

Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. Stefan Frantz

Etablierung von USP8 und USP48 Mutationen in Zell- linien für Cushing-Syndrom Analysen mittels CRISPR/Cas9

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Alexandra Rehm

aus

Stuttgart



Würzburg, den 13. April 2021



Referent: Prof. Dr. Martin Fassnacht

Koreferentin: PD Dr. Camelia-Maria Monoranu

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2021

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abbildungsverzeichnis | III |
| Tabellenverzeichnis | V |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Endokrine Stressachse | 1 |
| 1.2. Cushing Syndrom | 2 |
| 1.2.1. Morbus Cushing | 4 |
| 1.3. Die Genetik von Cushing's Disease: Mutationen von USP8 und USP48..... | 5 |
| 1.4. CRISPR/Cas9..... | 8 |
| 1.4.1. Geschichte von Genom Editing und CRISPR/Cas..... | 8 |
| 1.4.2. Was ist die CRISPR/Cas9 Methode? | 14 |
| 1.5. Zielsetzung..... | 16 |
| 2. Material und Methoden | 17 |
| 2.1. Materialien | 17 |
| 2.1.1. Zelllinien und Bakterienstämme | 17 |
| 2.1.2. Kulturmedien..... | 17 |
| 2.1.3. Antibiotika..... | 18 |
| 2.1.4. Vektor..... | 18 |
| 2.1.5. Oligonukleotide..... | 19 |
| 2.1.6. Antikörper | 20 |
| 2.1.7. Kits | 21 |
| 2.1.8. Enzyme..... | 21 |
| 2.1.9. Größenstandards..... | 21 |
| 2.1.10. Chemikalien..... | 21 |
| 2.1.11. Puffer und Lösungen | 22 |
| 2.1.12. Geräte | 23 |
| 2.1.13. Software und Datenbanken | 23 |
| 2.2. Methoden | 24 |
| 2.2.1. <i>In-silico</i> Design von sgRNA-Oligonukleotiden..... | 24 |
| 2.2.2. Molekularbiologische Methoden..... | 25 |
| 2.2.3. Mikrobiologische Methoden | 28 |
| 2.2.4. Zellbiologische Methoden..... | 30 |
| 2.2.5. Proteinbiochemische Methoden | 33 |
| 3. Ergebnisse | 36 |
| 3.1. Design von sgRNA | 36 |
| 3.2. Knock-out-Vektoren | 43 |
| 3.3. Knock-out USP8 Einzelzellklon..... | 44 |
| 3.3.1. Sequenzierung der generierten Zellklone von USP8 | 46 |
| 3.3.2. Knock-out Zellklon B5 erneut mit CRISPR/Cas9 behandelt..... | 47 |
| 3.3.3. Aktivität der USP8 Deubiquitinase | 48 |
| 3.3.4. Nachweis von Cas9 in Mischklonen von USP8..... | 49 |
| 3.3.5. Genomische Veränderungen bei der Erstellung von Einzelzellklonen | 50 |
| 3.4. Generierung von USP48 knock-out Zellklonen..... | 50 |
| 3.4.1. Sequenzierung der generierten Zellklone von USP48 | 51 |
| 3.4.2. Aktivität der USP48 Deubiquitinase | 55 |
| 4. Diskussion | 56 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.1. | Auswahl der gRNA..... | 56 |
| 4.2. | Folgen des Knock-Outs einer Deubiquitinase | 59 |
| 4.3. | Herstellung von Einzelzellklonen | 60 |
| 4.4. | Knock-out des <i>USP8</i> Gens durch CRISPR/Cas9 | 61 |
| 4.5. | Knock-out des <i>USP48</i> Gens mittels CRISPR/Cas9..... | 63 |
| 4.6. | Schwächen und Stärken der Arbeit..... | 64 |
| 4.7. | Fazit und Ausblick | 65 |
| 5. | Zusammenfassung | 67 |
| 6. | Literaturverzeichnis..... | 68 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1.1 Regulation der HHN-Achse..... | 2 |
| Abb. 1.2 Möglicher Signalweg von USP8 und USP48 in kortikotropen Hypophysenadenomen | 8 |
| Abb. 1.3 Schlüsselstudien zur Entwicklung von CRISPR-Cas9-Systems und Genome Editing. | 13 |
| Abb. 1.4 Überblick über CRISPR-Cas 9 Methode und NHEJ Reparatur Mechanismus. ("CRISPR Overview," 2018)..... | 14 |
| Abb. 1.5 Verdeutlichung des Knock-in mittels CRISPR Cas9 und Reparaturtemplate. ("CRISPR Overview," 2018)..... | 15 |
| Abb. 2.1 Plasmidkarte von pX459 Leer-Vektor (SnapGene®)..... | 19 |
| Abb. 2.2 Überblick über die Herstellung von gRNAs (Screenshot der Website CRISPOR). | 24 |
| Abb. 2.3 Beispiel des Annealing und Phosphorylierung von USP8 Exon 3..... | 25 |
| Abb. 2.4 Verdau und Ligation am Beispiel von humanem USP8..... | 27 |
| Abb. 2.5 Schematischer Versuchsüberblick über den Erhalt von CRISPR-Knock-out Einzelzellklonen. | 33 |
| Abb. 3.1 Guide List am Beispiel von USP8 Exon 3 von der Website crispor.tefor.net. | 36 |
| Abb. 3.2 Primer für gRNA am Beispiel von USP8 Exon 3. | 38 |
| Abb. 3.3 USP8 Gen Human mit den jeweiligen gRNA Oligonukleotiden. | 39 |
| Abb. 3.4 USP48 Gen Human mit den jeweiligen gRNA Oligonukleotiden. | 40 |
| Abb. 3.5 USP8 Maus Gen mit den jeweiligen gRNA Oligonukleotiden. | 41 |
| Abb. 3.6 Schematische Darstellung des USP48 Maus Gen mit designten gRNA Oligonukleotiden. | 42 |
| Abb. 3.7 Beispielhafte Darstellung der Produktauftragung der Kolonie PCR in ein Agarose Gel von USP8 Human. | 44 |
| Abb. 3.8 Generierung von USP8 knock-out HEK293 Zelllinien mittels CRISPR/Cas9 | 45 |
| Abb. 3.9 Sequenzierung der Knock-out homologen USP8 Mutante B5 (gRNA8HE20160) | 46 |
| Abb. 3.10 Sequenzierung der heterozygoten USP8 Mutatante A5 (gRNA8HE20160). | 47 |
| Abb. 3.11 Generierung von USP8 knock-out mit B5 (gRNA20160) Zellklon aus der | |

| | |
|--|----|
| HEK293AD Zelllinie mittels CRISPR/Cas9..... | 48 |
| Abb. 3.12 Vergleich der relativen Ubiquitinierung der Zellklone B5 (gRNA8HE20160), B5+363 zum Leer Vektor..... | 49 |
| Abb. 3.13 Expression von Cas9 | 50 |
| Abb. 3.14 Generierung von USP48 knock-out HEK293AD Zelllinien mittels CRISPR/Cas9..... | 51 |
| Abb. 3.15 Analysierung der Kolonie-PCR mittels Agarosegel..... | 52 |
| Abb. 3.16 Sequenzierung des Einzelklones USP48 Exon 2 G5 (gRNA48HE2110) | 52 |
| Abb. 3.17 Sequenzierung von Kolonie 38..... | 53 |
| Abb. 3.18 Sequenzierung der Kolonie 34. | 53 |
| Abb. 3.19 Sequenzierung der Kolonie 56 mit der Deletion von 9 Basenpaaren (c.881-889del9)..... | 54 |
| Abb. 3.20 Mittels FORECasT berechnete Wahrscheinlichkeit der Mutation von G5 (gRNA48HE2110)..... | 54 |
| Abb. 3.21 Vergleich der relativen Ubiquitinierung der Zellklone G5 (gRNA48HE2110), B3, C3 und E3 (alle gRNA48HE240) zum Leer Vektor..... | 55 |
| Abb. 4.1 Schematische Darstellung des Hotspot-Mutationsareal von USP8 in Exon 14 | 57 |
| Abb. 4.2 Schematische Darstellung des Hotspot-Mutationsareal von USP48 in Exon 10 | 58 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 2.1 Humane Zelllinien | 17 |
| Tabelle 2.2 Maus-Zelllinie | 17 |
| Tabelle 2.3 Eingesetzte Antibiotika. | 18 |
| Tabelle 2.4 Eingesetzter Leervektor. | 18 |
| Tabelle 2.5 Eingesetzte Expressionsplasmide. | 19 |
| Tabelle 2.6 Verwendete Primer | 19 |
| Tabelle 2.7 Primer zur Sequenzierung von USP8 und USP48 knock-out HEK293AD Zellen..... | 20 |
| Tabelle 2.8 In dieser Arbeit verwendete mRNA Sequenzen von USP8 und USP48 | 20 |
| Tabelle 2.9 Primär-Antikörper mit Verdünnung und ihrem Verwendungszweck. | 20 |
| Tabelle 2.10 Sekundär Antikörper und Verwendung und Verdünnung für WB..... | 20 |
| Tabelle 2.11 Verwendete Chemikalien, ihre Verwendung und ihr Hersteller. | 21 |
| Tabelle 2.12 Verwendete Geräte und ihre Hersteller | 23 |
| Tabelle 2.13 Reaktionsmix | 25 |
| Tabelle 2.14 Annealing und Phosphorylierung Programm | 26 |
| Tabelle 2.15 Pipettierschema für Verdau und Ligation..... | 26 |
| Tabelle 2.16 Verdau und Ligationsprogramm..... | 26 |
| Tabelle 2.17 Verwendetes Pipettierschema für Kolonie-PCR. | 29 |
| Tabelle 2.18 Verwendete Kolonie-PCR-Programm..... | 29 |
| Tabelle 3.1 Auflistung der gRNA für USP8 Human in 5'-3' Richtung. | 39 |
| Tabelle 3.2 Auflistung der gRNA für USP48 Human in 5'-3' Richtung. | 40 |
| Tabelle 3.3 Auflistung der gRNA für USP8 Maus in 5'-3' Richtung. | 41 |
| Tabelle 3.4 Auflistung der gRNA für USP48 Maus in 5'-3' Richtung..... | 42 |
| Tabelle 3.5 Auflistung der in dieser Arbeit hergestellten Knock-out Plasmiden in pX459 | 43 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| % | Prozent |
| μ | mikro |
| A | Adenin |
| ACTH | Adrenocorticotropes Hormon |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCA | Bicinchonic Acid Kit |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovine serum albumin Fraktion V |
| ca | circa |
| Cas | CRISPR-associated |
| CD | Cushing's Disease |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CREB | cAMP response element-binding Protein |
| CRH | Corticotropin-Releasing Hormon |
| CRISPR | clustered regularly interspaced palindromic repeats |
| CS | Cushing Syndrom |
| ddH ₂ O | ultra reines und steriles Wasser |
| DMEM | Dulbeccos's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxiribonucleic acid |
| DSB | Doppelstrangbrüche |
| DTT | Dithiothreitol |
| DUB | Deubiquitinase |
| <i>E.coli</i> | Escherichia coli |
| ECL | enhanced chemiluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGFR | Epidermal Growth Receptor Factor |
| FCS | Fetal calve serum |
| g | Gramm |
| GC | Glukokortikoide |
| Gli1 | glioma associated oncogen |
| GR | Glukokortikoid-Rezeptor |
| gRNA | guide RNA |
| HHN-Achse | Hypothalamische-Hypophysäre-Nebennierenrinden-Achse |
| HR | Homologe Rekombination |
| HRP | horseradish peroxidase (Merrettich Peroxidase) |
| HSP90 | Heat Shock Protein 90 |
| kb | kilobasen |
| kDa | kilo Dalton |
| LB | lysogeny broth |
| M | Molar |
| M. | Morbus |
| MAPK | mitogen-activated-protein Kinase |

| | |
|-------------|---|
| MC2-R | Melanocortin-Rezeptor 2 |
| MGEs | mobilen genetischen Elementen |
| ml | Milliliter |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NHEJ | Non-homologous-end-joining |
| nm | nanometer |
| NNR | Nebennierenrinde |
| nt | Nukleotid |
| N-Terminus | Amino-Terminus |
| ORF | Open reading frame |
| PAMs | proto-spacer-adjacent motiv |
| PCR | Polymerase-Chain-Reaktion |
| pmol | pikomol |
| Ptch1 | Patch1 |
| RIPA Puffer | Radioimmunopresipationsassay-Puffer |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | rounds per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | sodium dodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis |
| sgRNA | single guide RNA |
| SHH | Sonic-Hedgehog |
| Smo | Smoothened |
| STR | short tandem repeats |
| T | Thymin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TALE | transcriptor-activator-like-effector |
| TALEN | TALE-Nuklease |
| TBS | Tris-buffered saline |
| TBS - T | Tris-buffered saline + Tween20 |
| USP | ubiquitin-specific protease |
| V | Volt |
| WB | Western Blot |
| WT | Wildtyp |
| ZF | Zink-Finger |
| ZFNs | Zink-Finger-Nuklease |
| zw. | zwischen |

1. Einleitung

Die Hypophyse gliedert sich in drei Lappen: den Vorderlappen, Adenohypophyse genannt, den Hinterlappen, auch als Neurohypophyse bezeichnet, und den Pars Intermedia, den Mittellappen. Die Adenohypophyse besteht aus 5 verschiedenen Zelltypen, welche jeweils spezifische Hormone produzieren. Man unterscheidet kortikotrope, thyreotrope, gonadotrope, somatotrope und laktotrope Zellen. Eine Entartung der kortikotropen Zellen kann zu einem Adenom dieser Zellen führen, die Ursache hierfür ist noch nicht vollständig geklärt.

1.1. Endokrine Stressachse

Die hypothalamische-hypophysäre-Nebennierenrinden Achse (HHN-Achse) ebenfalls bezeichnet als Stressachse, wird bei psychischem und physiologischem Stress aktiviert, um somit die Homöostase im Körper aufrecht zu erhalten (Tsigos & Chrousos, 2002). Endogene Glukokortikoide (GC), insbesondere Kortisol, stehen am Ende dieser Stressachse (Sapolsky, Romero, & Munck, 2000; Silverman & Sternberg, 2012) (s. Abb. 1.1). Unter physiologischen Bedingungen wird Corticotropin-Releasing Hormon (CRH) in einem zirkadianen, pulsativen Rhythmus, verstärkt in den frühen Morgenstunden, von Zellen des Hypothalamus ausgeschüttet (Engler et al., 1989), wodurch auch mehr adrenocorticotropes Hormon (ACTH) und somit auch mehr Kortisol am Vormittag ausgeschüttet wird (Horrocks et al., 1990).

Unter Stress wird die Amplitude und Frequenz der CRH Sekretion verstärkt, wodurch basophile Zellen der Adenohypophyse verstärkt ACTH ausschütten (Tsigos & Chrousos, 2002). ACTH bindet an den Melanocortin Rezeptor-2 (MC2-R, welcher an der Oberfläche von Nebennierenrinden (NNR) Zellen in der Zona fasciculata liegt und stimuliert somit die Produktion und Ausschüttung von Kortisol (Clark et al., 2016). Kortisol terminiert über die Bindung an einen Glucocorticoid-Rezeptor im Hypothalamus beziehungsweise in der Hypophyse die Freisetzung von CRH oder ACTH. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus von Kortisol auf die ACTH Sekretion verringert somit den katabolen, antireproduktiven und immunsuppressiven Effekt von Kortisol (Yates, Leeman, Glenister, & Dallman, 1961). Eine übermäßige oder inadäquate Aktivierung der Stressachse insbesondere bei chronischem Stress und in Folge eine erhöhte Sekretion von Glukokortikoiden kann zur Entwicklung von Krankheiten beitragen (Smith & Vale, 2006).

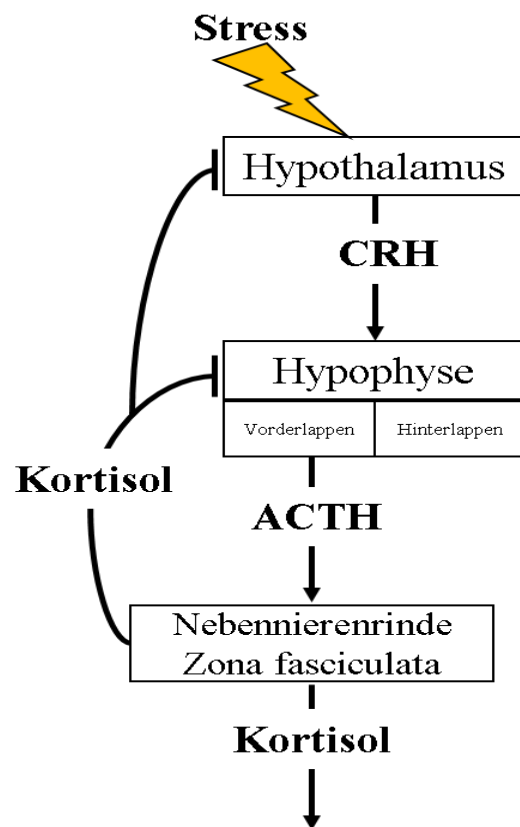


Abb. 1.1 Regulation der HHN-Achse. Der Hypothalamus schüttet CRH aus, welches die Zellen im Vorderlappen der Hypophyse zur Sekretion von ACTH stimuliert, ACTH gelangt über den Blutkreislauf zur Nebennierenrinde, wo in der Zona fasciculata Kortisol gebildet und ausgeschüttet wird. Das Kortisol inhibiert über eine negative Rückkopplung die ACTH und CRH Sekretion.

1.2. Cushing Syndrom

Das Cushing Syndrom wird durch einen chronischen Überschuss an Glukokortikoiden verursacht. Dieser kann iatrogen durch Medikamente oder endogen herbeigeführt sein. Das endogene Cushing Syndrom (CS) ist eine seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 2-5 pro einer Million Menschen pro Jahr und einer Prävalenz von 39 - 79 pro eine Million Menschen in verschiedenen Populationen (Lacroix, Felders, Stratakis, & Nieman, 2015).

Beim endogenen CS wird zwischen ACTH-abhängigem (ca. 80%) und unabhängigem (ca. 20%) Cushing Syndrom unterschieden. Die Ausschüttung von Kortisol wird - wie oben beschrieben - über ACTH reguliert. Bei einem kortikotropen Hypophysenadenom (Morbus Cushing) wird vermehrt ACTH ausgeschüttet. Es ist die häufigste Ursache für ACTH-abhängiges CS. Seltene Ursache für ACTH-abhängiges CS sind nicht-hypophysäre Tumore die ACTH ausschütten. Ursache für eine ektope ACTH-Sekretion können kleinzellige Bronchialkarzinome, neuroendokrine Neoplasien des Gastrointestinaltrakts oder Bronchial- und Thymuskarzinoide sein. Die Ursachen für ACTH-unabhängige CS sind entweder ein Nebennierenadenom oder -karzinom die GC produzieren. Für diese Form ist ein Kortisolüberschuss bei einem niedrigen ACTH-Spiegel charakteristisch, da die Ausschüttung von ACTH durch einen negativen Feedback Regulationsmechanismus gesteuert wird. (Newell-Price, Bertagna, Grossman, & Nieman, 2006).

Hyperkortisolismus präsentiert sich mit vielen unterschiedlichen und schwerwiegenden klinischen Merkmalen und Symptomen, was wiederum zu Schwierigkeiten in der Diagnostik führt. Patienten zeigen Stammfettsucht, Abgeschlagenheit, Störungen des Menstruationszyklus, Depressionen, Akne, rote Dehnungstreifen, dünnere und verletzlichere Haut, männlicher Behaarungstyp bei Frauen (Hirsutismus), sowie proximale Muskelschwäche. Kortisol hat auch Auswirkungen auf den Stoffwechsel und kann zu Diabetes mellitus, Bluthochdruck, und Osteoporose führen (Newell-Price, Trainer, Besser, & Grossman, 1998). Durch die kortisolbedingten Veränderungen des Lipid- und Glukosestoffwechsel haben CS Patienten eine höhere Arteriosklerose Prävalenz, dies spiegelt sich auch in einer höheren Mortalitätsrate mit Herzinfarkt und Schlaganfall wieder (Faggiano et al., 2003).

Bei einem Verdacht auf das Cushing Syndrom, werden nach Ausschluss einer exogenen Ursache, zur initialen Diagnosesicherung die erhöhte Ausscheidung von freiem Cortisol im 24-h Urin oder ein erhöhter Cortisolspiegel im Speichel oder Serum um Mitternacht gemessen, beziehungsweise ein pathologisch niedrigdosierter Dexamethason-Kurztest herangezogen (Nieman et al., 2008).

Nach einem sicheren Nachweis eines Hyperkortisolismus, sollten weitere endokrinologische Testverfahren zur differentialdiagnostischen Klärung eingesetzt werden. Zur Unterscheidung zwischen einem ACTH-abhängigen bzw. ACTH unabhängigen CS dient die Bestimmung des ACTH Spiegels, welcher bei den ACTH-unabhängigen (= adrenalen) Formen supprimiert ist. Ist das ACTH dagegen „normal“ oder erhöht, muss zwischen einer ektopen ACTH-Produktion und dem hypophysären M. Cushing unterschieden werden. Hierzu dienen der hochdosierte Dexamethason-Test und der CRH-Test. Beim M. Cushing kommt es in der Regel beim hochdosierten Dexamethason-Test zumindest zu einer gewissen Suppression des Cortisols und beim CRH-Test zu einer deutlichen Stimulierbarkeit von ACTH und Cortisol, was beides beim ektopen Cushing-Syndrom nicht der Fall ist. Nach weitgehender Klärung der Ursache dient ein bildgebendes Verfahren zur Lokalisationsdiagnostik. Hierzu ermöglicht eine Kernspintomographie der Sella-Region mit Kontrastmittelgabe den Nachweis von Hypophysenadenomen. Bei nicht eindeutiger endokrinologischer Funktionsdiagnostik und Bildgebung ist eine Katheterisierung des Sinus petrosus zur Diagnostik eines Hypophysenadenoms notwendig (Petersenn, 2017).

Abhängig von der Ursache (ACTH-abhängig oder unabhängig) variiert die weiterführende Therapie, wobei die chirurgische Entfernung des Hypophysenadenoms oder des Nebennierentumors die bevorzugte Therapieoption ist (Loriaux, 2017).

1.2.1. Morbus Cushing

M. Cushing, auch Cushing's Disease (CD) genannt, ist die häufigste Ursache für ein CS. Die transspenoidale, operative Resektion des kortikotropen Hypophysenadenoms ist die Therapie der Wahl und in 65-90% der Fälle erfolgreich, hat jedoch eine hohe Rezidivrate (Biller et al., 2008; Chandler et al., 2016). Patienten mit inoperablen Tumoren oder Rezidiven können mittels Radiotherapie oder einer medikamentösen Therapie behandelt werden. Zur Blockade der Glucocorticoid-Synthese stehen einerseits Inhibitoren der Hypophysen-ACTH-Sekretion wie Dopamin-Agonisten oder Somatostatin Analoga, andererseits Inhibitoren der Cortisol synthese mit adrenostatischen Substanzen, wie Ketoconazol, Metyrapone, Etomidate oder Mitotane zur Verfügung. Des Weiteren können auch Glucocorticoid Rezeptor-Blocker (GR) eingesetzt werden, wie

Milfepristone. Diese Medikamente gehen jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen einher und sind eine rein symptomatische Therapie (van der Pas, de Herder, Hofland, & Feelders, 2013). Wenn eine medikamentöse Therapie zur Kontrolle der Hormonüberproduktion nicht ausreichend ist, ist es teilweise notwendig, eine bilaterale Adrenalektomie, die Entnahme beider Nebennieren, durchzuführen (Ritzel et al., 2013). Dies erfordert eine lebenslange Ersatztherapie mit Hydro- und Fludrocortison.

Darum ist es essenziell, eine verbesserte medikamentöse Therapie zu entwickeln, die nicht nur eine symptomatische Therapie ist, sondern sich vielmehr gegen den Tumor richtet und somit kurativ ist. Um diese zu ermöglichen, muss auch die Ursache für das kortikotropes Hypophysenadenom besser untersucht werden. Beispielsweise zeigen Hypophysenadenome bei CD Patienten eine Vielzahl von veränderten Proteinen, wodurch unter anderem auch der negative Feedback-Mechanismus von Kortisol inhibiert wird. Proteine die als therapeutische Angriffspunkte dienen könnten, wären p27/kip1, CABLES1, HSP90 (Heat Shock Protein 90), aktiviertes CREB (cAMP response element-binding Protein), oder EGFR (Epidermal Growth Receptor Factor) (Weigand et al., 2019).

Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR), ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor, ist in humanen kortikotropen Hypophysenadenomen überexprimiert. Die *in vitro* Behandlung von operativ entfernten Hypophysenadenomzellen mit Tyrosinkinaseinhibitoren, Gefitinib, zeigte eine Reduzierung des ACTH-Spiegels. Weitere Versuche in Mäusen zeigten, dass die Behandlung mit Gefitinib, die Tumorgöße und die Kortikosteron-Spiegel verringert (Fukuoka et al., 2011). Der Erhalt und die Funktion von EGFR wird unter anderem durch Ubiquitinierung bestimmt, eine posttranslationale Proteinmodifikation (Ciechanover, 1994). USP8 ist ein Deubiquitinase-Enzym, welches Ubiquitin von verschiedenen Substraten, inklusive EGFR, entfernt und somit die Herunterregulierung inhibiert und den MAPK-Signalweg erhält (Mizuno et al., 2005). In CD Patienten konnten aktivierende Mutationen von USP8 nachgewiesen werden, was zur Vermutung führte, dass USP8 eine signifikante Rolle in der Pathogenese von M. Cushing hat (Reincke et al., 2015).

1.3. Die Genetik von Cushing's Disease: Mutationen von USP8 und USP48

Reincke et. al konnten mittels Exom- und Sanger-Sequenzierung in einer signifikanten

Anzahl an Patienten mit kortikotropen Hypophysenadenomen somatische Mutationen im *USP8* Gen nachweisen (Reincke et al., 2015). Diese Ergebnisse konnten von einer weiteren Gruppe bestätigt werden (Ma et al., 2015) und schafften somit einen kausalen Zusammenhang zwischen *USP8* Mutation und M. Cushing, zumindest in ungefähr der Hälfte der Tumoren. Die Adenome zeigten heterozygote Punktmutationen, alle lokalisiert zwischen den Aminosäuren 713 und 720, also innerhalb der 14-3-3- Bindedomäne (Ma et al., 2015; Reincke et al., 2015).

In gesunden Zellen wird ein Großteil von EGFR durch Ubiquitin markiert und lysosomal degradiert und nur ein sehr geringer Anteil durch USP8 recycelt. Es wird angenommen, dass physiologisch die 14-3-3 Proteine die katalytisch aktiven Zentren von je zwei USP8 Molekülen zusammenhalten und somit verhindern, dass die Deubiquitinase (DUB) an Ubiquitin-Moleküle bindet.

Die in der 14-3-3 Bindedomäne lokalisierten Hotspotmutationen von USP8 führen zu einer beeinträchtigten Proteinbindung des 14-3-3 und des USP8 und somit zu einer erhöhten Deubiquitinierung von verschiedenen Substraten inkl. EGFR durch USP8. Hierdurch erhöht sich z.B. die Anzahl an EGFR Rezeptoren in der Zellmembran, was zu einer verstärkten Aktivierung des MAPK-Signalwegs (mitogen-activated-protein Kinase) führt und über die Phosphorylierung von Nur77 und die vermehrte Transkription von POMC zu einer gesteigerten ACTH Synthese führen kann (Ma et al., 2015; Reincke et al., 2015; Sbiera et al., 2015). Zur Verdeutlichung siehe Abb. 1.2 auf Seite 8.

In multizentrischen Studien konnten in 35% bis 62% der kortikotropen Hypophysenadenomen die Mutationen des Deubiquitinase-Gens *USP8* nachgewiesen werden (Ma et al., 2015; Perez-Rivas et al., 2015). Dies legt nahe, dass die Inhibierung von USP8 oder die Modulierung der USP8/14-3-3 Bindung therapeutische Möglichkeiten gegen CD darstellen könnten (Centorrino, Ballone, Wolter, & Ottmann, 2018).

In weiterführenden Studien konnten Sbiera et al. mittels Exomsequenzierungen der kortikotropen Hypophysenadenomas, die einen Wildtyp *USP8* hatten, in 10,5% (15/142) der Fälle eine Hotspot Mutation im Gen *USP48* nachweisen (Sbiera, Perez-Rivas, et al.,

2019). Keine der Proben wies zeitgleich eine Mutation von *USP8* und *USP48* auf. Neben Mutationen in *USP48* konnten auch Mutationen in *TP53* Genen gefunden werden. Unterstützend dazu zeigten Chen et al ebenfalls, dass 23,1% (21/91) der Fälle eine Mutation im Gen *USP48* aufwiesen. Chen et al. wies auch in 16,5% der Fälle eine Mutation in *BRAF* V600E nach (Chen et al., 2018). Diese Mutation ist jedoch charakteristisch für maligne Tumore und konnte nur in einer von 142 Exomsequenzierungen von Sbiera et al. belegt werden (Sbiera, Perez-Rivas, et al., 2019).

USP48 ist wie *USP8* eine Deubiquitinase. Es wird vermutet, dass *USP48* NF- κ B aktiviert (Schweitzer & Naumann, 2015), welches als Transkriptionsfaktor zur Transkription von *POMC* und Produktion von ACTH führt (Karalis, Venihaki, Zhao, van Vlerken, & Chandras, 2004). In kortikotropen Hypophysenadenomen weist *USP48* eine Hotspot Mutation in M415 auf, welche vermutlich zu einer verstärkten Aktivierung des NF- κ B Wegs führt und somit zu einer verstärkten ACTH Sekretion.

Es konnte dargelegt werden, dass der Sonic-Hedgehog Signalweg (SHH) in kortikotropen Zellen die CRH-stimulierte Synthese von ACTH verstärkt. Dies geschieht über eine Aktivierung des SHH-Signalweges, wodurch der SHH-abhängigen Transkriptionsfaktor Gli1 ("glioma-associated oncogen") zu einer Potenzierung der ACTH Synthese führt (Vila et al., 2004). In kortikotropen Tumoren konnte eine Deregulierung des SHH-Signalwegs nachgewiesen werden (Vila et al., 2005). Von besonderem Interesse ist dies, da *USP48* Gli1 in Glioblastoma stabilisiert (Zhou et al., 2017). Dies legt nahe, dass in kortikotropen Tumoren das mutierte *USP48* Gli1 vermehrt deubiquiniert und somit stabilisiert, welches wiederum den CRH-Signalweg verstärkt und zu einer verstärkten ACTH-Synthese führt (Sbiera, Perez-Rivas, et al., 2019). In *Drosophila* S2 Zellen konnte gezeigt werden, dass *USP8* Smo deubiquitiniert (Xia, Jia, Fan, Liu, & Jia, 2012). Somit sind sowohl *USP8* als auch *USP48* am SHH-Signalweg beteiligt.

Es konnte auch gezeigt werden, dass *USP48* mit dem Histon H2A interagiert und die BRCA1 Ligase Funktion antagonisiert (Uckelmann et al., 2018). Somit führt das mutierte *USP48* über die Interaktion mit den verschiedenen Proteinen zu einer Deregulierung der DNA-Reparatur, welche vielleicht zur Tumorgenese beiträgt.

In der folgenden Abbildung (Abb. 1.2) sind mögliche, hypothetische Wege der erhöhten Produktion von ACTH bei *USP8* Mutation bzw. *USP48* Mutation in kortikotropen Hypophysenadenomen zusammengefasst dargestellt.

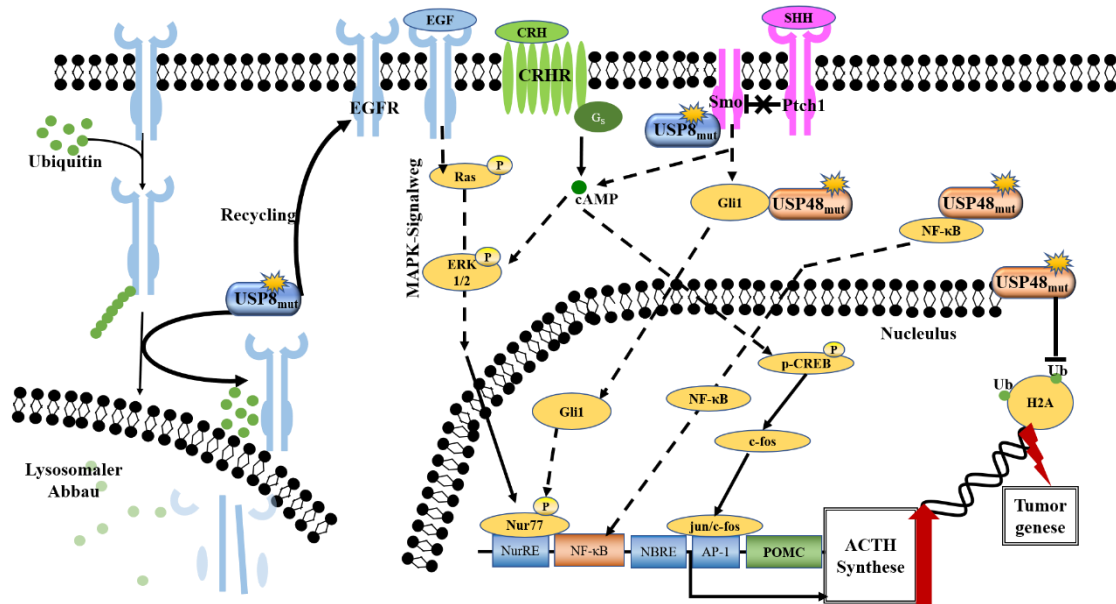


Abb. 1.2 Möglicher Signalweg von USP8 und USP48 in kortikotropen Hypophysenadenomen

Bindet CRH an seinen Rezeptor werden über cAMP und den MAPK-Signalweg Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche an Promotorelemente NurRE und AP1 des POMC Promotors binden. Die Transkription wird stimuliert durch Bindung von EGF an seinen Rezeptoren. Die aktivierende Mutation von USP8 führt zu einem vermehrten Recycling von EGFR, wodurch eine höhere Anzahl an EGFR in der Zellmembran vorhanden ist. Dies führt zu einer verstärkten Aktivierung des MAPK-Signalwegs und zu einer vermehrten ACTH Synthese.

Bindet SHH an Patched (Ptc1) hebt dies die Hemmung von Smo auf, wodurch Gli1 aktiviert werden kann. In Drosophilazellen konnte gezeigt werden, dass Smo von USP8 deubiquitiniert wird. Gli1 stimuliert ebenfalls die POMC-Transkription. Es wird vermutet, dass die aktivierende Mutation von USP48 zu mehr Gli1 führt, was zu einer verstärkten POMC Transkription führt. USP48 interagiert auch mit NF-κB, welches auch zu einer vermehrten Transkription von POMC und somit ACTH Synthese führt. Die USP48 Mutation kann auch zu einer vermehrten Deubiquitinierung von Histon H2A führen, was zu einer Deregulierung der DNA-Reparatur führt und wiederum eine Tumorgenese fördert.

1.4. CRISPR/Cas9

1.4.1. Geschichte von Genom Editing und CRISPR/Cas

Die Entdeckung der DNA-Doppelhelix im Jahre 1953 war der Startschuss für die Entwicklung von verschiedenen Methoden zur Manipulation, Veränderung und Herstellung

von DNA (Watson & Crick, 1974). Seitdem versuchen Wissenschaftler gezielte Veränderungen im Genom von verschiedenen Organismen und Zellen vorzunehmen, dies wird auch als Genome Editing oder Gtargeting bezeichnet (s. Abb. 1.3).

Ein weiterer wichtiger Schritt war auch die Entdeckung, dass Zellen einen endogenen Mechanismus haben, um Doppelstrangbrüche (DSB) in der DNA zu reparieren (Rudin, Sugarman, & Haber, 1989). Dies ist der DNA mittels homologer Rekombination (HR) möglich, dabei wird vom Schwesterchromosom die passende homologe Sequenz zur Reparatur des DSB verwendet. Gtargeting beschreibt den Prozess des Ersatzes eines Gens mittels homologer Rekombination. Dabei wird ein exogenes Reparatur-Template in die Zelle eingebracht, welches vereinzelte homologe Sequenzen zu der Ursprungssequenz hat und somit an dem zuvor eingebrachten DSB eingebaut wird (Capecchi, 1989). Daraufhin wurden Methoden entwickelt, um gezielte DSB durchzuführen und mittels HR oder NHEJ (non-homologous-end-joining) Insertions- oder Deletions-Mutationen durchzuführen (Choulika, Perrin, Dujon, & Nicolas, 1995; Plessis, Perrin, Haber, & Dujon, 1992; Rouet, Smih, & Jasin, 1994). Im Gegensatz zu HR benötigt NHEJ kein Reparatur-Template, sondern ligiert die beiden gebrochenen DNA-Enden zusammen (Weterings & Chen, 2008) was jedoch zu einer höheren Fehlerrate führt.

Ungefähr zeitgleich wurden Proteine beschrieben, die mittels Zink-Fingern (ZF) DNA binden (Miller, McLachlan, & Klug, 1985; Pavletich & Pabo, 1991) (s. Abb. 1.3), die Fusionierung dieser Zink-Finger Proteine mit dem Restriktionsenzym FokI führte zur Entwicklung einer ortsspezifischen Zink-Finger-Nuklease (ZFNs) (Kim, Cha, & Chandrasegaran, 1996). ZFNs können so designt werden, dass Sie bestimmte DNA-Sequenzen erkennen und wurden so erfolgreich eingesetzt, um in *Drosophila* und Säugerzellen Mutationen herbeizuführen (Bibikova, Beumer, Trautman, & Carroll, 2003; Bibikova, Golic, Golic, & Carroll, 2002). Funktionierende ZFNs mit der gewünschten DNA-Bindesequenz sind sehr schwierig zu designen, da sie einen sehr aufwendigen Screening-Prozess zum Ausschluss von Wechselwirkungen erfordern (Gonzalez et al., 2010; Maeder et al., 2008).

Eine einfachere Alternative zu ZFNs sind die zuerst 2009 beschriebenen transcriptor-

activator-like (TALE) Effektors (s. Abb. 1.3) (Boch et al., 2009; Moscou & Bogdanove, 2009). TALEs werden von *Xanthomas* Bakterien produziert, die ausschließlich Pflanzen infizieren. TALEs haben eine zentrale DNA-Erkennungsdomäne. Die Fusionierung der DNA-Erkennungsdomäne mit der FokI Endonuklease, ähnlich wie ZFN, führte zu der Entwicklung einer sequenz-spezifischen Nuklease, genannt TALE-Nuklease (TALEN) (Christian et al., 2010). TALENs sind im Vergleich zu ZFNs einfacher zu designen und auch einfacher zu validieren. Mit einer Größe von ca. 3 kb ist die Transfektion in Zellen aber sehr schwierig.

ZFN und TALEN sind zwei Methoden, die über Protein-DNA-Interaktion spezifische DNA-Sequenzen erkennen. CRISPR/Cas ist als neuere Methode der DNA Erkennung deutlich einfacher für die Herstellung von maßgeschneiderten Nukleasen.

CRISPR wurde 1987 das erste Mal beschrieben, als kurze repetitive Sequenzen unterbrochen von kurzen non-repetitiven Sequenzen im Genom von *E. coli* (Ishino, Shinagawa, Makino, Amemura, & Nakata, 1987) (Abb. 1.3). Diese besonderen repetitiven Sequenzen wurden auch in weiteren verschiedenen Bakterien und Archaea gefunden (Mojica, Diez-Villasenor, Soria, & Juez, 2000). Im Jahre 2005 wurde erkannt, dass die Sequenz von CRISPR-Spacern ähnlich zu mobilen genetischen Elementen (MGEs) ist, die in Viren und Plasmiden zu finden sind. Des Weiteren konnte eine positive Korrelation zwischen dem Besitz einer viralen Spacer-Sequenz und der Resistenz zu diesem jeweiligen Virus gefunden werden (Bolotin, Quinquis, Sorokin, & Ehrlich, 2005; Mojica, Diez-Villasenor, Garcia-Martinez, & Soria, 2005). Der Integrationsprozess jeder dieser Spacer-Sequenzen ist mit der Verdopplung einer der Repeats verbunden, was zu einer neuen Spacer-Repeat-Unit führt. Die Auswahl eines Spacer-Vorgängers (Proto-Spacers) der eindringenden Fremd-DNA wird bestimmt von der Erkennung des Proto-Spacer-anliegenden Motivs (PAMs) (Mojica, Diez-Villasenor, Garcia-Martinez, & Almendros, 2009). Zusammen mit der Erkenntnis, dass CRISPR Loci transkribiert werden (Tang et al., 2002) wurde die Vermutung aufgestellt, dass CRISPR-Sequenzen als ein Immungedächtnis und ein Verteidigungsmechanismus fungieren (Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005; Pourcel, Salvignol, & Vergnaud, 2005). Experimente mittels Phagen an *Streptococcus thermophilus* lieferten die ersten Beweise, dass CRISPR/Cas als adaptives Immunsystem wirkt und

dazu *Cas*-Gene zwingend notwendig sind (Barrangou et al., 2007). 2008 konnte gezeigt werden, dass CRISPR Sequenzen zu crRNA transkribiert werden und über die Ausbildung von Komplexen mit Cas-Proteinen dessen Nuklease-Aktivität steuern (Brouns et al., 2008).

Die crRNA können mittels dreier verschiedener molekularer Mechanismen prozessiert werden (Typ I - III). Typ I und Typ III bilden einen Komplex aus mehreren Cas-Enzymen um die gewünschten Nukleinsäuren zu erkennen und zu teilen (Makarova et al., 2011). Typ II verwendet eine trans-kodierte kurze RNA (tracrRNA) welche als Führungsstruktur zum Prozessieren der crRNA dient und mit der crRNA eine Duplexstruktur ausbildet. Diese wird über Cas9 katalysiert (Deltcheva et al., 2011). Cas9 ist in der Lage, DSBs in eindringenden Plasmiden und Phagen durchzuführen (Garneau et al., 2010). Sie enthält zwei Nukleasedomänen: RuvC-like in der Nähe des N-Terminus, und HNH-Nuklease Domäne in der Mitte des Proteins (Garneau et al., 2010; Makarova, Grishin, Shabalina, Wolf, & Koonin, 2006). Die HNH-Domäne wird zum Schneiden des DNA-Strangs verwendet, welcher komplementär zur crRNA ist. Die RuvC-like Domäne schneidet den DNA-Strang auf der gegenüberliegenden Seite des komplementären Stranges (Jinek et al., 2012).

Im Jahr 2011 konnte gezeigt werden, dass das CRISPR-System Typ II von *Streptococcus thermophilus* auf *E. coli* übertragbar ist und dort heterolog exprimiert wird (Sapranauskas et al., 2011). Ein Jahr später (2012) wurde beschrieben, dass Mutationen in den Nukleasedomänen von Cas9 zu einem RNA-geführten DNA-bindenden Protein führt (Gasiunas, Barrangou, Horvath, & Siksnys, 2012). Im selben Jahr wurde eine duale tracr:crRNA als eine einzelne leitende RNA (sgRNA) hergestellt. Die sgRNA hatte zwei besondere Merkmale, der 20-Nukleotid-lange crRNA Teil, auch "spacer" genannt, bindet an der gewünschten Ziel-DNA über Watson-Crick Basenpaarung und die Doppelstrangsstruktur am 3' Ende der sgRNA, die tracrRNA, auch "scaffold" genannt, bindet an Cas9 (Jinek et al., 2012). Mittels Veränderungen an der Führungssequenz (20-Nukleotide) der sgRNA ist das CRISPR/Cas9 System so zu programmieren, dass es alle gewünschten DNA Sequenzen angreift, solange es sich in der Nähe einer PAM-Sequenz befindet (Jinek et al., 2012). Seitdem gab es rapide Fortschritte. Ein Jahr später, 2013, wurden bereits erste

mittels CRISPR/Cas9 Methode genomisch veränderte Säugetierzellen beschrieben (Cong et al., 2013). Im selben Jahr konnte in Mäusen bereits gezeigt werden, dass genetische Erkrankungen durch die Anwendung von CRISPR/Cas9 korrigiert werden können. Dazu wurde in Mäusen das autosomal-dominante *Crygc* Gen, das Katarakt verursachen kann, in Zygoten durch das Wildtyp- (WT) Gen ersetzt. Hierdurch waren die resultierenden Mäuse in der Lage, die korrekten, gesunden Allele an ihre Nachkommen weiterzugeben (Wu et al., 2013).

In den darauffolgenden Jahren wurde das CRISPR/Cas9 System rasch von vielen verschiedenen Laboratorien angenommen und weiterentwickelt. Dieser schnelle Fortschritt wurde unter anderem durch open-source Plattformen wie beispielsweise Addgene unterstützt. Weitere Veränderungen in den letzten Jahren waren einerseits die Entdeckung von weiteren, effizienteren Cas9 Enzymen (Ran et al., 2015) und die Erhöhung der Spezifität des CRISPR/Cas9-System mit geringeren off-target Effekten (Tsai & Joung, 2016), sowie die Entwicklung von online-tools, wie CRISPOR, mit denen das *in-silico* Design von spezifischer gRNAs vereinfacht wurde (Haeussler et al., 2016). Zur Verdeutlichung der geschichtlichen Entwicklung von Genomediting und CRISPR/Cas9 siehe folgende Abbildung (Abb. 1.3).

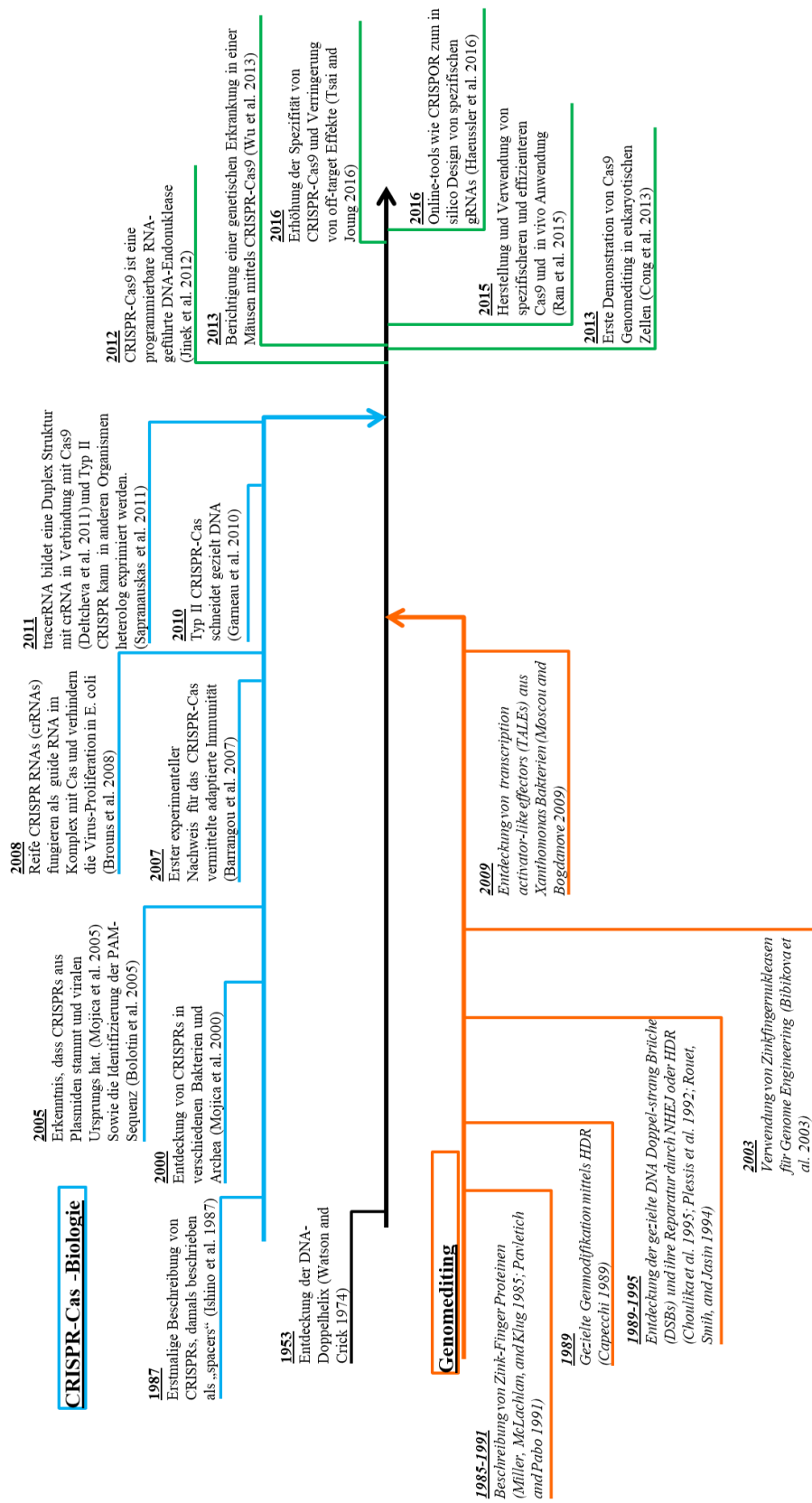


Abb. 1.3 Schlüsselstudien zur Entwicklung von CRISPR-Cas9-Systemen und Genome Editing. Zeitlich geordnet sind hier einzelne wichtige Entwicklungsprozesse aus beiden Gebieten dargestellt. Mit der Entdeckung, dass Cas9 eine RNA-programmierbare-DNA-Endonuklease ist, verschmolzen Genom Editing und CRISPR-Cas9 miteinander. Seitdem wurde Cas9 eingesetzt, um genetische Veränderungen, sowohl in humanen Zellen als auch in anderen Organismen zu bewirken (Doudna & Charpentier, 2014).

1.4.2. Was ist die CRISPR/Cas9 Methode?

Das CRISPR System, welches in Bakterien ein adaptives Immunsystem bildet (Barrangou et al., 2007), wurde für Genomediting so modifiziert, dass in der praktischen Anwendung die Methode aus einer nicht-spezifischen Endonuklease, der Cas9, und einem kleinen RNA Stück (gRNA) besteht. Für einen Knock-out in Zellen oder Säugetieren, d.h. ein Gen gezielt abzuschalten, ist es notwendig eine Koexpression von einer Endonuklease wie die Cas9 und die sgRNA, welche komplementär für die Ziel-DNA im Genom ist, durchzuführen.

Eine Anforderung an die sgRNA besteht jedoch darin, dass die 20-nt lange Sequenz einzigartig im Genom ist und somit nur an der gewünschten Stelle bindet und dass die Zielsequenz sich in der Nähe einer PAM Sequenz befindet, für *Streptococcus pyogenes* Cas9 wäre dies 5'-NGG (Hsu, Lander, & Zhang, 2014), wobei N für eine beliebige Aminosäure steht.

Sobald die Cas9 und die sgRNA in der Zelle exprimiert sind, bilden diese einen Ribonukleotidkomplex (siehe Abb. 1.4). Durch die Bindung führt die Cas9 eine Konformationsänderung von inaktiv in aktiv durch (Jinek et al., 2014). Der aktive Ribonukleotidkomplex kann nun das Genom entlang fahren. Nur wenn die Cas9 die PAM Sequenz plus die homologe Sequenz zu der sgRNA erkannt hat, führt die Cas9 eine zweite Konformationsänderung durch (Sternberg, Redding, Jinek, Greene, & Doudna, 2014). Dadurch werden die beiden Endonukleasendomänen HNH und RuvC der Cas9 an den beiden gegenüberliegenden DNA

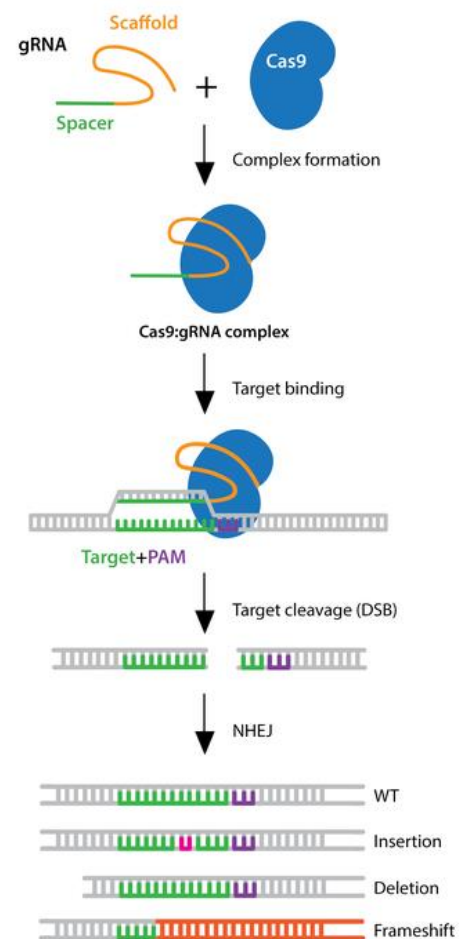


Abb. 1.4 Überblick über CRISPR-Cas 9 Methode und NHEJ Reparatur Mechanismus. ("CRISPR Overview," 2018)

Strängen positioniert. Dies ermöglicht dem Cas9-sgRNA-Komplex einen Doppelstrangbruch (DSB), ca. 3-4 nt innerhalb der Ziel-DNA, durchzuführen (s. Abb. 1.4) (Jinek et al., 2012). Der mittels CRISPR/Cas9 generierte DSB kann dann von zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen repariert werden. Der fehleranfällige NHEJ-Reparaturmechanismus kann schnell den DSB ligieren, führt häufig jedoch zu Insertions- oder Deletionsmutationen (Jinek et al., 2013), wodurch die Funktion des Zielgens gestört wird (s. Abb. 1.4). Dies wird für den knock-out, d.h. zur Inaktivierung eines Gens, genutzt.

Der DSB kann auch durch den homologen rekombinanten Reparaturmechanismus (HR) repariert werden. Dieser ist exakter, benötigt jedoch einen homologen DNA Strang als Reparaturtemplate. Dieser kann gemeinsam mit Cas9 und gRNA kofunktionalisiert werden. Mittels des Reparaturtemplates ist es möglich, einen Knock-in, d.h. den gezielten Austausch beispielsweise einer Base in das Gen, durchzuführen. Damit dies möglich ist, muss das Reparaturtemplate komplementär zu der Stelle sein, an der die Cas9 schneidet. Das Template enthält die Punktmutation, welche neu in das Gen eingebracht werden soll und eine veränderte PAM Sequenz, so dass das Reparaturtemplate nicht von der Cas9 wieder geschnitten wird (F. Zhang, Wen, & Guo, 2014) (siehe Abb. 1.5).

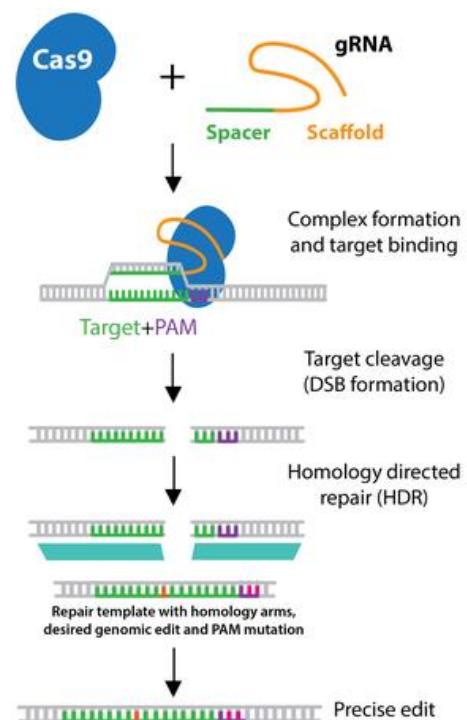


Abb. 1.5 Veranschaulichung des Knock-in mittels CRISPR Cas9 und Reparaturtemplate. ("CRISPR Overview," 2018)

1.5. Zielsetzung

Kortikotrope Hypophysenadenome sind die häufigste Ursache des endogene Cushing Syndroms und führen über die chronisch hohen ACTH-Spiegel und folglich hohen Cortisol-Spiegel zu gravierenden Stoffwechselfysregulationen, die für die Patienten mit deutlicher Morbidität und Mortalität einhergehen. In den letzten Jahren sind die molekularen Ursachen dieser Krankheit immer mehr aufgedeckt worden, jedoch ist man noch weit von der Heilung entfernt. Die aktuelle primäre Therapiemaßnahme, die transspenoidale Hypophysenentfernung, ist in 65-90% der Fälle erfolgreich (Chandler et al., 2016). Rezidive bzw. inoperable Tumore können mittels Radiotherapie oder medikamentös behandelt werden. Diese ist jedoch eine rein symptomatische Therapie mit einer Reihe unerwünschter Wirkungen. Somit ist es essenziell, kurative Therapiealternativen zu finden. Dazu wird jedoch ein besseres Verständnis von M. Cushing benötigt. Hierzu sind Zelllinienmodelle notwendig, um durch entsprechende *in vitro* Untersuchungen die pathophysiologischen Grundlagen der kortikotropen Hypophysenadenome besser zu verstehen.

Exomsequenzierungen haben als mögliche Ursachen für M. Cushing die Mutationen von *USP8* und *USP48* aufgedeckt. Ziel dieser Arbeit ist es, mittels der CRISPR/Cas9 Methode ein pathophysiologisch relevantes Zellmodell zu etablieren. Auf die Vorteile der CRISPR/Cas9 Methode ist weiter oben eingegangen worden. Wichtig ist in jedem Fall, dass in diesem Kontext eine sehr spezifische genetische Veränderung in den Zellen erzielt wird.

Als erster Schritt soll in HEK293AD Zellen ein knock-out von *USP8* sowie von *USP48* herbeigeführt werden, um die Methode zu etablieren. Anschließend soll dies erweitert werden, um die jeweiligen Mutationen in das Genom einzuschleusen. Im nächsten Schritt soll diese Methode anschließend auf At-T20 Zellen angewendet werden, um ein kortikotropes pathophysiologisches Zellmodell zu erhalten und um weiterführende Untersuchungen und Forschungen zu M. Cushing durchzuführen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Zelllinien und Bakterienstämme

2.1.1.1. Zelllinien

Für die verschiedenen *in vitro* Versuche wurden humane und Maus-Zelllinien verwendet. Diese sind in den Tabellen beschrieben.

Tabelle 2.1 Humane Zelllinien

| Name | Histologie | Beschreibung | Hersteller |
|----------|--------------------------------|---|------------|
| HEK293AD | humane embryonale Nierenzellen | Enthält E1-Region von Adenoviren für eine erhöhte Proteinproduktion | ATTC® |

Tabelle 2.2 Maus-Zelllinie

| Name | Histologie | Beschreibung | Hersteller |
|--------|------------------------------|------------------|------------|
| At-T20 | Maus Hypophysenadenom Zellen | Produzieren ACTH | ATTC® |

2.1.1.2. *Escherichia coli* Stamm

- NEB® 10-beta competent *E.coli* , NEB, Ipswich, MA, USA

2.1.2. Kulturmedien

2.1.2.1. Wachstumsmedium für Säugetierzellen

- **Kulturmedium für At-T20 Zellen:**
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma®)
hinzugefügt:
10 % FCS
Penicillin / Streptomycin
- **Kulturmedium für HEK293AD Zellen:**
DMEM - F12 (1:1) (gibco)
hinzugefügt:
10 % FCS

2.1.2.2. Wachstumsmedium für Bakterien

- NEB® 10-beta/Stable Outgrowth Medium
- LB Medium
1 % (6 g) Bacto Tryptone

0,5 % (3 g) Bacto Hefeextrakt

1% (6 g) NaCl

auf 600 ml ddH₂O

Medium wurde vor der Verwendung autoklaviert

2.1.3. Antibiotika

Tabelle 2.3 Eingesetzte Antibiotika.

Die in dieser Arbeit zur Selektion verwendet wurden.

| Name | Endkonzentration | Selektion für | Hersteller |
|-------------|-------------------------|----------------------|-------------------|
| Ampicillin | 50 µg/ml | Prokaryoten | AppliChem |
| Puromycin | 1 µg / ml | Eukaryoten | gibco® |

2.1.4. Vektor

Tabelle 2.4 Eingesetzter Leervektor.

Zur Herstellung der Oligonukleotid Expressions-Plasmide aus 2.1.5 . Wurde pX459 zur Transfektion von Zellen verwendet.

| Leervektor | Eigenschaften | Erhalten von |
|--|---|---------------------|
| pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 überlassen von Feng Zhang (Addgene plasmid # 62988) | <ul style="list-style-type: none">• Cytomegalievirus Transkriptionsverstärker• U6 Promoter• Chicken-β-actin Promoter• Ampicillinresistenz (Resistenz für Bakterien)• Puromycinresistenz (Eukaryotische Selektion)• BbsI (245) und BbsI (267)-Restriktionsenzymchnittstellen• Größe 9200 bp (Ran et al., 2013) | Addgene |

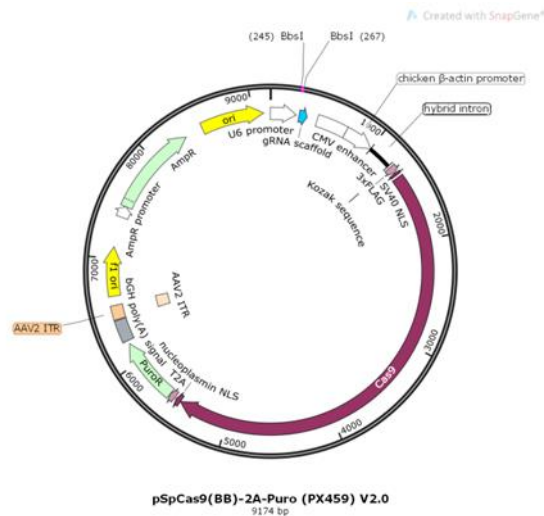


Abb. 2.1 Plasmidkarte von pX459 Leer-Vektor (SnapGene®)

Tabelle 2.5 Eingesetzte Expressionsplasmide.

Eingesetzte Expressionsplasmide verwendet zur Transfektion von Zellen

| Leervektor | Eigenschaften | Erhalten von |
|------------|---|--------------|
| P720R | pME-Flag (Reincke et al., 2015) <ul style="list-style-type: none"> mit einer aktivierenden USP8 Mutation an 14-3-3-Stelle | M. Reincke |

2.1.5. Oligonukleotide

2.1.5.1. Primer

Zur Klonierung und Sequenzierung der Expressionsvektoren wurde U6 von Addgene als Forward Primer benutzt. Zur Sequenzierung von USP8 und USP48 bei At-T20 Zellen wurden die selbstdesignten und in Tabelle 2.6 aufgeführten Primer verwendet (Eurofins Genomics).

Tabelle 2.6 Verwendete Primer

| Name | Oligonukleotide |
|------------|-------------------------|
| hU6-F: | GAGGGCCTATTTCCCATGATT |
| hU6-FCC | GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC |
| mu_USP8_F | TTGTGGTGGGATGACACTTG |
| mu_USP8_R | TCAGACAGGTTGAAGCGATG |
| mu_USP48_F | GACTCTGGGGAAGGAAGGAG |
| mu_USP48_R | AGGCATTCCTGAAAGCAATC |

Zur Verifizierung der inserierten Mutationen in USP8 und USP48 in HEK293AD Zellen sind die selbstdesignten Primer und ihre Sequenzen in Tabelle 2.7 aufgeführt.

Tabelle 2.7 Primer zur Sequenzierung von USP8 und USP48 knock-out HEK293AD Zellen

| Name | Oligonukleotide |
|----------------------|---------------------------|
| hUSP8_ Ex3_ Cas_ F | GCCGTGAACCAGTACCAATC |
| hUSP8_ Ex3_ Cas_ R | AAAATCAATAGCTCCATTATGCAA |
| hUSP8_ Ex14_ Cas_ F | TATGTACCCACCGGAAATGG |
| hUSP8_ Ex14_ Cas_ R | CCATCCACAGAAATTTCCAAC |
| hUSP8_ Ex20_ Cas_ F | CAGCAAGACAACGGTGGTT |
| hUSP8_ Ex20_ Cas_ R | GTCAGCACTGACCGGAATTAT |
| hUSP48_ Ex2_ Cas_ F | TTGTTTGTCTCTCATGAAACTATGG |
| hUSP48_ Ex2_ Cas_ R | GCCCAAACAAAAGCAAAAA |
| hUSP48_ Ex10_ Cas_ F | GGTGTTAATGTGTCTTGGGTGT |
| hUSP48_ Ex10_ Cas_ R | TGCCTGCTATAATCCTGGAAA |
| hUSP48_ Ex27_ Cas_ F | TTGATGCTCCCTGTTGATGA |
| hUSP48_ Ex27_ Cas_ R | TTGGGACAGTCACGTTTGAA |

2.1.5.2. mRNA Sequenzen von USP8 und USP48

Um die sgRNA für die Proteine USP8 und USP48 herzustellen, wurden jeweils für die Gattung Mensch und Maus die in der untenstehenden Tabelle verwendeten mRNA Sequenzen von der Website www.ensembl.org verwendet. Es wurden immer Exons vom Anfang, der Mitte und dem Ende des Open Reading Frames verwendet.

Tabelle 2.8 In dieser Arbeit verwendete mRNA Sequenzen von USP8 und USP48

| Gattung | Name | Ensembl ID | NM Ref |
|---------|----------------|-----------------------|--------------|
| Mensch | USP8 - Var. 1 | ENST00000307179.8 | NM_005154.4 |
| Mensch | USP48 - Var. 1 | ENST00000308271.13 | NM_032236 |
| Maus | USP8 - Var. 1 | ENSMUST00000028841.13 | NM_001252580 |
| Maus | USP48 - Var. 1 | ENSMUST00000055131.12 | NM_130879 |

2.1.6. Antikörper

Tabelle 2.9 Primär-Antikörper mit Verdünnung und ihrem Verwendungszweck.

WB: Western Blot

| Name | Spezies | Verwendung | Verdünnung | Hersteller |
|-------------------------|-----------|------------|------------|----------------|
| Anti-USP8 | Kaninchen | WB | 1: 2000 | Sigma |
| Anti- α -Tubulin | Maus | WB | 1:20000 | Sigma |
| Anti-USP48 | Kaninchen | WB | 1:1000 | Biomol/Bethyl |
| Anti-Ubiquitin | Maus | WB | 1:2000 | Cell signaling |
| Anti-Cas9 | Maus | WB | 1:1000 | Cell signaling |

Tabelle 2.10 Sekundär Antikörper und Verwendung und Verdünnung für WB

| Name | Verwendung | Verdünnung | Hersteller |
|----------------------------|------------|------------|------------------------|
| goat- α -rabbit-HRP | WB | 1:10000 | Jackson ImmunoResearch |
| goat- α -mouse-HRP | WB | 1:10000 | Jackson ImmunoResearch |

2.1.7. Kits

- BCA Kit, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Maxwell® RSC Blood Kit, Promega, Mannheim
- NucleoBond® Xtra Midi, MACHEREY-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
- NEB PCR Cloning Kit, New England BioLabs, Ipswich, MA, USA
- QIAprep® Spin Miniprep Kit, QIAGEN GmbH, Hilden
- SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific, Schwerte
- Transfektions Reagenzien:
 - Effectene Transfection Reagent, QIAGEN GmbH, Hilden

2.1.8. Enzyme

- BpI Restriktionsenzym, Thermo Scientific, Schwerte
- Red Taq Polymerase, Sigma, Deisenhofen
- T4 DNA Ligase, NEB, Ipswich, MA, USA
- T4 Polynucleotide Kinase, NEB, Ipswich, MA, USA

2.1.9. Größenstandards

- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Schwerte (SDS-PAGE)
- GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas (Agarose-Gelelektrophorese)

2.1.10. Chemikalien

Chemikalien und Lösungen wurden, wenn nicht anders im Text erwähnt, von den Firmen Applichem, Bio-Rad, Roth, Merck und Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 2.11 Verwendete Chemikalien, ihre Verwendung und ihr Hersteller.

| Name | Verwendung | Hersteller |
|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| ATP-Solution | Verdau und Ligation | Thermo Fisher Scientific |
| Chemilumineszenz (ECL)-HRP-Substrat | Western Blot | Thermo Fisher Scientific |
| DNA Ladepuffer (6x) | Agarose Gelelektrophorese | Fermentas |
| Entwickler und Fixierer | Entwicklung von Röntgenfilmen | Sigma Aldrich |
| GelRed | Agarose Gelelektrophorese | Biotium |
| Phosphatase Inhibitor Cocktail B | Zelllyse | Santa Cruz Biotech |

| | | |
|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Phosphatase Inhibitor Cocktail C | Zellyse | Santa Cruz Biotech |
| Protease Inhibitor Cocktail | Zellyse | Sigma Aldrich |
| Ripa Puffer | Zellyse | Sigma Aldrich |
| T4 DNA Ligase Puffer | Annealing und Phosphorylation | Thermo Fisher Scientific |

2.1.11. Puffer und Lösungen

2.1.11.1. Puffer für Western Blot

- SDS Laufpuffer
 - 25 mM Tris
 - 192 mM Glycine
 - 0,1 % SDS
- 5x SDS Probenpuffer nach Laemmli (1970)
 - 0,3 M Tris HCl (pH 6,8)
 - 10 mM DTT
 - 5% SDS
 - 0,5% Bromphenolblau
- Strippingpuffer
 - 25 mM Glycine
 - 1% SDS
 - pH 2
- TBS - T
 - 20 mM Tris
 - 200 mM NaCl
 - 0,01% Tween-20
- Milch 5% in TBS-T
 - für 250 ml:
 - 12,5 g Magermilchpulver
 - + 250 ml TBS-T
- Transferpuffer
 - 25 mM Tris
 - 0,2 mM Glycine
 - 10% Methanol
- WB Waschpuffer
 - 50 mM Tris
 - 150 mM NaCl
 - 0,2% BSA

0,2% NP-40

2.1.11.2. Puffer für Agarose-Gelelektrophorese

- TAE Puffer
40 mM Tris
10 mM Na Acetat
1 mM EDTA
pH 8

2.1.12. Geräte

Tabelle 2.12 Verwendete Geräte und ihre Hersteller

| Gerät | Typ und Hersteller |
|--------------------------------------|---|
| Agarose Gel Elektrophorese Apparatur | Sub-Cell® GT, Bio-Rad Labor |
| Blotting Kammer | Mini PROTEAN II™ Bio-Rad Labor |
| CO ₂ - Inkubator | C150 Binder GmbH, Tuttlingen |
| Extraktionsroboter | Maxwell RSC Promega GmbH, Mannheim |
| Heizblock | DRI-Block®, DB-20, Techne, Staffords- hire, UK |
| Invers-Mikroskop | Primovert, Zeiss |
| NanoDrop™ | ThermoFisher Scientific |
| PAGE Apparatur | Mini PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad La- bor |
| pH Meter | inoLab, A. Hartenstein, Würzburg |
| Pipet gun accu-jet® pro | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim |
| Thermo Shaker | TS-100, A. Hartenstein, Würzburg |
| Thermocycler | T100 Thermal Cycler, Bio-Rad Labor |
| UV Gel Dokumentationssystem | BioDoc Analyze Darkhood, Biometra, Analytik, Jena AG, Jena |
| Vortex | L46, A. Hartenstein, Würzburg |
| Zellzähler | Countess II FL, Life Technologies, Wal- tham, MA, USA |
| Zentrifugen | Mikto 200R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen |

2.1.13. Software und Datenbanken

- BioGrid (www.biogrid.org; zuletzt besucht 05.03.2018)
- Crispor (www.crispor.tefor.net (Haeussler et al., 2016); zuletzt besucht 15.11.2018)
- Ensemble (www.ensemble.org; zuletzt besucht 06.01.2018)
- Fiji (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012)
- GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)

- SnapGene software (from GSL Biotech; zu erhalten bei snapgene.com)
- FORECasT (<https://partslab.sanger.ac.uk/FORECasT#results> (Allen et al., 2018); zuletzt besucht am 25.06.2020)

2.2. Methoden

2.2.1. In-silico Design von sgRNA-Oligonukleotiden

Mit Hilfe der Website www.crispor.tefor.net (Haeussler et al., 2016) wurden sgRNA Oligonukleotide selbst designt. Dabei wurde immer vom Anfang, der Mitte und dem Ende des Open Reading Frames (ORF), die Exon-cDNA von der Website www.ensembl.org (siehe Tabelle 2.8) ausgewählt und mittels CRISPOR zur Herstellung von sgRNA verwendet, zur Verdeutlichung siehe Abb. 2.2. Dabei wurde die ausgewählte Sequenz in Step1 eingefügt. Zur Herstellung der humanen gRNAs wurde das Genom Homo sapiens - Human (GRCh38.p13) - UCSC Dec. 2013 ausgewählt (s. Abb. 2.2). Zur Herstellung der murinen gRNAs wurde das Genom Mus musculus - Mouse (GRCm38.p6) - UCSC Dec. 2011 verwendet. Als PAM Sequenz wurde 20bp-NGG- Sp Cas9, SpCas9+HF1, eSpCas9 1.1 ausgewählt.

CRISPOR is a program that helps design, evaluate and clone guide sequences for the CRISPR/Cas9 system. [Read the CRISPOR Manual for more details](#)

Step 1

Planning a lentiviral gene knockout screen? Use [CRISPOR Batch](#)

Sequence name (optional):

Enter a single genomic sequence, < 2000 bp, typically an exon

[Clear Box](#) - [Reset to default](#)

Paste here the genomic - not cDNA - sequence of the exon you want to target. The sequence has to include the PAM site for your enzyme of interest, e.g. NGG. Maximum size 2000 bp.

Text case is preserved, e.g. you can mark ATGs with lowercase.
Instead of a sequence, you can paste a chromosome range, e.g. chr1:11908-12378

Step 2

Select a genome

Note: pre-calculated exonic guides for this species are on the [UCSC Genome Browser](#).
We have 278 genomes, but not the one you need? Send its FASTA/GFF URL to [CRISPOR support](#)

Step 3

Select a Protospacer Adjacent Motif (PAM)

Version 4.3 - [Documentation](#) - [Contact us](#) - [Downloads/local installation](#)

Abb. 2.2 Überblick über die Herstellung von gRNAs (Screenshot der Website CRISPOR).

In Step 1 wurde die jeweilige genomische Sequenz des ausgewählten Exons eingefügt. Für Step2 wurde entweder das neuste Genom von Mensch beziehungsweise Maus ausgewählt. In Step 3 wurde die 20-bp NGG-SpCas9 ausgewählt, da diese SpCas9 in den folgenden Versuchen verwendet wurde.

Ausgewählt wurden ausschließlich sgRNAs, die einen hohen spezifischen Score, eine hohe erwartete Effektivität (Predicted Efficiency) und eine niedrige berechnete Off-targets

Rate haben. Anschließend wurden diese Oligonukleotide von Eurofins Genomics bezogen und in der entsprechenden Menge Wasser (Sigma) gelöst.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. DNA-Isolierung aus Zellen

Zur Isolierung von DNA aus At-T20- und HEK293AD Zellen, sowie zur Überprüfung des erfolgreichen Genomeditings mittels CRISPR/Cas wurde das Maxwell RSC Blood Kit™ (Promega) verwendet. Dies wurde zur Isolierung von sämtlicher DNA nach Absprache mit dem Hersteller, wie im Folgenden beschrieben, abgeändert. Zur Probenvorbereitung wurde die Zellsuspension bei 1000 xg, 7 min, Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl DPBS resuspendiert, 300 µl Lysis-Puffer und 10 µl Protein-kinase K wurden hinzugegeben, nach einem 15s vortexen wurden die Proben für 10 min bei 56°C inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.2.2. Annealing und Phosphorylierung von sgRNA

Die designten sgRNAs (vgl. 2.2.1) aufgeführt in Tabelle 3.1 bis Tabelle 3.4 wurden nach Herstellerangaben auf eine Konzentration von 100pmol/µl mit sterilem ddH₂O verdünnt, vorsichtig gemischt und 5 min bei 63°C inkubiert. Es wurde immer eine sgRNA sense (s) mit antisense (as) zusammengeführt. Dies wurde für alle sgRNAs durchgeführt. Als Überblick siehe Abb. 2.3. Der Reaktionsmix und das PCR Programm wurden wie in Tabelle 2.13 und Tabelle 2.14 durchgeführt.

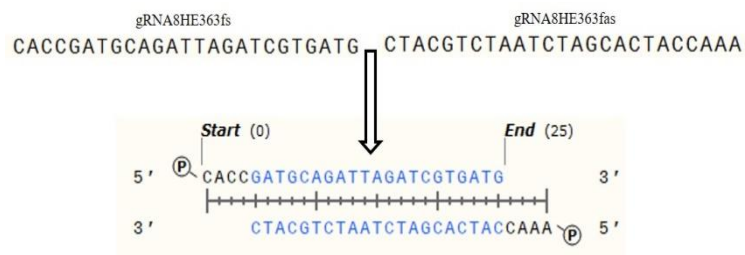


Abb. 2.3 Beispiel des Annealing und Phosphorylierung von USP8 Exon 3

Tabelle 2.13 Reaktionsmix

| | |
|--------|-------------------------|
| 6,5 µl | ddH ₂ O |
| 1 µl | gRNA[...] _s |
| 1 µl | gRNA[...] _{as} |

| | |
|--------|----------------------|
| 1 µl | T4 DNA Ligase Puffer |
| 1,5 µl | Polynukleotid Kinase |

Tabelle 2.14 Annealing und Phosphorylierung Programm

| | |
|-------|--------------------------|
| 37 °C | 30 min |
| 95 °C | 5 min |
| 25°C | langsam abkühlen 0,1°C/s |
| 4 °C | ∞ |

2.2.2.3. Verdau und Ligation

Der Verdau und die Ligation wurden durchgeführt, um die sgRNAs in das Expressionsplasmid (pX459) einzufügen. Für den Verdau wurden die Restriktionsenzyme BbsI verwendet. Zur Verdeutlichung dient die Abb. 2.4, in der dargestellt wird, an welcher Stelle des Expressionsplasmids, die sgRNA eingebaut werden. Das Pipettierschema und das Verdauprogramm sind in Tabelle 2.15 und Tabelle 2.16 aufgeführt.

Tabelle 2.15 Pipettierschema für Verdau und Ligation.

| | |
|---------|---|
| 11,5 µl | ddH ₂ O |
| 1 µl | pX459 (100 ng/µl) |
| 2 µl | Annealte und Phosphorylierte sgRNA 1:250 verdünnt |
| 2 µl | 10x Tango Puffer (Thermo-Fischer) |
| 1 µl | 10 mM DTT |
| 1 µl | ATP |
| 1 µl | Restriktionsenzyme BpiI / BbsI |
| 0,5 µl | T4 DNA Ligase |

Tabelle 2.16 Verdau und Ligationsprogramm

| | | |
|-------|--------|------------|
| 37 °C | 10 min | } 6 Zyklen |
| 23 °C | 10 min | |
| 4 °C | ∞ | |

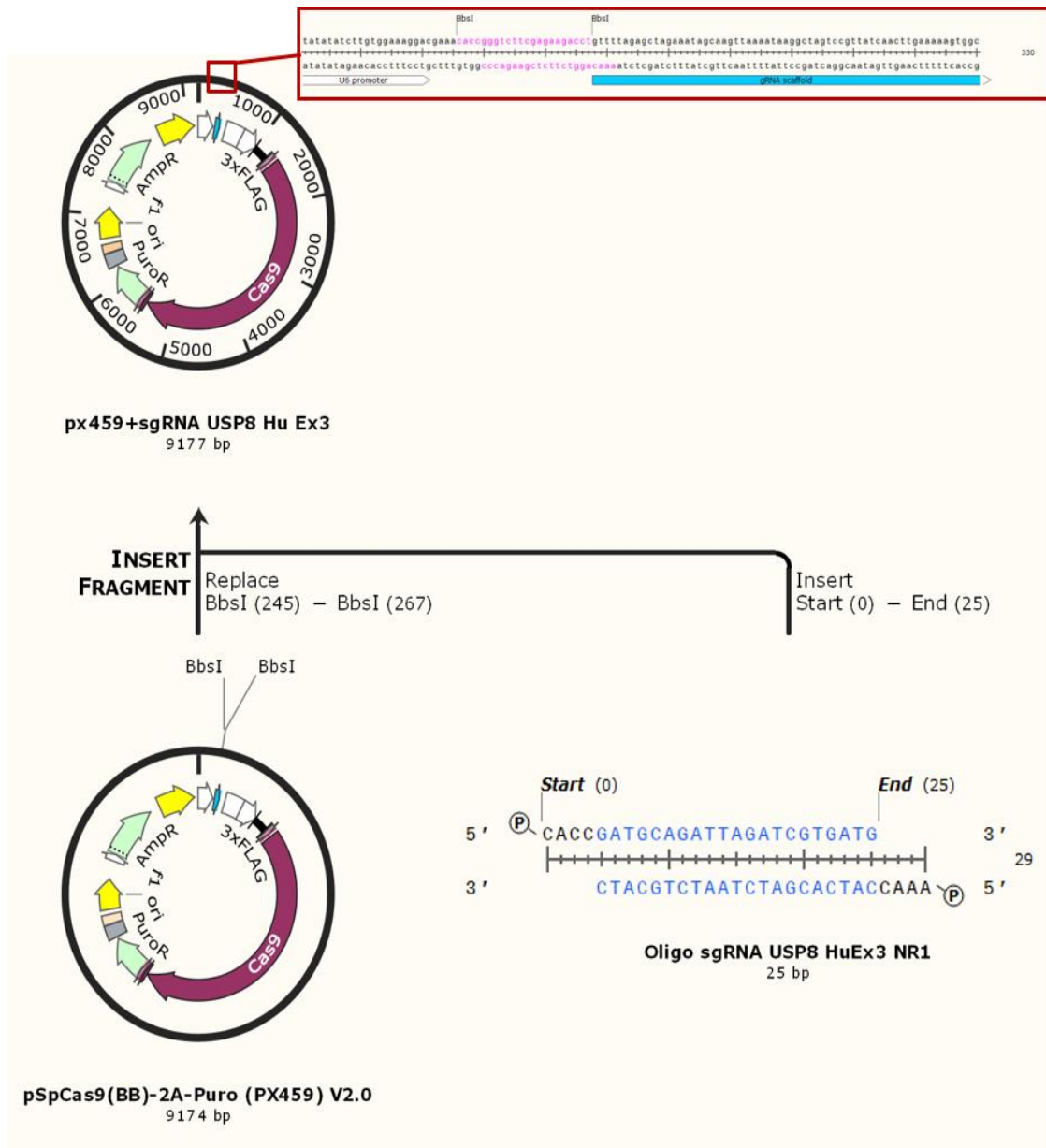


Abb. 2.4 Verdau und Ligation am Beispiel von humanem USP8

2.2.2.4. Sequenzierung

Um Mutationen der At-T20 Zellen auszuschließen oder um Plasmide mit eingefügter sgRNA, sowie ein erfolgreiches Genomediting zu überprüfen, wurde die extrahierte DNA mittels PCR amplifiziert und anschließend mittels Sanger Sequenzierung (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1992) überprüft. Die Sanger-Sequenzierung wurde von Dr. Sabine Herterich, Zentrallabor, Universitätsklinik Würzburg durchgeführt, die dazu verwendeten Primer siehe Tabelle 2.7.

Zur besseren Analysierung wurde das PCR-Produkt einer überlagerten Sequenz mittels "NEB-PCR-Cloning-Kit" nach Herstellerangaben kloniert. Die PCR-Produkte wurde mittels Agarosegel analysiert und geeignete PCR-Fragmente sequenziert. Den dazugehörigen Primer siehe hUSP48_Exon2_F und hUSP48_Exon2_R Tabelle 2.7.

Zum Ausschluss von Kontaminationen wurde die genomische DNA eines Einzelzellklons (B5, USP8 mit homologer Mutation in Exon 20) mittels STR-DNA Identifikation überprüft. Dies wurde von Dr. Sabine Herterich, Zentrallabor, Universitätsklinikum Würzburg durchgeführt.

2.2.2.5. DNA-Quantifizierung

Mittels NanoDrop™ Spektralphotometrie wurde die DNA-Konzentration durch die Absorption bei 260 nm bestimmt.

2.2.3. Mikrobiologische Methoden

2.2.3.1. Chemotransformation

Chemokompetente NEB® 10-beta competent *E.coli* (20 µl) wurden für 10 min auf Eis aufgetaut. Je 1 µl des Ligationsproduktes (siehe 2.2.2.3) wurde zu den Bakterien gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock bei 42°C für 30s unterzogen und sofort im Anschluss erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde ca. 500 µl 10-beta Medium (NEB) hinzugegeben und für 1 h bei 37°C und 750 rpm inkubiert. Die 500 µl Bakterienkultur wurde auf LB-Platten, die 100 µg/ml Ampicillin enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.3.2. Kolonie PCR

Sofern die Leer-Vektor-Platte als negative Kontrolle keine Kolonien aufwies, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, um den Erfolg der Chemotransformation weiter zu verifizieren. Das hierfür verwendete Pipettierschema siehe Tabelle 2.17. Dazu wurden je 3 Bakterienkolonien pro Platte gepickt, auf einer neuen LB-Ampicillin-Platte erneut ausgestrichen und kurz in 25 µl PCR Master Mix eingetaucht. Das PCR-Programm wurde wie in Tabelle 2.18 eingestellt.

Tabelle 2.17 Verwendetes Pipettierschema für Kolonie-PCR.

| | |
|----------|--|
| 18,75 µl | ddH ₂ O |
| 2,5 µl | 10x Red Taq PCR Reaktions Puffer (Sigma) |
| 0,5 µl | Deoxynukleotid Mix (NEB) |
| 1 µl | Primer 1: U6 Forward (100 pg/µl) 1:10 verdünnt |
| 1 µl | Primer 2: sgRNA, die antisense zu den verwendeten Oligos sind. |
| 1,25 µl | Red Taq DNA Polymerase gepickte Bakterienkolonie |

Tabelle 2.18 Verwendete Kolonie-PCR-Programm

| | | |
|-------|-------|-------------|
| 105°C | Lid | |
| 94 °C | 2 min | |
| 94°C | 1 min | } 30 Zyklen |
| 55°C | 2 min | |
| 72°C | 2 min | |
| 72°C | 5 min | |
| 4°C | ∞ | |

2.2.3.3. Plasmid-DNA Isolierung - Midi Prep

Um eine höhere Plasmidausbeute zu erhalten, wurden Übertagkolonien mit den gepickten Bakterienkolonien hergestellt. Dazu wurden 5 ml LB-Medium (zusätzlich 100 µg/ml Ampicillin) in ein steriles 15 ml Reaktionsgefäß gegeben, die gepickte Bakterienkolonie hinzugegeben und bei 37°C für 6 h und 550 rpm inkubiert.

Anschließend wurden 150 µl der Bakterienkultur in einen Glaskolben mit 60 ml LB-Ampicillin-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 550 rpm inkubiert, am nächsten Tag wurde diese Kultur für die Plasmid-DNA-Isolierung verwendet.

Am darauffolgenden Tag wurde die Bakterienkultur in 50 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und für 15 min bei 4°C und 4500xg zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde nach Herstellerangaben mittels Nucleo Bond® Xtra Midi Plus Plasmid Kit von Machery-Nagel isoliert. Zur DNA-Eluierung wurden 400 µl Tris verwendet. Die DNA-Konzentration

wurde am NanoDrop™ Spektrophotometer gemessen.

2.2.4. Zellbiologische Methoden

Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank (Thermo Fischer Scientific) durchgeführt. Die Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator bei 37°C, 96 % relative Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert.

2.2.4.1. Passagieren von Zellen

Die Kultivierung der Zellen wurde in T75 Flaschen durchgeführt. Kurz bevor die Zellen konfluieren konnten, wurden diese passagiert. Das Zellkulturmedium wurde danach entfernt und mit 10 ml DPBS gewaschen. Die Zellen inkubierten mit 1 bis 2 ml Trypsin-EDTA um diese vom Zellboden abzulösen. Das Trypsin-EDTA wurde verworfen und die Zellen mit 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Je nach Zelllinie wurden diese 1:3 (At-T20) oder 1:10 (HEK293AD) aufgeteilt. Wurde eine bestimmte Zellzahl benötigt, konnte diese in einem automatischen Zellzähler bestimmt werden (Countess II, Life technologies).

2.2.4.2. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen eingefroren. Dazu wurde das Medium entfernt und mit DPBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 - 2 ml Trypsin-EDTA vom Boden abgelöst. Frisches Medium wurde hinzugegeben, um das Trypsin zu inaktivieren, die Zellen wurden 10 min bei 900 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml Zellkulturmedium, das zusätzlich 10 % DMSO enthält, resuspendiert und je 1 ml in ein Kryoröhrchen gegeben. Diese wurden mittels speziellen Kryo-Boxen langsam auf -80°C abgekühlt und nach 24 h zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt. Die Kryoröhrchen wurden unter Verwendung eines Wasserbads (37°C) erwärmt. Die Zellen wurden dann in eine T75 Flasche mit 12 ml Kulturmedium übertragen.

2.2.4.3. Transfektion mittels Effectene

HEK293AD Zellen und At-T20 Zellen wurden mittels Effectene (Qiagen) transfiziert. Dazu wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion mit $0,6 \cdot 10^5$ HEK Zellen und $5 \cdot 10^5$ At-T20 Zellen in eine 6-er Well Platte ausgesät. In 150 µl EC-Puffer wurde 1 µg

Plasmid-DNA verdünnt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 4 µl Enhancer hinzugegeben und für weitere 3 min inkubiert, danach wurden 12,5 µl Effectene dazugegeben und der Transfektionsmix für 20 min inkubiert. Je 150 µl des Transfektionsmixes wurden tröpfchenweise pro Well zu den Zellen hinzugegeben und 48 h nach Transfektion weiterbehandelt.

2.2.4.4. Erstellung einer "Killing-Curve"

Da eine Selektion der Zellen durchgeführt werden musste, wurde mittels Puromycin zuvor die geringste Konzentration von Puromycin ermittelt, bei der nicht CRISPR/Cas9 transfizierte HEK293AD und At-T20 Zellen versterben. Dazu wurden 24 h zuvor $0,6 \cdot 10^5$ HEK293AD Zellen bzw. $5 \cdot 10^5$ At-T20 Zellen in einer 6-er Wellplatte ausgesät. Am folgenden Tag wurde Puromycin in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben und nach 24 h und 48 h wurde ermittelt, welches die geringste Konzentration von Puromycin ist, bei der die Zellen verstorben sind.

2.2.4.5. Selektion mit Puromycin

48 h nach Transfektion wurde Puromycin in der zuvor ermittelten Konzentration hinzugegeben (siehe 2.2.4.4). Für HEK293AD Zellen wurde 2,5 µg/ml Puromycin pro Well hinzugegeben. Bei At-T20 Zellen wurde 0,2 µg/ml Puromycin pro Well hinzugegeben.

2.2.4.6. CRISPR-Klon Vereinzelung - Low density seeding Methode

48 h nach der Selektion mittels Puromycin wurde die Klon-Vereinzelung durchgeführt. Dazu wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 200 µl Trypsin-EDTA vom Well gelöst, das Trypsin wurde mit 900 µl Medium inaktiviert und bei Raumtemperatur für 10 min bei 900 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels des automatischen Zellzählers (Countess II, Life technologies) ermittelt. 4/5 der Zellsuspension wurden lysiert, die restliche Zellsuspension wurde zurück ins Well überführt. Nach Ermittlung mittels Western Blot (Erläuterung siehe 2.2.5.4), welche der transfizierten Klone die geringste relative USP8 oder USP48 Proteinkonzentration aufwies und somit am erfolgversprechendsten waren, wurden diese Zellen vereinzelt. Dazu wurden die Zellen erneut aus dem Well trypsiniert und in einer Konzentration von ca. 84 Zellen pro ml in einer 10 cm Platte mit insgesamt 12 ml Medium

vereinzelt, d.h. es wurde eine Gesamtzellzahl von 1000 Zellen in 12 ml Medium angestrebt. Für die Vereinzlung und Verdünnung wurde Zellkulturmedium verwendet, welches konjugiert wurde, d.h. Medium, das von den Zellen mit Wachstumsfaktoren versorgt wurde. Bevor das konjugierte Medium verwendet wurde, wurde es mittels Filtration (Filtropur 0,20 μ m; Sarstedt) gereinigt. Als Überblick über die Gewinnung von Einzelzellklonen siehe Abb. 2.5.

Die Platte wurde nach 1, 5 und 7 Tagen auf Einzelzellkolonien überprüft und nach ca. 7 Tagen in eine 96 Well-Platte transferiert.

Am ca. 7. Tag wurden die markierten Einzelzellkolonien in eine 96er Well Platte transferiert. Das Zellkulturmedium wurde entfernt und 5 ml DPBS wurde zu den Zellen gegeben. Die zuvor markierten Einzelkolonien wurden mittels Pipettenspitze unter der Sterilwerkbank vorsichtig abgekratzt und in je ein Well mit 100 μ l vorgelegtem konjugiertem Medium transferiert. Pro Platte wurden zwischen 2 und 4 Einzelkoloniezellen auf jeweils 8 Wells verteilt. Am nächsten Tag wurde überprüft, in welchen Wells der Transfer erfolgreich war. Die Zellen wurden über die darauffolgenden Tage von 96er Well Platten über mehrere Schritte in 6er Well Platten aufgezogen.

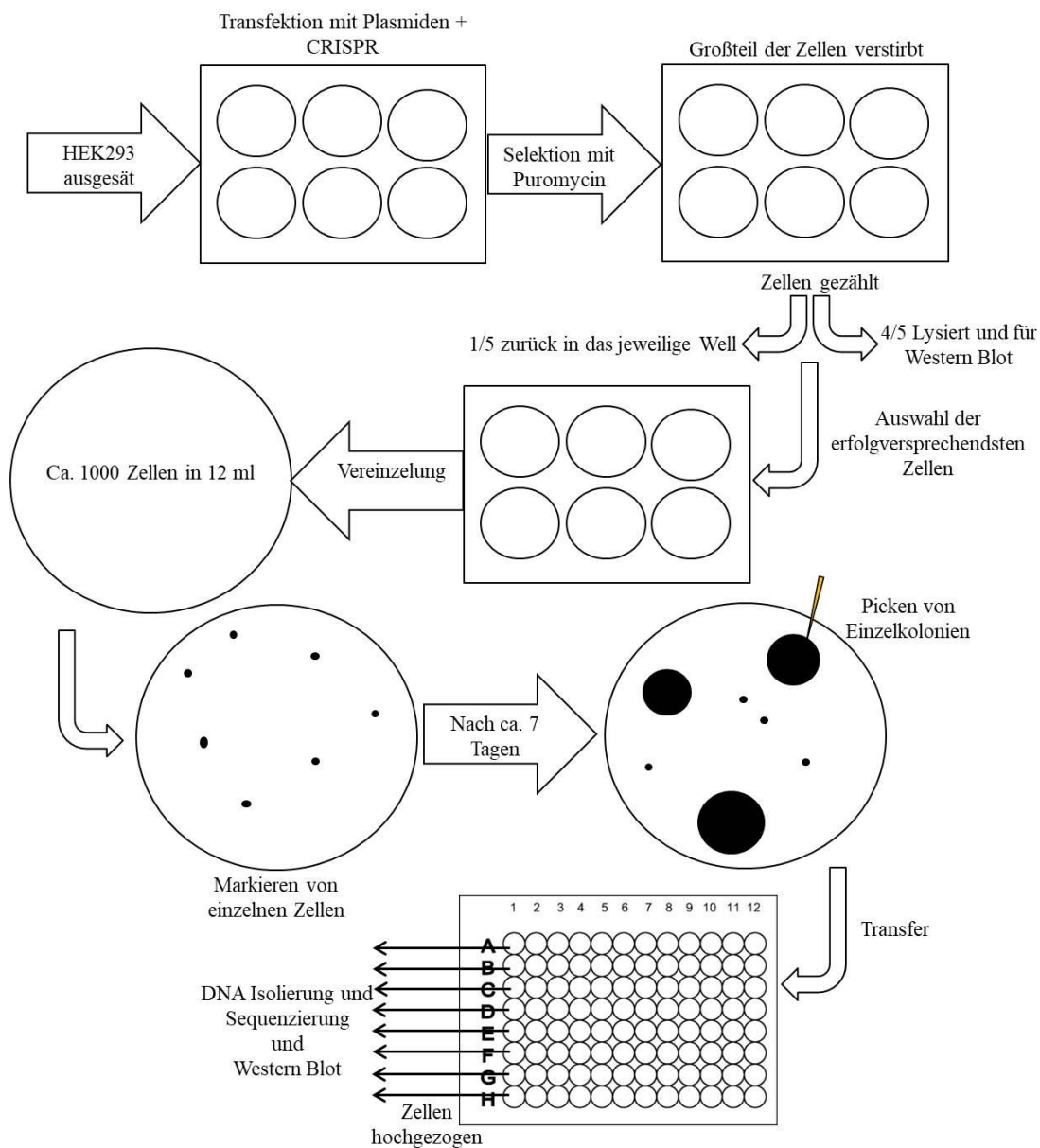


Abb. 2.5 Schematischer Versuchsüberblick über den Erhalt von CRISPR-Knock-out Einzelzellklonen.

Die ausgesäten HEK293AD Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden (siehe 2.2.2.3) transfiziert und nach 48h mit Puromycin selektiert. Anschließend wurde ein Großteil zur Western Blot Analyse verwendet. Die Zellen, welche die geringste relative USP8 /-48 Konzentration aufwiesen wurden vereinzelt und daraus Einzelklone gewonnen.

2.2.5. Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1. Aufbereitung von Proteinen aus Zelllysat

Zur Proteinaufbereitung wurde das Zelllysat aus einer ausreichenden Menge an RIPA

Puffer (für eine 6-Wellplatte ca. 250 µl) hergestellt, der mit Protease und Phosphatase Cocktails versetzt wurde. Das Zellkulturmedium wurde verworfen, RIPA plus Protease und Phosphatasen zu den Zellen gegeben und die Mischung für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Zellysate in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 4°C und 21 000 x g zentrifugiert. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5.2. Quantifizierung von Proteinen mittels BCA-Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels BCA-Assay nach Herstellerangaben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C erfolgte die Absorptionsmessung mittels Photometer. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurden die Proben zum BCA-Standard korreliert.

2.2.5.3. SDS-PAGE

Die eindimensionale SDS-PAGE ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Polypeptiden nach ihrer molekularen Masse innerhalb eines elektrischen Feldes nach Thomas und Kornberg (Thomas & Kornberg, 1975). Damit diese Separation unabhängig von der Eigenladung der Polypeptide geschieht, wird das anionische Detergens Sodiumdodecylsulfate (SDS) hinzugegeben, dabei wird die Eigenladung der Polypeptide mit einer einheitlichen negativen Ladung überdeckt. Zu den Proteinproben wurde 5x SDS-Ladepuffer im Verhältnis 1:5 hinzugegeben und für 5 min bei 98°C denaturiert, damit die Proteine in ihrer Primärstruktur vorliegen. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und auf ein Polyacrylamid-Gradienten-Gel (4 - 15 %) (BioRad) geladen. Als Größenstandard wurde 3,5 µl des "Page Ruler prestrained protein ladder plus" (Thermo Scientific) aufgetragen. Die Auftrennung der Polypeptide erfolgt in SDS Running-Puffer bei 80 V für 20 min und anschließend 150 V für 45 min.

2.2.5.4. Immunoblot (Western Blot)

Die Identifizierung und Quantifizierung von spezifischen Proteinen erfolgte mittels Western Blot. Dazu wurden die Polypeptide, die zuvor nach ihrer molekularen Masse (siehe 2.2.5.3) in SDS-PAGE aufgetrennt wurden, vom Polyacrylamidgel durch ElektrobloTTing

in einem elektrischen Feld auf eine Trägermatrix (hier: Nitrocellulose) übertragen. Die Proteine wurden mittels Tank-Blot vom Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulose bei 100 V, 1 h bei 4°C transferiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulose Membran 1 h bei Raumtemperatur (RT) mit 5%-Milch-TBS-T inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper im entsprechenden Verhältnis in 5% Milch-TBS-T entweder bei 4°C über Nacht oder 1 h bei RT inkubiert (s. Tabelle 2.9). Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer für je 10 min gewaschen. Die Trägermatrix wurde für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper (α -rabbit, α -mouse s. Tabelle 2.10), welcher 1:10.000 in Waschpuffer verdünnt und mit HRP (Meerrettich-Peroxidase) konjugiert wurde, inkubiert. Anschließend erfolgten erneut drei Waschschritte mit Waschpuffer um überschüssige Antikörper zu entfernen.

Da der Sekundärantikörper mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert wurde und dies in Anwesenheit von H_2O_2 zu einer chemischen Lumineszenz führt, kann der Protein-Antikörper-Komplex sichtbar gemacht werden. Dazu wurde SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific) in einem Verhältnis von 1:1 auf die Membran gegeben und für 1 min bei Dunkelheit inkubiert. Die Membran wurde danach luftblasenfrei in Folie gelegt und in eine Filmkassette übertragen. Die Lumineszenz wurde fotografisch mittels Röntgenfilm detektiert.

3. Ergebnisse

3.1. Design von sgRNA

Zur Herstellung von Knock-out Mutationen mittels der CRISPR/Cas9 Methode wurden gRNAs erstellt, die spezifisch für die humanen und das Maus-Gen von *USP8* und *USP48* sind (siehe 2.2.1). Um gRNAs zu erhalten, welche spezifisch zum Anfang, der Mitte und dem Ende des Open-Reading-Frames waren, wurden die jeweiligen Gen-Sequenzen der Exone in die Website CRISPOR eingegeben. Spezifisch zur Inputsequenz ermittelte die Website eine sogenannte Guide List (siehe Abb. 3.1). In der ersten Spalte wurde die Position der gRNA in der Inputsequenz angegeben und der Strang, d.h. 3'-5' oder 5'-3', angegeben.

| Position/ Strand | Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes + Variants <input type="checkbox"/> Only G- <input type="checkbox"/> Only A- | Specificity Score | Predicted Efficiency all scores Doench '16 Mor-Mateos | Out-of- Frame score Click on score to show micro-homology | Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM | Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score <input type="checkbox"/> exons only <input type="checkbox"/> chr15 only |
|---------------------|--|----------------------|---|--|---|---|
| 63 / fw | ATCGAGATTAGATCGTGAAG AGG Enzymes: <i>Hpy188III</i> Cloning / PCR primers | 92 | 64 | 44 | 60 0-0-0-4-63 0-0-0-0-1 67 off-targets | 4:intron.CERS4 4:intergenic.SNORA31-RNU6-1075P 4:intergenic.Y_RNA-RP11-319F12.2 show all... |
| 68 / fw | GATTAGATCGTGAAGAGAA AGG Enzymes: <i>BshFI, EcoO109I, PspPI</i> Cloning / PCR primers | 82 | 53 | 35 | 65 0-0-0-4-83 0-0-0-0-0 87 off-targets | 4:intergenic.Metazoa_SRP-SPAT48-AS1 4:intergenic.CHRM3-AS2-CHRM3 4:intergenic.RNU7-190P-AC009312.1 show all... |
| 16 / rev | CTCCCTCTTAAGACTTC AGG Enzymes: <i>MflI, BaeGI, BglII</i> Cloning / PCR primers | 73 | 27 | 25 | 85 0-0-1-20- 192 0-0-0-3-5 213 off-targets | 3:intron.ATP2A2 3:intergenic.TENM4-RP11-258O13.1 3:intergenic.RAB18-MKO show all... |

Abb. 3.1 Guide List am Beispiel von USP8 Exon 3 von der Website crispor.tefor.net.

Dargestellt ist ein Ausschnitt der Guide List für USP8 Human mit Beispielen für die vorgeschlagenen gRNAs mit der dazugehörigen PAM-Sequenz. Rot umrandet ist eine der gRNA für Exon 3, welche für die weiteren Versuche verwendet wurde. (Haeussler et al., 2016)

In der zweiten Spalte ist die Guide Sequenz (gRNA) zu sehen, diese ist 20 bp lang. Die PAM Sequenz ist ebenfalls mit aufgeführt. Zusätzlich sind in der 2. Spalte auch Restriktionsenzyme aufgeführt (vgl. Abb. 3.1), welche zu den 3 bp der PAM Sequenz am 5' Ende überlappend sind. Diese sind aufgeführt, da sie bei dem durchgeführten DNA-Doppelstrangbruch durch die Cas9 gestört werden können und somit zum Screening nach Mutanten mittels PCR genutzt werden könnten.

Der spezifische Score in der 3. Spalte ist eine mathematische Annahme und beschreibt, ob die gRNA unspezifisch im Genom binden könnte und so zu off-targets im Genom

führen würde, d.h. zu Doppelstrangbrüchen irgendwo im Genom außerhalb des intendierten Bereichs mittels der Cas9. Der spezifische Score reicht von 0-100, mit 100 als bester Sequenz, d.h. es konnte im gesamten Genom keine Sequenz gefunden werden, die bis auf 4 Nukleotide gleich ist (Haeussler et al., 2016). Es wurden ausschließlich gRNAs ausgewählt, die einen spezifischen Score von >50 hatten.

Die "Predicted Efficiency" in Spalte 4 stellt eine Annahme dar, wie effizient die Ziel-Sequenz von der gRNA geschnitten wird und wird von 0 - 100 angegeben, mit 100 als beste "Predicted Efficiency". Da die Expression mittels U6 Promoter durchgeführt wurde, gab der Score von Doench (Doench et al., 2016) die primäre Orientierung, da dieser für U6 Promoter eine höhere Aussagekraft haben soll (Haeussler et al., 2016) und in diesem Beispiel bei 62 liegt (vgl. Abb. 3.1).

Spalte 5 "Out-of-frame- Score" (0-100) ist eine Vorhersage für die Wahrscheinlichkeit out-of-frame Deletionen, also Mutationen zu erhalten, die das Leseraster verschieben.

Der "Off-Target Mismatch Count" in Spalte 6 gibt eine Wahrscheinlichkeit an, wie häufig eine Fehlpaarung (=Mismatch) der gRNA an anderer Stelle im Genom auftritt. Für das Beispiel hier 0-0-0-4-63 (s. Abb. 3.1 roter Kasten) würde dies bedeuten, dass bei der Sequenz USP8 Exon 3 die ausgewählte gRNA an keinem anderen Ort im Genom binden würde und es somit zu keiner Fehlpaarung kommt. Weiterführend würde dies bedeuten, dass selbst bei Veränderung der gRNA von 1 bp oder 2 bp es zu keiner Fehlpaarung innerhalb des Genoms kommen würde. Erst bei einer Veränderung von 3 bp der gRNA gäbe es 4 Fehlpaarungen innerhalb des Genoms. Bei einer Veränderung von 4 bp würde dies zu 63 Fehlpaarungen innerhalb des Genoms führen. Bei einer Gesamtlänge der gRNA von 20 Basen würde dies bedeuten, dass erst bei einer Sequenz, die sich über ein Sechstel von unserer Sequenz unterscheidet die Fehlpaarung stattfinden kann, was eine hohe Spezifität zeigt.

Spalte 7 (s. Abb. 3.1) führt auf, wo diese Fehlpaarungen aus Spalte 6 auftreten würden. Hier in diesem Beispiel würden diese Fehlpaarungen innerhalb von Introns, d.h. einer

kodierenden Sequenz, gelegen sein. Dies bedeutet, dass ausschließlich gRNAs ausgewählt wurden, welche nur einen geringen Anteil an "Off-Targets Mismatch Count" hatten und diese möglichst nur in Introns gelegen waren.

Nach der Ermittlung der passenden gRNAs wurden über "Cloning / PCR primers" in Spalte 2 der Abb. 3.1 die Primer ausgewählt. Der verwendete Vektor enthält einen U6 Promoter, so dass in den Zellen eine Expression möglich ist. Da in dieser Arbeit das verwendete Plasmid (px459 s. Tabelle 2.4) ein Derivat des pX330 Plasmids ist, wurde pX330 als CRISPR Plasmid ausgewählt, um die Primer designen zu können (siehe Abb. 3.2). Die vorgeschlagenen Primer mit einem, hinzugefügtem Guanin wurden anschließend von Eurofins bezogen. Das Guanin wurde hinzugefügt, da der U6 Promoter bevorzugt mit einem Guanin am Anfang beginnt.

U6 expression from an Addgene plasmid

The guide sequence ATGCAGATTAGATCGTGATG does not contain the motif TTTT, which terminates RNA polymerase, so it can be transcribed in mammalian cells.

Select your Addgene plasmid:

To clone the guide into *pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Zhang lab) + derivatives*, use these primers:

Note: Efficient transcription from the U6 promoter requires a 5' G. This G has been added in the sequence below, it is underlined. For a full discussion about G- prefixing, see the discussion of G-prefixing under [overlapping oligonucleotides](#).

| Name | Primer Sequence |
|---|-----------------------------------|
| USP8Hu Exon3_guideRNA63forwU6sensepX330 | <u>CACCG</u> ATGCAGATTAGATCGTGATG |
| USP8Hu Exon3_guideRNA63forwU6antisensepX330 | AAACCATCACGATCTAATCTGCAT <u>C</u> |

The plasmid has to be digested with: *Bbs1*

[Click here](#) to download the cloning protocol for *pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Zhang lab) + derivatives*

Abb. 3.2 Primer für gRNA am Beispiel von USP8 Exon 3.

Dargestellt ist ein Ausschnitt über die vorgeschlagenen Primer von CRISPOR abhängig vom verwendeten Primer und Expressionssystem und ein Vorschlag mit welchen Restriktionsenzymen die Restriktions-Ligations-Klonierung durchgeführt werden kann. (Haeussler et al., 2016)

Für USP8 Human wurden dann mit diesen Tools je 2 Oligonukleotide für den Anfang, die Mitte und das Ende des Open-Reading-Frames ausgewählt. Zur Verdeutlichung siehe Abb. 3.3.

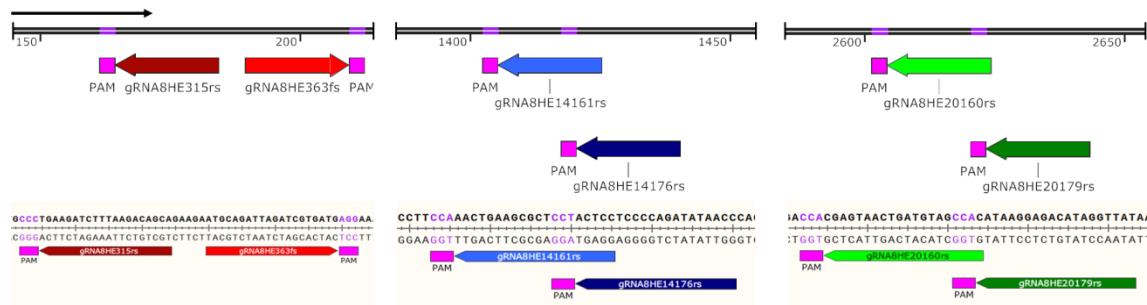


Abb. 3.3 USP8 Gen Human mit den jeweiligen gRNA Oligonukleotiden.

Der schwarze Pfeil markiert die Translationsrichtung. Die Doppellinie stellt das USP8 Gen dar. Die farbigen Pfeile markieren die jeweiligen gRNAs. Rot Exon 3, Blau Exon 14 und Grün Exon 20. Das rosa Viereck markiert die PAM-Sequenz.

In Tabelle 3.1 sind die jeweiligen Oligonukleotide komplementär dargestellt. Sie sind in Abb. 3.3 als Pfeile zu sehen, sortiert nach ihrer Lokalisation im Gen. Für USP8 Human wurde Exon 3 als Start des ORFs ausgewählt. Exon 14 befindet sich in der Mitte des ORFs und enthält bei M. Cushing-Patienten, die Mutation des USP8 Gens (Reincke et al., 2015). Exon 20 befindet sich am Ende des ORFs von USP8 Human.

Tabelle 3.1 Auflistung der gRNA für USP8 Human in 5'-3' Richtung.

Fett und grün hinterlegt ist die jeweilige komplementäre gRNA Sequenz. Schwarz, ist die PAM-Sequenz.

| USP8Hu Exon 3 (Start ORF) | Seq. Lok | | |
|----------------------------------|----------|------|-----------------------------------|
| gRNA8HE363fs | 63 5' | CACC | GATGCAGATTAGATCGTGATG |
| gRNA8HE363fas | 63 3' | | CTACGTCTAATCTAGCACTAC CAAA |
| gRNA8HE315rs | 15 5' | CACC | GTGCTGTCTTAAAGATCTTCA |
| gRNA8HE315ras | 15 3' | | CACGACAGAATTTCTAGAAGT CAAA |
| USP8Hu Exon 14 (Mut) | | | |
| gRNA8HE14176rs | 176 5' | CACC | GGTTATATCTGGGGAGGAGT |
| gRNA8HE14176ras | 176 3' | | CCAATATAGACCCCTCCTCA CAAA |
| gRNA8HE14161rs | 161 5' | CACC | GGAGTAGGAGCGCTTCAGTT |
| gRNA8HE14161ras | 161 3' | | CCTCATCCTCGCGAAGTCAA CAAA |
| USP8Hu Exon 20 (Stop ORF) | | | |
| gRNA8HE20179rs | 179 5' | CACC | GATAACCTATGTCTCCTTATG |
| gRNA8HE20179ras | 179 3' | | CTATTGGATACAGAGGAATAC CAAA |
| gRNA8HE20160rs | 160 5' | CACC | GTGGCTACATCAGTTACTCG |
| gRNA8HE20160ras | 160 3' | | CACCGATGTAGTCAATGAGC CAAA |

Für USP48 Human wurden ebenfalls sgRNA Oligonukleotide designt. Für eine schematische Darstellung des USP48 Gens mit den jeweils hergestellten Oligonukleotiden siehe Abb. 3.4. Es wurden für den Anfang und die Mitte des ORFs je zwei sgRNAs designt. Für Exon 27, dem Ende des ORFs konnte nur eine gRNA designt werden, da nur eine der vorgeschlagenen gRNAs den oben aufgeführten Ansprüchen gerecht wurde.

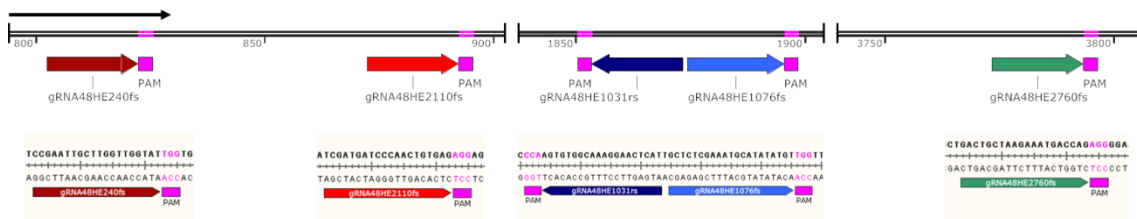


Abb. 3.4 USP48 Gen Human mit den jeweiligen gRNA Oligonukleotiden.

Der schwarze Pfeil markiert die Translationsrichtung. Die Doppellinie stellt das USP48 Gen dar. Die farbigen Pfeile markieren die jeweiligen gRNAs. Rot Exon 2, Blau Exon 10 und Grün Exon 27. Das rosa Viereck markiert die PAM-Sequenz.

Die designten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.2 komplementär dargestellt, sie sind in Abb. 3.4 als Pfeile zu sehen, sortiert nach ihrer Lokalisation im Gen. Für USP48 Human wurde Exon 2 als Start des ORFs ausgewählt. Exon 10 befindet sich in der Mitte des ORFs und enthält bei M. Cushing Patienten die Mutation des USP48 Gens. Exon 27 befindet sich am Ende des ORFs von USP48 Human.

Tabelle 3.2 Auflistung der gRNA für USP48 Human in 5'-3' Richtung.

Fett und grün hinterlegt ist die jeweilige komplementäre gRNA Sequenz. Schwarz, ist die PAM-Sequenz.

| USP48Hu Exon 2 (Start ORF) | Seq. Lok | | | |
|------------------------------|----------|----|-----------------------------------|----|
| gRNA48HE240fs | 40 | 5' | CACC GCCGAATTGCTTGGTTGGTAT | 3' |
| gRNA48HE240fas | 40 | 3' | CGGCTTAACGAACCAACCATA CAAA | 5' |
| gRNA48HE2110fs | 110 | 5' | CACC GTCGATGATCCCAACTGTGAG | 3' |
| gRNA48HE2110fas | 110 | 3' | CAGCTACTAGGGTTGACACTC CAAA | 5' |
| USP48Hu Exon 10 (Mut) | | | | |
| gRNA48HE1076fs | 76 | 5' | CACC GCTCTCGAAATGCATATATGT | 3' |
| gRNA48HE1076fas | 76 | 3' | CGAGAGCTTTACGTATATACA CAAA | 5' |
| gRNA48HE1031rs | 31 | 5' | CACC GATGAGTTCCTTTGCCCACT | 3' |
| gRNA48HE1031ras | 31 | 3' | CTACTCAAGGAAACGGTGTGA CAAA | 5' |

| | | | | |
|-----------------------------------|----|----|----------------------------------|----|
| USP48Hu Exon 27 (Stop ORF) | | | | |
| gRNA48HE2760fs | 60 | 5' | CACC GACTGCTAAGAAATGACCAG | 3' |
| gRNA48HE2760fas | 60 | 3' | CTGACGATTCTTTACTGGTC CAAA | 5' |

USP8 Maus wurden ebenfalls designt, da dieses später für den knock-in in At-T20 Zellen verwendet werden sollte. Für die At-T20 Zelllinien wurden ebenso sgRNA Oligonukleotide designt (s. Abb. 3.5). Wie für die humane Zelllinie, wurden auch hier je zwei sgRNAs vom Anfang, der Mitte und dem Ende des ORFs ausgewählt.

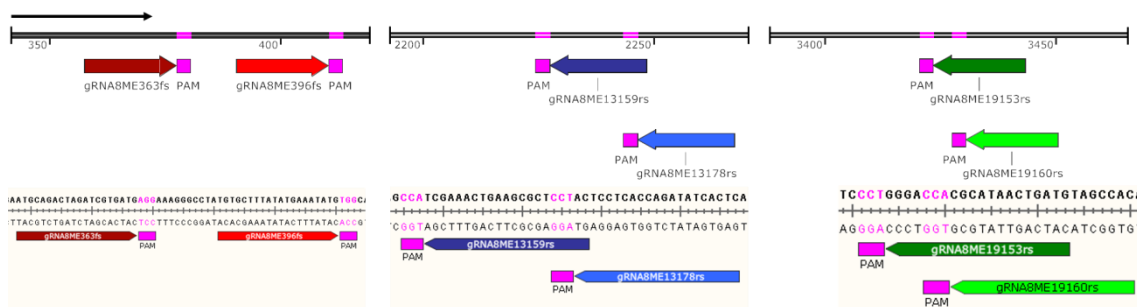


Abb. 3.5 USP8 Maus Gen mit den jeweiligen gRNA Oligonukleotiden.

Der schwarze Pfeil markiert die Translationsrichtung. Die Doppellinie stellt das USP8 Gen dar. Die farbigen Pfeile markieren die jeweiligen gRNAs, Rot Exon 3, Blau Exon 13 und Grün Exon 19. Das rosa Viereck markiert die PAM-Sequenz.

Die für USP8 Maus designten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.3 komplementär dargestellt (vgl. Abb. 3.5). Sie sind als Pfeile zu sehen, sortiert nach der Lokalisation im Gen. Für USP8 Maus wurde Exon 3 als Start des ORFs ausgewählt. Exon 13 befindet sich in der Mitte des ORF und enthält die zu der humanen USP8 Mutationen korrespondierende Region, Exon 19 befindet sich am Ende des ORFs von USP8 Maus.

Tabelle 3.3 Auflistung der gRNA für USP8 Maus in 5'-3' Richtung.

Fett und grün hinterlegt ist die jeweilige komplementäre gRNA Sequenz. Schwarz, ist die PAM-Sequenz.

| USP8Ms Exon 3 (Start ORF) | Seq. Lok | | | |
|----------------------------------|-----------------|----|-----------------------------------|----|
| gRNA8ME363fs | 63 | 5' | CACC GATGCAGACTAGATCGTGATG | 3' |
| gRNA8ME363fas | 63 | 3' | CTACGTCTGATCTAGCACTAC CAAA | 5' |
| gRNA8ME396fs | 96 | 5' | CACC GTGTGCTTTATATGAAATATG | 3' |
| gRNA8ME396fas | 96 | 3' | CACACGAAATATACTTTATAC CAAA | 5' |
| USP8Ms Exon 13 (Mut) | | | | |

| | | | | |
|----------------------------------|-----|----|-----------------------------------|----|
| gRNA8ME13159rs | 159 | 5' | CACC GTAGGAGCGCTTCAGTTTCGA | 3' |
| gRNA8ME13159ras | 159 | 3' | CATCCTCGCGAAGTCAAAGCT CAAA | 5' |
| gRNA8ME13178rs | 178 | 5' | CACC GAGTGATATCTGGTGAGGAGT | 3' |
| gRNA8ME13178ras | 178 | 3' | CTCACTATAGACCACTCCTCA CAAA | 5' |
| USP8Ms Exon 19 (Stop ORF) | | | | |
| gRNA8ME19160rs | 160 | 5' | CACC GTGGCTACATCAGTTATGCG | 3' |
| gRNA8ME19160ras | 160 | 3' | CACCGATGTAGTCAATACGC CAAA | 5' |
| gRNA8ME19153rs | 153 | 5' | CACC GCATCAGTTATGCGTGGTCCC | 3' |
| gRNA8ME19153ras | 153 | 3' | CGTAGTCAATACGCACCAGGG CAAA | 5' |

Für USP48 Maus wurden ebenfalls Oligonukleotide designt, schematisch dargestellt in Abb. 3.6 und komplementär aufgelistet in Tabelle 3.4. Exon 10 enthält auch hier die zu der humanen USP48 Mutation korrespondierende Region

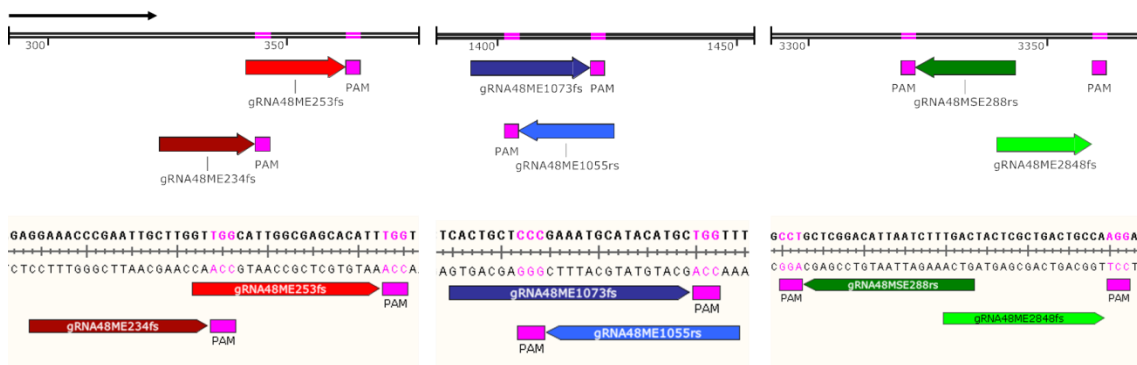


Abb. 3.6 Schematische Darstellung des USP48 Maus Gen mit designten gRNA Oligonukleotiden.

Der schwarze Pfeil markiert die Translationsrichtung. Die Doppellinie stellt das USP48 Gen dar. Die farbigen Pfeile markieren die jeweiligen gRNAs. Rot Exon 2, Blau Exon 10 und Grün Exon 28. Das rosa Viereck markiert die PAM-Sequenz.

Tabelle 3.4 Auflistung der gRNA für USP48 Maus in 5'-3' Richtung

Fett und grün hinterlegt ist die jeweilige komplementäre gRNA Sequenz. In schwarz, ist die PAM-Sequenz.

| USP48Ms Exon 2 (Start ORF) | Seq. Lok | | | |
|----------------------------|----------|----|-----------------------------------|----|
| gRNA48ME234fs | 34 | 5' | CACC GGAACCCGAATTGCTTGGT | 3' |
| gRNA48ME234fas | 34 | 3' | CCTTTGGGCTTAACGAACCA CAAA | 5' |
| gRNA48ME253fs | 53 | 5' | CACC GTTGGCATTGGCGAGCACATT | 3' |
| gRNA48ME253fas | 53 | 3' | CAACCGTAACCGCTCGTGTA CAAA | 5' |

| | | | | | |
|---------------------------------------|----|----|----------------------------|----|--|
| USP48Ms Exon 10 (Mut) | | | | | |
| gRNA48ME1073fs | 73 | 5' | CACCGCTCCCGAAATGCATACATGC | 3' | |
| gRNA48ME1073fas | 73 | 3' | CGAGGGCTTTACGTATGTACGC AAA | 5' | |
| gRNA48ME1055rs | 55 | 5' | CACCGAACCAGCATGTATGCATTTTC | 3' | |
| gRNA48ME1055ras | 55 | 3' | CTTGGTTCGTACATACGTAAAG AAA | 5' | |
| USP48Ms Exon 28 (Stop ORF) | | | | | |
| gRNA48MSE288rs | 8 | 5' | CACCGTCAAAGATTAATGTCCGAGC | 3' | |
| gRNA48ME288ras | 8 | 3' | CAGTTTCTAATTACAGGCTCG AAA | 5' | |
| gRNA48ME2848fs | 48 | 5' | CACCGTGACTACTCGCTGACTGCCA | 3' | |
| gRNA48ME2848fas | 48 | 3' | CACTGATGAGCGACTGACGGT AAA | 5' | |

3.2. Knock-out-Vektoren

Um die CRISPR/Cas Methode anwenden zu können, wurden die designten sgRNA Oligonukleotide (siehe 3.1) in Knock-Out-Vektoren ligiert und anschließend in Bakterien kloniert (siehe Tabelle 3.5)

Tabelle 3.5 Auflistung der in dieser Arbeit hergestellten Knock-out Plasmiden in pX459

| | | Knock-Out | Exon |
|--------------|---------------|------------------|-------------|
| Human | USP 8 | 8HE363 | 3 |
| | | 8HE315 | 3 |
| | | 8HE14176 | 14 |
| | | 8HE14161 | 14 |
| | | 8HE20179 | 20 |
| | | 8HE20161 | 20 |
| | USP 48 | 48HE240 | 2 |
| | | 48HE2110 | 2 |
| | | 48HE1076 | 10 |
| | | 48HE1031 | 10 |
| 48HE2760 | | 27 | |
| Maus | USP 8 | 8ME363 | 3 |
| | | 8ME396 | 3 |
| | | 8ME13159 | 13 |
| | | 8ME13178 | 13 |
| | | 8ME19160 | 19 |
| | | 8ME19153 | 19 |
| | USP 48 | 48ME234 | 2 |
| | | 48ME253 | 2 |
| | | 48ME1073 | 10 |

| | | |
|--|----------|----|
| | 48ME1055 | 10 |
| | 48ME288 | 28 |
| | 48ME2848 | 28 |

Die Klonierung wurde mittels Kolonie-PCR bestätigt. Es wurden pro Plasmid jeweils 3 Bakterienklone ausgewählt (siehe Abb. 3.7). Für die Aufreinigung und anschließende Sequenzierung wurden ausschließlich diejenigen Klone ausgewählt, die bei der erwarteten Größe von 276 bp ausreichend DNA aufwiesen.

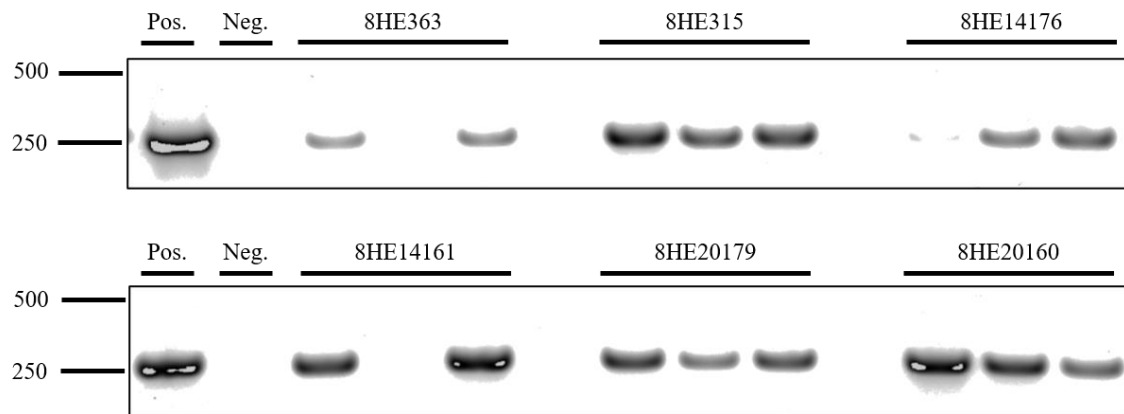


Abb. 3.7 Beispielhafte Darstellung der Produktauftragung der Kolonie PCR in ein Agarose Gel von USP8 Human.

Die PCR Produkte liegen bei der erwarteten Größe von 276 bp. Pro kloniertem Plasmid wurden je 3 Bakterienklone aufgetragen, zusätzlich je eine positive und negative Kontrollprobe.

Mittels Sanger-Sequenzierung wurde überprüft, ob die sgRNA an der richtigen Stelle und korrekt in das Plasmid ligiert wurde.

3.3. Knock-out USP8 Einzelzellklon

Zur Überprüfung des erfolgreichen Knock-outs von USP8 (s. Abb. 3.8) wurden Immunoblots aus den Einzelzellklonen angefertigt. Die Einzelzellklone wurden nach den Nummern der Wells benannt, aus denen die Zellklone gewachsen sind (siehe Abb. 2.5). Daraus folgt, dass z.B. B5 und F5 mit demselben CRISPR/Cas9 Konstrukt transformiert wurden, aber zwei unterschiedliche Einzelzellkolonien sind. Aus dem Well F5 wurde wiederum erneut eine Einzelzellkolonie gezogen, diese hatte sich separiert. Die Kolonien sind demzufolge F5 und F5#1. Ab einer bestimmten Zellzahl wurde Zellysate von HEK293AD

Zellen verwendet, welche mittels der verschiedenen CRISPR/Cas9 Konstrukte transfiziert worden waren. Für eine Auflistung der verwendeten gRNAs siehe Tabelle 3.1.

Es konnte keine ausgeprägte Reduzierung der Proteinkonzentration von USP8 im Vergleich zu mit Leer-Vektor transfizierten Zellen im Immunoblot erkannt werden, auch wenn mehrere gRNAs gleichzeitig transfiziert wurden (siehe Abb. 3.8A D3 und C7). Die quantitative Analyse zeigte ebenfalls für keinen der erhaltenen Zellklone eine signifikante Reduzierung des relativen Proteinlevels (s. Abb. 3.8B).

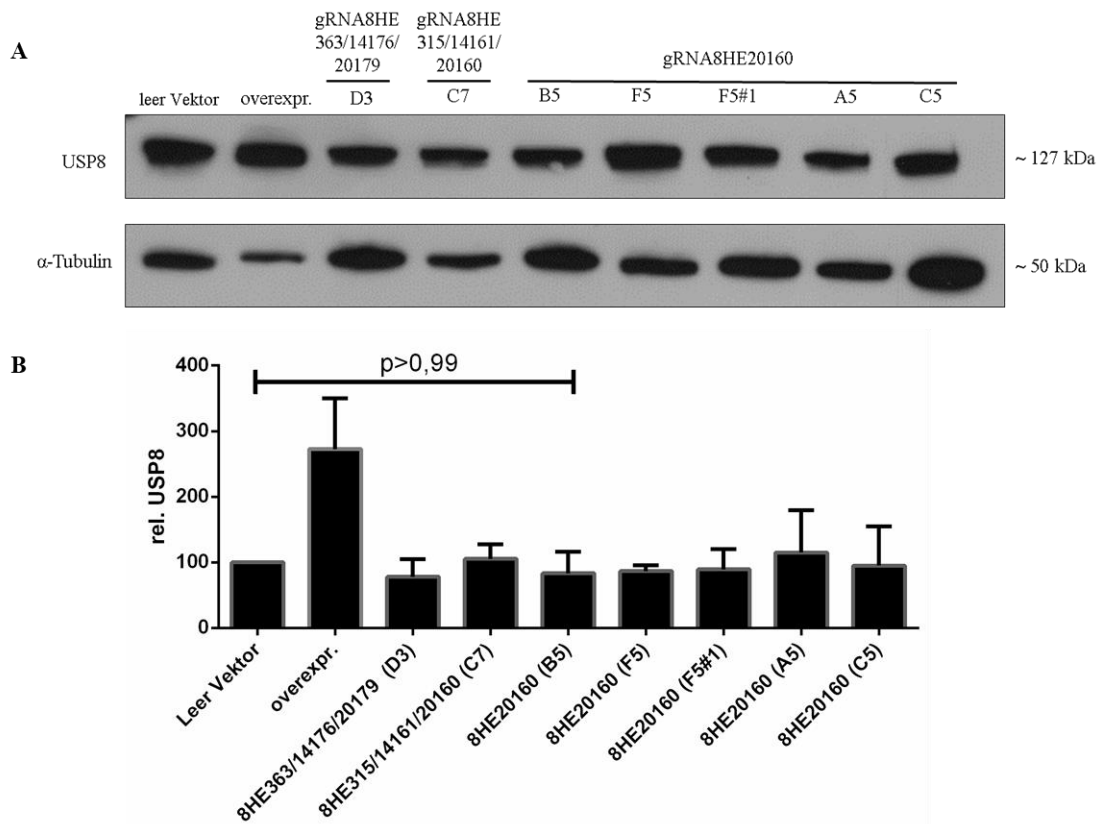


Abb. 3.8 Generierung von USP8 knock-out HEK293 Zelllinien mittels CRISPR/Cas9

(A) Immunoblot Analyse unter Verwendung von Antikörpern gegen USP8 und α -Tubulin zeigt bei keinem Zellklon eine Reduzierung des Proteinlevels von USP8. (B) Quantitative Analyse der WB-Banden (n=2) von allen erhaltenen Zellklonen. Jeder Balken steht für den Mittelwert des Verhältnisses zw. USP8 Signals zu α -Tubulin Signals mit dem jeweiligen Standardfehler. Statistische Analyse mittels ANOVA und Friedman Test.

3.3.1. Sequenzierung der generierten Zellklone von USP8

Die Sequenzierungen der DNA aller Zellklone ergab für den Zellklon B5 (gRNA8HE20160) eine homologe Insertionsmutation in Exon 20. Die Insertionsmutation eines Guanins konnte an der erwarteten Stelle, vier Nukleotide nach der PAM Sequenz, dargestellt werden (vgl. Abb. 3.9A). Die Insertionsmutation führte zu einer Leserasterverschiebung. Die folgende Abbildung (Abb. 3.9) verdeutlicht das Ergebnis der Sanger-Sequenzierung und ist für das bessere Verständnis komplementär dargestellt.

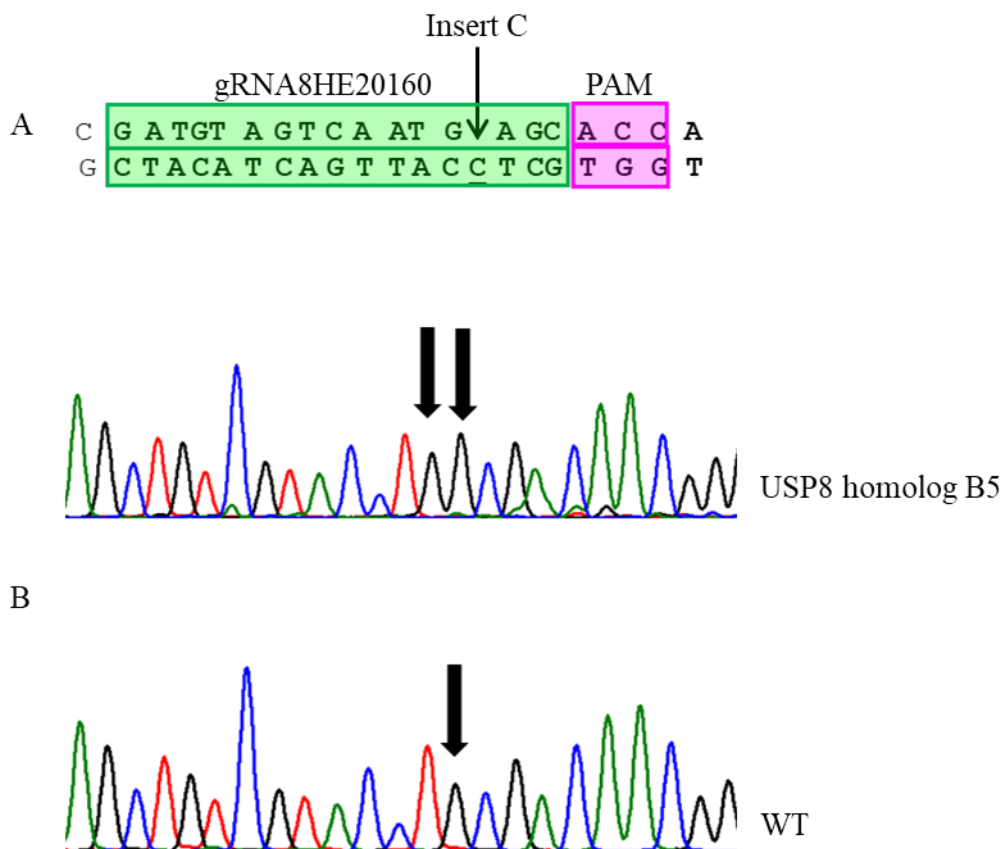


Abb. 3.9 Sequenzierung der Knock-out homologen USP8 Mutante B5 (gRNA8HE20160)

A Darstellung der Sequenz mit Markierung der komplementären gRNA, PAM Sequenz und Markierung der Insertionsmutation mittels schwarzen Pfeils. Da der reverse Strang dargestellt ist, ist die Insertion ein Cystein (C)

B Im Vergleich zur mutierten B5 Sequenz die Wildtyp (WT) Sequenz mit nur einem Cystein an der Stelle markiert mit einem schwarzen Pfeil.

Alle weiteren erzeugten Einzelzellklone A5 und C5 (gRNA8HE20160) waren heterozygot, d.h. nur ein Allel wies eine Insertionsmutation auf. Es wurde ebenfalls, 4 Nukleotide

nach der PAM Sequenz, ein Guanin inseriert (die heterozygote Mutation mit Chromogramm siehe in Abb. 3.10).

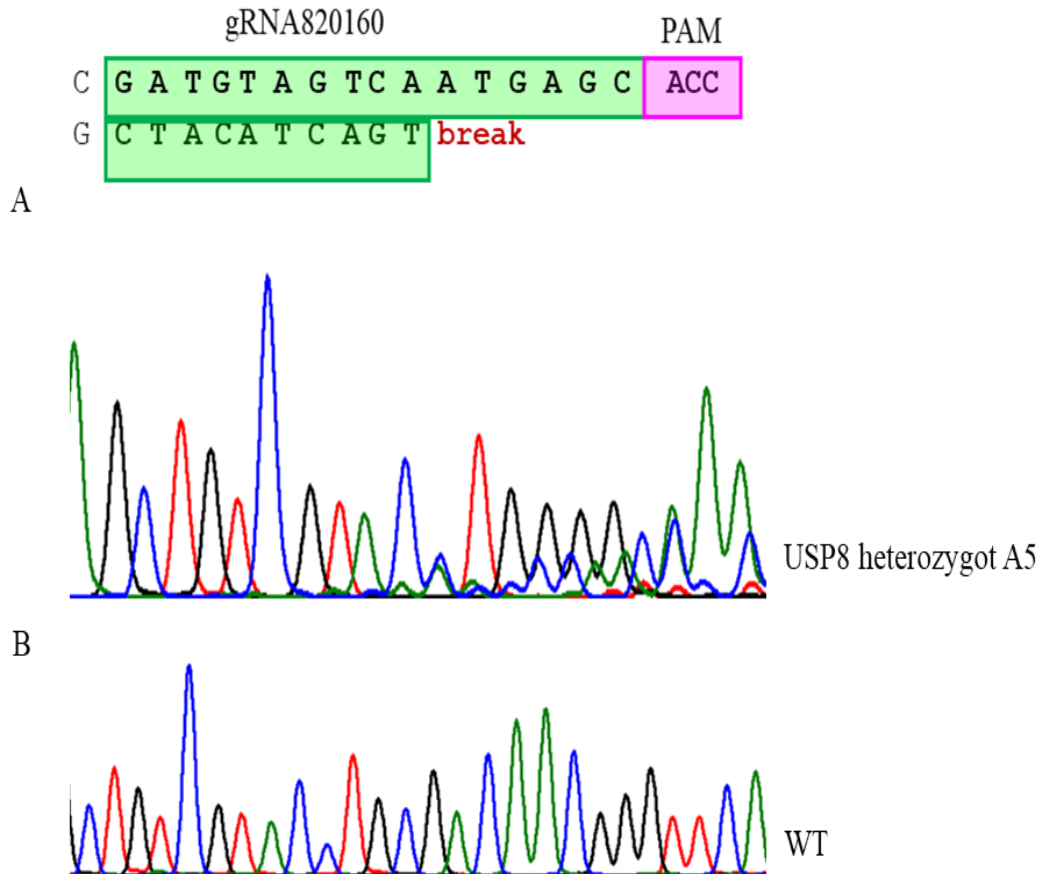


Abb. 3.10 Sequenzierung der heterozygoten USP8 Mutatante A5 (gRNA8HE20160)

A Darstellung der Sequenz mit gRNA, PAM Sequenz und der heterozygoten Mutation nur eines Guanin.

B Darstellung der Wildtyp (WT) Sequenz.

3.3.2. Knock-out Zellklon B5 erneut mit CRISPR/Cas9 behandelt

Nachdem ein Klon B5 (gRNA8HE20160) mit einer homologen Insertionsmutation in Exon 20 erfolgreich gewonnen werden konnte, wurde dieser erneut mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Methode mit gRNAs für Exon 3 und 14 transfiziert. Es konnte eine einzige weitere Einzelzellkolonie aus diesem B5 (gRNA8HE20160) Einzelzellklon gewonnen werden, seine Transfizierung wurde mit gRNA8HE363 durchgeführt und er wurde als B5+363 bezeichnet. Der Einzelzellklon zeigte eine Reduzierung der relativen Proteinex-

pression um 43,9 % im Vergleich zum Leer Vektor (100 vs 56,0±16,2; p=0,73) (Friedman-Test). Die ursprüngliche Einzelzellkolonie B5 (gRNA8HE20160) zeigte eine höhere Reduzierung der relativen Proteineexpression um 60,5 % im Vergleich zum Leer Vektor (100 vs 39,5±15,9; p=0,36) (Friedman-Test) (s. Abb. 3.11).

Die darauffolgende Sequenzierung zeigte für den Einzelzellklon B5+363 ein Wildtypgenom mit zusätzlichem Verlust der ursprünglichen Insertionsmutation in Exon 20.

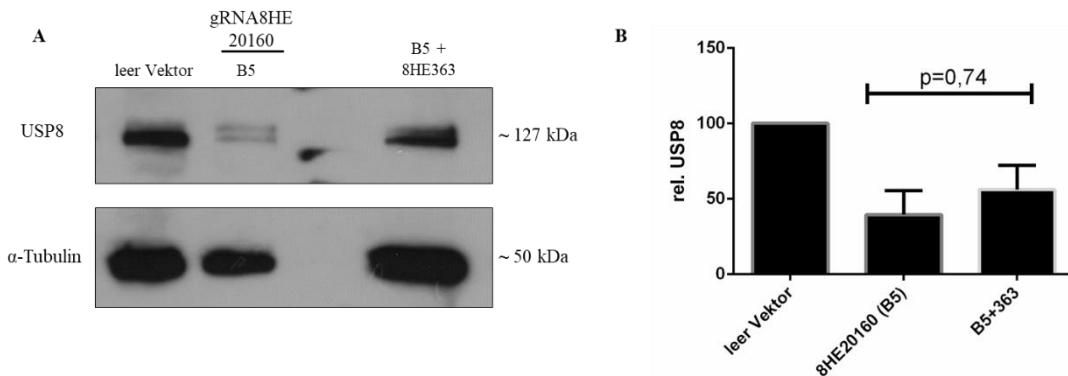


Abb. 3.11 Generierung von USP8 knock-out mit B5 (gRNA20160) Zellklon aus der HEK293AD Zelllinie mittels CRISPR/Cas9.

(A) Eine Immunoblot Analyse unter Verwendung von Antikörpern gegen USP8 und α -Tubulin zeigt nur bei dem Zellklon B5 (gRNA8HE20160) eine Reduzierung des USP8 Proteinlevels. (B) Quantitative Analyse der WB-Banden (n=2) im Vergleich des Zellklons mit dem Leer Vektor. Jeder Balken steht für den Mittelwert des Verhältnisses zw. USP8 Signals zu α -Tubulin Signal mit dem jeweiligen Standardfehler. Statistische Analyse mittels ANOVA und Friedman Test.

3.3.3. Aktivität der USP8 Deubiquitinase

Zur Überprüfung, ob die Aktivität der Deubiquitinase USP8 durch den Knock-out verändert wurde, wurden Immunoblots durchgeführt (vgl. Abb. 3.12A). Es konnte gezeigt werden, dass beim Zellklon B5 (gRNA8HE20160) mit 4,6 % (100 vs 95,4±5,2; p>0,99) (Friedman-Test) kein erhöhtes relatives Level von Ubiquitin vorlag. Einzelzellklon B5+363 zeigte im Vergleich mit dem Leer Vektor ebenfalls kein signifikant erhöhtes Ubiquitin mit 13,3 % (100 vs 86,7±7,34; p>0,99). Die Einzelzellklone B5 (gRNA8HE20160) und B5+363 (gRNA8HE20160 + gRNA8HE363) zeigten somit keine Veränderung der USP8 Aktivität auf Ubiquitin. Im Vergleich dazu zeigte USP8 überexprimiert, das heißt 1×10^6 Zellen, die mit p-ME-P720R transfiziert wurden, wiesen ein

erhöhtes Proteinlevel von Ubiquitin im Vergleich zum Leer-Vektor auf, bei jedoch nied-

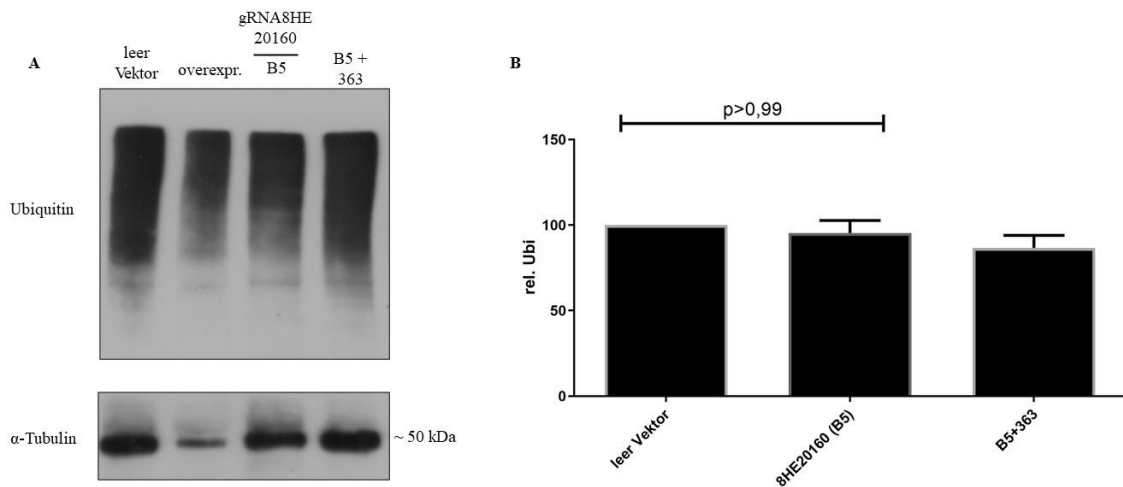


Abb. 3.12 Vergleich der relativen Ubiquitinierung der Zellklone B5 (gRNA8HE20160), B5+363 zum Leer Vektor.

(A) Immunoblots unter Verwendung von Antikörpern gegen Ubiquitin und α -Tubulin. Es ist keine sichtbare Veränderung der Deubiquitinase Wirkung von USP8 bei den Zellklonen B5(gRNA8HE20160) und B5+363 (Zellklon B5, welcher zusätzlich mit gRNA8HE363 transfiziert wurde) im Vergleich zum Leer Vektor erkennbar. (B) Quantitative Analyse der WB-Banden (n=2) im Vergleich des Zellklons mit dem Leer Vektor. Jeder Balken steht für den Mittelwert des Verhältnisses zw. Ubiquitin Signals zu α -Tubulin Signal mit dem jeweiligen Standardfehler. Statistische Analyse mittels ANOVA und Friedman Test.

rigem α -Tubulin (s. vgl. Abb. 3.12).

3.3.4. Nachweis von Cas9 in Mischklonen von USP8

Zum Nachweis, dass in der verwendeten Ursprungs-Zelllinie HEK293AD keine Cas9 Endonuklease schon vorhanden war, sondern diese erst mit der CRISPR/Cas9 Methode in diese Zelllinie eingebracht wurde, wurden Immunoblots durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass in nativen Zellen kein Cas9 vorhanden war, trotz vorhandener Ladekontrolle α -Tubulin. Im Vergleich dazu wiesen Zellklone, welche mittels der CRISPR/Cas9 Methode transfiziert wurden ein Signal für Cas9 auf. Dies konnte auch für weitere USP8 Zellklone dargelegt werden (s. Abb. 3.13).

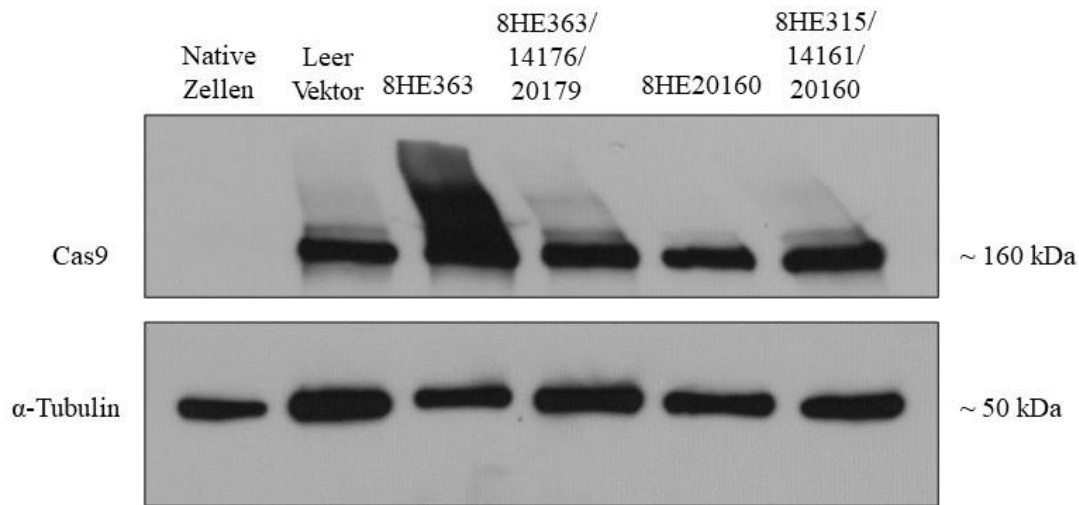


Abb. 3.13 Expression von Cas9

Immunoblot Analyse unter Verwendung von Antikörpern gegen Cas9 und α -Tubulin. Verwendung von Zelllysate aus nativen Zellen im Vergleich zu Zellen, die mittels der CRISPR/Cas9 Methode behandelt wurden, den Leer-Vektor und, die Mischklone mit der jeweiligen eingeführten gRNA.

3.3.5. Genomische Veränderungen bei der Erstellung von Einzelzellklonen

Die Erstellung von Einzelzellklonen beinhaltet eine hohe Kontaminationsgefahr. Zur Überprüfung, ob die Einzelzellklone weiterhin noch HEK293AD Zellen sind, wurde die genomische DNA des homozygoten B5 (gRNA8HE20160) Klons mittels STR-DNA Identifikation überprüft (ANSI/ATCC, 2011). Dabei wurden kurze, hoch polymorphe Tandemwiederholungen und Lokalisationen, "highly polymorphic short tandem repeats", typisiert. Das STR-Profil zeigte für D5S818: 8, 9; D13S317: 12, 14; D7S820: 11, 11; D16S539: 9, 13; vWA: 16, 19; TH01: 7, 9, 3; TPOX: 11, 11; CSF1PO: 12, 12; AMEL: X. Somit konnte gezeigt werden, dass der B5 Klon weiterhin eine HEK293AD Zelle ist und somit keine Kontaminierung stattgefunden hat.

3.4. Generierung von USP48 knock-out Zellklonen

Zur Überprüfung des erfolgreichen Knock-outs von USP48 wurden Immunoblots durchgeführt (siehe Abb. 3.14). Dabei wurde Zelllysate von HEK293AD Zellen verwendet, welche mittels CRISPR/Cas9 transfiziert worden waren. Die hierfür verwendeten gRNAs sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Der Einzelzellklon G5, welcher mit gRNA48HE2110 transfiziert wurde, zeigt eine ausgeprägte Reduzierung der relativen Proteinkonzentration

von USP48 im Vergleich zum Leer Vektor um 96,5 % (100 vs $3,5 \pm 1,6$; $p=0,08$) (Friedman-Test) (s. Abb. 3.14B). Weitere Einzelzellklone wie B3 (gRNA48HE240), C3 (gRNA48HE240) und E3 (gRNA48HE240) zeigten keine Erniedrigung der relativen Proteinkonzentration von USP48 im Vergleich zum Leer Vektor (100 vs $156,8 \pm 48,1$, $58,9 \pm 7,8$, bzw. $87,4 \pm 23,0$).

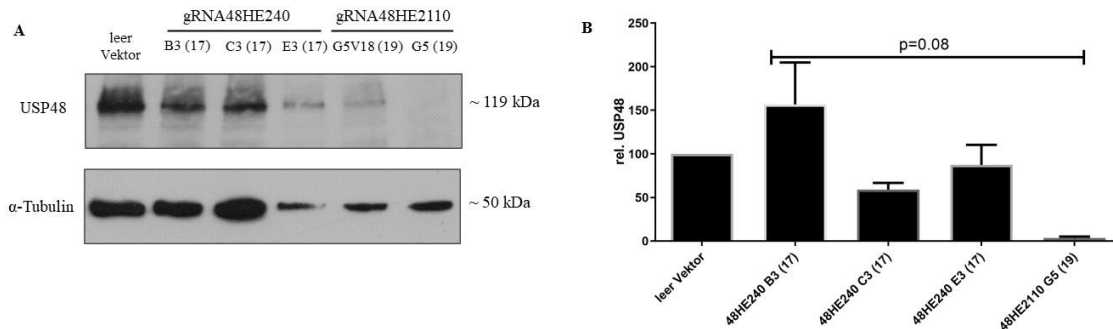


Abb. 3.14 Generierung von USP48 knock-out HEK293AD Zelllinien mittels CRISPR/Cas9.

(A) Immunoblot Analyse unter Verwendung von Antikörpern gegen USP48 und α -Tubulin. Sie zeigt bei dem Zellklon G5 (gRNA48HE2110) einen kompletten Knock-out des gewünschten Gens. (B) Quantitative Analyse der WB-Banden ($n=3$) von allen erhaltenen Zellklonen. Jeder Balken steht für den Mittelwert des Verhältnisses zw. USP48 Signals zum α -Tubulin Signal mit dem jeweiligen Standardfehler. Statistische Analyse mittels ANOVA und Friedman Test.

3.4.1. Sequenzierung der generierten Zellklone von USP48

In der DNA-Sequenzierung wiesen die Einzelzellklone B3, C3 und E3 (alle transfiziert mit gRNA48HE240) ein Wildtypgenom auf. Einzelzellklon G5 (gRNA48HE2110), welcher eine signifikante Reduktion des Proteinlevels aufwies, zeigte in der Sequenzierung einen Abbruch und eine Überlagerung (siehe Abb. 3.16), markiert mit "break". Diese Überlagerung ist vergleichbar mit einer Compound-Mutation, bei der zwei verschiedene Mutationen auf den jeweiligen Allelen vorhanden sind.

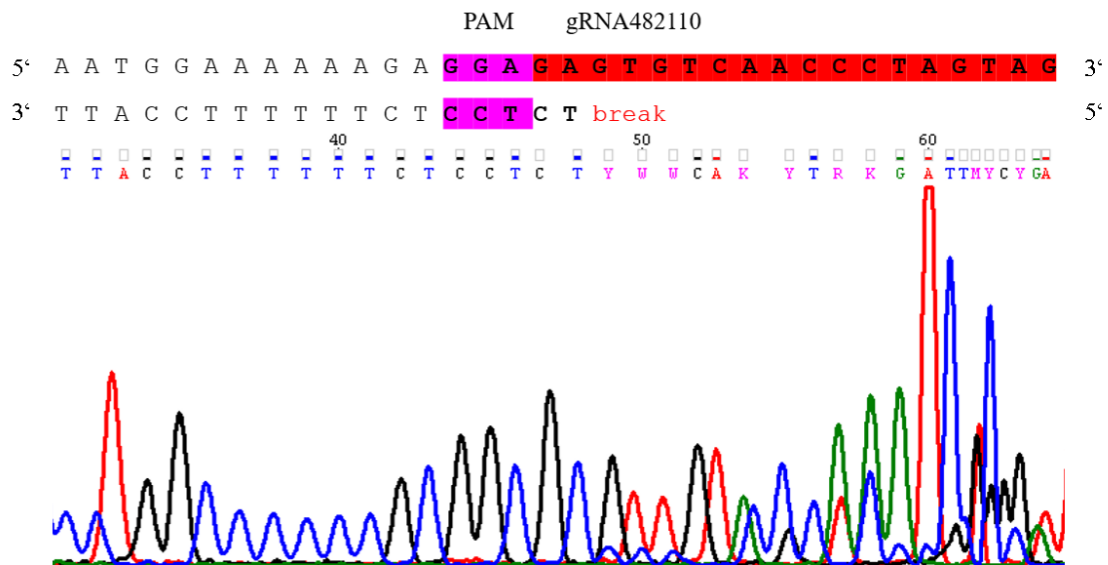


Abb. 3.16 Sequenzierung des Einzelklones USP48 Exon 2 G5 (gRNA48HE2110)
 Darstellung der Sequenzierung von Exon 2 USP48 Klones. Zwei Nukleotide nach der PAM Sequenz erfolgt der Doppelstrangbruch der Cas9 mit nachfolgender Mutation, hier indiziert mit "break". Die anschließende Sequenz ist, aufgrund der Compound Mutation überlagert. In Reverser Darstellung zur besseren Übersicht.

Zur besseren Analyse der Überlagerungen des Klons G5 (gRNA48HE2110) wurde die genomische DNA mittels "NEB PCR Cloning Kit" als Kolonie-PCR amplifiziert, mittels Agarosegelen analysiert und danach sequenziert.

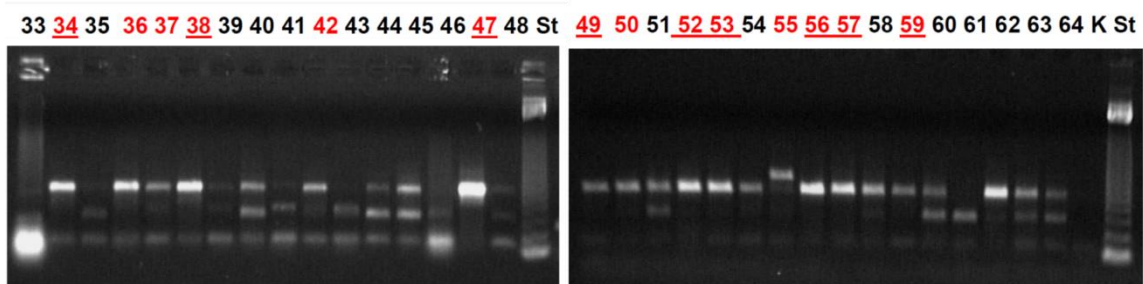


Abb. 3.15 Analysierung der Kolonie-PCR mittels Agarosegel
 Die rot markierten Kolonien wurden sequenziert. Die zusätzlich noch unterstrichenen Kolonien konnten auch ausgewertet werden.

Es wurden insgesamt 14 Kolonien sequenziert (siehe Abb. 3.15), fünf Kolonien konnten auf Grund von Überlagerungen nicht ausgewertet werden (Kolonien 36, 37, 42, 50 und 55). Sechs Kolonien von neun auswertbaren Kolonien wiesen eine Insertionsmutation c.889_890insT auf (Kolonien 38, 49, 52, 53, 57, und 59). In Abb. 3.17 wird das anhand der Sequenzierung der Kolonie 38 beispielhaft dargestellt, die Insertionsstelle ist mittels eines schwarzen Pfeils markiert. Die Insertion eines T führt direkt an dieser Stelle zu einem Stopp-Codon.

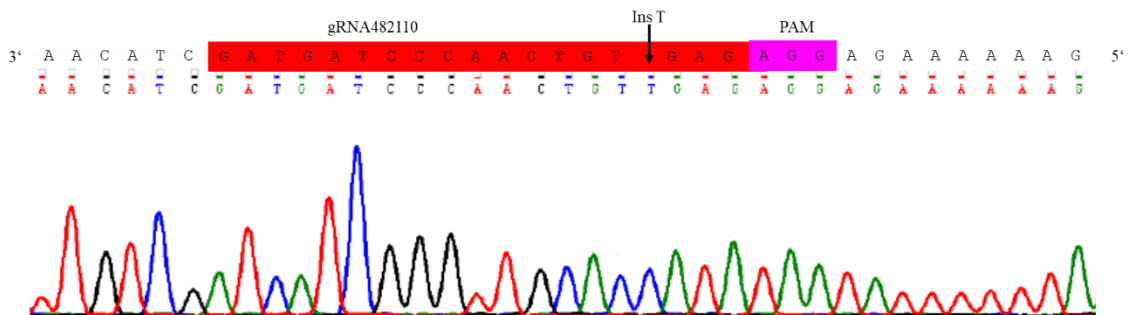


Abb. 3.17 Sequenzierung von Kolonie 38

Der schwarze Pfeil markiert die Insertionsstelle c.889_890insT. Rot markiert ist die Sequenz der gRNA482110 mit der zugehörigen PAM Sequenz.

Eine weitere Kolonie, Kolonie 34, zeigte eine Deletion von 3 Basenpaaren, c.887-889del-TGT, dies führte zum Verlust der Aminosäure Cystein an der Position 80 von USP48 (siehe Kasten Abb. 3.18). Zusätzlich wies dieser Klon eine Punktmutation, bei der Adenin (A) in Thymin (T) ausgetauscht wurde c.885A>T, auf (siehe schwarzer Pfeil Abb. 3.18).

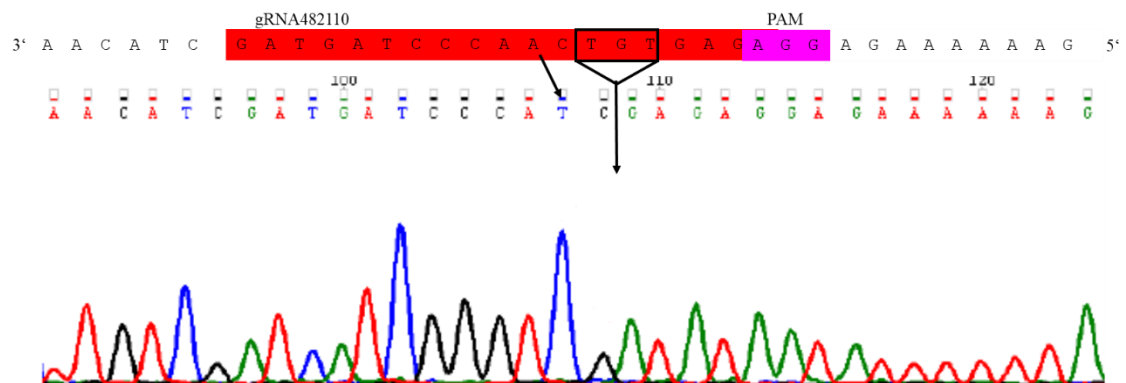


Abb. 3.18 Sequenzierung der Kolonie 34.

Es konnte eine Deletion von TGT nachgewiesen werden, siehe Kasten c.887-889del-TGT. Der schwarze Pfeil markiert die Punktmutation von Adenin zu Thymin c.885A>T. Rot hinterlegt ist die gRNA482110 mit der zugehörigen PAM Sequenz.

Die Kolonie 56 wies eine Deletion von neun Basenpaaren auf, was zu einem Verlust von 3 Aminosäuren führt (c.881-889del9). In gleicher Art wie auch Kolonie 34 weist Kolonie 56 die Deletion delTGT auf. Die Deletion der 9bp ist in Abb. 3.19 zusehen, indiziert mit einem schwarzen Pfeil.

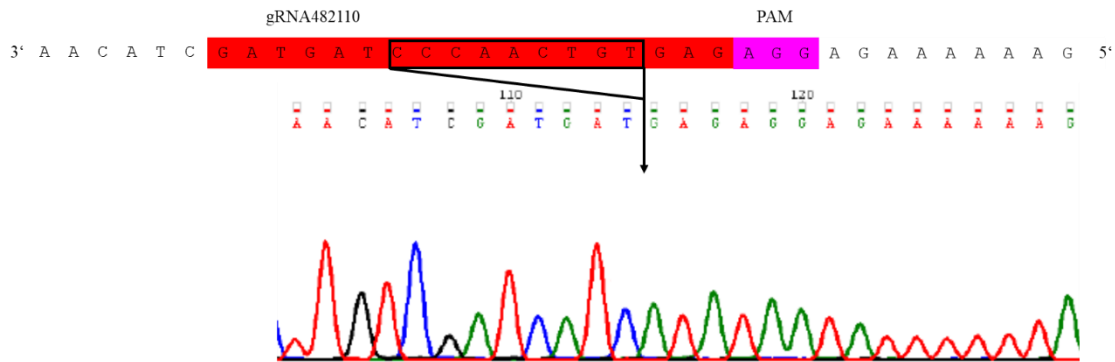


Abb. 3.19 Sequenzierung der Kolonie 56 mit der Deletion von 9 Basenpaaren (c.881-889del9)

Rot hinterlegt ist die gRNA482110, dabei ist mit einem Kasten und Pfeil die Deletion der 9bp markiert.

FORECasT, ist ein Online-Tool welches die Wahrscheinlichkeit angibt, welche Mutationen durch Cas9 an welcher Stelle hervorgerufen werden (Allen et al., 2018). Für die DNA-Sequenz von G5 (gRNA48HE2110) ergibt sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 50,8% eine Insertionsmutation von Thymin. Diese Insertionsmutation ist an der gleichen Stelle wie bei Kolonie 38 (s. Abb. 3.20).

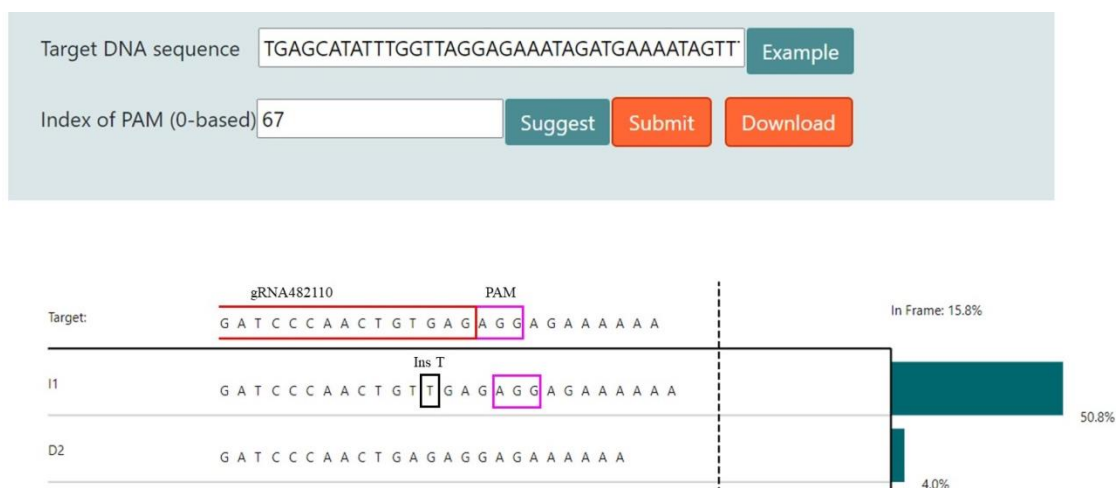


Abb. 3.20 Mittels FORECasT berechnete Wahrscheinlichkeit der Mutation von G5 (gRNA48HE2110)

Roter Kasten markiert die G5 (gRNA48HE2110) Sequenz. Rosa Kasten markiert die zugehörige PAM Sequenz. Insertion T mit schwarzen Kasten markiert.

3.4.2. Aktivität der USP48 Deubiquitinase

Im Zellklon G5 (gRNA48HE2110) konnte mittels Immunoblots mit $-49,38\%$ (100 vs $149,4 \pm 53,0$; $p > 0,99$) keine signifikante Erhöhung des relativen Levels von Ubiquitin im Vergleich zum Leer Vektor nachgewiesen werden. Weitere Einzelzellklone ohne erfolgreichen Knock-out mit USP48, wie die Zellklone B3 (gRNA48240), C3 (gRNA48240) und E3 (gRNA48240) zeigten teilweise eine stärkere Erhöhung des relativen Ubiquitin Levels im Vergleich zum Leer Vektor (100 vs $287,5 \pm 213,9$, 100 vs $153,0 \pm 82,9$, 100 vs $559,8 \pm 141,0$; $p > 0,99$) (s. Abb. 3.21). Es wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt bekannt, dass es sich bei G5 (gRNA48HE2110) um einen Mischklon handelt. Eine erneute Ver- einzelung und der Erhalt von Einzelzellklonen hätten die Zellen vermutlich nicht über- lebt. Somit wurde von einer Wiederholung abgesehen.

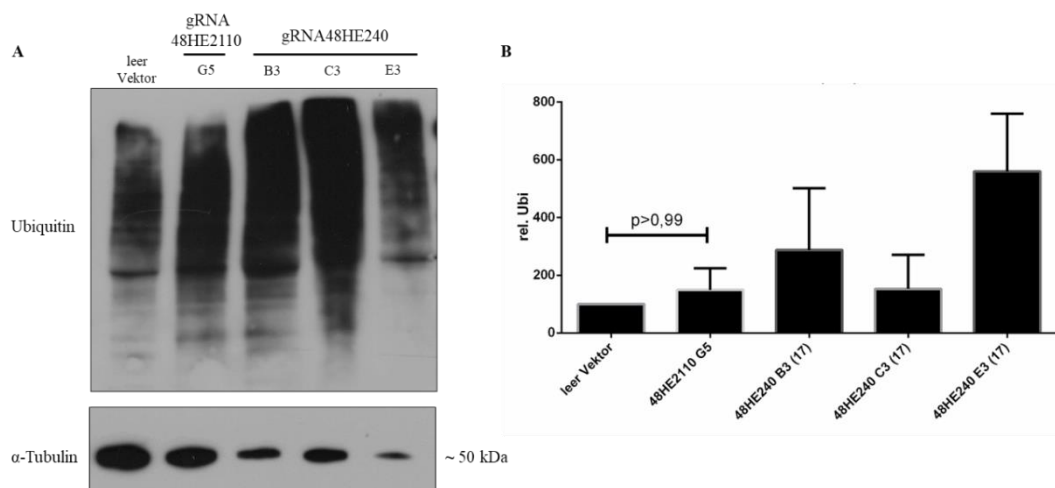


Abb. 3.21 Vergleich der relativen Ubiquitinierung der Zellklone G5 (gRNA48HE2110), B3, C3 und E3 (alle gRNA48HE240) zum Leer Vektor.

(A) Immunoblots unter Verwendung von Antikörpern gegen Ubiquitin und α -Tubulin. Es ist keine sichtbare Veränderung der Deubiquitinase Wirkung von USP48 bei den Zellklonen G5 (gRNA48HE2110), B3, C3 und E3 (gRNA48HE240) im Vergleich zum Leer Vektor erkennbar. (B) Quantitative Analyse der WB-Banden ($n=2$) im Vergleich des Zellklons mit dem Leer Vektor. Jeder Balken steht für den Mittelwert des Verhältnisses zw. Ubiquitin Signals und α -Tubulin Signal zusammen mit dem jeweiligen Standardfehler. Statistische Analyse mittels ANOVA und Friedman Test.

4. Diskussion

Morbus Cushing, verursacht durch das kortikotrope Hypophysenadenom, hat eine hohe Morbidität und eine hohe Mortalität. Folge des Morbus Cushing ist der Hyperkortisolismus, welcher potenziell letale Komplikationen hat. Medikamentöse Therapieansätze sind jedoch nur begrenzt vorhanden, dies liegt insbesondere an der noch weitgehenden unbekanntem Pathogenese. Im Zusammenhang mit M. Cushing kristallisieren sich in der Literatur zwei verschiedene Typen von Veränderungen des kortikotropen Hypophysenadenoms heraus. Zum einen konnten Hotspot-Mutationen im Deubiquitinase Gen *USP8* nachgewiesen werden (Ma et al., 2015; Perez-Rivas et al., 2015; Reincke et al., 2015). Zum anderen konnten auch genetische Hotspot-Mutationen in einer weiteren Deubiquitinase *USP48* gefunden werden. Weitere Mutationen, die als molekulare Zielstruktur für Therapieoptionen dienen könnten, sind deregulierte Proteine, wie HSP90 (heat shock protein 90), TR4 (orphan nuclear receptor 4), HDAC2 (Histon Deacetylase 2), sowie TP53 (Sbiera et al., 2015; Sbiera, Perez-Rivas, et al., 2019). Zum weiteren Verständnis der Mutationen von *USP8* und *USP48* sollte hierfür mit der vorliegenden Arbeit die Vorarbeit geleistet werden, um später ein Zelllinienmodell mittels der CRISPR/Cas9 Methode erstellen zu können.

4.1. Auswahl der gRNA

Mittels der CRISPR/Cas9 Methode ist es möglich, gezielt Veränderungen, wie z.B. einen Knock-out, innerhalb eines Genoms durchzuführen. Eine erfolgreiche Anwendung dieser Methode erfordert jedoch zuerst einmal die Auswahl der richtigen Ziellokalisierung innerhalb der Gens von *USP8* und *USP48* und darauffolgend die korrekte Auswahl und das richtige Design der gRNA.

Zur Durchführung des Knock-outs von *USP8* und *USP48* wurden verschiedene Ziellokalisierungen innerhalb des Open-Reading-Frames der jeweiligen Gene ausgewählt. Sowohl für das Gen *USP8* als auch *USP48* wurde das erste Exon ausgewählt, welches von allen mRNA Isoformen geteilt wird, um so eine Frameshift-Mutation zu generieren (Wiles, Qin, Cheng, & Wang, 2015).

Von Reincke et al. gefundene Hotspot Mutationen in kortikotropen Hypophysenadenomas sind im Exon 14 von *USP8* lokalisiert, welches zum Teil das 14-3-3 Bindemotiv (RXSXSXP) codiert (Reincke et al., 2015). Zentral innerhalb dieses 14-3-3 Bindemotivs ist die Aminosäure Serin (718S), welche auch als am häufigsten durch Mutationen betroffen nachgewiesen wurde (Sbiera, Kunz, et al., 2019). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden zwei gRNAs ausgewählt, die kurz vor und innerhalb der häufigsten Mutationsstelle lokalisiert waren (Abb. 4.1).

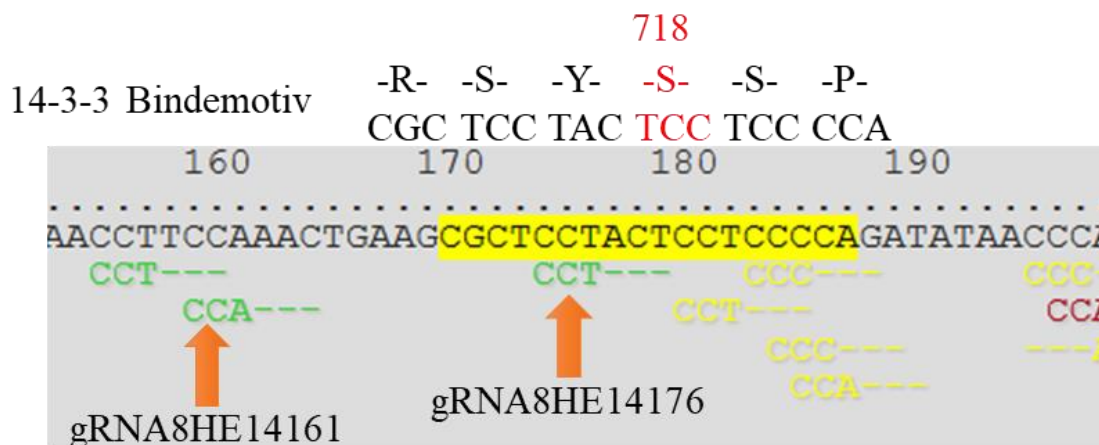


Abb. 4.1 Schematische Darstellung des Hotspot-Mutationsareals von USP8 in Exon 14

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz, rot markiert ist Serin an Stelle 718 welche im Bindungsmotiv 14-3-3 in kortikotropen Hypophysenadenomen mit am häufigsten als mutiert beschrieben wurde. Gelb markiert ist die dazugehörige Sequenz in CRISPR mit den von uns ausgewählten gRNAs und ihrer Lokalisation im Vergleich zu dem Hotspot- Mutationsareal.

Da Sbiera et al. (Sbiera, Perez-Rivas, et al., 2019) in Exomsequenzierungen eine Hotspot-Mutation in *USP48* (415Met) im Exon 10 darlegen, wurden ebenfalls für dieses Exon zwei gRNAs ausgewählt, welche kurz vor und innerhalb des mutierten Areals lokalisiert sind (vgl. Abb. 4.2)

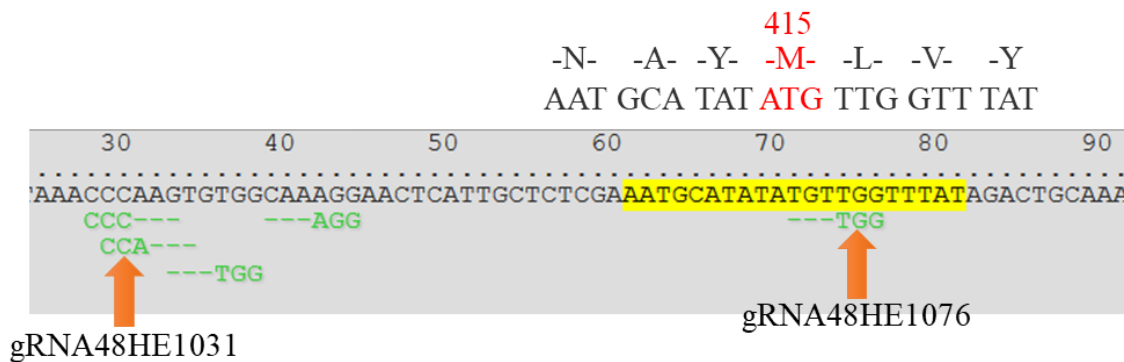


Abb. 4.2 Schematische Darstellung des Hotspot-Mutationsareal von USP48 in Exon 10

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz, rot markiert ist Methionin an Stelle 415, welche in kortikotropen Hypophysenadenomen als mutiert beschrieben wurde. Gelb markiert ist die dazugehörige Sequenz in CRISPOR mit den von uns ausgewählten gRNAs und ihrer Lokalisation im Vergleich zu dem Hotspot-Mutationsareal.

Des Weiteren wurden auch gRNAs aus dem 3' Ende des Open-Reading-Frames für *USP8* und *USP48* ausgewählt. Die Überlegung war, in der Zukunft, falls alle anderen Anstrengungen scheitern, diese gRNAs zusammen mit den gRNAs, die für den Anfang bzw. Mitte des ORF spezifisch sind, zu verwenden, um das komplette *USP8* oder *USP48* Gen auszuschneiden und das jeweilige Gen mittels einer cDNA, welche die oben aufgeführten Mutationen enthält, zu ersetzen. Hiervon haben wir am Ende Abstand genommen, da eine cDNA keine Introns gehabt hätte und dies wiederum nicht physiologisch gewesen wäre. Zusätzlich wird ein Knock-in mittels HDR dann als am effektivsten beschrieben, wenn die einzufügende Sequenz möglichst kurz und nah am Doppelstrangbruch lokalisiert ist und das Repair Template zusätzlich eine möglichst lange homologe Sequenz zu der ursprünglichen Sequenz hat (Aird, Lovendahl, St Martin, Harris, & Gordon, 2018; J. P. Zhang et al., 2017). Dies wäre bei einem kompletten neuen Einfügen des jeweiligen Gens nicht möglich gewesen.

Neben der Position in der Zielsequenz wurden die gRNAs, wie in 3.1 beschrieben, in erster Linie aufgrund ihrer Bindungswahrscheinlichkeit und somit dem erwarteten Erfolg für einen Knock-out ausgewählt. Um diese Erwartung zu sichern, wurden - wenn möglich - je zwei gRNAs pro Exon ausgewählt.

Mittels Sequenzierung der erhaltenen Zellklone (siehe 3.3.1, 3.4.1) konnte gezeigt werden, dass die ausgewählten gRNAs an der korrekt vorhergesagten Stelle gebunden haben und die Cas9 den Doppelstrangbruch auch dort durchgeführt hat. Die Cas9 sollte ca. 3-5 Nukleotide nach der PAM-Sequenz einen Doppelstrangbruch durchführen. Für alle Zellklone, die eine Mutation hatten, war dies der Fall und es konnte die Mutation genau 3-5 Nukleotide nach der PAM-Sequenz nachgewiesen werden. Somit haben alle gRNAs, die eine Mutation herbeigeführt haben, an der gewünschten Zielsequenz gebunden.

4.2. Folgen des Knock-Outs einer Deubiquitinase

Ubiquitinierung bedeutet die post-translationale Markierung von Proteinen mit mehreren Ubiquitinproteinen. Die bekannteste Aufgabe von Ubiquitinketten ist die Markierung von Proteinen zum Abbau in Lysosomen. Die post-translationale Regulierung von Proteinen mittels Ubiquitin wird in fast allen Zellen angewendet. Eine Gegenregulation von Ubiquitin ist mittels Deubiquitinasen (DUBs) möglich (Dufner & Knobeloch, 2019). Wird ein Knock-out von Deubiquitinasen wie *USP8* und *USP48* durchgeführt, führt dies zu einem unphysiologischen Anstieg von Ubiquitinierungen. Dies wiederum interferiert mit jeglichen Signalwegen, da Proteine vermehrt abgebaut und nicht mehr durch die Deubiquitinasen recycelt oder stabilisiert werden. In kortikotropen Hypophysenadenomen, wurden bisher allerdings nur aktivierende Mutationen, d.h. solche mit einer verstärkten Aktivität der Deubiquitinasen, nachgewiesen.

In dieser Arbeit sollte zuerst ein Knock-out von *USP8* und *USP48* durchgeführt werden, obwohl bekannt war, dass dies zu einem unphysiologischem Anstieg von Ubiquitin führt und damit einer essenziellen Störung von verschiedenen Signalwegen ergeben würde. Der Knock-out sollte als Zwischenziel dienen, um dann die aktivierende Mutation zu etablieren. Bei einer erhöhten Sterblichkeit der mittels CRISPR/Cas9 transfizierten Zellen stellen wir die Hypothese auf, dass *USP8* und auch *USP48* essenziell für die Lebensfähigkeit von Zellen sind und *USP8* oder *USP48* Knock-out Zellen nur begrenzt lebensfähig sind. Ähnlich wurde auch nachgewiesen, dass *USP8* Knock-out Mäuse nicht lebensfähig sind (Niendorf et al., 2007).

4.3. Herstellung von Einzelzellklonen

Die Anwendung der CRISPR/Cas9 Methode resultiert erst einmal in einer heterogenen polyklonalen Population, in welcher die gewünschten Veränderungen innerhalb der verschiedenen Zellen variieren. Um eine Zelllinie mit einem homologen genetischen Hintergrund mit dem gewünschten Genotyp und dem entsprechenden Downstream-Phänotyp zu generieren, mussten Einzelzellklone aus dieser polyklonalen Zellpopulation gewonnen werden.

Hierzu wurde eine Kombination aus der low density seeding Methode und dem manuellen Zellpicken verwendet, d.h. manuell wurden einzelne Zellklone durch starke Verdünnung separiert, siehe 2.2.4.6. Vorteile dieser Methode sind, dass zum einen die Lebensfähigkeit der verwendeten Zellen kaum beeinträchtigt wird und zum anderen nur einfache, kostengünstige Geräte verwendet werden. Nachteil dieser Methode ist, dass sie auf einer statistischen Wahrscheinlichkeit beruht und ein hoher Aufwand betrieben werden muss, um mikroskopisch die einzelnen Zellen auszuwählen (Gross et al., 2015; Hu, Zhang, Xin, & Deng, 2016).

Neben den technischen Schwierigkeiten bei der Gewinnung von monoklonalen Zellklonen wurde auch eine hohe Sterberate der Zellklone beobachtet. Dies beruht offenbar darauf, dass die verwendeten Zellen den Zell-Zell-Kontakt benötigen, um optimal wachsen zu können. Um die Sterberate dennoch niedrig zu halten, wurde konditioniertes Medium in der Hoffnung verwendet, dass die darin enthaltenen Wachstumsfaktoren die Lebensfähigkeit und die Wachstumsgeschwindigkeit verbessern. Hierdurch konnten letztendlich eine Reihe monoklonaler Zelllinien gewonnen werden.

Die erheblichen technischen Herausforderungen bei der Gewinnung von monoklonalen Zellkolonien und die Verwendung der low-density seeding Methode führte auch dazu, dass teilweise nur eine recht niedrige Fallzahl ($n=2$) möglich war. Es wurden zwar eine Reihe monoklonaler Zellkolonien gewonnen, doch in der mehrwöchigen Wartezeit bis zu einer Überprüfung, ob diese die gewünschten mittels CRISPR/Cas9 bewirkten Veränderungen beinhalteten, verstarben diese bis auf wenige Ausnahmen.

4.4. Knock-out des *USP8* Gens durch CRISPR/Cas9

Um ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Rolle von *USP8* zu erhalten, war das Ziel eine Zelllinie mit einem Knock-out von *USP8* herzustellen. Hierzu wurden HEK293AD Zellen mit je zwei gRNAs designt für Exon 3, 14 und 20 des *USP8* Gens transfiziert. Obwohl eine heterogene, polyklonale Mischkolonie von gRNA8HE363 nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 3.13), war es nicht möglich, diesen Klon als monoklonale Zelllinie zu erhalten. Es konnten auch keine Zellklone mit Knock-out von Exon 14 hergestellt werden. Ursächlich hierfür dürfte einerseits sein, dass die gRNA8HE363, [...]315, [...]14176 und [...]14161 nicht ausreichend an die genomische DNA der Zellen binden konnten und somit es der Cas9 nicht möglich war, einen Doppelstrangbruch in Exon 3 und Exon 14 durchzuführen. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass die low-density-seeding Methode zu einem erhöhten Stress auf die Zellen geführt hat, wodurch die erhaltenen Zellklone kurze Zeit nach der Vereinzelung verstorben sind. Ein Knock-out von Exon 3 und 14 kann zu einem Verlust von *USP8* geführt haben, *USP8* ist jedoch für die Zellen lebensnotwendig, ein Verlust führt dann zu einem Tod dieser Knock-out Zellen. Insbesondere mit dem zusätzlichen Stress auf die Zellen durch die Vereinzelung. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass *USP8*-Knock-out Mäuse im Embryonalstadium versterben und nicht lebensfähig sind (Niendorf et al., 2007).

Eine homologe Mutation von Exon 20 konnte, siehe 3.3.1, mit dem Zellklon B5 (gRNA8HE20160) nachgewiesen werden. Sie führte jedoch zu keiner signifikanten Reduzierung der Proteinkonzentration von *USP8* (siehe Abb. 3.8). Somit hat diese homologe Insertionsmutation auf die Funktion von *USP8* keine Auswirkungen, obwohl die Mutation zu einem verfrühten Stopp-Codon führen sollte.

Sowohl beim homologen, mutierten Zellklon B5 (gRNA8HE20160) wie auch in den heterozygot mutierten Zellklonen wie A5, C5 (gRNA8HE20160) wurde nachgewiesen, dass eine Insertionsmutation stattgefunden hat. Die Insertion eines Guanins erfolgte 4 nt nach der PAM Sequenz (siehe 3.3.1). Dies bedeutet, dass die Cas9 an der vorhergesagten Stelle einen Doppelstrangbruch herbeigeführt hat und die gRNAs somit korrekt designt und gebunden haben.

Um doch noch einen kompletten Knock-out von USP8 zu erhalten, wurde der Zellklon B5 (gRNA8HE20160) mit der homologen Mutation in Exon 20 erneut mittels der CRISPR/Cas9 Methode verändert. Hierbei wurden zusätzlich gRNAs für Exon 3 (gRNA8HE363 und gRNA8HE316) und Exon 14 (gRNA14HE175 und gRNA14HE161) verwendet. Es wurde ein verlangsamtes Wachstum und eine erhöhte Sterberate beobachtet. Ein Einzelzellklon (B5 (gRNA8HE20160) + gRNA8HE363) wurde hergestellt. Dabei wies der Zellklon B5+363 eine Wildtyp Sequenz auf, d.h. er hatte keine Mutation in Exon 3 und einen Verlust der Insertionsmutation in Exon 20. Dies beruht darauf, dass der Zellklon B5 (gRNA8HE20160) möglicherweise kein Einzelzellklon war und durch ein erneutes Durchführen der low density seeding Methode ein Klon ohne die CRISPR/Cas9 Modifikation gewonnen wurde. Des Weiteren kann auch hier sein, dass ein Knock-out von Exon 3 und 14 zu einem Zellsterben geführt hat.

Nach dem Erhalt des Zellklons B5 (gRNA8HE20160) mit der Mutation in Exon 20 wurde überprüft, ob dies eine Auswirkung auf die Deubiquitinase USP8 hat. Es konnte keine Veränderung der Aktivität von USP8 auf die gesamte zelluläre Ubiquitinlevels festgestellt werden. B5 (gRNA8HE20160) zeigte annähernd eine ähnliche Proteinexpression wie der Leer Vektor (vgl. Abb. 3.12). Ein erfolgreicher Knock-out hätte zu einem erhöhten relativen Ubiquitinlevel geführt.

Zum Vergleich wurde USP8 mit einer aktivierenden Mutation an der 14-3-3-Stelle P720R, aufgetragen. Das USP8 stammt aus Zellen, die mittels pME-P720R Plasmid transfiziert wurden. Da mutierte USP8 vermehrt aktiv ist und somit verstärkt deubiquitieren müsste, sollte in Abb. 3.12 ein geringeres Ubiquitinlevel zu sehen sein (Reincke et al., 2015). Man kann sehen, dass bei USP8 überexprimiert ein geringeres Ubiquitinlevel vorhanden ist. Eine quantitative Auswertung führt jedoch zu einer Verzerrung, da das Houskeeping Gen (α -Tubulin) für USP8, welches vermehrt exprimiert wird, hier ein schwächeres Signal aufweist als für die restlichen Proben (vgl. Abb. 3.12A). Ursächlich für ein schwächeres Signal von α -Tubulin könnte sein, dass bei einer verstärkten Expression USP8, die restlichen Proteine wie α -Tubulin nur noch in einem geringeren Ausmaß vorhanden sind.

Bei der CRISPR/Cas9 Methode ist der Erhalt einer Einzelkolonie besonders zeitaufwendig, da aus einer einzigen Zelle eine Kolonie entstehen muss, die sich zu vermehren hat, um neben DNA auch Proteine extrahieren zu können. Sowohl für die Isolierung von DNA als auch für die Isolierung von Proteinen werden mindestens eine Million Zellen benötigt. Um auszuschließen, dass innerhalb dieses zeitaufwendigen Prozesses eine Kontamination stattgefunden hat, wurde der Zellklon B5 (gRNA8HE20160) auf tiefgründige genomische Veränderungen überprüft. Es konnte nachgewiesen werden, dass keine Kontamination stattgefunden hat und B5 (gRNA8HE20160) weiterhin eine HEK293AD Zelle ist.

Um auch gewährleisten zu können, dass die Endonuklease Cas9 mittels der Transfektion in die HEK293AD Zellen hinzugefügt wurde, wurden Western-Blot Analysen durchgeführt (siehe Abb. 3.13). Dabei wurde zuerst Zelllysat der polyklonalen Zellpopulation verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass Cas9 mittels der Transfektion in die HEK293AD Zellen hinzugefügt wurde, und dies in den unterschiedlichen Zellpopulationen in gleichem Maße erfolgt ist.

4.5. Knock-out des *USP48* Gens mittels CRISPR/Cas9

Exomsequenzierungen von kortikotropen Hypophysenadenoma rückten das mutierte *USP48* in den Fokus. Da die pathophysiologische Rolle von *USP48* noch weitgehend unbekannt ist, war das Ziel, eine Zelllinie mit einem Knock-out von *USP48* zu erschaffen. Hierzu wurden HEK293AD Zellen mit je 2 gRNAs für Exon 2 (gRNA48HE2110, gRNA48HE240), 10 (gRNA48HE1076, gRNA48HE1031) und 1 gRNA für Exon 27 (gRNA48HE2760) transfiziert. Die Deubiquitinase, *USP48*, konnte mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Methode in einem Einzelklon G5 (gRNA48HE2110) ausgeknockt werden. Der Doppelstrangbruch und somit auch die Mutation fanden in Exon 2 statt. G5 zeigte eine Reduzierung des Proteinlevels von *USP48* im Vergleich zum Leer Vektor um 96,5% (vgl. Abb. 3.14). Es konnten weitere Einzelklone B3, C3 und E3 (gRNA48HE240) gewonnen werden. Diese Einzelklone zeigten jedoch im Vergleich zum Leer Vektor keine Reduzierung des relativen Proteinlevels von *USP48*. Dies beweist, dass bei diesen Klonen kein Verlust von *USP48* stattgefunden hat. Bestätigt wurde dies in der Sequenzierung, die keine Mutation in Exon 2 zeigt.

Die Sequenzierung des Klons G5 (gRNA48HE2110) zeigte eine Überlagerung 2 Nukleotide hinter der PAM Sequenz. Eine Compound Mutation, d.h. zwei verschiedene Mutationen auf den jeweiligen Allelen, hätte für die Überlagerung verantwortlich sein können. Weitere Analysen zeigten jedoch drei verschiedene Mutationen: eine Insertion eines Thymins, eine Deletion von 3 Basen mit dem Austausch von Adenin mit Thymin und einer Deletion von 9 Basen (siehe 3.4.1). Es ist bereits bekannt, dass mittels der CRISPR/Cas9 Methode bevorzugt Einzelbasen-Insertionen erzielt werden, insbesondere Thymin (Allen et al., 2018). An sechs von neun Kolonien konnte die Insertion von Thymin experimentell nachgewiesen werden. Bei einer Verwendung von FORECasT, ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 50,8% für eine Insertion von Thymin. Die Vorhersage ermittelt die InsT Mutation exakt an der Stelle, an der sie auch in Kolonie 38 nachgewiesen wurde (siehe Abb. 3.17).

Da es jedoch sehr unwahrscheinlich ist, 3 verschiedene Mutationen an der gleichen Stelle zu erhalten, ist es wahrscheinlicher, dass G5 kein monoklonaler Zellklon ist, sondern ein polyklonaler Zellklon und die Vereinzlung somit nicht erfolgreich war. Ein Verlust von USP48 hat aber trotzdem stattgefunden.

Zur Überprüfung der Aktivität der Deubiquitinase USP48 beim Zellklon G5 (gRNA48HE2110) wurde der Proteinlevel von Ubiquitin mit dem Leer Vektor verglichen. Bei einem vollständigen Knock-out von USP48 hätte man ein höheres Proteinlevel von Ubiquitin erwartet, dies war jedoch nicht der Fall. Die Zellklone B3 und E3 (gRNA48HE240), mit dem Wildtypgenom, zeigten ein höheres relatives Ubiquitinlevel. Ursächlich dafür ist das im Verhältnis schwächere Signal von α -Tubulin und somit eine der Auswertung geschuldete Verzerrung (siehe Abb. 3.21). Obwohl USP48 im Zellklon G5 (gRNA48HE2110) nicht nachweisbar war, war trotzdem die Viabilität des Zellklons nicht eingeschränkt.

4.6. Schwächen und Stärken der Arbeit

Eine Hauptlimitierung der Arbeit ist, dass in einigen Versuchen die Fallzahl der Replikate nur bei zwei liegt. Die wesentliche Ursache hierfür ist die, gegenüber den Erwartungen, deutlich aufwendigere und zeitintensivere Etablierung und Anwendung der

CRISPR/Cas9 Methode. Dies galt v.a. auch für die Überprüfung des Erfolgs der jeweiligen Transfektionen, die mehrere Wochen in Anspruch nahmen, da zuerst die Zellen vereinzelt und anschließend aus einer Zelle genügend weitere Zellen gezüchtet werden mussten. Erst danach war eine Überprüfung mittels Western Blot und ein genetischer Nachweis möglich. Dennoch ist bei den meisten Experimenten davon auszugehen, dass eine höhere Fallzahl das Ergebnis inhaltlich nicht wesentlich verändert hätte.

Zu den längerfristigen Erfolgen der Arbeit gehört, dass neben dem korrekten Design der gRNA für das humane USP8 und USP48 auch gRNAs für USP8 und USP48 der Maus erfolgreich hergestellt werden konnten. Die entsprechenden Expressionsplasmide wurden zur Verwendung in einer weiterführenden Arbeit bereitgestellt. Zusätzlich stehen die monoklonalen, genetisch durch die CRISPR/Cas9 Methode veränderten Zellkolonien zur weiteren Verwendung bei entsprechenden Fragestellungen in dieser Arbeitsgruppe zur Verfügung. Für USP8 konnte eine monoklonale Zellkolonie mit einer Punktmutation in Exon 20 und für USP48 ebenfalls eine solche mit einer Mutation in Exon 2 mit daraus folgender eingeschränkter USP48 Funktion erstellt werden.

Das ursprüngliche Ziel einen Knock-out von USP8 zu erreichen, hat sich im Verlauf der Arbeiten als nicht möglich dargestellt, da die Zellen ohne USP8 offenbar nicht lebensfähig sind. Parallel konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibierung von USP8 in At-T20 Zellen die Zellproliferation verhindert und die Apoptose induziert (Kageyama, Asari, Sugimoto, Niioka, & Daimon, 2020). Zusätzlich zum Stress der Vereinzelnung ist die Gewinnung einer Zellkolonie mit USP8 knock-out offenbar kaum möglich. Gemeinsam mit der Erkenntnis, dass USP8 Knock-out Mäuse nicht lebensfähig sind (Niendorf et al., 2007), legt das die Vermutung nahe, dass ein knock-out von USP8 auch in humanen HEK293AD Zellen letal ist, dies bleibt in späteren Untersuchungen zu verifizieren.

4.7. Fazit und Ausblick

Aufbauend auf diesen Ergebnissen, der erfolgreichen Etablierung der CRISPR/Cas9 Methode, dem Wissen, welche gRNAs erfolgreich sind und mit der Schaffung der Knock-out Mutante für USP48 G5 (gRNA48HE2110), kann weiterführend gearbeitet werden. In der Zukunft kann die hier etablierte Methode auf die ACTH-produzierende hypophysäre

Maus-Zelllinie At-T20 erweitert werden und es können sicherlich mittels eines Knock-in die jeweiligen Hotspot Mutationen in verschiedenen Zelllinien etabliert werden. Aus diesen Zelllinien können dann vielleicht sogar 3D-Modelle, Sphäroiden, generiert werden, an denen die physiologischen Umstände sogar noch besser untersucht werden können.

Der Knock-out von *USP48* war möglicherweise deswegen erfolgreicher, weil er in den HEK293AD Zellen zu einer verbesserten DNA-Stabilität geführt hat und somit die Zellen gegenüber genetischem Stress resistenter waren. Ganz ähnlich hierzu wurde auch in Fanconi-Anämie-Zellen bei einem durchgeführter Knock-out von *USP48* mittels CRISPR/Cas9 eine Verbesserung der DNA-Reparatur und eine Verbesserung der DNA-Stabilität beobachtet (Velimezi et al., 2018). Dagegen führt ein Verlust von *USP8* zu einer Verringerung der Lebensfähigkeit. Dies bedeutet, dass statt erneut einen Knock-out von *USP8* zu versuchen ausschließlich ein Knock-in der Hotspot Mutation versucht werden sollte, da dies nicht zu einem Verlust von *USP8* führen wird.

Die CRISPR/Cas9 Methode zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit als eine zuverlässige und effiziente Methode um ein Genomediting durchzuführen, einige Aspekte müssen aber wohl überlegt werden. So ist die Wahl der Zielsequenz und Ziellokalisierung, das Design der gRNAs, und die Wahl der Applikationsmethode von entscheidender Bedeutung für ein effektives Vorgehen. Bei zukünftigen Arbeiten sollte eine lentivirale Transduktion von CRISPR/Cas9 Konstrukten gewählt werden, da diese als effizientere Applikationstechnik gilt (Liu, Zhang, Liu, & Cheng, 2017) um so erfolgreich Knock-in Zelllinien von *USP8* und *USP48* herzustellen. Hierfür wäre die Nutzung eines S2 zertifizierten Labors erforderlich.

Die noch bestehenden Unsicherheiten bezüglich der molekularen Pathogenese von Morbus Cushing erfordern noch weitere Untersuchungen insbesondere zur Frage, welche Rollen *USP8* und *USP48* haben. Hierfür ist es wichtig, das dargestellte Zelllinienmodell weiter zu verfeinern.

5. Zusammenfassung

Morbus Cushing ist die häufigste Ursache für endogenes Cushing-Syndrom und führt auf Grund des Glucocorticoid Überschusses zu einer hohen Morbidität und Mortalität. Die Therapie des kortikotropen Hypophysenadenoms beinhaltet die transspheoidale Resektion des Tumors, ggf. auch Radio- oder medikamentöse Therapie, mit erheblichen Nebenwirkungen. Eine verbesserte medikamentöse Therapie hat zur Voraussetzung, dass man die Pathophysiologie des Morbus Cushing besser versteht. In den letzten Jahren wurden hier mittels Exomsequenzierung mehrere Mutationen identifiziert, von denen besonders die aktivierenden Mutationen von *USP8* und *USP48* von besonderem Interesse ist. Diese beiden Deubiquitinasen sind maßgeblich in der Steuerung der ACTH-Synthese und wohl auch an einer Tumorgenese beteiligt. Zur weiteren Erforschung werden jedoch Zellmodelle benötigt, die idealerweise diese Mutation enthalten.

Mittels CRISPR/Cas9, einer Genomediting-Methode, wurde es möglich, gezielt Mutationen in einem beliebigen Zielgenom zu etablieren. Dafür wurden in dieser Arbeit gRNAs für *USP8* und *USP48* designt, welche anschließend in die humane embryonale Zelllinie HEK293AD Zellen transfiziert wurden. Diese Zellen wurden wiederum vereinzelt, um monoklonale Zellen zu erhalten, mit dem Ziel in diesen monoklonalen Zellen einen Knock-out von *USP8* bzw. *USP48* zu generieren.

In dieser Dissertation konnte ein erfolgreicher Knock-out von *USP48* nachgewiesen werden. Hierzu konnte im Einzelzellklon G5 (gRNA48HE2110) an der erwarteten Stelle im Exon 2 eine Mutation generiert werden, welche zu einer Reduzierung des Proteinlevels von *USP48* geführt hat. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass ein Genomediting von *USP8* zwar möglich ist, solange die Funktion von *USP8* nicht beeinträchtigt wird. Ein monoklonaler Zellklon war nur mittels B5 (gRNA8HE20160) möglich. Er enthielt aber eine Mutation in Exon 20, welche die Funktion von *USP8* erhält. Ein Knock-out von *USP8* erwies sich als unmöglich, wobei hier zu vermuten ist, dass *USP8* für HEK293AD Zellen lebenswichtig ist.

Somit konnte die CRISPR/Cas9 Methode für die Etablierung eines M. Cushing-Zellmodel (zumindest teilweise erfolgreich) etabliert werden. Diese Untersuchungen stellen nun eine gute Ausgangsbasis für weitere Experimente (z.B. ein gezielter Knock-in bestimmter für M. Cushing besonders relevanter *USP8*- und *USP48*- Mutationen) dar.

6. Literaturverzeichnis

- Aird, E. J., Lovendahl, K. N., St Martin, A., Harris, R. S., & Gordon, W. R. (2018). Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template. *Commun Biol*, *1*, 54. doi:10.1038/s42003-018-0054-2
- Allen, F., Crepaldi, L., Alsinet, C., Strong, A. J., Kleshchevnikov, V., De Angeli, P., . . . Parts, L. (2018). Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nature Biotechnology*, *37*, 64. doi:10.1038/nbt.4317
<https://www.nature.com/articles/nbt.4317#supplementary-information>
- ANSI/ATCC. (2011). Authentication of human cell lines: standardization of STR profiling. ANSI/ATCC ASN-0002-2011. Retrieved from <https://webstore.ansi.org/Standards/ATCC/ANSIATCCASN00022011>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., . . . Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, *315*(5819), 1709-1712. doi:10.1126/science.1138140
- Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J. K., & Carroll, D. (2003). Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, *300*(5620), 764. doi:10.1126/science.1079512
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G., & Carroll, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, *161*(3), 1169-1175.
- Biller, B. M., Grossman, A. B., Stewart, P. M., Melmed, S., Bertagna, X., Bertherat, J., . . . Boscaro, M. (2008). Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab*, *93*(7), 2454-2462. doi:10.1210/jc.2007-2734
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., . . . Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, *326*(5959), 1509-1512. doi:10.1126/science.1178811
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, *151*(Pt 8), 2551-2561. doi:10.1099/mic.0.28048-0
- Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., . . . van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, *321*(5891), 960-964. doi:10.1126/science.1159689
- Capecchi, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science*, *244*(4910), 1288-1292.
- Centorrino, F., Ballone, A., Wolter, M., & Ottmann, C. (2018). Biophysical and structural insight into the USP8/14-3-3 interaction. *FEBS Lett*, *592*(7), 1211-1220. doi:10.1002/1873-3468.13017
- Chandler, W. F., Barkan, A. L., Hollon, T., Sakharova, A., Sack, J., Brahma, B., & Schteingart, D. E. (2016). Outcome of Transsphenoidal Surgery for Cushing Disease: A Single-Center Experience Over 32 Years. *Neurosurgery*, *78*(2), 216-223. doi:10.1227/neu.0000000000001011
- Chen, J., Jian, X., Deng, S., Ma, Z., Shou, X., Shen, Y., . . . Shi, Y. (2018). Identification of recurrent USP48 and BRAF mutations in Cushing's disease. *Nat Commun*, *9*(1),

3171. doi:10.1038/s41467-018-05275-5
- Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B., & Nicolas, J. F. (1995). Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, *15*(4), 1968-1973.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., . . . Voytas, D. F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, *186*(2), 757-761. doi:10.1534/genetics.110.120717
- Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, *79*(1), 13-21.
- Clark, A. J., Forfar, R., Hussain, M., Jerman, J., McIver, E., Taylor, D., & Chan, L. (2016). ACTH Antagonists. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *7*, 101. doi:10.3389/fendo.2016.00101
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., . . . Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, *339*(6121), 819-823. doi:10.1126/science.1231143
- CRISPR Overview. (2018). Retrieved from <https://www.addgene.org/crispr/guide/#overview>
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., . . . Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, *471*(7340), 602-607. doi:10.1038/nature09886
- Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., . . . Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, *34*(2), 184-191. doi:10.1038/nbt.3437
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213), 1258096. doi:10.1126/science.1258096
- Dufner, A., & Knobeloch, K.-P. (2019). Ubiquitin-specific protease 8 (USP8/UBPy): a prototypic multidomain deubiquitinating enzyme with pleiotropic functions. *Biochemical Society transactions*, *47*(6), 1867-1879. doi:10.1042/BST20190527
- Engler, D., Pham, T., Fullerton, M. J., Ooi, G., Funder, J. W., & Clarke, I. J. (1989). Studies of the secretion of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin into the hypophysial-portal circulation of the conscious sheep. I. Effect of an audiovisual stimulus and insulin-induced hypoglycemia. *Neuroendocrinology*, *49*(4), 367-381. doi:10.1159/000125141
- Faggiano, A., Pivonello, R., Spiezia, S., De Martino, M. C., Filippella, M., Di Somma, C., . . . Colao, A. (2003). Cardiovascular Risk Factors and Common Carotid Artery Caliber and Stiffness in Patients with Cushing's Disease during Active Disease and 1 Year after Disease Remission. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *88*(6), 2527-2533. doi:10.1210/jc.2002-021558
- Fukuoka, H., Cooper, O., Ben-Shlomo, A., Mamelak, A., Ren, S. G., Bruyette, D., & Melmed, S. (2011). EGFR as a therapeutic target for human, canine, and mouse ACTH-secreting pituitary adenomas. *J Clin Invest*, *121*(12), 4712-4721. doi:10.1172/jci60417
- Garneau, J. E., Dupuis, M. E., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., . . .

- Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67-71. doi:10.1038/nature09523
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(39), E2579-2586. doi:10.1073/pnas.1208507109
- Gonzalez, B., Schwimmer, L. J., Fuller, R. P., Ye, Y., Asawapornmongkol, L., & Barbas, C. F., 3rd. (2010). Modular system for the construction of zinc-finger libraries and proteins. *Nat Protoc*, 5(4), 791-810. doi:10.1038/nprot.2010.34
- Gross, A., Schoendube, J., Zimmermann, S., Steeb, M., Zengerle, R., & Koltay, P. (2015). Technologies for Single-Cell Isolation. *Int J Mol Sci*, 16(8), 16897-16919. doi:10.3390/ijms160816897
- Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., Renaud, J.-B., . . . Concordet, J.-P. (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology*, 17(1), 148. doi:10.1186/s13059-016-1012-2
- Horrocks, P. M., Jones, A. F., Ratcliffe, W. A., Holder, G., White, A., Holder, R., . . . London, D. R. (1990). Patterns of ACTH and cortisol pulsatility over twenty-four hours in normal males and females. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 32(1), 127-134.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010
- Hu, P., Zhang, W., Xin, H., & Deng, G. (2016). Single Cell Isolation and Analysis. *Front Cell Dev Biol*, 4, 116. doi:10.3389/fcell.2016.00116
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 169(12), 5429-5433.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. doi:10.1126/science.1225829
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., & Doudna, J. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2, e00471. doi:10.7554/eLife.00471
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., . . . Doudna, J. A. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343(6176), 1247997. doi:10.1126/science.1247997
- Kageyama, K., Asari, Y., Sugimoto, Y., Niioka, K., & Daimon, M. (2020). Ubiquitin-specific protease 8 inhibitor suppresses adrenocorticotrophic hormone production and corticotroph tumor cell proliferation. *Endocr J*, 67(2), 177-184. doi:10.1507/endocrj.EJ19-0239
- Karalis, K. P., Venihaki, M., Zhao, J., van Vlerken, L. E., & Chandras, C. (2004). NF-kappaB participates in the corticotropin-releasing, hormone-induced regulation of the pituitary proopiomelanocortin gene. *J Biol Chem*, 279(12), 10837-10840. doi:10.1074/jbc.M313063200

- Kim, Y. G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(3), 1156-1160.
- Lacroix, A., Feelders, R. A., Stratakis, C. A., & Nieman, L. K. (2015). Cushing's syndrome. *The Lancet*, *386*(9996), 913-927. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61375-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61375-1)
- Liu, C., Zhang, L., Liu, H., & Cheng, K. (2017). Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, *266*, 17-26. doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.012
- Loriaux, D. L. (2017). Diagnosis and Differential Diagnosis of Cushing's Syndrome. *N Engl J Med*, *376*(15), 1451-1459. doi:10.1056/NEJMra1505550
- Ma, Z. Y., Song, Z. J., Chen, J. H., Wang, Y. F., Li, S. Q., Zhou, L. F., . . . Zhao, Y. (2015). Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing's disease. *Cell Res*, *25*(3), 306-317. doi:10.1038/cr.2015.20
- Maeder, M. L., Thibodeau-Beganny, S., Osiaik, A., Wright, D. A., Anthony, R. M., Eichinger, M., . . . Joung, J. K. (2008). Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell*, *31*(2), 294-301. doi:10.1016/j.molcel.2008.06.016
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*, *1*, 7. doi:10.1186/1745-6150-1-7
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., . . . Koonin, E. V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, *9*(6), 467-477. doi:10.1038/nrmicro2577
- Miller, J., McLachlan, A. D., & Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *Embo j*, *4*(6), 1609-1614.
- Mizuno, E., Iura, T., Mukai, A., Yoshimori, T., Kitamura, N., & Komada, M. (2005). Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes. *Mol Biol Cell*, *16*(11), 5163-5174. doi:10.1091/mbc.E05-06-0560
- Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, *155*(Pt 3), 733-740. doi:10.1099/mic.0.023960-0
- Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, *60*(2), 174-182. doi:10.1007/s00239-004-0046-3
- Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*, *36*(1), 244-246.
- Moscou, M. J., & Bogdanove, A. J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, *326*(5959), 1501. doi:10.1126/science.1178817
- Newell-Price, J., Bertagna, X., Grossman, A. B., & Nieman, L. K. (2006). Cushing's syndrome. *The Lancet*, *367*(9522), 1605-1617.

doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68699-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68699-6)

- Newell-Price, J., Trainer, P., Besser, M., & Grossman, A. (1998). The Diagnosis and Differential Diagnosis of Cushing's Syndrome and Pseudo-Cushing's States. *Endocr Rev*, *19*(5), 647-672. doi:10.1210/edrv.19.5.0346
- Nieman, L. K., Biller, B. M. K., Findling, J. W., Newell-Price, J., Savage, M. O., Stewart, P. M., & Montori, V. M. (2008). The Diagnosis of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *93*(5), 1526-1540. doi:10.1210/jc.2008-0125
- Niendorf, S., Oksche, A., Kisser, A., Lohler, J., Prinz, M., Schorle, H., . . . Knobeloch, K. P. (2007). Essential role of ubiquitin-specific protease 8 for receptor tyrosine kinase stability and endocytic trafficking in vivo. *Mol Cell Biol*, *27*(13), 5029-5039. doi:10.1128/mcb.01566-06
- Pavletich, N. P., & Pabo, C. O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*, *252*(5007), 809-817.
- Perez-Rivas, L. G., Theodoropoulou, M., Ferrau, F., Nusser, C., Kawaguchi, K., Stratakis, C. A., . . . Reincke, M. (2015). The Gene of the Ubiquitin-Specific Protease 8 Is Frequently Mutated in Adenomas Causing Cushing's Disease. *J Clin Endocrinol Metab*, *100*(7), E997-1004. doi:10.1210/jc.2015-1453
- Petersenn, S. (2017). Diagnostik und Therapie des Cushing-Syndroms. *Endokrinologie Informationen Sonderheft* 38–43.
- Plessis, A., Perrin, A., Haber, J. E., & Dujon, B. (1992). Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. *Genetics*, *130*(3), 451-460.
- Pourcel, C., Salvignol, G., & Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, *151*(Pt 3), 653-663. doi:10.1099/mic.0.27437-0
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., . . . Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, *520*(7546), 186-191. doi:10.1038/nature14299
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, *8*(11), 2281-2308. doi:10.1038/nprot.2013.143
- Reincke, M., Sbiera, S., Hayakawa, A., Theodoropoulou, M., Osswald, A., Beuschlein, F., . . . Komada, M. (2015). Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease. *Nat Genet*, *47*(1), 31-38. doi:10.1038/ng.3166
- Ritzel, K., Beuschlein, F., Mickisch, A., Osswald, A., Schneider, H. J., Schopohl, J., & Reincke, M. (2013). Clinical review: Outcome of bilateral adrenalectomy in Cushing's syndrome: a systematic review. *J Clin Endocrinol Metab*, *98*(10), 3939-3948. doi:10.1210/jc.2013-1470
- Rouet, P., Smih, F., & Jasin, M. (1994). Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol*, *14*(12), 8096-8106.
- Rudin, N., Sugarman, E., & Haber, J. E. (1989). Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*,

- 122(3), 519-534.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*, 24, 104-108.
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*, 21(1), 55-89. doi:10.1210/edrv.21.1.0389
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 39(21), 9275-9282. doi:10.1093/nar/gkr606
- Sbiera, S., Deutschbein, T., Weigand, I., Reincke, M., Fassnacht, M., & Allolio, B. (2015). The New Molecular Landscape of Cushing's Disease. *Trends Endocrinol Metab*, 26(10), 573-583. doi:10.1016/j.tem.2015.08.003
- Sbiera, S., Kunz, M., Weigand, I., Deutschbein, T., Dandekar, T., & Fassnacht, M. (2019). The New Genetic Landscape of Cushing's Disease: Deubiquitinases in the Spotlight. *Cancers (Basel)*, 11(11). doi:10.3390/cancers11111761
- Sbiera, S., Perez-Rivas, L. G., Taranets, L., Weigand, I., Flitsch, J., Graf, E., . . . Fassnacht, M. (2019). Driver mutations in USP8 wild-type Cushing's disease. *Neuro Oncol*, 21(10), 1273-1283. doi:10.1093/neuonc/noz109
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671. doi:10.1038/nmeth.2089
- Schweitzer, K., & Naumann, M. (2015). CSN-associated USP48 confers stability to nuclear NF-kappaB/RelA by trimming K48-linked Ub-chains. *Biochim Biophys Acta*, 1853(2), 453-469. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.11.028
- Silverman, M. N., & Sternberg, E. M. (2012). Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*, 1261, 55-63. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06633.x
- Smith, S. M., & Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*, 8(4), 383-395.
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62-67. doi:10.1038/nature13011
- Tang, T. H., Bachellerie, J. P., Rozhdetsvensky, T., Bortolin, M. L., Huber, H., Drungowski, M., . . . Huttenhofer, A. (2002). Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11), 7536-7541. doi:10.1073/pnas.112047299
- Thomas, J. O., & Kornberg, R. D. (1975). An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(7), 2626-2630.
- Tsai, S. Q., & Joung, J. K. (2016). Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet*, 17(5), 300-312. doi:10.1038/nrg.2016.28
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*, 53(4), 865-871.
- Uckelmann, M., Densham, R. M., Baas, R., Winterwerp, H. H. K., Fish, A., Sixma, T. K., & Morris, J. R. (2018). USP48 restrains resection by site-specific cleavage of the

- BRCA1 ubiquitin mark from H2A. *Nat Commun*, 9(1), 229. doi:10.1038/s41467-017-02653-3
- van der Pas, R., de Herder, W. W., Hofland, L. J., & Feelders, R. A. (2013). Recent Developments in Drug Therapy for Cushing's Disease. *Drugs*, 73(9), 907-918. doi:10.1007/s40265-013-0067-6
- Velimezi, G., Robinson-Garcia, L., Munoz-Martinez, F., Wiegant, W. W., Ferreira da Silva, J., Owusu, M., . . . Loizou, J. I. (2018). Map of synthetic rescue interactions for the Fanconi anemia DNA repair pathway identifies USP48. *Nat Commun*, 9(1), 2280. doi:10.1038/s41467-018-04649-z
- Vila, G., Papazoglou, M., Stalla, J., Theodoropoulou, M., Stalla, G. K., Holsboer, F., & Paez-pereda, M. (2004). Sonic hedgehog regulates CRH signal transduction in the adult pituitary. *The FASEB Journal*, 19(2), 281-283. doi:10.1096/fj.04-2138fje
- Vila, G., Theodoropoulou, M., Stalla, J., Tonn, J. r. C., Losa, M., Renner, U., . . . Paez-Pereda, M. (2005). Expression and Function of Sonic Hedgehog Pathway Components in Pituitary Adenomas: Evidence for a Direct Role in Hormone Secretion and Cell Proliferation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(12), 6687-6694. doi:10.1210/jc.2005-1014
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1974). Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. J.D. Watson and F.H.C. Crick. Published in Nature, number 4356 April 25, 1953. *Nature*, 248(5451), 765.
- Weigand, I., Knobloch, L., Flitsch, J., Saeger, W., Monoranu, C. M., Hofner, K., . . . Sbiera, S. (2019). Impact of USP8 gene mutations on protein deregulation in Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. doi:10.1210/jc.2018-02564
- Weterings, E., & Chen, D. J. (2008). The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res*, 18(1), 114-124. doi:10.1038/cr.2008.3
- Wiles, M. V., Qin, W., Cheng, A. W., & Wang, H. (2015). CRISPR-Cas9-mediated genome editing and guide RNA design. *Mamm Genome*, 26(9-10), 501-510. doi:10.1007/s00335-015-9565-z
- Wu, Y., Liang, D., Wang, Y., Bai, M., Tang, W., Bao, S., . . . Li, J. (2013). Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 13(6), 659-662. doi:10.1016/j.stem.2013.10.016
- Xia, R., Jia, H., Fan, J., Liu, Y., & Jia, J. (2012). USP8 promotes smoothed signaling by preventing its ubiquitination and changing its subcellular localization. *PLoS biology*, 10(1), e1001238-e1001238. doi:10.1371/journal.pbio.1001238
- Yates, F. E., Leeman, S. E., Glenister, D. W., & Dallman, M. F. (1961). INTERACTION BETWEEN PLASMA CORTICOSTERONE CONCENTRATION AND ADRENOCORTICOTROPIN-RELEASING STIMULI IN THE RAT: EVIDENCE FOR THE RESET OF AN ENDOCRINE FEEDBACK CONTROL. *Endocrinology*, 69(1), 67-80. doi:10.1210/endo-69-1-67
- Zhang, F., Wen, Y., & Guo, X. (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*, 23(R1), R40-R46. doi:10.1093/hmg/ddu125
- Zhang, J. P., Li, X. L., Li, G. H., Chen, W., Arakaki, C., Botimer, G. D., . . . Zhang, X. B. (2017). Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome Biol*, 18(1), 35.

doi:10.1186/s13059-017-1164-8

Zhou, A., Lin, K., Zhang, S., Ma, L., Xue, J., Morris, S. A., . . . Huang, S. (2017). Gli1-induced deubiquitinase USP48 aids glioblastoma tumorigenesis by stabilizing Gli1. *EMBO Rep*, 18(8), 1318-1330. doi:10.15252/embr.201643124

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Martin Fassnacht bedanken, der mir die Möglichkeit gab, diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu verwirklichen. Ganz herzlich danke ich auch PD Dr. Camelia-Maria Monoranu für die Übernahme des Koreferats.

Mein großer Dank geht auch an Dr. Silviu Sbiera für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Er hatte immer ein offenes Ohr für mich und hat meine Arbeit durch zahllose Hinweise und Tipps gefördert. Ohne Ihn wäre sie nicht zustande gekommen.

Bei Frau Dr. Sabine Herterich und Daniela Scheld möchte ich mich ganz herzlich für die Sequenzierungen und die vielen Ratschläge bedanken. Prof. Dr. Nikita Popov und seiner Arbeitsgruppe gilt mein Dank für die Einführung in CRISPR/Cas und viele Hinweise und Hilfestellungen. Allen Mitgliedern des endokrinologischen Laborteams und insbesondere Isabel und Laura danke herzlich für das angenehme Arbeitsklima und den zahlreichen Ratschlägen.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für die Ablenkung, Unterstützung und die vielen schönen Momente bedanken, die mich auch in weniger erfolgreichen Phasen dieser Arbeit immer wieder aufgerichtet haben. Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken für ihre ewige Unterstützung. Danke auch für das Korrekturlesen, die Formatierungshilfen und das Ausmerzen der Kommafehler.