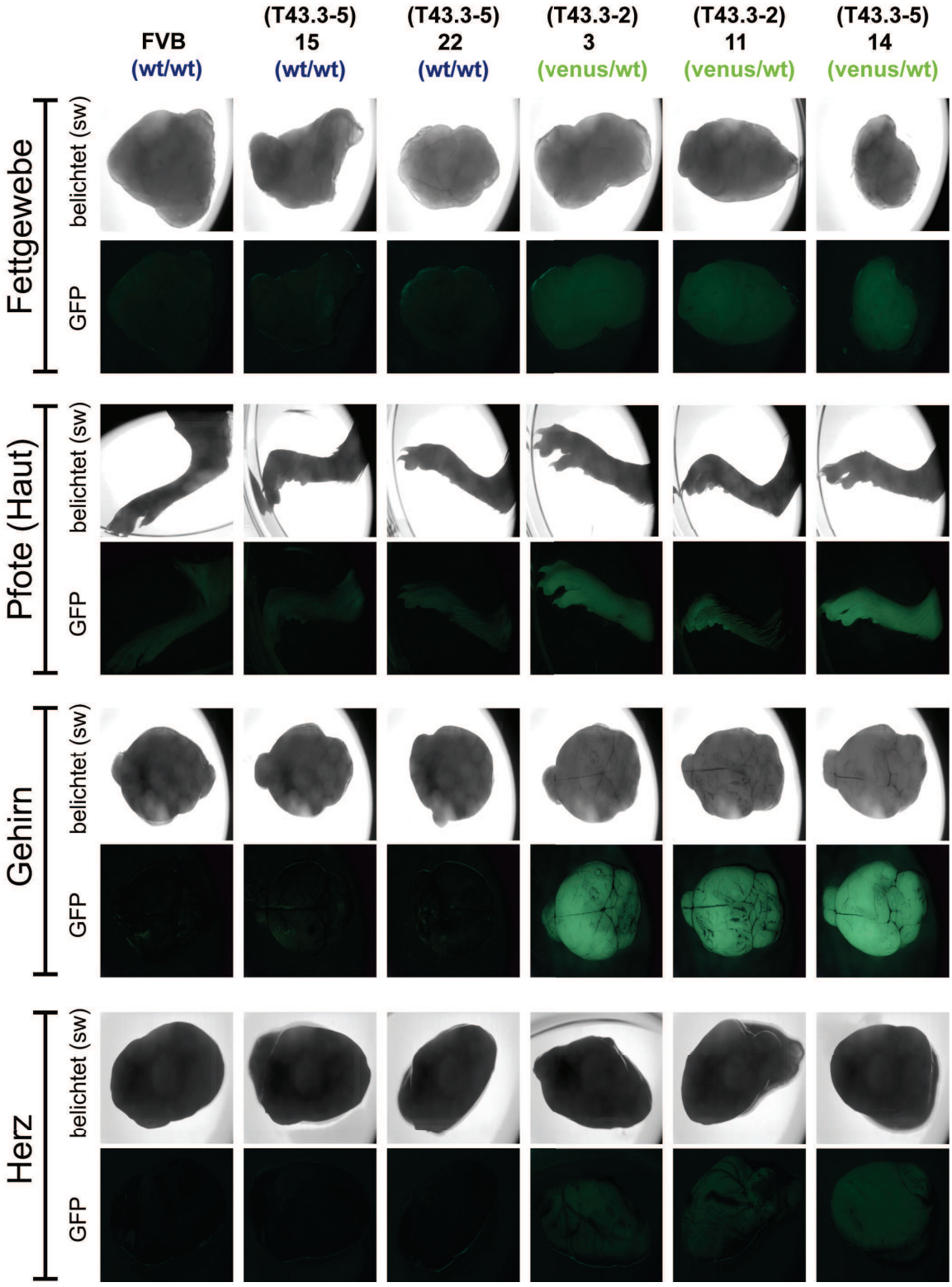


Abb. 6.31: Vergleich der *Venus*-Expression in dem Fettgewebe, der Haut, dem Gehirn und dem Herz von *Rosa26*$^{3\text{-}3}$/*Rosa26*^{WT}-Mäusen mit *Rosa26*$^{WT/WT}$-Mäusen

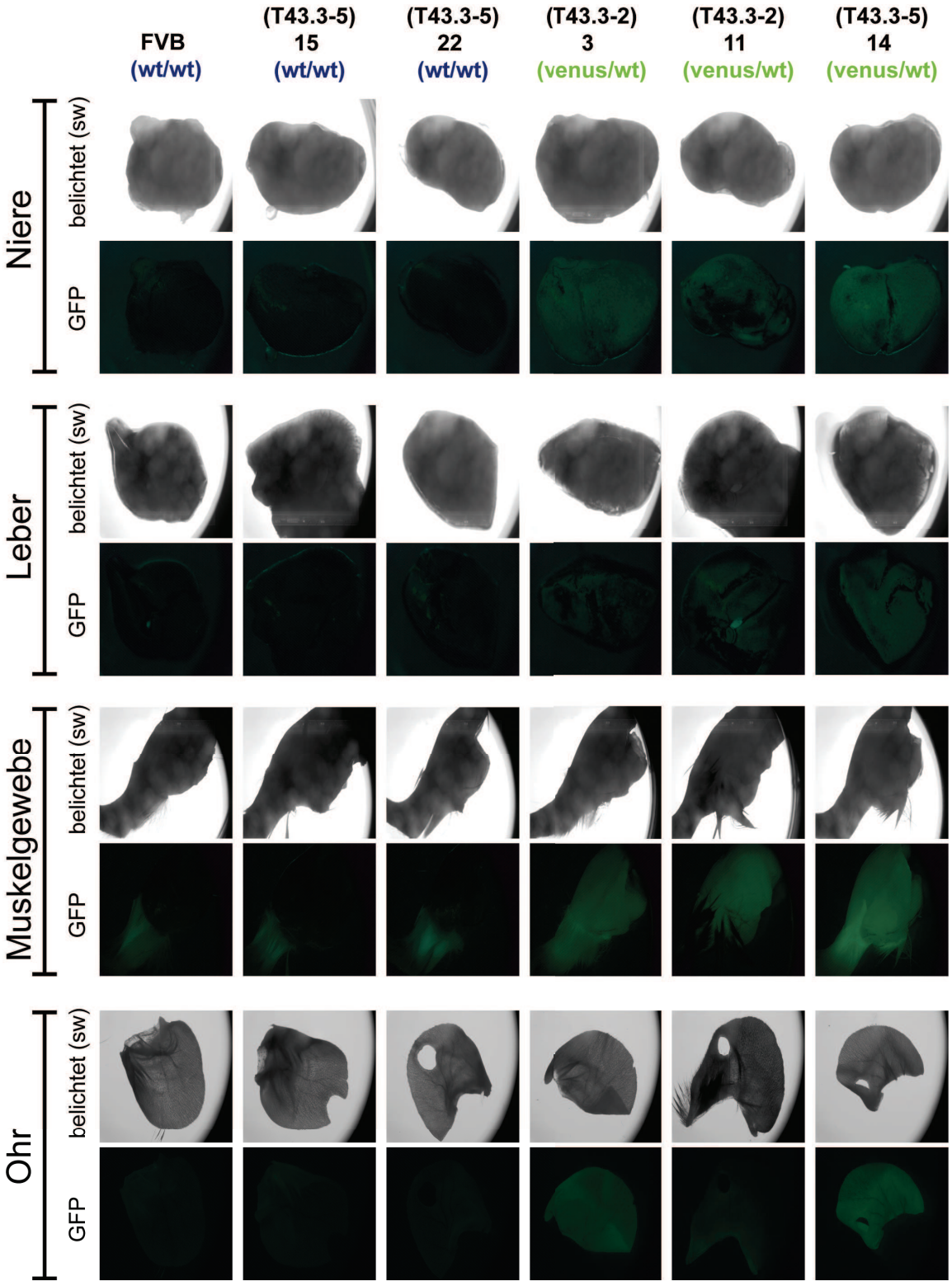


Abb. 6.32: Vergleich der *Venus*-Expression in der Niere, der Leber, dem Muskelgewebe und dem Ohr von *Rosa26*$^{3\text{-}3}$/*Rosa26*^{WT}-Mäusen mit *Rosa26*$^{WT/WT}$-Mäusen

6.6 Fellfarben der *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$ Nachkommen

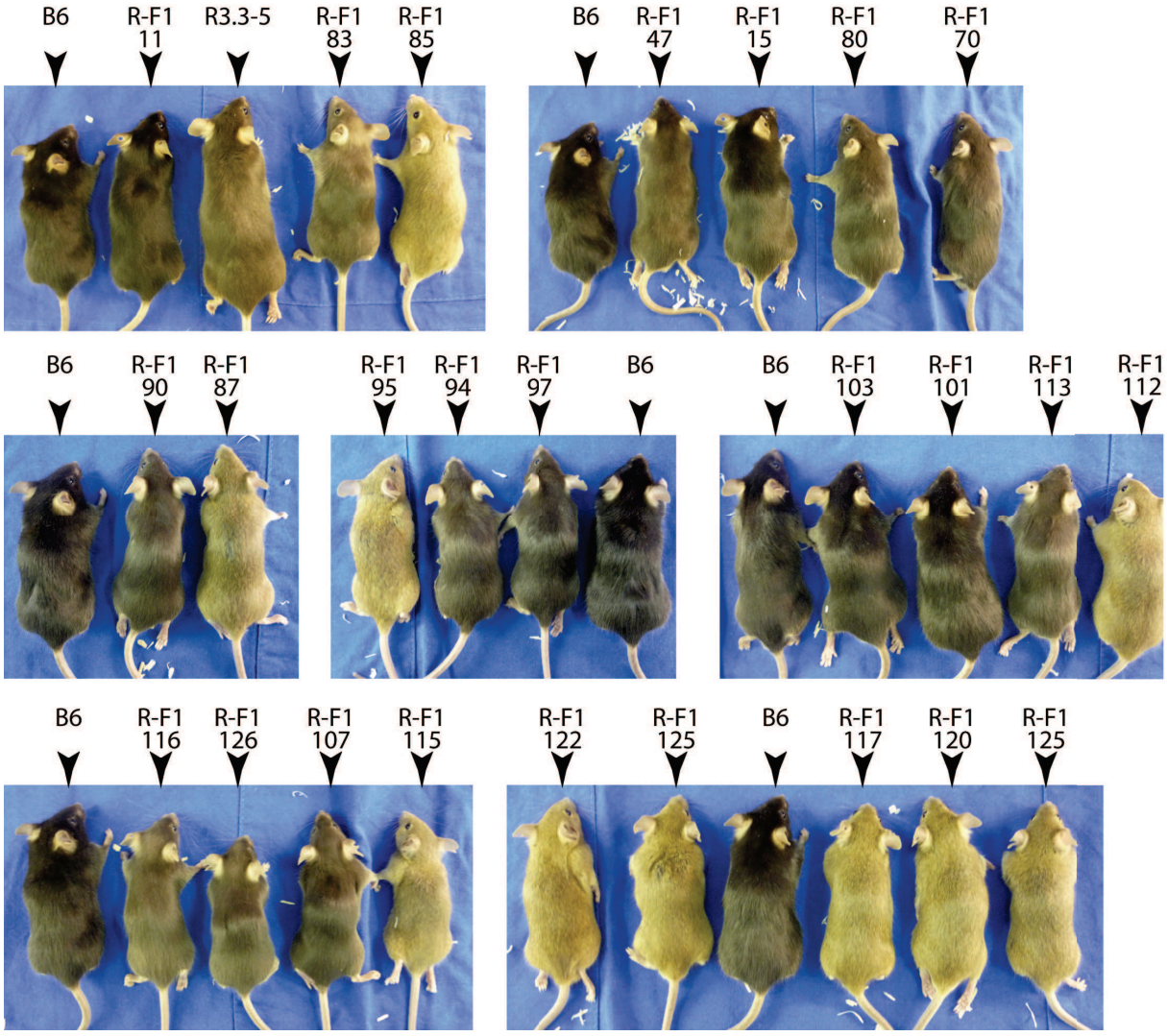


Abb. 6.33: Analyse der verschiedenen Fellfarben von *Rab38*$^{Z\text{-}IDGCht}$-Nachkommen verschiedener Genotypen im Vergleich zu einer C57BL/6J (B6)-Maus mit homozygotem *Rab38*^{WT}-Genotyp

,

6.7 Eigene Publikationen

Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases

Melanie Meyer[a,b], Martin Hrabé de Angelis[b,c], Wolfgang Wurst[a,b,d,1], and Ralf Kühn[a,b,1]

[a]Institute for Developmental Genetics, Helmholtz Center Munich, Munich, Germany; [c]Institute of Experimental Genetics, Helmholtz Center Munich, Munich, Germany; [b]Technical University Munich, Munich, Germany; and [d]Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e.V., Munich, Germany

Communicated by Pierre Chambon, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch-Cedex, France, June 30, 2010 (received for review June 16, 2010)

Gene targeting by homologous recombination in embryonic stem cells is extensively used to generate specific mouse mutants. However, most mammalian species lack tools for targeted gene manipulation. Since double-strand breaks strongly increase the rate of homologous recombination at genomic loci, we explored whether gene targeting can be directly performed in zygotes by the use of zinc-finger nucleases. Here we report that gene targeting is achieved in 1.7–4.5% of murine one-cell embryos upon the coinjection of targeting vectors with zinc-finger nucleases, without preselection. These findings enable the manipulation of the mammalian germ line in a single step in zygotes, independent of ES cells.

Gene targeting by homologous recombination in ES cells is widely used to mutate and modify the mouse genome. Thereby the mouse is established as the most commonly used animal model system (1). With the exception of mice, most other mammalian species lack tools for targeted gene manipulation because functional ES cell lines are not established. Gene targeting in somatic cells combined with nuclear transfer has been used as an alternative for the engineering of livestock species, but represents an elaborate task (2, 3).

Zinc-finger nucleases (ZFN) link a DNA binding domain of the zinc-finger type to the nuclease domain of Fok I and enable the induction of double-strand breaks (DSBs) at preselected genomic sites (4). DSBs closed by the error-prone, nonhomologous end-joining (NHEJ) DNA repair pathway frequently exhibit nucleotide deletions and insertions at the cleavage site. This technology has been applied to introduce knockout mutations into the germ line of rats and zebrafish by the expression of ZFNs in early embryos that target coding sequences (5–8).

It has been initially shown by using the yeast homing endonuclease I-SceI that the induction of DSBs at genomic insertions of I-SceI recognition sites increases the rate of homologous recombination (HR) in mammalian cells by several orders of magnitude (9). Artificially designed ZFNs further increased the ability to generate site-specific double-strand breaks in endogenous genes, without the requirement to introduce artificial nuclease recognition sites. Following this principle, ZFNs have been used to achieve efficient homologous recombination of gene targeting vectors with various endogenous loci in cultured and primary mammalian cells (10–13).

Zygotes provide a logical substrate for the single-step modification of the mammalian germ line. Whereas pronuclear DNA injection is routinely used to generate transgenic mice, rats, and other mammals by random genomic integration of transgenes (14–16), gene targeting in zygotes is not established due to the low rate of spontaneous HR. Because the mouse is the best established mammalian genetic model system, we explored whether targeted mutants can be directly obtained through ZFN-assisted homologous recombination in zygotes, upon the coinjection of ZFN mRNAs and gene targeting vectors (Fig. 1).

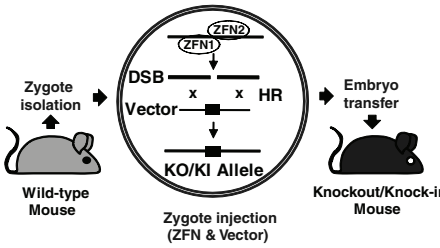


Fig. 1. Principle of ZFN-assisted gene targeting in zygotes. Zygotes collected from wild-type mice are coinjected into the pronucleus and cytoplasm with DNA of a gene targeting vector and mRNAs for the expression of a pair of gene specific zinc-finger nucleases (ZFN1/2). HR of the targeting vector with the target site results in a knockout (KO) or knock-in (KI) allele. Manipulated zygotes are subsequently transferred into pseudopregnant females to recover mutant mice.

Results

We used a ZFN pair (ZFN^{Rosa}) that recognizes 18 nucleotides upstream and 12 nucleotides downstream of the XbaI site in the first intron of *Rosa26* (Fig. 2*A*), a locus that enables widespread transgene expression in vivo (17). To confirm the stimulatory power of ZFN^{Rosa}-induced homologous recombination, we first transfected murine ES cells with a hygromycin selectable gene targeting vector (pRosa26.11; Fig. 2*A*) with or without ZFN^{Rosa} expression plasmids. Hygromycin-resistant ES cell clones were expanded and analyzed by Southern blotting for their *Rosa26* genotype. Thirty-two ES cell clones transfected with pRosa26.11 alone exhibited only the 11.5-kb EcoRV wild-type band (Fig. 2*B*). The cotransfection of pRosa26.11 with ZFN^{Rosa} plasmids strongly enhanced recombination at *Rosa26*, such that 11 of 34 analyzed clones exhibited the predicted 4.5-kb EcoRV fragment derived from a targeted allele (Fig. 2*C*). One ES cell clone exhibited only the targeted band and likely represents the targeting of both *Rosa26* alleles.

Targeted Integration of a β-Galactosidase Reporter Gene into the *Rosa26* Locus. To insert a β-Galactosidase gene into *Rosa26* of one-cell embryos, we linked a 4.2-kb reporter cassette to homology regions flanking the target XbaI site (Fig. 3*A*). This targeting vector was coinjected with ZFN^{Rosa} mRNAs in a two-step

Author contributions: M.H.d.A., W.W., and R.K. designed research; M.M. performed research; M.H.d.A. contributed new reagents/analytic tools; M.M. and R.K. analyzed data; and W.W. and R.K. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

[1]To whom correspondence may be addressed. E-mail: wurst@helmholtz-muenchen.de or ralf.kuehn@helmholtz-muenchen.de.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1009424107/-/DCSupplemental.

Genmodifikation

Gezielte Manipulation des Genoms mit Zinkfingernukleasen

MELANIE MEYER, BENEDIKT WEFERS, OSKAR ORTIZ, WOLFGANG WURST, RALF KÜHN
INSTITUT FÜR ENTWICKLUNGSGENETIK, HELMHOLTZ-ZENTRUM MÜNCHEN

In vielen Säugetierarten gab es bis jetzt keine effektiven Werkzeuge für eine gezielte Genmodifikation. Die Entwicklung der Zinkfingernuklease-Technologie ermöglicht nun auch in diesen Organismen eine schnelle und einfache Genommanipulation.

Most mammalian species lack useful tools for targeted gene modification. With the discovery of the zinc-finger nuclease technology it is now possible to achieve rapid and easy genome manipulations in mammals.

■ Die Herstellung von Tieren oder Pflanzen mit gezielten Genmodifikationen ist ein potentes Werkzeug, um die Funktion von Genen zu untersuchen, Krankheitsmechanismen zu entschlüsseln und Organismen von biotechnologischem Nutzen zu erzeugen. Während frühe Mutagenesetechniken wie die chemisch induzierte ENU(*ethyl nitroso urea*)-Mutagenese nur zufällige Mutationen erzeugen, zielen neuere Methoden auf eine spezifische, vorab planbare Manipulation des Genoms ab. Die Transgenese umfasst die Expression von Fremd-DNA oder die Veränderung des Expressionsmusters und/oder der Expressionsstärke der endogenen Gene durch gezielte Einbringung von DNA-Modifikationen. Die erste Technik der gezielten Genveränderung, das Gen-Targeting in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), die in den 1980er-Jahren entwickelt wurde, beruht auf dem natürlichen DNA-Reparaturmechanismus der homologen Rekombination (HR), der die zweite Kopie des Chromosoms als Reparaturvorlage benutzt. Die HR ist robust, jedoch im Allgemeinen, mit einer Frequenz von 10^{-6} bis 10^{-9} modifizierten Zellen, wenig effizient [1]. Bisher hat diese niedrige Frequenz der HR in Säugerzellen und die daraus resultierende Notwendigkeit von Selektionsverfahren die Anwendung dieser Technik auf ES-Zellen beschränkt. Außerdem wurden ES-Zellen, die pluripotent sind und bleiben, bis jetzt nur in Maus, Ratte und Mensch charakterisiert. Durch die Verwendung der I-SceI-Meganuklease aus Hefe konnte gezeigt werden, dass die Erzeugung eines Doppelstrangbruchs (DSB) innerhalb des Genoms die HR am Ziellocus in einer hohen Frequenz ermöglicht, indem die natürlichen DNA-Reparaturmechanismen stark aktiviert werden. Die beobachtete Frequenz liegt hier bei 10^{-2} bis 10^{-4} modifizierten Zellen [2]. Kürzlich wurde jedoch eine neue Technik zur Erzeugung von DSB, basierend auf der Verwendung von sequenzspezifischen Zinkfingernukleasen (ZFN), entwickelt und für die Herstellung von Organismen mit Genmodifikationen benutzt.

Mechanismus der Zinkfingernukleasen

Um für die Genommanipulation von Nutzen zu sein, muss eine Endonuklease spezielle Anforderungen erfüllen. Sie muss einzigartige Zielsequenzen spezifisch erkennen und an jeden beliebigen Locus angepasst werden können. Die ZFN erfüllen diese Bedingungen, da sie aus zwei funktionellen Domänen aufgebaut werden:

BIO*spektrum* | 05.11 | 17. Jahrgang DOI: 10.1007/s12268-011-0086-3

Modeling disease mutations by gene targeting in one-cell mouse embryos

Melanie Meyer[a,b,1], Oskar Ortiz[a,1], Martin Hrabé de Angelis[b,c], Wolfgang Wurst[a,b,d,2], and Ralf Kühn[a,b,2]

[a]Institute for Developmental Genetics, Helmholtz Center Munich, 85764 Munich, Germany; [b]Technical University Munich, 80333 Munich, Germany; [c]Institute of Experimental Genetics, Helmholtz Center Munich, 85764 Munich, Germany; and [d]Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e. V., 80336 Munich, Germany

Edited by Joseph S. Takahashi, Howard Hughes Medical Institute, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, and approved April 20, 2012 (received for review December 21, 2011)

Gene targeting by zinc-finger nucleases in one-cell embryos provides an expedite mutagenesis approach in mice, rats, and rabbits. This technology has been recently used to create knockout and knockin mutants through the deletion or insertion of nucleotides. Here we apply zinc-finger nucleases in one-cell mouse embryos to generate disease-related mutants harboring single nucleotide or codon replacements. Using a gene-targeting vector or a synthetic oligodesoxynucleotide as template for homologous recombination, we introduced missense and silent mutations into the *Rab38* gene, encoding a small GTPase that regulates intracellular vesicle trafficking. These results demonstrate the feasibility of seamless gene editing in one-cell embryos to create genetic disease models and establish synthetic oligodesoxynucleotides as a simplified mutagenesis tool.

Gene targeting in embryonic stem (ES) cells is routinely applied to modify the mouse genome and established the mouse as the most commonly used genetic animal model (1). Direct genome editing by zinc-finger nucleases (ZFN) in one-cell embryos has been recently established as an alternative mutagenesis approach in mice, rats, rabbits, and zebrafish (2–9). Such nucleases are designed to induce double-strand breaks (DSBs) at preselected genomic target sites (10–13). DSBs targeted to coding exons frequently undergo sequence deletions leading to gene knockout or allow the insertion (knockin) of DNA sequences from gene-targeting vectors via homologous recombination (HR). We and others recently reported the generation of knockout and knockin mutants at the *Rosa26*, *Mdr1a*, *Pxr*, and *IgM* loci by microinjection of ZFNs one-cell embryos of mice, rats, and rabbits (3, 5, 8).

Genetically modified mammals can serve as valuable models of human inherited disorders, but the majority of disease-associated alleles represent single nucleotide replacements that lead to missense, nonsense, or silent mutations (14, 15). The successful use of ZFNs to induce knockout and knockin alleles prompted us to further explore whether disease-related mutants harboring seamless nucleotide replacements can be created as well. Here we apply gene editing in one-cell mouse embryos to introduce nucleotide replacements into the *Rab38* gene.

RAB38 is a member of the RAB small GTPase family that regulates intracellular vesicle trafficking (16, 17). In mice and rats, *Rab38* is expressed in melanocytes, retinal pigment epithelial cells, alveolar pneumocytes, and platelets (17–20). In *chocolate* mutant mice, the *Rab38* gene exhibits a nucleotide replacement within codon 19 ($Rab38^{cht}$) (21). The resulting G19V amino acid substitution impairs the sorting of the tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) into melanosomes, leading to impaired pigment production. Homozygous $Rab38^{cht}$ mice exhibit a chocolate-like brown coat color, ocular hypopigmentation, and alterations of the lung surfactants and alveolar structure (22–24). In the rat substrains Fawn-hooded and Cinnamon, a point mutation in the Ruby locus, encoding the *Rab38* homolog, causes hypopigmentation, platelet storage pool deficiency, and lung pathology (19, 20, 25). These RAB38 deficient mutants are considered as phenotypic models of Hermansky-Pudlak syndrome (HPS) in humans, characterized by oculocutaneous albinism (OCA), progressive pulmonary fibrosis, and platelet storage disease (20, 26, 27). HPS defines a group of eight recessive disorders that arise from defects in the biogenesis of lysosome-related organelles, including melanosomes and platelet-dense granules (26, 27). The genes associated with HPS encode components of the biogenesis of lysosome-related organelles (BLOC-1,-2-3) and the AP3 protein complexes that play roles in intracellular protein trafficking and/or organelle distribution. In *Drosophila*, a synthetic lethal interaction between the BLOC-1 binding partner RAB11 and its paralog *lightoid*, the ortholog of mammalian *Rab38/32*, argues for a partially overlapping function of these RAB proteins (28, 29). Therefore, *Rab38* is considered a HPS-related locus, though patients harboring mutations in *Rab38* have not been identified (26, 27).

By employing ZFNs in one-cell embryos, we introduced missense and silent mutations into the first exon of *Rab38* using a gene-targeting vector or a synthetic oligodesoxynucleotide (ODN) as repair templates. These results demonstrate the feasibility of seamless gene editing in one-cell mouse embryos to create genetic disease models and establish synthetic ODNs as a simplified tool for mutagenesis.

Results

Generation of *Rab38* G19V Mutants by ZFNRab38 and Gene-Targeting Vector. For HR with the *Rab38* locus, we designed a gene-targeting vector that includes a glycine to valine replacement at codon 19 (G19V) in the first exon, flanked by homology regions of 0.9 kb and 2.8 kb (Fig. 1*A*). To create the G19V replacement, a *T* was placed at the second codon position as found in $Rab38^{cht}$ (*chocolate*) mutants (21), whereas a silent A replacement was made at the third position as an identifier for our targeted $Rab38^{IDG\text{-}Cht}$ allele (Fig. 1*B*). These replacements further generated a SexAI and erased a BsaJI site and enabled us to discriminate the targeted $Rab38^{IDG\text{-}Cht}$ and the $Rab38^{+}$ (wild type) allele by restriction analysis. To stimulate HR at the *Rab38* locus, we used a ZFN pair (ZFN^{Rab38}) with a specific cleavage site located 50 bp downstream of codon 19 (Fig. 1*A*). To avoid the processing of the targeting vector by ZFN^{Rab38}, the vector's ZFN binding sequences were modified by silent nucleotide replacements (Fig. 1*D*).

The targeting vector was microinjected together with ZFN^{Rab38} mRNAs into $(C57BL/6N \times FVB)F_1$ mouse one-cell

Author contributions: M.H.d.A., W.W., and R.K. designed research; M.M., O.O., and R.K. performed research; M.H.d.A. contributed new reagents/analytic tools; M.M. and R.K. analyzed data; and M.M., O.O., W.W., and R.K. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

[1]M.M. and O.O contributed equally to this work.

[2]To whom correspondence may be addressed. E-mail: wurst@helmholtz-muenchen.de or ralf.kuehn@helmholtz-muenchen.de.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1121203109/-/DCSupplemental.

Gene Editing in One-Cell Embryos by Zinc-Finger and TAL Nucleases

Benedikt Wefers,[1] Melanie Meyer,[1,2] Svenja Hensler,[1,2] Sudeepta Panda,[1,2] Oskar Ortiz,[1] Wolfgang Wurst,[1,2,3,4] and Ralf Kühn[1,2]

[1]Helmholtz Center Munich, Institute for Developmental Genetics Munich, Germany
[2]Chair for Developmental Genetics, Technische Universität München, Munich, Germany
[3]Max Planck Institute of Psychiatry, Molecular Neurogenetics, Munich, Germany
[4]Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, Standort München, Munich, Germany

ABSTRACT

Gene targeting by sequence-specific nucleases in one-cell embryos provides an expedited mutagenesis approach in rodents. This technology has been recently established to create knockout and knockin mutants through sequence deletion or sequence insertion. This article provides protocols for the preparation and microinjection of nuclease mRNA and targeting vector DNA into fertilized mouse eggs. Furthermore, we provide guidelines for genotyping the desired mouse mutants. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 2:347-364 © 2012 by John Wiley & Sons, Inc.

Keywords: pronucleus injection • gene targeting • mouse mutant • zinc-finger nuclease • TAL nuclease • homologous recombination

INTRODUCTION

This article describes the microinjection of gene-specific nuclease mRNA and targeting vector DNA into one-cell mouse embryos. This technique makes it possible to produce targeted mouse mutants in a single step by stimulating homologous recombination with the paternal or maternal pronuclear genomes. We provide step-by-step protocols for the preparation of injection buffer (Basic Protocol 1), nuclease mRNA (Basic Protocol 2), and targeting vector DNA (Basic Protocol 3), and the setup of these components into aliquots for microinjection (Basic Protocol 4). These are followed by protocols for the microinjection of one-cell embryos (Basic Protocol 5) and for genotyping of nuclease-induced mutants (Basic Protocol 6). The protocol section is preceded by an introduction to nuclease technology and followed by a discussion of strategies for genotyping offspring to identify the desired mutants.

Strategic Planning and Experimental Design

Gene targeting is routinely applied in embryonic stem (ES) cells to modify the mouse genome, and has established the mouse as the most commonly used genetic animal model (Capecchi, 2005). Gene targeting in ES cells relies on spontaneously occurring homologous recombination (HR) of a gene-targeting vector with its chromosomal counterpart. The absolute frequency of these events in ES cells is low, and spontaneous HR is antagonized by the more frequent event of random vector integration. Therefore, gene targeting in ES cells requires the inclusion of selection marker genes in targeting vectors and the isolation of drug-resistant ES cell clones. Usually, genotyping of several hundred colonies is required to identify a few recombined ES cell clones among the majority of clones harboring random vector integrations. Recombined ES cells are subsequently

Current Protocols in Mouse Biology 2: 347-364, December 2012
Published online December 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI: 10.1002/9780470942390.mo120177
Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Inc.

Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides

Benedikt Wefers[a,1], Melanie Meyer[a,1,2], Oskar Ortiz[a], Martin Hrabé de Angelis[b,c], Jens Hansen[a], Wolfgang Wurst[a,c,d,e,3], and Ralf Kühn[a,c,3]

[a]Institute of Developmental Genetics, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, 85764 Munich, Germany; [b]Institute of Experimental Genetics, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, 85764 Munich, Germany; [c]Technische Universität München, 85350 Freising-Weihenstephan, Germany; [d]Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e.V., 80336 Munich, Germany; and [e]Max Planck Institute of Psychiatry, 80804 Munich, Germany

Edited* by Pierre Chambon, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U596, Université de Strasbourg, College de France, Illkirch-Cedex, France, and approved January 23, 2013 (received for review October 31, 2012)

The study of genetic disease mechanisms relies mostly on targeted mouse mutants that are derived from engineered embryonic stem (ES) cells. Nevertheless, the establishment of mutant ES cells is laborious and time-consuming, restricting the study of the increasing number of human disease mutations discovered by high-throughput genomic analysis. Here, we present an advanced approach for the production of mouse disease models by microinjection of transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and synthetic oligodeoxynucleotides into one-cell embryos. Within 2 d of embryo injection, we created and corrected *chocolate* missense mutations in the small GTPase RAB38; a regulator of intracellular vesicle trafficking and phenotypic model of Hermansky-Pudlak syndrome. Because ES cell cultures and targeting vectors are not required, this technology enables instant germline modifications, making heterozygous mutants available within 18 wk. The key features of direct mutagenesis by TALENs and oligodeoxynucleotides, minimal effort and high speed, catalyze the generation of future in vivo models for the study of human disease mechanisms and interventions.

gene targeting | mouse genetics | knockout | knockin

Gene targeting in embryonic stem (ES) cells is routinely applied to modify the mouse genome and establish the mouse as the most commonly used genetic disease model (1). Nevertheless, the production of targeted mutants is a laborious and time-consuming task that requires the construction of targeting vectors with selection markers, the isolation of mutant ES cells, and the generation of germ-line chimaeras. Moreover, advanced allele design strategies, like the creation of missense mutations, require an additional working step to eliminate selection marker genes from targeted loci (2). Therefore, the establishment of such mutants is presently a low-throughput and long-term procedure, restricting rapid advancements in disease modeling. In contrast, a burst of nucleotide replacements, small deletions and insertions in coding regions that underlie Mendelian or complex human diseases are discovered by high-throughput genomic analysis such as whole-exome sequencing (3–5). The faithful reproduction of such mutations in mouse models will be instrumental in understanding disease mechanisms and to develop therapeutic interventions. This demand is neither covered by available mutagenesis technologies nor by large-scale mouse mutagenesis programs that aim for complete gene inactivation in classical or conditional knockout mice (6). To cope with this challenge, we aimed to create mutations within the shortest time directly in the genome of one-cell mouse embryos, avoiding the time-consuming handling of ES cells, gene-targeting vectors, selection markers, and chimaeras. Our approach is based on transcription activator-like (TAL) effector nucleases (TALENs) to create targeted double-strand breaks that are either sealed by homologous recombination (HR) with mutant, synthetic oligodeoxynucleotides (ODNs) or closed by nonhomologous end-joining (NHEJ) repair that frequently elicits deletion and insertion mutations. We previously demonstrated that zinc-finger nucleases (ZFNs) can be used for direct gene editing in one-cell mouse embryos (7, 8), but limitations of the zinc-finger DNA recognition code precludes a wider application of this technology to any genomic coding sequence (9, 10). In contrast to ZFNs, the recognition code of the transcription activator-like (TAL) effector proteins enables the construction of new DNA-binding domains with unprecedented freedom (11, 12). The TAL DNA recognition code is based on four variants of 34-residue peptide elements (TAL repeats) that each mediate the binding to one of the four nucleotides of a DNA target sequence. As specified by a selected target sequence, TAL repeats can be combined in the appropriate order and function as sequence-specific TAL nucleases (TALENs) by fusion with the FokI nuclease domain. A typical, complete TALEN target site includes binding sites for two TAL-Fok fusion proteins of 14–18 bp that are each preceded by a T and separated by a spacer region of 14–16 bp (13, 14). Upon expression of TALENs in mammalian cell lines, mouse, rat, and pig embryos knockout alleles were obtained through NHEJ-mediated sequence deletion (15–17).

Here, we apply TALENs for the expedited creation of mouse disease models from one-cell embryos. We developed tools for the genome-wide analysis of TALEN target sites, the modular construction of TALEN coding vectors, and a nuclease reporter assay for quality control. TALEN mRNAs are microinjected together with synthetic, single-stranded ODNs into one-cell embryos that develop into heterozygous founder mutants. We applied this technology to the *Rab38* gene, a small GTPase that regulates intracellular vesicle trafficking in melanocytes, retinal pigment epithelial cells, alveolar pneumocytes, and platelets (18, 19). Mutant *chocolate* mice (18) (*Rab38*^{cht}) exhibit a missense, and *ruby* rats (20) exhibit a nonsense mutation within *Rab38* and are considered to be phenotypic models of Hermansky–Pudlak syndrome (21, 23), a disease characterized by oculocutaneous albinism (OCA), progressive pulmonary fibrosis, and platelet storage disease. For the human *Rab38* gene, more than 50 missense, nonsense, and deletion mutations were identified by large-

Author contributions: B.W., M.M., W.W., and R.K. designed research; B.W., M.M., O.O., and R.K. performed research; M.H.d.A. and J.H. contributed new reagents/analytic tools; B.W., M.M., O.O., W.W., and R.K. analyzed data; and B.W., W.W., and R.K. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

*This Direct Submission article had a prearranged editor.

[1]B.W. and M.M. contributed equally to this work.

[2]Present address: University Children's Hospital Munich, Dr von Haunersches Kinderspital, 80337 Munich, Germany.

[3]To whom correspondence may be addressed. E-mail: wurst@helmholtz-muenchen.de or ralf.kuehn@helmholtz-muenchen.de.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1218721110/-/DCSupplemental.

6.8 Genehmigungen zur Veröffentlichung

6.8.1 PNAS

Betreff: RE: Permission to use figures of my article for my PhD thesis
Von: PNAS Permissions <PNASPermissions@nas.edu>
Datum: 20.10.2013 20:21
An: 'Melanie Meyer'

Thank you for your message. The email response below is our way of granting approval

Sincerely,

Kay McLaughlin
PNAS Permissions

-----Original Message-----
From: Melanie Meyer
Sent: Saturday, October 19, 2013 3:46 AM
To: PNAS Permissions
Subject: Re: Permission to use figures of my article for my PhD thesis

Dear Sirs and Madams,

My university asked me the question to get the permission from you, to publish my dissertions online on the library website of the university as part of my defence.

Can I get the permission from you in a writen form

Thank you in advance

Best regards
Melanie Meyer

Am 29.02.2012 18:42, schrieb PNAS Permissions:

> Dear Dr. Meyer,
>
> Authors need not obtain permission for the following uses of material they have published in PNAS: (1) to use their original figures or tables in their future works; (2) to make copies of their papers for their classroom teaching; or (3) to include their papers as part of their dissertations.
>
> Of course, citation to the original source should be included and copies should include the copyright notice of the original report [full journal reference].
>
> Please feel free to contact us with any additional questions you might have.
>
> Thanks!
>
> Best regards,
> Audrey Springer for
> Diane Sullenberger
> Executive Editor
> PNAS

6.8.2 Biospektrum

Betreff: WG: Copyright meiner Abbildung
Von: "Schmidt-Loeffler, Barbara, Springer DE" <Barbara.Schmidt-Loeffler@springer.com>
Datum: 09.02.2012 09:17
An: "Meyer, Melanie" <melanie.meyer@helmholtz-muenchen.de>

Abbildungen
Gezielte Manipulation des Genoms mit Zinkfingernukleasen
Melanie Meyer, Benedikt Wefers, Oskar Ortiz, Wolfgang Wurst and Ralf Kühn
BIOspektrum, 2011, Volume 17, Number 5, Pages 537-540

Sehr geehrte Frau Meyer,

Unter den folgenden Voraussetzung erteilen wir Ihnen hiermit die kostenlose Genehmigung, das angefragte Material für Ihre Dissertation zu übernehmen:

- Es handelt sich um original in unserem Werk erschienenes Material, d.h. dass bei dieser Abbildung kein Hinweis auf eine andere Quelle vorhanden ist;
- Die Quelle der Originalpublikation muss genau angegeben werden - einschließlich des Zusatzes: Mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

Es ist selbstverständlich gestattet die finale Version Ihrer Dissertation auf Ihrer persönlichen Homepage, bzw. der Homepage der Universität zu veröffentlichen.

Mit freundlichen Grüßen
—
Barbara Schmidt-Löffler
Springer
Rights and Permissions
—
Tiergartenstr. 17 | 69121 Heidelberg | Germany
barbara.schmidt-loeffler@springer.com
www.springeronline.com
—