

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität  
Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Süleyman Ergün

---

**Die Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems in humanen  
induzierten pluripotenten Stammzellen zur Untersuchung der  
Funktion des Kanalproteins Connexin 43 in der  
Embryonalentwicklung**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Helena Dambacher  
aus Schwäbisch Hall

Würzburg, Februar 2020

**Referent:** Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

**Koreferent/Koreferentin:** PD Dr. Marco Metzger

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 26.05.2021

**Die Promovendin ist Zahnärztin**

*Für meine Eltern und Geschwister*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Das CRISPR/Cas9-System	1
1.1.1. Die Funktionsweise des CRISPR/Cas9-Systems	1
1.1.2. Genomveränderungen durch gentechnisch veränderte Nukleasen	5
1.2. Humane induzierte pluripotente Stammzellen	6
1.3. Gap Junctions	10
1.4. Mutationen in Connexingenen	13
1.5. Zielsetzung	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1. Material	16
2.1.1. Labor Equipment	16
2.1.2. Puffer und Lösungen	28
2.1.3. Medien, Lösungen und Materialien für die Zellkultur	33
2.1.4. Immunhistochemie	39
2.1.1. Zelllinien	40
2.1.2. Primer und Oligonukleotide	41
2.1.3. Enzyme und Plasmide	42
2.1.4. Antikörper	43
2.1.5. Kits	45
2.2. Methoden	45
2.2.1. Molekularbiologie	45
2.2.2. Zellkultur	57
2.2.2.1. Beschichtung der Zellkulturschalen	57
2.2.2.2. Kultur von HEK293T-Zellen	58

2.2.2.3.	Kultur von FSiPS-Zellen	60
2.2.2.4.	Elektroporation	61
2.2.2.5.	Differenzierung der iPS-Zellen	63
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>66</b>
3.1.	Die Erstellung eines funktionsfähigen CRISPR/Cas9-Konstruktes	67
3.2.	Die Transfektion der Zellen via Elektroporation	71
3.2.1.	Selektion der HEK-Kolonien mittels eines Dot Blots	73
3.2.2.	Die Analyse des Cx43-KO in HEK-Zellen	75
3.3.	Cx43-knockout in pluripotenten Stammzellen	84
3.3.1.	Nachweis der Pluripotenz der FSiPS-Zellen	84
3.3.1.1.	Nachweis der Cx43-Expression in FSiPS-Zellen	85
3.3.1.2.	Cx43-Defizienz in FSiPS-Zellen	86
3.4.	Differenzierungspotential der Cx43-defizienten FSiPS-Zellen	93
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
4.1.	Die Generierung einer Cx43-Defektmutante mittels des CRISPR/Cas9-Systems	97
4.2.	Connexine in der Embryonalentwicklung	103
4.3.	Differenzierungspotential der FSiPS Cx43-Defektmutante	107
4.4.	Ausblick	109
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>114</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>115</b>
	Anhang	
	Danksagung	
	Lebenslauf	

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
20-nt	20 Nukleotide
3D	dreidimensional
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
Cas	CRISPR-assoziierte Gene
CBM	Cardiac Basal Medium
CEM	Cardiac Enrichment Medium
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	clustered regulary interspaced short palindromic repeats
crRNA	CRISPR RNA
crRNP	CRISPR Ribonukleoprotein Komplex
CSM	Cardiac Specific Medium
cTnT	Cardiac Troponin T

Cx43	Connexin 43
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dbcAMP	Dibutyryl-cAMP
ddH <sub>2</sub> O	Demineralisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Ribonukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EB	Embryoid Body
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESCs	Embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
FSiPS	foreskin iPS
g	Gramm
GDNF	Glial cell-derived neurotrophic factor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure

hCx43	humanes Connexin 43
HDR	homology directed repair
HEK-Zellen	Menschliche embryonale Nierenzellen
HeLa-Zellen	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
hESC-MG	human ESC-qualified Matrigel
hESCs	Human embryonic stem cells
hiPSCs	Human induced pluripotent stem cells
HNH Nuklease	Bereich der Nuklease SpCas9
hSpCas9-2A-Puro V2.0	Plasmid mit Cas9 von <i>S. pyogenes</i> mit 2A-Puro und cloning backbone für sgRNA (V2.0)
ICM	Innere Zellmasse
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
k	Kilo
kDa	Kilodalton
KO	knockout
l	Liter
LB-Medium	lysogeny broth medium
M	molare Masse
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
miRNA	microRNA



mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ms	Millisekunde
N	Nukleotid
NaCl	Natriumchlorid
NEP	Neurale epithelialen Vorläuferzellen
ng	Nanogramm
NHEJ	non-homologous end joining
nm	Nanomol
Oct-4	Octamer binding transcription factor 4
ODDD	Okulodentodigitale Dysplasie
PAM	protospacer adjacent motif
PBS	phosphate-buffered saline
PCA	p coumaric acid
PCR	polymerase chain reaction
Pen/Strep	Penicillin Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydrogenii
PMA	Purmorphamin
pmol	picomol
Poly-HEMA	Polyhydroxyethylmethacrylat
pox	Peroxidase
pre-crRNA	precursor CRISPR RNA
Puro	Puromycin

RI	Rho-associated protein kinase inhibitor
RIPA Puffer	radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RuvC Nuklease	Bereich der Nuklease SpCas9
SB	SB431542
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sgRNA	single guide RNA
siRNA	small interfering RNA
SOC	super optimal broth with catabolite repression medium
Sox2	sex determining region Y-box 2
SpCas9	Cas9 Protein des Streptococcus pyogenes
SRA	Sarcomeric $\alpha$ -Actinin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
TBS-T	Tris buffered saline with Tween® 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
tracrRNA	trans-activating RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSCs	trophoblast stem cells
U	unit

UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
WNT	wingless-related MMTV integration site family
WT	Wildtyp
ZFN	zinc finger nuclease
$\mu\text{L}$	Mikroliter

# 1. Einleitung

## 1.1. Das CRISPR/Cas9-System

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems zur Erzeugung Connexin-defizienter Stammzellen. Das CRISPR/Cas-System wurde Ende der 1980er-Jahre ursprünglich in Bakterien entdeckt (Ishino et al. 1987). Es stellt ein RNA-vermitteltes, adaptives Immunsystem (Karginov und Hannon 2010) von Prokaryonten wie Bakterien und Archaeae gegen eindringende Viren und Plasmide dar (Barrangou et al. 2007; Horvath und Barrangou 2010; Lillestol et al. 2006; Marraffini und Sontheimer 2008; Sapranaukas et al. 2011; Sorek et al. 2008; Terns und Terns 2011). Aufgrund des großen Selektionsdrucks haben die Prokaryoten einen Mechanismus entwickelt, Fragmente fremder viraler DNA in ihr eigenes Genom zu integrieren. Die Fremd-DNA wird auf diesem Wege bei erneutem Virenbefall wiedererkannt und von Nukleasen gespalten und somit unschädlich gemacht (Garneau et al. 2010). Diese Methode macht man sich heutzutage in der Forschung zunutze, um DNA gezielt zu schneiden und zu verändern.

### 1.1.1. Die Funktionsweise des CRISPR/Cas9-Systems

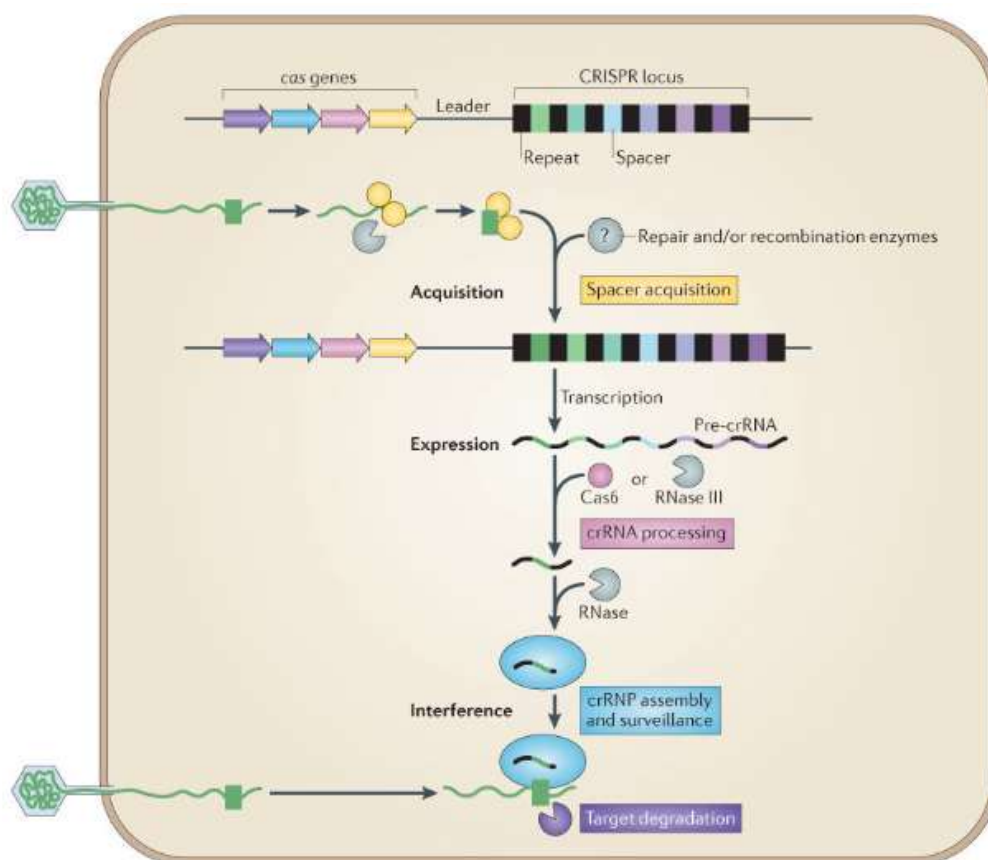
Es gibt drei Typen von CRISPR/Cas-Systemen (Makarova et al. 2011a; Makarova et al. 2011b). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem CRISPR/Cas-System des *Streptococcus pyogenes* (Typ II).

Der CRISPR-Locus ist ein DNA-Locus, der durch kurze repetitive DNA-Sequenzen (Palindrome) von meist 21-47 Basenpaaren gekennzeichnet ist (Godde und Bickerton 2006). Diese Palindrome sind durch sogenannte Spacer mit einer variablen Länge von ca. 15-70 bp getrennt (Jansen et al. 2002), in den meisten Fällen sind es 32-38 bp. Sie stammen von gezielt integrierter extrachromosomaler DNA (Bolotin et al. 2005; Mojica et al. 2005; Pourcel et al. 2005). Dieser Aufbau erklärt die Bezeichnung CRISPR = Clustered regulary interspaced short palindromic repeats (Jansen et al. 2002; Mojica et al. 1995) (**Abbildung 1**). Die dem CRISPR-Locus vorgeschaltete Sequenz (Leader-

Sequenz) dient als Promotor für dessen Expression. Die Cas (CRISPR-associated) -Gene wiederum befinden sich direkt vor der Leader-Sequenz. Die palindromischen Sequenzen des CRISPR-Locus bewirken nach Transkription die Ausbildung von stabilen, haarnadelförmigen RNA-Sekundärstrukturen (Barrangou und Marraffini 2014). Die Bestandteile des CRISPR-Locus, nämlich die Palindrome, Spacer, Leader-Sequenzen und Cas-Gene sind in ihrer Größe, Lage und Ausprägung variabel (Bachellier et al. 1997; Grissa et al. 2007; Lupski et al. 1996; van Belkum et al. 1998). Außerdem ist die Anzahl der Spacer-Sequenzen und der Palindrome zwischen verschiedenen Bakterienstämmen meist unterschiedlich (van Embden et al. 2000). Eng miteinander verwandte Bakterienarten zeigen gleiche Muster der repetitiven Sequenzen und der angrenzenden DNA-Abschnitte, wobei artfremde Bakterien keine Ähnlichkeiten diesbezüglich aufweisen (Kamerbeek et al. 1997; Mojica et al. 1995).

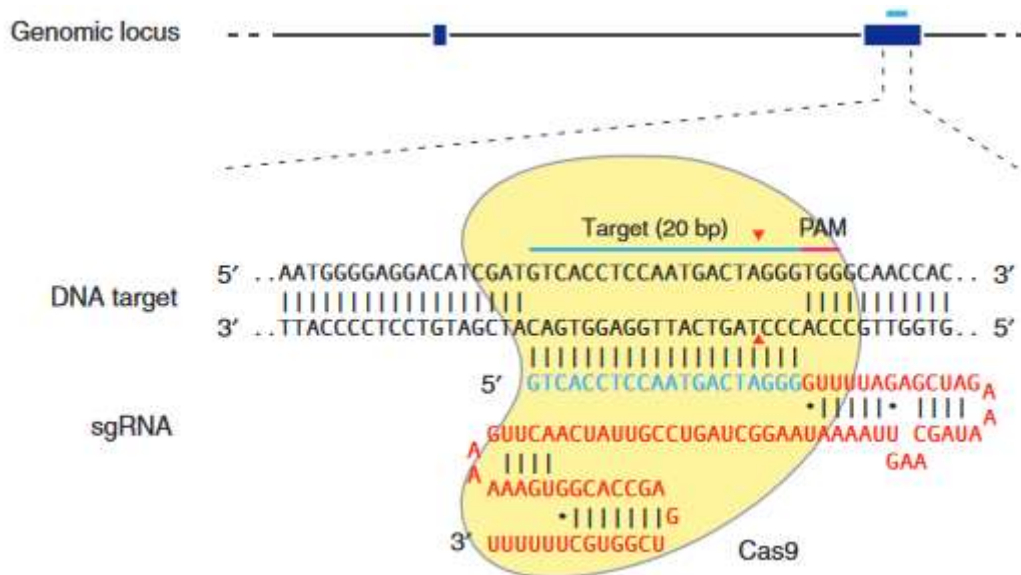
Bei Erstkontakt mit dem Erbgut von Viren wie bspw. Bakteriophagen, nehmen die Bakterien in der adaptiven Phase eine kurze Sequenz der Fremd-DNA in ihr eigenes Genom auf. Diese Sequenz wird vor das proximale Ende eines Palindroms innerhalb des CRISPR-Locus integriert (Bhaya et al. 2011; Terns und Terns 2011; Wiedenheft et al. 2012) (**Abbildung 1**). In der Folge kommt es zur Transkription der repeat-spacer-Elemente in eine gemeinsame, lange pre-crRNA (precursor CRISPR RNA). Diese pre-crRNA wird nun mit Hilfe der RNase III bzw. mit Hilfe von Cas-Hilfsproteinen in kürzere crRNAs prozessiert (Brouns et al. 2008; Carte et al. 2010; Carte et al. 2008; Deltcheva et al. 2011). Dazu lagern sich an jeden sich palindromisch wiederholenden DNA-Abschnitt Hilfs-RNAs, die base-paired to transactivating crRNAs (tracrRNAs) an (Gasiunas et al. 2012) (**Abbildung 2**). Die crRNA und tracrRNA weisen zueinander komplementäre Sequenzabschnitte auf. Bei der jeweiligen crRNA liegt der komplementäre Abschnitt direkt stromabwärts der Spacer-Sequenz. Die tracrRNA triggert nun die Prozessierung der crRNAs durch die RNase III (Deltcheva et al. 2011; Gottesman 2011; Jinek et al. 2012). Der Komplex aus tracrRNA und crRNA schließt sich mit Cas9 zusammen, es entsteht der CRISPR Ribonukleoproteinkomplex (crRNP). Somit wird Cas9 aktiviert (Jinek et al. 2012; Sapranaukas et al. 2011) und weist ihm den Weg zu den zu spaltenden DNA-Abschnitten (Brouns et al. 2008; Lintner

et al. 2011; Semenova et al. 2011; Sternberg et al. 2014; Wiedenheft et al. 2011a; Wiedenheft et al. 2011b). Dabei lagert sich der crRNA:tracrRNA Komplex über die crRNA komplementär an die eindringende fremde DNA an (**Abbildung 2**). Cas9 erkennt dabei eine bestimmte Sequenz auf der Fremd-DNA, nämlich die PAM-Sequenz (protospacer adjacent motif) (Sternberg et al. 2014). Diese stellt für Cas9 des *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) die Sequenz 5'-NGG-3' dar (Kleinstiver et al. 2015). Hier folgt (von 5' zu 3') einem beliebigen Nukleotid zwei Mal die Purinbase Guanin.



**Abbildung 1: Das CRISPR/Cas-System.** Das CRISPR/Cas-System als Abwehr gegen fremde DNA. Für die Abwehr ist das Zusammenspiel von crRNAs und Cas-Proteinen verantwortlich. Die unterschiedlich fungierenden Cas-Gene sind farblich markiert: Erfassung und Einbau von Spacern (Teile der Fremd-DNA) (gelb), Verarbeitung der crRNA (pink), crRNA Zusammensetzung (blau), Abbau der Fremd-DNA (lila). In grau sind die beteiligten Komponenten dargestellt, die nicht zu den Cas-Proteinen gehören (van der Oost et al. 2014).

Cas9 besitzt zwei Endonukleasedomänen (HNH und RuvC), welche im Folgenden Doppelstrangbruch (DSB) induzieren und die Fremd-DNA somit unschädlich machen (Rath et al. 2015). Der DSB entsteht 3 Basen stromaufwärts der 5'-NGG-3' PAM-Sequenz. Der Schnitt der Cas9 HNH Nuklease erfolgt auf dem crRNA-gebundenen Strang (Folgestrang), der gegenüberliegende Strang (Leitstrang) wird von der Cas9 RuvC-Domäne an der entsprechenden Stelle durchtrennt (Garneau et al. 2010; Jinek et al. 2012; Nishimasu et al. 2014). Dabei entsteht ein stumpfes Ende (Garneau et al. 2010). Das Genom des Bakteriums selbst besitzt keine PAM-Sequenzen und ist somit gegen die Degradation der eigenen DNA geschützt.



**Abbildung 2: Die Cas9 Nuklease.** Die Cas9 Nuklease (gelb) lagert sich mit Hilfe der 20-nt guide Sequenz (Protospacer) der crRNA (blau) an die Ziel-DNA an. Der rote Abschnitt stellt die tracrRNA dar. Essenziell für die Anlagerung des Cas9 Proteins ist die PAM-Sequenz (rosa), die bei *S. pyogenes* die Abfolge 5'-NGG darstellt. Die Nuklease Cas9 führt 3 Basen stromaufwärts der PAM-Sequenz einen Doppelstrangbruch durch (Dreiecke) (Ran et al. 2013b).

### **1.1.2. Genomveränderungen durch gentechnisch veränderte Nukleasen**

Das Genom Editing hat in den vergangenen Jahrzehnten durch die einfache Anwendung und hohe Spezifität an Popularität gewonnen. Neben TALEN (transcription-activator-like effector nuclease) (Boch 2011) und den Zinkfingernukleasen (ZFNs) (Urnov et al. 2010) hat sich das CRISPR/Cas9-System seit 2012 etabliert und scheint den anderen Techniken für viele Anwendungen an Einfachheit und Effizienz deutlich überlegen. Eine Forschungsgruppe um Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna entwickelte im Jahre 2012 ein Plasmid, welches ein RNA-Fusionsprodukt aus crRNA und tracrRNA codiert. Das Produkt aus crRNA und tracrRNA wird als single guide RNA (sgRNA oder gRNA) bezeichnet. Die sgRNA führt Cas9 zu der Ziel-DNA und induziert dort eine ortspezifische Spaltung der Doppelstrang-DNA (Jinek et al. 2012). Die Basenabfolge der crRNA, welche den Zielort auf der Fremd-DNA bestimmt, kann beliebig ausgetauscht werden. Somit können beliebige DNA-Abschnitte im Genom gezielt geschnitten und so manipuliert werden. Einzige Restriktion ist ein Vorhandensein der PAM-Sequenz. Das CRISPR/Cas9-System funktioniert nicht nur in Bezug auf virale DNA, sondern ist auch in eukaryotischen Zellen anwendbar und stellt somit ein vielseitiges Werkzeug für genetische Manipulationen in Bakterien, Pflanzen und Tieren dar.

#### **Reparaturmechanismen der Zelle und Entstehung von Mutationen**

Nachdem die Nuklease Cas9 einen Doppelstrangbruch in der Ziel-DNA induziert hat, unterzieht sich die Zelle einer der folgenden zwei Reparaturmechanismen: Non-homologous end joining (NHEJ) oder homology directed repair (HDR) (Chapman et al. 2012; Symington und Gautier 2011; Wyman und Kanaar 2006).

Die Art des Reparaturmechanismus ist in fast allen Zellen abhängig von der Zyklusphase der Zelle (Branzei und Foiani 2008; van Gent et al. 2001; Zlotorynski 2016). Meist tritt der Fall des NHEJ dann ein, wenn keine Reparaturvorlage vorhanden ist. Die getrennten DNA-Stränge werden ohne Beachtung der Sequenz wieder verknüpft. Bei der Reparatur des Defektes durch das NHEJ kann



es zur Deletion oder Insertion von Basen kommen. Die Verschiebung der Basenabfolge kann zu einer Leserasterverschiebung (frameshift) im codierenden Bereich führen. Daraus resultiert entweder ein nicht funktionsfähiges Peptid (Nonsense-Polypeptid) oder es kommt zur Entstehung eines neuen Stopp-Codons und die Translation wird vorzeitig beendet. Wenn das Ziel-Protein nicht mehr funktionsfähig ist bzw. gar nicht in der Zelle exprimiert wird, ist eine sogenannte Defektmutante entstanden.

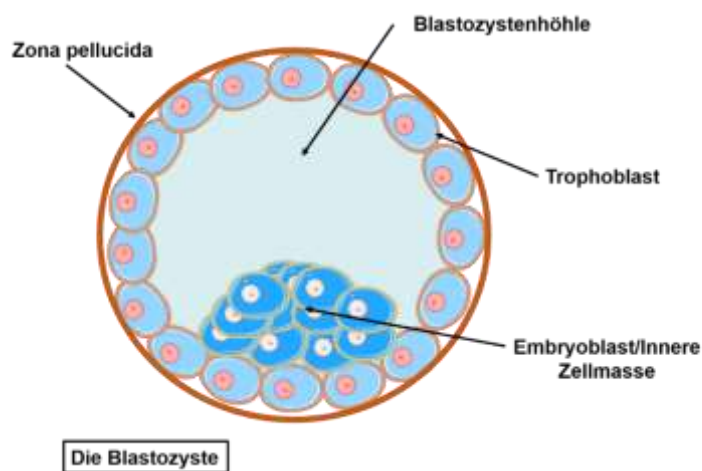
Beim HDR kann die DNA in Anwesenheit einer Vorlage wieder komplett hergestellt werden. Als Vorlage dient in der späten S-Phase und ab der G2-Phase das Schwester-Chromatid, welches Abschnitte mit Basenabfolgen besitzt, die zu den flankierenden Bereichen des DSB komplementär sind (Iliakis et al. 2004). Werden der Zellen künstliche, im Vergleich zum Original teils modifizierte DNA-Abschnitte als Reparaturvorlage angeboten, kann auf diesem Wege eine gezielte Mutation ins Genom eingeführt werden.

## **1.2. Humane induzierte pluripotente Stammzellen**

Stammzellen im Allgemeinen werden durch zwei Eigenschaften charakterisiert: Sie haben die Fähigkeit zur lebenslangen Selbsterneuerung und sie können sich in einen oder mehrere spezielle Zelltypen differenzieren. Man unterscheidet adulte Stammzellen von embryonalen Stammzellen. Während embryonale Stammzellen einen gesamten Organismus bilden können (Pluripotenz), beschränkt sich die Fähigkeit der adulten Stammzellen auf die Regeneration. Adulte Stammzellen sind multipotent, sie können nur noch Zellen eines spezifischen Gewebetyps ausbilden.

Vor Implantation in den Uterus durchläuft die Eizelle nach der Befruchtung mehrere Stadien. Direkt nach Befruchtung befindet sie sich im Zygotenstadium, dann fängt die Zelle an sich zu teilen. Während der frühen Entwicklungsphase sind die Zellen totipotent, das heißt, sie haben die Fähigkeit einen vollständigen Organismus zu bilden. Nach vier bis sechs Tagen nach Befruchtung bezeichnet man den entstandenen Embryo als Blastozyste. Diese wird sich schließlich in die Wand des Uterus einnisten. Die Blastozyste beherbergt im Inneren den

Embryoblasten bzw. die innere Zellmasse, außen befinden sich die Zellen des Trophoblasten (**Abbildung 3**). Die Zellen des Trophoblasten bilden nachfolgend die Plazenta, der Embryoblast bildet die restlichen Zellen des Organismus. Die Zellen des Embryoblasten, die embryonalen Stammzellen, sind pluripotent, das bedeutet, sie haben die Fähigkeit sich in die Zellen der drei Keimblätter (Ektoderm, Entoderm, Mesoderm) zu differenzieren (Evans und Kaufman 1981; Martin 1981). Unterschiedliche Signalwege bestimmen zu welchen Gewebetyp sich die Stammzellen entwickeln.



**Abbildung 3: Aufbau einer Blastozyste.** Die Blastozyste besteht aus den Zellen des Trophoblasten, des Embryoblasten bzw. der Inneren Zellmasse (ICM). Die Zellen des Trophoblasten bilden später die Plazenta, die Zellen des Embryoblasten werden zu Zellen des Ektoderms, Entoderms oder Mesoderms. Umhüllt wird die Blastozyste von der Zona pellucida (Eihülle). Dieses Schema besteht aus grafischen Elementen der Bilddatenbank Servier Medical Art, die unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (CC BY 3.0) lizenziert sind (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0>).

Im Jahre 2006 gelang es einer Forschergruppe durch Zell-Reprogrammierung induzierte embryonale Stammzellen zu generieren. Embryonale oder adulte Fibroblasten der Maus dienten als Spenderzellen und wurden durch virale Überexpression der Transkriptionsfaktoren Oct-3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 in embryonale pluripotente Stammzellen reprogrammiert. Diese Zellen werden als induzierte pluripotente Stamm (iPS) -Zellen bezeichnet (Takahashi und Yamanaka 2006). Kurze Zeit später konnten auch Fibroblasten aus der Haut oder aus dem Blut des Menschen mit Hilfe derselben oben genannten Faktoren in iPS-Zellen umprogrammiert werden (Takahashi et al. 2007; Yu et al. 2007).

## Die Bedeutung von iPS-Zellen in Forschung und Medizin

Die Technik der Reprogrammierung von Fibroblasten in iPS-Zellen hat die biomedizinische Forschung und die Entwicklung neuer Therapieansätze in der Medizin wesentlich beeinflusst.

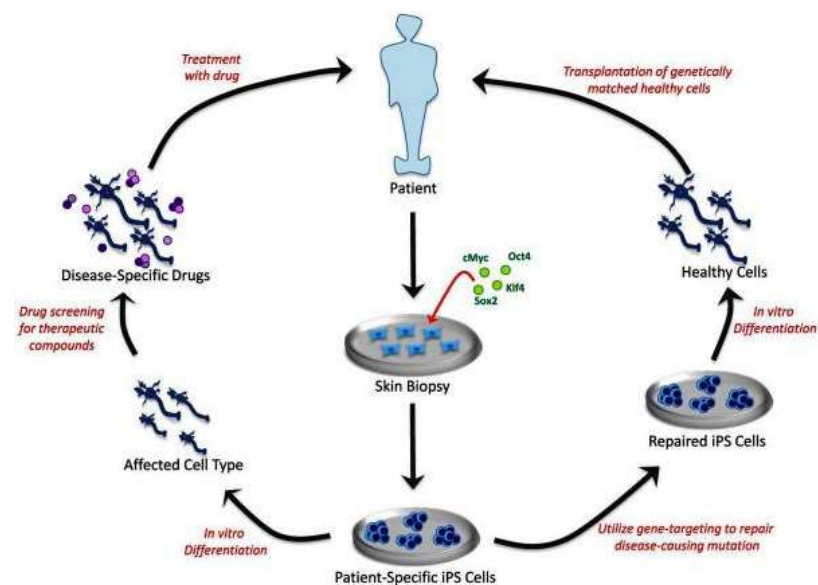
Aufgrund des demographischen Wandels steigt nicht nur die Anzahl der altersbedingten, sondern auch der chronischen Erkrankungen. Viele dieser Krankheitsbilder sind genetisch prädisponiert. Humane iPS-Zellen stellen eine attraktive Plattform zur Erforschung solcher Krankheiten dar.

Ferner könnten bspw. somatische Zellen von Patienten mit einem genetischen Defekt entnommen und in iPS-Zellen reprogrammiert werden. Anschließend könnte der Gendefekt korrigiert werden. Es folgt eine Differenzierung in den im Patienten betroffenen Zelltyp und eine Transplantation der korrigierten Zellen (**Abbildung 4**, rechter Abschnitt). Da es sich hierbei um autologe Transplantate handelt, wären immunologische Reaktionen selten.

Verschiedene Krankheiten könnten so durch die Stammzellforschung detaillierter erforscht und neuartige Therapieansätze für die Heilung der Krankheiten entwickelt werden. Ein eindrückliches Beispiel für die Machbarkeit solcher Therapiekonzepte ist Heilung der Sichelzellanämie am Tiermodell (Hanna et al. 2007). Hierzu wurden Mäusen mit Sichelzellanämie Fibroblasten entnommen und in iPS-Zellen reprogrammiert. Anschließend wurde die Mutation des Sichelhämoglobin-Allels in iPS-Zellen korrigiert. Aus den iPS-Zellen wurden dann hämatopoetische Vorläuferzellen differenziert und den erkrankten Tieren nach Ganzkörperbestrahlung transplantiert. Dieses Verfahren führte zur Heilung der Sichelzellanämie der Mäuse.

Ferner spielen Stammzellen eine große Rolle im Bereich der regenerativen Medizin. Ein Beispiel hierfür ist die altersbedingte Makuladegeneration bei asiatischen Patienten, welche mit einer Degeneration des retinalen Pigmentepithels und einer Visuseinschränkung einhergeht. Zu therapeutischen Zwecken wurden bereits pluripotente Stammzellen in Zellen des retinalen

Pigmentepithels differenziert und ersten Patienten transplantiert, was bei  $\frac{3}{4}$  der Patienten zu einer Verbesserung der Sehschärfe beitrug (Song et al. 2015). Des Weiteren können Stammzellen zur Therapie autoimmuner Erkrankungen, wie zum Beispiel dem Diabetes mellitus Typ I dienen (Farooq et al. 2018). Außerdem konnten mit Hilfe von iPS-Zellen erste tierexperimentelle Forschungsergebnisse zur Therapie von Rückenmarksverletzungen (Deshpande et al. 2006) und Morbus Parkinson (Barker et al. 2016; Bjorklund et al. 2002; Grealish et al. 2014; Takagi et al. 2005) erzielt werden. Weiterhin könnten an iPS-Zellen abgeleiteten Zellen von Patienten Arzneimitteltests durchgeführt werden und personalisierte Therapieansätze bezüglich verschiedener Medikamente entwickelt werden (**Abbildung 4**, linker Abschnitt). Diese ausgewählten Beispiele zeigen das große Potential der Stammzellen in der Medizin auf. Damit weitere Krankheiten geheilt werden können, muss die Forschung der Stammzellen stetig vorangetrieben werden.



**Abbildung 4: Anwendung von iPSCs in der Medizin.** Reprogrammierung von adulten Fibroblasten in iPSCs mittels der Transkriptionsfaktoren Oct-4, Sox2, cMyc und Klf4. Rechts: Weg, wenn krankheitsverursachende Mutation bekannt ist: Reparatur des Gen-Defektes, Differenzierung und Implantation der gesunden Zellen. Links: Testen potentieller Medikamente und Entdeckung neuer therapeutischer Ansätze (Robinton und Daley 2012).

### 1.3. Gap Junctions

Als Gap Junctions werden fleckförmige Bereiche (Plaques) in der Plasmamembran einer Zelle bezeichnet, welche Ansammlungen von spezifischen, direkten Zell-Zell-Verbindungen darstellen (Laird 2006). Es handelt sich hierbei um Kanäle, welche die direkte Kommunikation zwischen benachbarten Zellen erlauben (Loewenstein 1965). Dies bewirkt, dass sich mehrere Zellindividuen zu einem funktionellen Synzytium verbinden. Dieser Kontakt wird durch die besonders enge räumliche Beziehung der zwei Zytoplasmamembranen ermöglicht. Der elektronenmikroskopisch erkennbare Spalt (engl. gap) beträgt nur 2-3,5 nm, wobei der reguläre Abstand von zwei Zellmembranen normalerweise 20-30 nm beträgt. Gap Junctions befinden sich in den meisten Geweben: unter anderem im Myokard (Beyer et al. 1995; Gros und Jongasma 1996; Moreno 2004), in der Wand der Blutgefäße (Figuroa und Duling 2009), in der Haut (Avshalumova et al. 2014), im Knochen (Jiang et al. 2007), in der Leber (Nicholson et al. 1987; Zhang und Nicholson 1994), der Augenlinse (Mathias et al. 2010), in neuronalen Zellen (Saez et al. 1991) und im Innenohr (Nickel und Forge 2008).

Im Gegensatz zu Adhäsionskontakten, welche eine mechanische Funktion aufweisen oder Tight Junctions, welche eine Diffusionsbarriere darstellen, ist allein den Gap Junctions vorbehalten, Zellen durch den Austausch von Molekülen elektrophysiologisch und metabolisch zu einer Funktionseinheit zu koppeln (Hormuzdi et al. 2004). Der Austausch von Molekülen geschieht durch passive Diffusion. Allerdings sind die Gap Junctions nur für eine Molekülgröße von bis zu circa 1,8 kDa durchlässig, um zu verhindern, dass Proteine oder Nukleinsäuren die Kanäle passieren (Kumar und Gilula 1996). Neben Ionen, Aminosäuren, Nukleotiden, linearen Peptiden, microRNAs und siRNAs können auch sekundäre Botenstoffe (second messenger) wie cAMP, IP<sub>3</sub>, ATP und Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch die Kanäle treten (Alexander und Goldberg 2003; Aucher et al. 2013; Katakowski et al. 2010; Lemcke et al. 2015; Neijssen et al. 2007; Valiunas et al. 2005; Zong et al. 2016). Weiterhin können Connexone, welche nicht mit der benachbarten Zelle verbunden sind, mit dem Extrazellulärraum kommunizieren

(Begandt et al. 2017; Belousov et al. 2017; Leybaert et al. 2017). Die Kommunikation der Zellen über die Gap Junctions ist essenziell für die Embryogenese und die Funktion von Organen (Kibschull et al. 2015; Sohl und Willecke 2004; Warner et al. 1984).

### **Struktur der Gap Junctions**

Connexine stellen die Proteinuntereinheiten der Gap Junctions dar. Die Translation der Connexine geschieht im endoplasmatischen Retikulum. Im trans-Golgi Netzwerk formieren sich die Connexine zu Connexonen. Ein Connexon besteht aus 6 Connexin-Untereinheiten und bildet einen Halbkanal. Es zeigt einen ringförmigen Körper mit hexagonaler Struktur (Revel und Karnovsky 1967). Die Connexone werden schließlich zur Zellmembran transportiert und gehen mit einem Connexon der benachbarten Zelle eine Verbindung ein. Die entstandene Pore ist hydrophil und misst ca. 2 nm. Mehrere hunderte dieser Kanäle sammeln sich an einem Bereich der Zellmembran und bilden Gap Junction Plaques (Laird 2006).

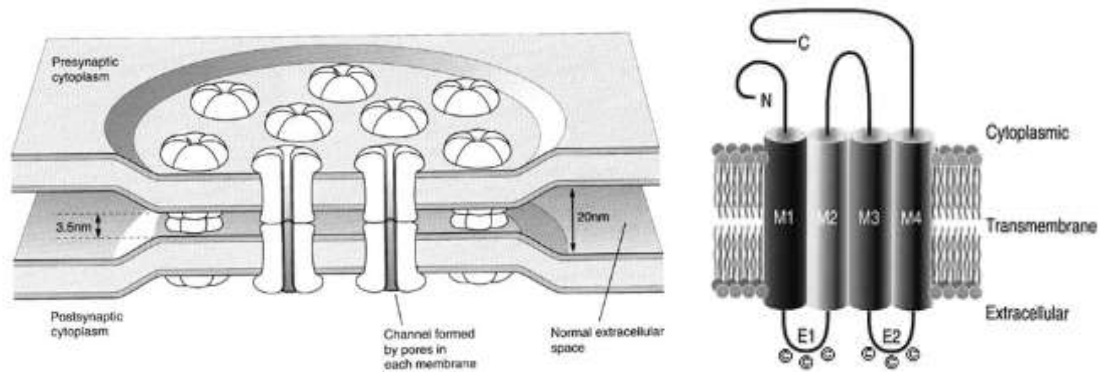
Es existieren 21 humane Connexingene (Sohl und Willecke 2004). Die Connexine sind nach ihrer theoretischen molekularen Masse (in kDa) benannt. So hat beispielsweise Cx43 eine molekulare Masse von 43 kDa. Die Expression der verschiedenen Connexine ist gewebespezifisch.

Ein Connexon kann entweder aus gleichen Connexinproteinen (homomer) oder aus verschiedenen Connexinproteinen (heteromer) zusammengesetzt sein (Brink et al. 1997; Kumar und Gilula 1996). Verschiedene Kombinationsmöglichkeiten erhöhen die Diversität der Gap Junctions.

### **Struktur der Connexinproteine**

Ein Connexin ist ein aus vier Transmembrandomänen (M1-M4) bestehendes Protein (**Abbildung 5**). Die zwei Protein-Schleifen zwischen M1 und M2 sowie zwischen M3 und M4 stellen die zwei extrazellulären Schleifen (E1 und E2) dar. Eine weitere Protein-Schleife (CL) (zwischen M2 und M3) sowie das N-, wie auch das C-terminale Ende liegen intrazellulär (Laird und Revel 1990). Abhängig von

der Sequenzabfolge und Länge der intrazellulären Schleifen können die Connexine in verschiedene Subfamilien ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) unterteilt werden (Eiberger et al. 2001).



**Abbildung 5: Struktur der Gap Junctions und Aufbau der Connexin-Proteine.** Gap Junction Plaques sind Ansammlungen von vielen Gap Junction Kanälen (links). Eine Zelle steuert jeweils ein Connexon zur Bildung eines Kanals bei. Rechts ist schematisch der Aufbau eines Connexin-Proteins dargestellt. Es besteht aus vier Transmembrandomänen (M1-M4), zwei extrazellulären Schleifen und einer intrazellulären Schleife. Das C-terminale sowie das N-terminale Ende befinden sich ebenfalls intrazellulär (Sohl und Willecke 2004).

### Das Protein Connexin 43

Das Protein Connexin 43, oder auch Gap Junction alpha-1 Protein (GJA1) genannt, befindet sich beim Menschen auf Chromosom 6 (Fishman et al. 1991; Sohl und Willecke 2003). Es ist das häufigste Connexin-Protein im menschlichen Körper und befindet sich in mehr als 35 verschiedenen Zell- und Gewebearten (Laird 2006). Es dient, wie die anderen Connexine, der direkten Zellkommunikation. Des Weiteren spielt es eine wichtige Rolle in der Transkription von Genen, Zellwachstum, Zelltod und erfüllt zudem mechanische Aufgaben (Esseltine und Laird 2016; Martins-Marques et al. 2015). Außerdem kann Connexin 43 die Zellkommunikation über kleine Nanotubes (TNTs) und Vesikel steuern (Soares et al. 2015; Wang et al. 2010). Es hat zudem wichtige Aufgaben bei Zellwachstum und Zelldifferenzierung (Cheng et al. 2015).

## 1.4. Mutationen in Connexingenen

Beim Menschen werden 28 Krankheitsbilder durch Mutationen von Connexinen verursacht. Hierbei spielen Cx26 und Cx43 eine große Rolle. Alleine diese zwei Proteine verursachen die Hälfte dieser Erkrankungen (Srinivas et al. 2018). Im Folgenden sollen einige Krankheiten im Detail aufgeführt werden, um die Potenz der Connexine und die phänotypische Varianz der Krankheiten aufzuzeigen.

Der Morbus Charcot-Marie-Tooth basiert auf einer Mutation des Cx32, welche mit einer Neuropathie durch Demyelinisierung peripherer Nerven einhergeht (Abrams et al. 2000; Bergoffen et al. 1993; Kleopa et al. 2012; Kleopa und Scherer 2006; Scherer und Kleopa 2012). Ebenso zeigt die Pelizaeus Merzbacher ähnliche Krankheit (PMLD) eine Beeinträchtigung von Nerven durch unvollständige Ausprägung oder Abbau des Myelins (hypomyelinisierende Leukodystrophie). Diese Krankheit basiert auf Mutationen von Cx46.6 und Cx47 (Osaka et al. 2010; Uhlenberg et al. 2004). Mutationen des Proteins Cx26, welches sich z.B. in der Cochlea, Hornhaut und Haut befindet (Forge et al. 1999; Lucke et al. 1999; Salomon et al. 1994), sind vielseitig (Avshalumova et al. 2014; Lee und White 2009). Mehrere Syndrome zu Mutationen des Cx26 sind bekannt: Das Bart-Pumphrey Syndrom (Richard et al. 2004), das Keratitis-Ichthyosis-Taubheitssyndrom (Richard et al. 2002) und das Vohwinkel-Syndrom (Ozturk et al. 2016). Weiterhin existiert die Nicht-syndromale Schwerhörigkeit und Taubheit, welche ebenso auf eine Mutation des Cx26 zurück zu führen ist (Kelsell et al. 1997).

Mutationen des Cx31 und Cx30.3 verursachen die Hauterkrankung Erythrokeratoderma variabilis (Fuchs-Telem et al. 2011; Richard et al. 2003).

Cx46 und 50 werden mit der Vererbung von Katarakt assoziiert (Berry et al. 1999; Beyer et al. 2013). Die Mutation des Cx40 führt im Herzen zur atrialen Kardiomyopathie und Herzvorhofflimmern (Gollob et al. 2006; Lubkemeier et al. 2013).



Eine weitere wichtige Erkrankung ist die Okulodentodigitale Dysplasie (ODDD). Diese basiert auf Mutationen des Cx43 (Attig et al. 2016; Flenniken et al. 2005; Meyer-Schwickerath et al. 1957). Die meist autosomal-dominant vererbte Erkrankung ist selten, es sind bislang circa 300 Fälle weltweit beschrieben. Es wurden über 62 Mutationen in Zusammenhang mit der Krankheit ODDD in Verbindung gebracht (Laird 2008; Paznekas et al. 2009).

Die erkrankten Patienten weisen Anomalien im Bereich der Augen, Zähne, Finger und Zehen sowie außerdem charakteristische Gesichtszüge auf (Paznekas et al. 2003). Es handelt sich um Menschen mit bilateralem Mikrophthalmus, Mikrokornea, Hypotelorismus, eine schmale Nase und hypoplastische Nasenflügel, Anomalien der Iris, Glaukom, Schmelzhypoplasie, Veränderung des Kieferkammes im Unterkiefer und ein gestörtes Wachstum der Haare, Haut und Nägeln (Cowan 1959; Gorlin et al. 1963; Meyer-Schwickerath et al. 1957; Paznekas et al. 2003; Paznekas et al. 2009). Ein weiteres typisches Merkmal erkrankter Patienten sind Campodaktylien und Syndaktilien des vierten und fünften Fingers und Aplasien oder Hypoplasien der mittleren Phalanx von Hand und/oder Fuß (Gorlin et al. 1963; Richardson et al. 2004). Weitere skelettale Anomalien sind Hüftgelenkluxationen und verspätete Verknöcherung des Gelenkkopfes des Oberschenkels (Pitter und Svejda 1952).

Neben diesen äußeren Fehlbildungen zeigen die Patienten auch neuronale Defekte (Gutmann et al. 1991). Weiterhin sind Dysarthrie, neurogene Blasenstörungen, spastische Paraparesen, Ataxien, Schwäche des Musculus tibialis anterior, Anfälle, Hörverlust und Herzrhythmusstörungen beschrieben (Kalcheva et al. 2007; Paznekas et al. 2003; Paznekas et al. 2009; Wittlieb-Weber et al. 2016).

## 1.5. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollen in iPS-Zellen mittels des CRISPR/Cas9-Systems verschiedene Cx43-Defektmutanten generiert werden.

Um die Technik erstmals in der Stammzellforschungsgruppe der Anatomie zu etablieren, wurde als Zielstruktur das Protein Connexin 43 ausgewählt. Die Arbeitsgruppe hat bereits viel Erfahrung in der Forschung mit diesem Protein und mit der Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems sollten weitere Erkenntnisse auf diesem Gebiet erzielt werden.

Hierzu wurden die Cx43-Defektmutanten zunächst in HEK293T-Zellen erzeugt. Dabei wurden sowohl die ausgewählten sgRNAs und Transfektionsmethoden erprobt als auch Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung mutanter Zellklone getestet und etabliert. Die HEK293T-Zelllinie stellt ein attraktives Testsystem dar, da die Zellen schnell proliferieren, leicht und hoch effizient zu transfizieren sind und sich klonal expandieren lassen.

Nach erfolgreicher Etablierung des Systems war beabsichtigt, die Technik auf iPS-Zellen zu übertragen und damit mehrere Cx43-Defektmutanten zu erzeugen, welche dann ausführlich *in vitro* charakterisiert werden sollten.

Ziel dieser Arbeit war, die Grundlage für die Erzeugung CRISPR/Cas9-basierter Connexin-Defektmutanten in humanen iPS-Zellen zu schaffen. Zum einen sollte durch Erzeugung einer Leserasterverschiebung (frameshift) der komplette Verlust des Cx43-Proteins erreicht werden, zum anderen sollte durch eine in-frame-Deletion ein großer Teil des N-Terminus trunkiert werden, um das menschliche Krankheitsbild ODDD nachzubilden. Aufbauend darauf können verschiedene Connexin-basierte humane Krankheiten *in vitro* erforscht werden. Außerdem bilden Connexin-defiziente iPS-Zellen die Basis dafür, die Rolle von Connexinen und Gap Junctions während der Entwicklung des menschlichen Embryos zu untersuchen. In diesem Zusammenhang könnten kürzlich beschriebene Organoid-Modelle sowie artifizielle Embryo-artige Strukturen als attraktives Zellkulturmodell genutzt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Labor Equipment

##### Autoklaven

DX-23	Systemec GmbH, Wetttenberg, Deutschland
Hiclave HV-133	HMC Europe GmbH, Tüßling, Deutschland
Varioklav Classic 400E	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland

##### Chemilumineszenz

Fusion Solo 4M	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
----------------	---

##### Elektrophoresekammern

Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Herkules, Kalifornien, USA
Perfect Blue™ Mini L	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

##### Elektrophorese-Netzgerät

PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories, Inc., Herkules, Kalifornien, USA
-----------------	---

##### Festwinkelrotor

J-Lite® JLA-16.250	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA
--------------------	--

##### Flockeneisbereiter

AF-100	Scotsman, Pogliano, Italien
--------	-----------------------------

##### Gefrierbehälter

Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
-------------	--

## Inkubationsschüttler

Model G25  
New Brunswick Scientific Co, Edison,  
New Jersey, USA

## Inkubatoren

B6120  
Heraeus GmbH & Co. KG, Hanau,  
Deutschland

C150  
BINDER GmbH, Tuttlingen,  
Deutschland

MCO-19AIC UV-RE  
PHC Europe B.V., Etten-Leur,  
Niederlande

## Magnetrührer

WiseStir MSH-20A  
witeg Labortechnik GmbH, Wertheim,  
Deutschland

## Mikroskope

ECLIPSE Ti confocal laser  
scanning microscope  
Nikon, Chiyoda, Japan

Axiovert 40 CFL  
Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena,  
Deutschland

DMIL LED  
Leica Microsystems GmbH, Wetzlar,  
Deutschland

## Mikrowelle

NN-E201W  
Panasonic Corporation, Kadoma,  
Japan

## pH-Meter

inoLab pH 720  
WTW GmbH, Weilheim, Deutschland

## Pipetten

accu-jet® pro  
Brand GmbH und Co. KG GmbH und  
Co. KG, Wertheim, Deutschland

Multipipette® M4  
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Transferpipetten  
Brand GmbH und Co. KG, Wertheim,  
Deutschland

## Revolver

Tube Revolver 88881002 Thermo Fisher Scientific, Waltham,  
Massachusetts, USA

## Sicherheitswerkbank

Vinitex Air EN 14175 Vinitex Laboreinrichtungen GmbH &  
Co. KG, Sint-Oedenrode, Niederlande

## Spectrophotometer

NanoDrop™ 2000c Thermo Fisher Scientific, Waltham,  
Massachusetts, USA

SmartSpec™ Plus Bio-Rad Laboratories, Inc., Herkules,  
Kalifornien

## Sterilwerkbanken

Airstream® Class II Biological Safety Cabinet Esco Micro, Singapur

BSB 4 Klasse II Sicherheitswerkbank Gelaire Flow Laboratories,  
Laminar Flow Meckenheim, Deutschland

## Stickstoffbehälter

CryoSystem 4000 MVE Jutta Ohst german-cryo GmbH, Jüchen,  
Deutschland

## Thermocycler

Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler Thermo Fisher Scientific, Waltham,  
Massachusetts, USA

## Thermoschüttler

Grant Instruments™ Grant Bio™ Thermoschüttler Thermo Fisher Scientific, Waltham,  
Massachusetts, USA

## Transfektionssystem

Neon™ Transfection System Thermo Fisher Scientific, Waltham,  
Massachusetts, USA

## Trockenblockthermostat

Bio TDB-100 SIA Biosan, Riga, Lettland

## UV-Transilluminator

Quantum-ST4  
Vilber Lourmat Deutschland GmbH,  
Eberhardzell, Deutschland

## Vortex-Schütter

RS-VA 10  
Phoenix Instrument GmbH, Garbsen,  
Deutschland

Vortex-Genie 2  
Scientific Industries Inc., Bohemia, New  
York, USA

Vortex-Schüttler  
VWR International, Radnor,  
Pennsylvania, USA

## Waage

Präzisionswaage EG 2200-2NM  
KERN & SOHN GmbH, Balingen,  
Deutschland

## Wasserbad

WNB 14  
Memmert GmbH & Co. KG,  
Schwabach, Deutschland

## Western Blot- Transfer System

Trans-Blot® Turbo™  
Bio-Rad Laboratories, Inc., Herkules,  
Kalifornien, USA

## Wippschüttler

MR-12  
SIA Biosan, Riga, Lettland

## Zählkammer

Neubauer Zählkammer  
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG,  
Lauda-Königshofen, Deutschland

## Zentrifugen

Avanti® J-26 XP  
Beckman Coulter, Brea, Kalifornien,  
USA

Heraeus™ Multifuge™ X1R  
Thermo Fisher Scientific, Waltham,  
Massachusetts, USA

Heraeus™ Pico™ 17  
Mikrozentrifuge  
Thermo Fisher Scientific, Waltham,  
Massachusetts, USA

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>
8 well Real-Time PCR Gefäße	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland
Deckgläser (15 mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim von der Rhön, Deutschland
Einmal-Skalpelle	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Falcon Röhrchen (15, 50 mL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Filter (0,2 µm)	Pall Deutschland Holding GmbH & Co. KG, Dreieich, Deutschland
Gewebekulturflaschen (T25, T75)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Gewebekulturplatten (6-, 12-, 48-, 96-wells)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Kimtech Präzisionstücher	Kimberly-Clark, Dallas, Texas, USA
Kryoröhrchen 1,8 mL	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Küvetten	BRAND GMBH UND CO. KG GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland
Mini Trans-Blot® Filterpapier	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Mullkompressen	MaiMed GmbH, Neuenkirchen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland
Nitril Handschuhe	PAUL HARTMANN Ges.m.b.H., Wiener Neudorf, Österreich
Nitrozellulose Membran 0,45 µm	GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, Massachusetts, USA

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>
Objektträger	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
PARAFILM® M	Bemis Company, Inc., Neenah, Wisconsin, USA
Pasteur Pipetten	Kimble Chase Life Science, Rockwood, Pennsylvania, USA
Petrischalen	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipetten Filterspitzen (0,5-10, 1- 200, 100-1000 µL)	Sorenson BioScience Inc, Salt Lake City, Utah, USA
Pipetten Spitzen (10, 100, 1000 µL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5, 1, 2 mL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Sarogold®-Folie	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Schikanekolben	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipetten (5, 10, 25, 50 mL)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Spritzen	Becton Dickinson, East Rutherford, New Jersey, USA
Zellkulturschalen (10 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich



Tabelle 2: Chemikalien, Small molecules und Wachstumsfaktoren

<b>Bestandteil</b>	<b>Hersteller</b>
1x Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Inc., Herkules, Kalifornien, USA
Advanced DMEM (1x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Agar-Agar, Bioscience, granuliert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa®	Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg, Deutschland
APS 10 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ATP 100 mM	Epicenter, Madison, Wisconsin, USA
B27 supplement (50x)	Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
B27 supplement without Insulin	Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
B27 supplement without Vitamin A (50x)	Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
BDNF 10 µg/mL	PeproTech, Inc., Rocky Hill, New Jersey, USA
Biozym Plaque GeneticPure Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
BMP4	PeproTech, Inc., Rocky Hill, New Jersey, USA
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BSA für Bradford	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Buffer G	Promega Corporation, Fitchburg, Wisconsin, USA
CHIR99021 10 mM	Axon Medchem, Groningen, Niederlande

<b>Bestandteil</b>	<b>Hersteller</b>
Corning® Matrigel® Matrix, hESC-qualified	Discovery Labware, Inc., Bedford, Massachusetts, USA
DABCO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DAPI (1:5000)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
dbcAMP	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DMEM/F12	Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dorsomorphin 10 mM	Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich
DPBS (Dulbecos PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
DTT 100 mM	Epicenter, Madison, Wisconsin, USA
EDTA	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EtOH	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
FCS	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
GDNF 10 µg/mL	PeproTech Inc., Rocky Hill, New Jersey, USA

<b>Bestandteil</b>	<b>Hersteller</b>
Gelatine	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
Glucose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glutaraldehyd 25 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycidylether	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Green GoTaq® Flexi Buffer (5x)	Promega Corporation, Fitchburg, Wisconsin, USA
HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt, mikrogranuliert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Knockout™ Serum Replacement	Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
L-Lactat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
Lumiol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

<b>Bestandteil</b>	<b>Hersteller</b>
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> -Lösung 25 mM	Promega Corporation, Fitchburg, Wisconsin, USA
MgSO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
Midori Green Advance	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland
Mowiol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
Neurobasalmedium	Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
Nuclease-freies Wasser	Promega Corporation, Fitchburg, Wisconsin, USA
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
PBS	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
PBS buffer powder (1x Dulbecco's)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
PCA	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
Penicillin G sodium salt	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA

<b>Bestandteil</b>	<b>Hersteller</b>
Poly (2-hydroxyethyl methacrylate)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
Ponceau S	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Purmorphamin (PMA)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
Roti® Quant	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 no glucose medium	Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
SB431542	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
SDS	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
StemMACS™ iPS-Brew XF 50x supplement	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
StemMACS™ iPS-Brew XF, human	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
StemPro®Accutase®	Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
T4 Polynukleotid Kinase Buffer (10x)	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
T7 Ligase Buffer	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Tango Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

<b>Bestandteil</b>	<b>Hersteller</b>
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris Base	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
Triton™ X100	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
Trypsin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Trypton aus Casein, granuliert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vitamin C 25 mg/mL	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA
Wasserstoffperoxid 30 %	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Y27632 Rock Inhibitor (RI)	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA

<b>Bestandteil</b>	<b>Hersteller</b>
WNT-Inhibitor IWR1 10 mM	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 3: Sonstiges

Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

### **2.1.2. Puffer und Lösungen**

#### PBS-Puffer

137 mM	Natriumchlorid
8,1 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
2,7 mM	Kaliumchlorid
1,5 mM	Kaliumdihydrogenphosphat

#### TAE-Puffer (50x)

57,1 mL	Essigsäure
18,61 g	EDTA
242,2 g	Tris
1000 mL	Ampuwa®

TAE-Puffer (1x): TAE-Puffer (50x) im Mischungsverhältnis 1:50 mit Ampuwa®.

#### LB-Medium (2 Liter)

10 g	Hefeextrakt
20 g	NaCl
20 g	Trypton
Ad 2 L	ddH <sub>2</sub> O
4 mL	Ampicillin (1:500)

Alle Bestandteile wurden gemischt und auf dem Magnetrührer so lange gerührt, bis alles aufgelöst war. Der pH-Wert wurde auf 7.0 eingestellt. Das fertige Medium wurde schließlich autoklaviert.

#### SOC-Medium

0,5 %	Hefeextrakt
2,0 %	Trypton
10 mM	NaCl
2,5 mM	Kaliumchlorid
20 mM	Glucose
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	MgSO <sub>4</sub>
	Ampuwa®

Das SOC-Medium wurde nach der Herstellung sterilisiert.

#### Agarplatten (1,5 %)

98,5 %	LB-Medium
1,5 %	Agar-Agar
	Ampicillin (1:500)

Das Agar-Agar wurde mit dem LB-Medium vermischt und in der Mikrowelle mehrmals aufgekocht. Das noch warme Medium wurde in die Zellkulturschalen gegossen und erkalten lassen.



#### Ripa-Puffer

150 mM	Natriumchlorid
50 mM	Tris, pH 8,0
1 %	Triton™ X100
0,5 %	Natriumdeoxycholat
0,1 %	SDS

#### Lämmli-Ladepuffer (5x)

250 mM	Tris HCl, pH 6,8
50 %	Glycerin
25 %	β-Mercaptoethanol
10 %	SDS
0,2 %	Bromphenolblau

Dot blot-Puffer (5x) = Lämmli-Puffer ohne Glycerin und Bromphenolblau

250 mM	Tris HCl, pH 6,8
25 %	β-Mercaptoethanol
10 %	SDS

#### Trenngel-Puffer Tris HCl SDS pH 8,8 (4x)

1,5 M	Tris Base
2 g	SDS (0,2 ml 10 % Lösung)

Die Tris Base und das SDS wurden in 300 mL H<sub>2</sub>O aufgelöst. Der gewünschte pH-Wert von 8,8 wurde mit 1M HCl eingestellt. Dann wurde die Lösung mit H<sub>2</sub>O auf 500 mL aufgefüllt.

#### Sammelgel-Puffer Tris HCl SDS pH 6,8 (4x)

0,5 M	Tris HCl
0,4g	SDS (0,4 ml in 10 % SDS Lösung)

TrisHCl und das SDS wurden in 40 mL H<sub>2</sub>O aufgelöst. Der gewünschte pH-Wert von 6,8 wurde mit 1M HCl eingestellt. Dann wurde die Lösung mit H<sub>2</sub>O auf 100 mL aufgefüllt.

Tabelle 4: SDS Page 4x (10 %)

Produkt	Trenngel		Sammelgel	
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	33,2 %	6,25 mL	13 %	0,813 mL
Puffer	24,97 %	4,7 mL	25,6 %	1,6 mL
H <sub>2</sub> O	41,43 %	7,8 mL	60,8 %	3,8 mL
TEMED	0,06 %	0,0125 mL	0,1 %	0,00625 mL
APS 10 %	3,32 %	0,0625 mL	0,5 %	0,03125 mL

Nachdem das Trenngel in die Vorrichtung gegeben worden war, wurde Isopropanol dazugegeben, um die Trenngel-Flüssigkeit waagrecht auszurichten. Nach 30 Minuten Wartezeit war die Polymerisation abgeschlossen und der Isopropanol konnte entfernt werden. Dann wurde das Sammelgel eingefüllt und ebenso für 30 Minuten polymerisieren lassen.

#### SDS-Page Laufpuffer (5x)

125 mM	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
1 M	Glycin
0,5 %	SDS

Die Inhaltsstoffe wurden gemischt und vor Verwendung zu einer 1x Lösung verdünnt.

#### Western Blot Transferpuffer (1x)

25 mM	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid pH 8,3 1M
150 mM	Glycin
10 %	Methanol

#### TBS-T-Puffer (10x)

100 mM	Tris HCl pH 8,3
1,5 mM	NaCl
0,5 %	Tween® 20

TBS-T-Puffer (1x): TBS-T-Puffer (10x) 1:10 mit Ampuwa® ansetzen.

#### Blocking-Lösung Western Blot

95 %	TBS-T (1x)
5 %	Milchpulver

#### ECL I

5 mL	Tris HCl pH 8,5 1M
500 µL	Lumiol
220 µL	PCA
ad 50 mL	dH <sub>2</sub> O

#### ECL II

5 mL	Tris HCl pH 8,5 1M
32 µL	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
ad 50 mL	dH <sub>2</sub> O

#### Ponceau S Lösung

3 %	Trichloressigsäure
0,5 %	Ponceau S

Agarose-Gel (1,5 %)

50 mL	TAE (1x)
0,75 g	GeneticPure Agarose
2,5 µL	Midori Green

Die Agarose wurde in 1x TAE-Lösung unter mehrfachem Aufkochen aufgelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurde Midori Green dazugegeben.

### **2.1.3. Medien, Lösungen und Materialien für die Zellkultur**

Alle Medien, Lösungen und Materialien sind vom Hersteller steril geliefert worden. Selbst gemischte Lösungen wurden vor Verwendung autoklaviert.

#### **Einfriermedium**

Das Einfriermedium wurde kurz vor Benutzung frisch hergestellt. Anhängig von den verwendeten Zellart besteht die Basis dieses Mediums aus FCS oder KO-SR. Bei HEK Zellen ist dies FCS, bei FSIPS-Zellen Knockout™ Serum Replacement.

90 %	FCS oder Knockout™ Serum Replacement
10 %	DMSO

## Medien und Lösungen für die HEK-293T-Zellkultur

### Gelatine-Beschichtung (0,5 %)

10 g	Gelatine-Pulver
2 L	Ampuwa®

Die Mischung wurde 2-3 Stunden leicht erwärmt (unter 40 °C) und geschüttelt bis sich das Pulver aufgelöst hat. Danach wurde die Gelatine-Lösung 1 Stunde bei 100 °C autoklaviert.

### Trypsin-Stammlösung (Konzentration 0,05 % in 0,02 % EDTA)

9,55 g	PBS-Pulver
Ad 900 mL	Ampuwa®
0,2 g	EDTA
0,05 g	Trypsin
Ad 1000 mL	Ampuwa®

Zuerst wurde das PBS-Pulver in Ampuwa® gelöst, dann wurden EDTA und Trypsin zugegeben. Danach wurde das Ganze mit Ampuwa® auf 1 L aufgefüllt und der pH-Wert auf einen Wert von 7,2 eingestellt. Danach wurde die Lösung sterilfiltriert.

Penicillin/Streptomycin (je 10000 U/mL)

9,55 g	PBS-Pulver
6 g	Penicillin
13 g	Streptomycin
Ad 1000 mL	Ampuwa®

Nach dem Einwiegen wurde der pH-Wert auf 5,58 eingestellt, dann sterilfiltriert und aliquotiert. Pen/Strep wurde im Verhältnis 1:100 bis 1:200 eingesetzt.

Advanced HEK-Medium

88 %	Advanced DMEM (1x)
10 %	FCS
2 mM	L-Glutamin

### **Medien und Lösungen für die FSIPS-Zellkultur**

Matrigel-Beschichtung

287 µL	Corning® Matrigel® Matrix
24 mL	DMEM/F12

Die Falcons mit der Corning® Matrigel® Matrix wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurden 287 µL in 24 mL DMEM/F12 gegeben. Pro 6-well-Vertiefung wurden ca. 1 mL der Mischung gegeben. Das Pipettieren erfolgte mit gekühlten Spitzen. Die Platten wurden mit PARAFILM® M umwickelt und ÜN in den Kühlschrank gestellt. Zur Benutzung wurde der Überstand der Beschichtung abgenommen und dann mit Medium (MACS-Medium+ RI) benetzt.

Poly-HEMA-Beschichtung

10 g	Poly (2-hydroxyethyl methacrylate)
500 mL	Ethanol (95 %)

Es wurden 10 g Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) in 500mL Ethanol (95 %) gegeben. Davon wurden je 1 mL auf eine Vertiefung einer 6-well-Platte gegeben und bei RT auf einer Wippe geschwenkt. Vor Verwendung wurde die Beschichtung mit PBS gewaschen.

## MACS-Medium

500 mL	StemMACS™ iPS-Brew XF, human
10 mL	StemMACS™ iPS-Brew XF 50x supplement

## Medien für die Differenzierung von humanen iPS-Zellen

### Kardiomyozyten-Differenzierung

Tabelle 5: Cardiac Basal Medium (CBM)

Produkt	Menge
RPMI 1640	500 mL
B27	10 mL
Vitamin C (142 mmol)	1 mL
β-Mercaptoethanol	1 mL

Tabelle 6: Cardiac Specific Medium (CSM)

Produkt	Menge
RPMI 1640	500 mL
B27 ohne Insulin	10 mL
Vitamin C (142 mmol)	1 mL
β-Mercaptoethanol	1 mL

Tabelle 7: Cardiac Enrichment Medium (CEM)

Produkt	Menge
RPMI 1640, no glucose medium	500 mL
L-Lactat	500 µL

## Neuronale Differenzierung

Tabelle 8: EB3-Medium

Produkt	Menge	Endkonzentration
DMEM/F12 Medium	24 mL	
Neurobasalmedium	24 mL	
B27 ohne Vitamin A	1 mL	1x
N2	0,5 mL	1x
L-Glutamin	0,5 mL	1 %
CHIR99021 10 mM	15 µL	3 µM
SB431542 50 mM	10 µL	10 µM
Dorsomorphin 10 mM	5 µM	1 µM
PMA 10 mM	1,5 µL	

Tabelle 9: EB5-Medium

Produkt	Menge	Endkonzentration
DMEM/F12 Medium	24 mL	
Neurobasalmedium	24 mL	
B27 ohne Vitamin A	1 mL	1x
N2	0,5 mL	1x
L-Glutamin	0,5 mL	1 %
Vitamin C 25 mg/ml in Ampuwa	125 µL	200 µM
CHIR99021 10 mM in DMSO	15 µL	3 µM
PMA 10 mM in DMSO	2,5 µL	



Tabelle 10: EBC-Medium

<b>Produkt</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
DMEM/F12 Medium	24 mL	
Neurobasalmedium	24 mL	
B27 ohne Vitamin A	1 mL	
N2	0,5 mL	
L-Glutamin 100x	0,5 mL	
Vitamin C 25 mg/mL	125 µL	
CHIR99021 10 mM	50 µL	10 µM
Pen/Strep 100x	0,5 mL	1 µM

Tabelle 11: PNS1-Medium

<b>Produkt</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
DMEM/F12 Medium	24 mL	
Neurobasalmedium	24 mL	
B27 ohne Vitamin A	1 mL	1x
N2	0,5 mL	1x
L-Glutamin 100x	0,5 mL	1 %
BMP4 50 µg/mL	10 µL	10 ng/mL

Tabelle 12: PNS2-Medium

Produkt	Menge	Endkonzentration
DMEM/F12 Medium	24 mL	
Neurobasalmedium	24 mL	
B27 ohne Vitamin A	1 mL	1x
N2	0,5 mL	1x
L-Glutamin	0,5 mL	1 %
BDNF 10 µg/mL	50 µL	10 ng/mL
GDNF 10 µg/mL	50 µL	10 ng/mL
dbcAMP	50 µL	500 µM

#### 2.1.4. Immunhistochemie

##### PFA Lösung (4 %)

4 %	PFA
96 %	PBS

##### Blocking-Lösung und Färbe-Lösung

96 %	PBS
4 %	BSA
0,1 %	Triton™ X100

Um die Zellen für intrazelluläre und nukleäre Färbungen zugänglich zu machen, wurde der Blocking- und Färbelösung stets Triton™ X100 zugegeben. Triton™ X100 entfällt bei Oberflächenmarkern.

### Mowiol-Lösung

2,4 g	Mowiol 4-88
6,0 g	Glycerol
6,0 mL	ddH <sub>2</sub> O
12,0 mL	0,2 M Tris-HCL (pH 8,5)
25 mg/mL	DABCO

Das Mowiol 4-88, Glycerol und ddH<sub>2</sub>O wurden gemischt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde TrisHCL dazugegeben und für weitere zwei Stunden bei 50 °C gerührt. Danach wurde DABCO dazugegeben und über Nacht eingerührt. Nach dem Aliquotieren wurde die Lösung bei -20 °C gelagert.

#### **2.1.1. Zelllinien**

Escherichia coli (DH5- $\alpha$ )	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
HEK293T-Zellen	Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA
FSiPS-Zellen	1c/2 p18 von Chee Keong Kwok

### 2.1.2. Primer und Oligonukleotide

sgRNA#1 top bottom	Microsynth SeqLab, Göttingen, Deutschland 5'-CACCCgATGGGTGACTGGAGCGCCTT-3' 5'-AAACAAGGCGCTCCAGTCACCCATc-3'
sgRNA#2 top bottom	Microsynth SeqLab, Göttingen, Deutschland 5'-CACCCgGTTCAAGCCTACTCAACTGC-3' 5'-AAACGCAGTTGAGTAGGCTTGAACc-3'
sgRNA#3 top bottom	Microsynth SeqLab, Göttingen, Deutschland 5'-CACCCgCATTTTCCGAATCCTGCTGC-3' 5'-AAACGCAGCAGGATTCGGAAAATGc-3'
Cx43-primer fwd rev	Microsynth SeqLab, Göttingen, Deutschland 5'-GGACAGGAAGAGTTTGCACT-3' 5'-GCGCACATGAGAGATTGGGAA-3'
dNTPs (je 10 mM)	Genaxxon bioscience, Ulm, Deutschland
U6-fwd-Primer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA 5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC-3'

### 2.1.3. Enzyme und Plasmide

FastDigest Bbl (BbsI)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
GoTaq® G2 DNA Polymerase (5 U/μL)	Promega Corporation, Fitchburg, Wisconsin, USA
Proteinkinase K	Genaxxon bioscience, Ulm, Deutschland
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0	Addgene # 62988, Watertown, Massachusetts, USA
pSpCas9-2A-GFP (PX458)	Addgene # 48138, Watertown, Massachusetts, USA
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μL)	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
T7 DNA-Ligase (3000 U/μL)	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA

## 2.1.4. Antikörper

### Antikörper für die Immunhistochemie

Tabelle 13: Liste der Primärantikörper

Antigen	Gattung	Verdünnung IHC	Verdünnung WB	Hersteller
Anti-Connexin 43	rabbit	1:1000	1:8000	Abcam, Cambridge, UK #ab11370
Anti-β-Aktin	mouse		1:10000	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA #A1978
Anti-Sox2	mouse	1:300		R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA #MAB2018
Anti-Oct-3/4	mouse	1:50		Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA #sc-5279
Anti-Nanog	rabbit	1:100		Cell Signaling Technology, Inc., Massachusetts, Danvers, USA #4903T
Anti-Tra-1-60	mouse	1:100		Abcam, Cambridge, UK #ab16288
Anti-Nestin	mouse	1:100		R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA #MAB1259
Anti-Sox1	goat	1:100		R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA #AF3369
Anti-TUJ1	mouse	1:1000		BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland BLD-801202
Anti-SRA	rabbit	1:100		Abcam, Cambridge, UK #ab68167

<b>Antigen</b>	<b>Gattung</b>	<b>Verdünnung IHC</b>	<b>Verdünnung WB</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-cTnT	mouse	1:200		Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA #MA5-12960

Tabelle 14: Liste der Sekundärintikörper

<b>Antigen</b>	<b>Gattung</b>	<b>Verdünnung IHC</b>	<b>Verdünnung WB</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-mouse Cy™ 3	goat	1:600		DIANOVA GmbH, Hamburg, Deutschland #115-165-003
Anti-rabbit Cy™ 3	goat	1:600		DIANOVA GmbH, Hamburg, Deutschland #111-165-003
Anti-mouse Cy™ 2	goat	1:300		DIANOVA GmbH, Hamburg, Deutschland #115-225-146
Anti-goat Cy™ 3	donkey	1:600		DIANOVA GmbH, Hamburg, Deutschland #705-165-003
Anti-rabbit (POX)	goat		1:10000	DIANOVA GmbH, Hamburg, Deutschland #111-035-003
Anti-mouse (POX)	goat		1:10000	DIANOVA GmbH, Hamburg, Deutschland #115-035-068

### 2.1.5. Kits

Tabelle 15: Kommerziell erhältliche Kits

Kit	Hersteller
100 bp DNA Leiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Neon™ Transfection System (10 und 100 µL) Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NucleoBond® Xtra Maxi Kit	Macherey Nagel, Düren, Deutschland
Quick Start™ Bradford Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega Corporation, Fitchburg, Wisconsin, USA

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Molekularbiologie

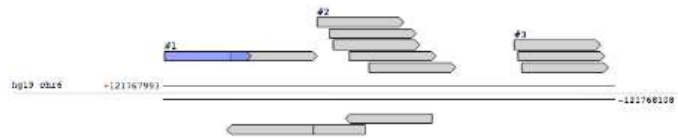
#### Gestaltung der single guide RNAs

Die Gensequenz des Proteins Connexin 43 wurde von der Internetseite des NCBI übernommen (NCBI 2016). Die single guide RNAs wurden mit Hilfe eines CRISPR Design Tools erstellt (Zhang 2019). Hierbei wurden das Exon 2 des Cx43 auf Chromosom 6 in das Programm eingegeben und es wurden potentielle Abschnitte für Genom-Editing kenntlich gemacht (**Abbildung 6**). Diese wurden anhand eines Scores bewertet, der die Spezifität von Cas9 und off-target-Effekte mitberücksichtigt. Je höher der Score, desto geringer sind diese off-target-Effekte und damit unerwünschte Punktmutationen.



## "hCx43"

Interactive results: [mouse over a guide or explore below for details](#)



### all guides

scored by inverse likelihood of offtarget binding  
[mouse over for details](#) [... show legend](#)

	score	sequence
Guide #1	85	ATGGGTGACTGGAGCGCCTT <b>AGG</b>
Guide #2	72	GTTCAGCCTACTCAACTGC <b>TGG</b>
Guide #3	72	CATTTCCGAATCCGTCTGC <b>TGG</b>
Guide #4	67	ATTTTCGGAATCCTGTGCT <b>GGG</b>
Guide #5	50	CAAGCCTACTCAACTGCTGG <b>AGG</b>
Guide #6	44	ANGCCTACTCAACTGCTGGA <b>GGG</b>

### guide #1 quality score: 85

guide sequence: ATGGGTGACTGGAGCGCCTT **AGG**  
 on-target locus: chr6:+121767993  
 number of offtarget sites: 109 (17 are in genes)

#### sequence

GTGTGTGACTGGAGCGCCTAGGG  
 ATGGGAGCCTGGAGCGCCTGGGG  
 GTGGGTGACTGGAGCGCCTGGG  
 ATTGGTGGCTGGAGCGCCTGAG

#### top 20 genome-wide off-target sites

score	mismatches
1.5	3MMs [1:4:20]
0.8	3MMs [6:8:20]
0.8	3MMs [1:9:17]
0.8	3MMs [3:8:15]

**Abbildung 6: Selektion der single guide RNAs.** Vom CRISPR Design Tool werden mehrere single guide RNAs (sgRNAs) berechnet und mit Hilfe eines scores bewertet. Hier werden Guide #1- Guide #5, markiert mit grün, unter Berücksichtigung der off-target-Effekte als geeignet eingestuft. Der Zielsequenz (20 bp lang) folgt die Basenabfolge 5'-NGG-3' (PAM-Sequenz). N steht für ein beliebiges Nukleotid, G steht für Guanin. Rechts oben wird die Lokalisation der sgRNA innerhalb der Cx43-Gensequenz angezeigt (Zhang 2019).

Die Editierung der vom CRISPR Design Tool berechneten Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programmes ApE (Davis 2003). Diese Sequenzen wurden anschließend mit Schnittstellen für das Enzym BbsI versehen. Nach den Restriktionsverdau mit BbsI entstehen Überhänge (sticky ends), welche sich mit den Überhängen des pSpCas9(BB)-2A-Puro-Plasmids aneinanderlagern (**Abbildung 9**). Es wurden jeweils Sequenzen für die Zielsequenz der Guides #1, #2 und #3 bestellt, da ihre Bewertung (in Bezug auf off-target-Effekte) und der Bereich des Genome Editings als positiv angesehen werden konnte. Die Bestellung erfolgte bei der Firma Microsynth Seqlab (Microsynth Seqlab).

### Phosphorylierung und Annealing der sgRNAs

Tabelle 16: Erstellung der sgRNA-Oligonukleotid-Inserts

Komponente	Menge (%)
sgRNA top (100 µM)	5
sgRNA bottom (100 µM)	5
T4 ligation buffer (10x)	5
T4 PNK	5
ddH <sub>2</sub> O	30
Summe	50

Die sgRNA Komponenten (Tabelle 16) wurden mit einer endgültigen Konzentration von 100 µM eingesetzt. Die Phosphorylierung und die Verknüpfung der Stränge erfolgte im Thermocycler (Tabelle 17).

Tabelle 17: Programm Thermocycler zur Erstellung des sgRNA-Oligonukleotid-Inserts

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	37	30
2	95	5
3-16	-5 °C/ min	

Die Phosphorylierung der Nukleotide am 5'-Ende erfolgte bei 37 °C durch die T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK). Im Schritt 2 wurde das Enzym T4 PNK bei 95 °C denaturiert und die Oligonukleotide aufgeschmolzen. Beim Abkühlen um je -5 °C pro Minute lagerten sich die Doppelstränge aneinander.

Nach der Reaktion wurden die verknüpften Oligonukleotide mit raumtemperiertem ddH<sub>2</sub>O 1:200 verdünnt.

### **Die Klonierung der sgRNA-Oligonukleotide in das pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 Plasmid**

Die Restriktion des Plasmids und Ligation der Inserts erfolgte in 2 getrennten Schritten (Tabelle 18 und Tabelle 20).

Tabelle 18: Die Restriktion des pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 Plasmids

Mit Insert	Menge	Negativ Kontrolle	Menge
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	16 µL	Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	18 µL
Buffer G (10x)	2 µL	Buffer G (10x)	2 µL
DNA (1 µg/µL)	1 µL	DNA (1 µg/µL)	1 µL
Bpil (BbsI)	2 µL	-	-

Das Auftrennen des pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 Plasmids erfolgte durch das Enzym Bpil (BbsI) für 180 Minuten bei 37 °C. Im Anschluss wurde das Enzym bei 65 °C für 30 Minuten inaktiviert. Die Reaktionen wurden im Thermocycler durchgeführt (Tabelle 19).

Tabelle 19: Programm Thermocycler für den Restriktionsverdau des Plasmids

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	37	120-180
2	65	30

Tabelle 20: Ligation der sgRNAs in das pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 Plasmid

pSpCas9(BB) geschnitten	Menge		Negativ Kontrolle	Menge	
Restriktionsschritt (siehe oben)	5 %	1 µL	Negativ-Kontrolle - Restriktionsschritt (siehe oben)	5 %	1 µL
Insert	10 %	2 µL	-	-	-
T7 Ligase buffer (2x)	50 %	10 µL	T7 Ligase buffer (2x)	50 %	10 µL
T7 Ligase	5 %	1 µL	T7 Ligase	5 %	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	30 %	6 µL	ddH <sub>2</sub> O	40 %	8 µL

Das Einfügen des Inserts (sgRNA) erfolgte durch das Enzym T7 Ligase (Tabelle 21). Der Negativkontrolle wurde anstatt der sgRNA die gleiche Menge an Wasser dazu gegeben.

Tabelle 21: Programm Thermocycler zur Ligation der sgRNA in das Plasmid

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	25	30

Die Ligation der sgRNAs in das Plasmid erfolgte bei 25 °C für 30 min (Tabelle 21).

### **Herstellung von Glycerinstocks**

Von der Bakteriensuspension *E. coli* (kompetente Zellen) wurden je 8,5 mL abgenommen und auf Eis mit 1,5 mL 98 prozentigem Glycerin gemischt und zu je 1 mL aliquotiert. Die Aliquots wurden sofort in Stickstoff überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### **Transformation der Plasmide in *E. coli***

Die Transformation wurde nach dem Protokoll wie von Ran und seinen Kollegen beschrieben, durchgeführt (Ran et al. 2013b). Die Transformation erfolgte mit einem kompetenten *Escherichia coli*-Stamm (DH5- $\alpha$ ). Zu Beginn wurden 2,5  $\mu$ L des pSpCas9-Plasmids mit zuvor einklonierter sgRNA zu 25  $\mu$ L kompetenten Zellen gegeben. Diese Mischung wurde zunächst für 10 Minuten auf Eis inkubiert (4 °C). Danach wurde der Ansatz für 30 Sekunden auf 42 °C erwärmt und dann direkt wieder zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Schließlich wurden 100  $\mu$ L SOC-Medium dazu gegeben und auf LB-Agar-Agar-Platten mit Ampicillin (2  $\mu$ g/ml) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Als Negativkontrolle diente hier die Reaktion mit einem Plasmid mit Wasser statt sgRNA.

### **Kolonien picken**

Um eine große Menge der klonierten Plasmide zu erhalten, wurden diese in einem Nährmedium vermehrt. Von jeder Agarose-Platte wurden mit einer Pipettenspitze isoliert liegende, gut ausgeprägte Kolonien aufgenommen. Die Spitze wurde anschließend in 200 mL LB-Medium mit Ampicillin abgeworfen. Die

Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 300 rpm in einem Schikanekolben. Zum Erhalt der Kolonien diente eine Replika-Platte. Nach der Inkubationszeit von ca. 12 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung wurde die Platte im Kühlschrank gelagert.

### **Aufreinigung von Plasmid-DNA mittels Maxiprep**

Die DNA-Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des Kits NucleoBond® Xtra Maxi EF nach Herstellerangaben. Es wurden die mL-Angaben für die ‚High-Copy‘ Aufreinigung angewendet. Das angeimpfte LB-Medium wurde nach der Inkubation über Nacht bei 4000 \* g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um die Bakterienzellen zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden anschließend lysiert. Das entstandene Präzipitat wurde nach der Neutralisierung auf einen NucleoBond® Xtra Säulen-Filter aufgetragen. Nach dem ersten Waschvorgang wurde der Filter entfernt. Es folgen 2 weitere Waschschrte. Die DNA wurde schließlich eluiert und in einem Falcon aufgefangen. Um die DNA auszufällen wurde Isopropanol dazugegeben. Die Mischung wurde nun bei 4500 \* g bei 4 °C ÜN zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit Endotoxin-freiem Ethanol (70 %) gewaschen und wieder zentrifugiert. Dies geschah bei 4500 \* g für 1 Stunde bei 4 °C. Der Ethanol-Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet trocknete bei Raumtemperatur unter der Sterilbank. Das Pellet wurde zuletzt in 300 µL sterilem Wasser auf dem Schüttler aufgelöst. Per Gel-Elektrophorese wurde die Integrität der sgRNA im Plasmid nachgewiesen. Im NanoDrop wurde der DNA-Gehalt gemessen.

### **Sequenzierung der Plasmid-DNA**

Anschließend wurde das Plasmid sequenziert, um die Integrität der sgRNA nachzuweisen. Die Plasmide wurden dazu so verdünnt, dass eine DNA-Konzentration von 100 ng/µL erreicht wurde. Die Sequenzierung (Sanger Sequencing) wurde von der Firma Microsynth SeqLab durchgeführt. Die Analyse der Sequenzierungs-Ergebnisse erfolgte mittels der frei erhältlichen Software ApE (Davis 2003).

## **Immunfluoreszenz-Färbung**

Die Zellen wurden zuerst mit PBS gewaschen. Der zweite Schritt, die Fixierung, erfolgte für 5-10 Minuten mittels PFA (4 %). Danach folgten erneut 3 Waschschrirte mit PBS. Um nicht-spezifische Bindungen der Antikörper zu reduzieren, wurden entsprechende Epitope für 1 Stunde bei RT mittels einer entsprechenden Blockierlösung abgesättigt. Der erste Antikörper wurde in Blockierlösung verdünnt und verblieb anschließend über Nacht bei 4 °C auf den Zellen. Danach folgten erneut 3 Waschschrirte mit PBS. Schließlich wurde das Präparat mit dem zweiten Antikörper in Blockierlösung für 1 Stunde in der Dunkelkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurden die Zellen nochmals 2 Mal in PBS gewaschen. Um eine Kernfärbung zu erhalten wurden die Zellen für 5-10 Minuten mit DAPI behandelt. Im Anschluss daran erfolgten 2 Waschschrirte mit PBS und 2 mit ddH<sub>2</sub>O. Die Zellen wurden am Ende mit Mowiol+Dabco auf Objektträgern fixiert und somit konserviert.

## **Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten wurde nach der Methode nach Bradford durchgeführt (Bradford 1976). Diese Methode nutzt den Farbumschlag des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brilliant-Blue G-250. Der Farbumschlag ist durch die Komplexbildung in saurer Lösung bedingt und kann photometrisch nachgewiesen werden. Nach einer Inkubationszeit für 5 Minuten wurde die optische Dichte durch eine photometrische Messung bei 600 nm bestimmt. Nach der Erstellung einer Eichgeraden (Tabelle 22) konnten die Konzentrationen der Proben bestimmt werden (Tabelle 23).

Tabelle 22: Eichgerade für die Proteinbestimmung nach Bradford

Eichgerade	0 µg	2 µg	4 µg	6 µg	8 µg	10 µg	12 µg
<b>BSA (100 ng/mL)</b> [µL]	0	20	40	60	80	100	120
<b>Ripa-Puffer [µL]</b>	2	2	2	2	2	2	2
<b>H<sub>2</sub>O [µL]</b>	98	78	58	38	18	0	0
<b>1x Bio-Rad Protein Assay [µL]</b>	900						

Tabelle 23: Probenzusammensetzung für die Proteinbestimmung nach Bradford

Probe	
<b>Lysat [µL]</b>	2
<b>H<sub>2</sub>O [µL]</b>	98
<b>1x Bio-Rad Protein Assay [µL]</b>	900

### Proteinextrakt

Das Zellpellet wurde mit einer adäquaten Menge Ripa-Puffer versetzt. Um den Proteingehalt der Probe zu messen wurde die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Die Proben wurden dann mit 5x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Um den Zellüberstand zu sedimentieren wurden die Proben nach dem Vortexen bei 1700 \* g für 5 Minuten zentrifugiert.

### SDS-Page

Nach dem Auftragen der Proben wurde die Gelelektrophorese zu Beginn bei 20 mA durchgeführt. Nachdem die Front des Bromphenol-Farbstoffes des Probenpuffers das Trenngel erreicht hatte wurde die Spannung auf 25 mA erhöht.



## **Western Blot (Semidry)**

Vor dem Blotten wurden insgesamt 6 zugeschnittene Whatman Filterpapiere in Western Blot-Transferpuffer eingeweicht. Die Schichtung wurde wie beschrieben durchgeführt.

Kathode

3 Whatman Filterpapiere

Western Blot Gel

Nitrozellulose Membran

3 Whatman Filterpapiere

Anode

Der Vorgang des Blottens wurde bei 1,0 A/25 V für 30 Minuten im Trans-Blot® Turbo™ Transfersystem durchgeführt.

## **Detektion**

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver (Blocking-Lösung für Western Blot) für 1 Stunde bei RT geblockt. Die Primärantikörper in der Blocking-Lösung gelöst, erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C. Vor der Zugabe des jeweiligen Zweitantikörpers (ebenfalls in Blocking-Lösung für Western Blot gelöst) wurde die Membran 3 Mal für 5 Minuten mit 1x TBS-T gewaschen. Die Inkubation des Zweitantikörpers erfolgte bei RT für 1 Stunde.

## **Dot Blot**

Das Zelllysat (HEK293T-Zellen plus Ripa-Puffer) wurde mit einer adäquaten Menge Dot Blot-Puffer gemischt und für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Es wurden pro Probe jeweils 1 µL Lysat auf mit Bleistift markierte Bereiche der Nitrozellulose Membran aufgetragen und trocknen lassen. Nach Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurde der Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen wurde die Membran für 1 Stunde bei RT mit dem Zweitantikörper inkubiert und abschließend entwickelt.

## **Bildentwicklung Western Blot und Dot Blot**

Die Entwicklerlösung (ECL I und ECL II) wurde im Verhältnis 1:1 gemischt und für 1 Minute auf die Nitrozellulose Membran gegeben und geschwenkt. Danach wurde die Membran auf eine Platte gelegt und mit Folie blasenfrei abgedeckt. Danach erfolgte die Entwicklung des Bildes.

## Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Tabelle 24: Ansatz für Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bestandteil	Endvolumen ( $\mu\text{l}$ )
5x Green GoTaq® Flexi Buffer	10
MgCl <sub>2</sub> Lösung 25 mM	2
PCR Nukleotid Mix, je 10 mM	1
upstream primer (1 $\mu\text{M}$ )	0,5
downstream primer (1 $\mu\text{M}$ )	0,5
GoTaq® G2 DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,25
template DNA (<0,5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ )	1
Nuclease-freies Wasser	Ad 50 $\mu\text{L}$

Tabelle 25: Programm für PCR im Thermocycler

Schritt	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Zeit (min)	Zyklen
Einleitende Denaturierung	95	2	1
Denaturierung	95	0,5	35
Annealing	50	0,5	
Erweiterung	72	0,5	
Finale Erweiterung	72	5	1

## Agarose-Gel

Die Agarose wurde in 1x TAE-Lösung unter mehrfachem Aufkochen aufgelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60  $^{\circ}\text{C}$  wurde Midori Green dazugegeben und das Gel wurde in die Elektrophoresekammer gegossen. Nach dem Festwerden des Gels konnte die Elektrophoresekammer mit 1x TAE befüllt werden. Danach

wurden die Taschen mit den PCR-Proben beladen. Die angelegte Spannung betrug die ersten 3 Minuten 90 V, dann wurde sie auf 110 V erhöht.

### **Banden aus Agarose-Gel ausschneiden**

Die Banden des Gels wurden unter dem UV-Licht sichtbar gemacht. Entsprechende Banden wurden mit dem Skalpell exakt ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

### **Miniprep**

Die DNA-Extraktion aus den Banden des Gels erfolgte mit Hilfe des Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems.

### **Sequenzierung**

Tabelle 26: Pipettierschema für die Sequenzierung von PCR-Proben

<b>DNA template</b>	<b>Konzentration (ng/μL)</b>	<b>Effektive Menge (ng) pro 12μL</b>	<b>H<sub>2</sub>O ad</b>
PCR ca. 400 bp	6,0	72	12 μL
Primer separat	10 pmol		3 μL

Die Proben wurden, wie in Tabelle 26 beschrieben, gemischt. Die Sequenzierung wurde von der Firma Microsynth SeqLab durchgeführt.

## **2.2.2. Zellkultur**

### **2.2.2.1. Beschichtung der Zellkulturschalen**

#### **Matrigel-Beschichtung**

Für die Kultivierung der induzierten pluripotenten Stammzellen wurden die Zellkulturplatten bzw. Deckgläschen mit Corning® Matrigel® Matrix, hESC-qualified (hESC-MG), beschichtet. Die Stock-Konzentration und Verdünnung erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Die Beschichtung erfolgte mit gekühlten Pipettenspitzen, um ein vorzeitiges Festwerden der Matrix zu

verhindern. Die Platten wurden mindestens eine Nacht jedoch maximal 2 Wochen im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Alternativ kann die Inkubation für 2 h bei RT oder für 30 Minuten bei 37 °C erfolgen. Vor Benutzung der Platten wurden diese nochmals für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, um eine optimale Benetzung zu garantieren.

### **Gelatine-Beschichtung**

Die Gelatine wurde in PBS verdünnt und autoklaviert. Die mit dieser Gelatine-Lösung beschichteten Platten wurden für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert.

### **Poly-HEMA-Beschichtung**

Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) wurde in Ethanol (95 %) gegeben. Davon wurden je 1 mL auf eine Vertiefung einer 6-well-Platte gegeben und bei RT auf einer Wippe geschwenkt. Vor Verwendung wurde die Beschichtung mit PBS gewaschen.

#### **2.2.2.2. Kultur von HEK293T-Zellen**

In dieser Arbeit wurden humane embryonale Nierenzellen der Linie HEK293T verwendet. Damit sich die Zellen an der Zellkulturschale anheften konnten, wurde diese 10 Minuten vor dem Aussäen der Zellen mit 0,1 % Gelatinelösung beschichtet und inkubiert.

Die Zellen wurden in HEK-Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank kultiviert. Das Kulturmedium musste alle 2 Tage ausgetauscht werden.

#### **Passagieren von HEK293T-Zellen**

Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen passagiert. Die Zellen wurden zunächst einmal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden sie mit Trypsinlösung versetzt und für 3 bis 5 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert, um sowohl die Zell-Zell-Kontakte wie auch die Verbindung von den

Zellen zur Schalenbeschichtung zu lösen. Um die Wirkung der Trypsinlösung abzustoppen wurde anschließend die 3-fache Menge an HEK-Medium zur Trypsinlösung dazu gegeben. Zur Sedimentation wurde die Suspension für 3 Minuten bei 900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das verbliebene Zell-Sediment wurde in frischem HEK-Medium aufgenommen und die vereinzelt Zellen auf einer neuen Kulturschale ausgesät. HEK-293T-Zellen wurden im Verhältnis 1:5 bis 1:10 gesplittet.

### **Einfrieren und Auftauen von HEK293T-Zellen**

Die Zellen wurden zunächst einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsinlösung versetzt und inkubiert. Um die Trypsinierung abzustoppen, wurde die 3-fache Menge der eingesetzten Trypsinlösung an HEK-Medium zugegeben. Zur Sedimentation wurde die Suspension für 3 Minuten bei 900 rpm zentrifugiert. Der Überstand, in welchem sich auch das Trypsin befindet, wurde abgesaugt und verworfen. Diese oben genannten Schritte sind analog zum Passagiervorgang. Dann wurde das Zellpellet mit HEK-Einfriermedium aufgenommen und auf Kryoröhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen wurden in einem Einfrierbehälter bei -80 °C eingefroren. Nach wenigen Tagen konnten die Kryoröhrchen mit den Zellen in einen Stickstoffbehälter überführt werden und sonach dauerhaft gelagert werden.

Um die HEK283T-Zellen erneut in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad gehalten. Noch bevor die Zell-Einfriermedium-Suspension komplett aufgetaut war, wurde 1 mL DMEM/F12 Medium zugegeben und schließlich wurde die komplett aufgetaute Lösung in 6 mL DMEM/F12 Medium aufgenommen. Die Zentrifugation geschah für 3 Minuten bei 900 rpm. Der Überstand, in welchem sich auch das Einfriermedium befand, wurde abgesaugt und verworfen. Die sedimentierten HEK-Zellen wurden in frisches HEK-Medium aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde dann auf gelatinierte Zellkulturschalen ausplattiert.

### **2.2.2.3. Kultur von FSiPS-Zellen**

Die in dieser Arbeit verwendeten hiPSCS-Zellen (FSiPS-Zellen) wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank inkubiert. Die Zellkulturplatten wurden mindestens 1 Tag vor dem Ausplattieren mit Corning® Matrigel® Matrix beschichtet und über Nacht bei 4 °C oder für 30 Minuten bei 37 °C aufbewahrt. Als Kulturmedium wurde MACS-Medium verwendet. Das Medium wurde täglich gewechselt. Am ersten Tag wurde 10 µM Rho-assoziierte Kinase-Inhibitor Y27632 (RI) beigefügt.

### **Passagieren von FSiPS-Zellen**

Waren die FSiPS-Zellen zu einer Konfluenz von 80-100 % herangewachsen, konnten sie passagiert werden. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von Accutase wurden die Zell-Zell-Kontakte und die Kontakte zur Zellkulturschale gelöst. Die Inkubation der Accutase erfolgte für 5 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank. Die Reaktion der Accutase wurde mit der 3-fachen Menge an DMEM/F12 Medium abgestoppt. Um die Accutase zu entfernen, wurde die Zell-Accutase-Suspension für 3 Minuten bei 900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die Zellen aus dem Zellsediment wurden dann in frisches Medium aufgenommen und vereinzelt. Danach konnten die Zellen erneut auf Kulturschalen mit MACS-Medium und Y27632 Rock Inhibitor ausgesät werden. FSiPS-Zellen können im Verhältnis 1:6 bis 1:10 replattiert werden.

### **Einfrieren und Auftauen der FSiPS-Zellen**

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Mit Hilfe von Accutase wurden die Zellen vom Plattenboden und voneinander gelöst. Dies geschah während der Inkubationszeit der Accutase von 5 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung. Die Accutase-Reaktion wurde durch Zugabe von DMEM/F12 Medium abgestoppt. Durch die Zentrifugation von 3 Minuten bei 900 rpm wurden die Zellen sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde in 4 mL Einfriermedium aufgenommen, welches zu 10 % aus DMSO und zu 90 % aus KO-Serum Replacement bestand. Jeweils 1 mL davon

wurden in ein vorbeschriftetes Kryoröhrchen gegeben und in einem Einfrierbehälter bei -80 °C eingefroren. Nach wenigen Tagen konnten die Kryoröhrchen mit den Zellen in einen Stickstoffbehälter überführt werden und so dauerhaft gelagert werden.

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad gehalten. Kurz bevor die Zell-Einfriermedium-Suspension komplett aufgetaut war wurde zur Verdünnung 1 mL DMEM/F12 Medium zugegeben und diese Mischung in 6 mL DMEM/F12 Medium aufgenommen. Die Trennung der Zellen vom Einfriermedium erfolgte für 3 Minuten Zentrifugationszeit bei 900 rpm. Das abzentrifugierte Medium wurde abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden dann auf eine 6-well-Platte mit frischem MACS-Medium und Y27632 Rock Inhibitor (10 µM) gegeben.

#### **2.2.2.4. Elektroporation**

2 Stunden vor der geplanten Elektroporation wurde bei den Zellen das Medium gewechselt.

Kurz bevor die Zellen abgelöst wurden, wurden 10 cm<sup>2</sup> große Zellkulturschalen mit Corning® Matrigel® Matrix beschichtet und mit MACS-Medium und Y27632 Rock Inhibitor (10 µM) versehen. Zudem wurde die gewünschte DNA Menge in Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt (25 µg DNA gesamt pro Reaktion).

Zuerst wurden die zu 80 % konfluenten Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen und dann mit Accutase abgelöst. Die Inkubationszeit der Accutase betrug 3 Minuten bei 37 °C. Die Wirkungsweise der Accutase wurde mit DMEM/F12 Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 900 rpm für 3 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überschuss wurde verworfen und das Sediment wurde zum Zählen in PBS aufgenommen. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt. Zum Zählen wurden die Zellen in eine Neubauer-Zählkammer aufgenommen. Die gewollten Zellmengen (Tabelle 27) wurden dann in Falcons überführt und nochmals zentrifugiert (900 rpm, 3 min, 4 °C). Der Überschuss wurde wiederum abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde dann in Puffer R aufgenommen und mit der vorbereiteten DNA vermischt. Eine schnelle



Arbeitsweise war ab diesem Zeitpunkt essenziell. Das Gemisch aus Zellen, DNA und Puffer B wurde luftblasenfrei in eine Neon 100  $\mu\text{L}$  Spitze aufgenommen und in die Nucleofector Küvette des Neon Transfection Systems überführt. Diese Küvette war zuvor mit 3 mL Puffer E befüllt worden. Schließlich folgte die Elektroporation mit den eingestellten Parametern für die jeweiligen Zellen (Tabelle 27). Dann wurde die Neon-Spitze direkt aus der Küvette entnommen und die Zellsuspension auf die zuvor vorbereitete 10  $\text{cm}^2$  große Zellkulturschale gegeben. Um die Zellen gut auf der Schale zu verteilen, wurde sie mehrmals geschwenkt. Dann wurden die elektroporierten Zellen für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Um nicht transfizierte Zellen abzutöten, erfolgte 1 Tag nach dem Aussäen und Adhäsion der Zellen ein Selektionieren mittels Puromycin (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) für 24 h.

Tabelle 27: Parameter für die Elektroporation

Zellen	Impulsspannung (V)	Impulslänge (ms)	Impulszahl	Zelldichte	Neon Tip ( $\mu\text{L}$ ) = Puffer R
HEK293T	1150	20	2	$5 \times 10^6$	10
FSIPS	1200	20	2	$2,5 \times 10^6$	100

### Picken der Zell-Kolonien

Die Zellkolonien waren nach ca. 7 Tagen so groß, um sie mit einer Pipettenspitze zur weiteren Expansion aufnehmen zu können. Das Picken erfolgte unter dem Mikroskop an der Sterilbank. Die Dichte der Kolonien sollte möglichst gering sein, um eine monoklonale Expansion zu ermöglichen. Die Kolonien wurden mit der einer 100  $\mu\text{L}$  Pipettenspitze vorsichtig abgelöst, aufgesaugt und in eine Vertiefung einer 96-well Platte mit MACS+Y27632 Rock Inhibitor (10  $\mu\text{M}$ ) überführt. Beim Überführen wurde der Inhalt mehrmals auf- und abpipettiert. Die

Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Der Mediumwechsel mit MACS erfolgte täglich.

### **Limited dilution cloning**

Um eine monoklonale Zellkultur der HEK293T-Zellen zu erzeugen, wurden die Zellen vereinzelt auf eine 96-well Platte ausgesät. Im Gegensatz zum originalen Limiting dilution cloning, welches auf einer Verdünnungsreihe basiert, wurde die Zellsuspension in der vorliegenden Arbeit so verdünnt, dass statistisch gesehen, in jedes well der 96-well Platte 0,8 Zellen gegeben wurden. Vertiefungen, in denen mehr als eine Zelle oder gar keine Zelle wuchs, wurden 24 Stunden später verworfen.

### **Expansion der Kolonien**

Nach 7-10 Tagen konnten die Kolonien von der 96-well Platte im Verhältnis 1:2 auf eine 48-well Platte gesplittet werden. Sobald die Zellen auf der 48-well Platte wiederum bis zu 80 % konfluent waren, wurden sie im Verhältnis 1:1 oder 1:2 auf eine 24-well Platte gesplittet. Dieser Vorgang wurde von der 24-well Platte über die 12-well Platte bis hin zur 6-well Platte fortgeführt. Schließlich wurden die Zellen eingefroren.

#### **2.2.2.5. Differenzierung der iPS-Zellen**

##### **Kardiomyozyten-Differenzierung aus humanen iPS-Zellen**

Für die Differenzierung wurden beschichtete Kultur-Platten (Corning® Matrigel® Matrix) mit 80-90 % konfluenten iPS-Zellen und MACS-Medium verwendet. An Tag 0 wurden diese gesplittet und je 3 Millionen Zellen pro 6-well Vertiefung ausgesät.

An Tag 1 folgte ein Mediumwechsel mit dem Cardiac Basal Medium (CBM) (Tabelle 5), welches mit dem BMP4 mit der Konzentration von 25 ng/mL und CHIR99021 (5 µM) versetzt war.

An Tag 2 folgte ein Mediumwechsel mit CBM und CHIR99021 (5 µM).

An Tag 3 wurde das Cadiac Specific Medium (CSM) (Tabelle 6) zu den Zellen gegeben.

An Tag 4 folgte ein Medium, bestehend aus dem CSM und dem WNT-Inhibitor IWR1 (10 mM).

In den darauffolgenden 6 bis 8 Tagen wurde ein täglicher Mediumwechsel mit CSM+WNT-Inhibitor IWR1 (10 mM) vorgenommen. In dieser Phase sollten die Zellen nun zu schlagen beginnen. Sobald die Zellen anfangen zu schlagen, wurden die Zellen wieder 4 bis 5 Tage mit CBM versetzt. Der Mediumwechsel erfolgte hier täglich. Danach (4 bis 5 Tage nach Beginn des Herzschlages) wurde dann ein täglicher Mediumwechsel mit dem Cardiac Enrichment Medium (CEM) (Tabelle 7) fortgeführt.

### **Neuronale Differenzierung aus humanen iPS-Zellen**

Die iPS-Zellen wurden bis zum Start der Differenzierung in MACS-Medium (+RI) kultiviert. An Tag 1 wurden die Zellen mit Hilfe von Accutase abgelöst und geplittet. Es wurden jeweils 350 000 Zellen auf eine Vertiefung einer 6-well Platte, welche mit Poly-HEMA beschichtet war, ausgesät. In jede Vertiefung wurden je 1,5 mL EB3-Medium (Tabelle 8) gegeben. Den Zellen wurde es möglich eine 3-dimensionale Formation einzugehen.

Bis Tag 3 bzw. 4 erfolgte jeden Tag ein Mediumwechsel mit dem EB3-Medium (3D-Kultur).

An Tag 5 wurde schließlich zu dem EB5-Medium (Tabelle 9) gewechselt. Bis zu diesem Tag befanden sich die Zellen im iPS-Stadium.

Am 6. Tag sollten die Zellen wieder zu einer 2D-Kultur gebracht werden. Hierzu wurden die 3D-Sphären zunächst in 15 mL Röhrchen überführt. Nach 5 Minuten Wartezeit waren diese zum Boden des Röhrchens abgesunken und der Überstand wurde abgezogen. Schließlich wurde 1 mL Accutase zu dem verbliebenen Pellet gegeben und das Röhrchen geschüttelt. Danach wurde das Röhrchen 5 bis 7 Minuten in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt und

währenddessen hin und wieder geschüttelt. Nach Entnahme aus dem Wasserbad wurde die Zellen-Accutase- Mischung nochmals mit einer großen Pipettenspitze resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 900 rpm für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment wurde mit EB5-Medium resuspendiert und anschließend auf Corning® Matrigel® Matrix-beschichtete 6-well Kulturplatten ausgesät. In das Medium wurde abschließend RI (Konzentration 1:1000) zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung. Ab Tag 6 bezeichnete man die Zellen als neuronale epitheliale Vorläuferzellen.

Ab Tag 7 bis Tag 16 folgte ein täglicher Mediumwechsel mit EB5-Medium, bei Bedarf wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 gesplittet. Zur Erhaltung der Kultur wurde ein Teil der Zellen eingefroren.

An Tag 17 und 18 befanden sich die Zellen im Neuralleistenstadium und benötigten EBC-Medium. Danach können P27-Färbungen vorgenommen werden.

Am darauffolgenden Tag, an Tag 19, wurden mindestens 50 000 Zellen auf eine Vertiefung einer 12-well Kulturplatte (mit Corning® Matrigel® Matrix beschichtet) ausgesät. Es wurde nun PNS1-Medium zu den Zellen gegeben.

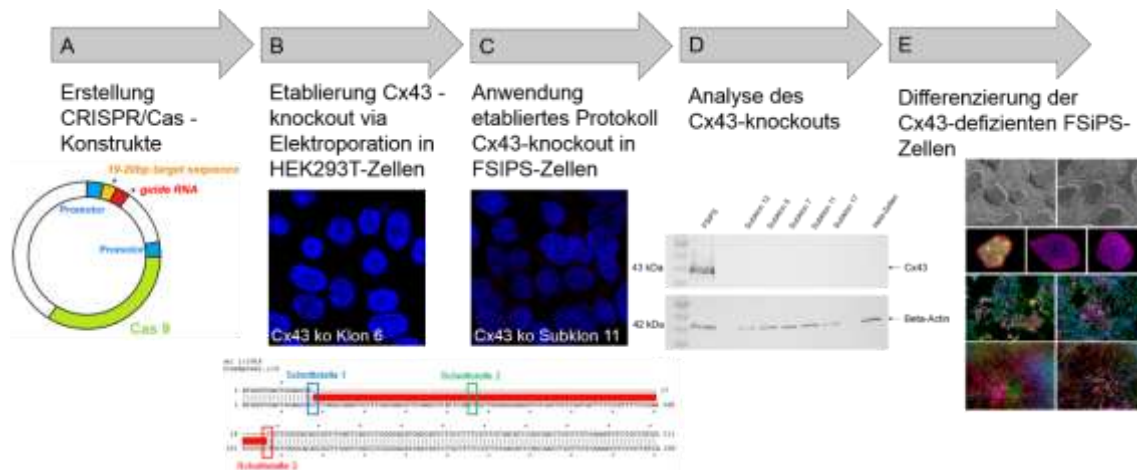
Bis zum Tag 27 wurde ein täglicher Mediumwechsel mit PNS1-Medium (Tabelle 11) durchgeführt. Von Tag 19 bis 27 befanden sich die Zellen im PNS1-Stadium.

Ab Tag 28 wurden den Zellen mit PNS2-Medium (Tabelle 12) zugegeben, sie befanden sich nun im PNS2-Stadium.

### 3. Ergebnisse

Für die Generierung zweier unterschiedlicher Cx43-Defektmutanten in humanen induzierten pluripotenten Stammzellen wurden FSiPS-Zellen verwendet. Bei diesen Zellen speziell handelt es sich um aus der Vorhaut stammende reprogrammierte Fibroblasten (foreskin derived induced pluripotent stem cells: FSiPS).

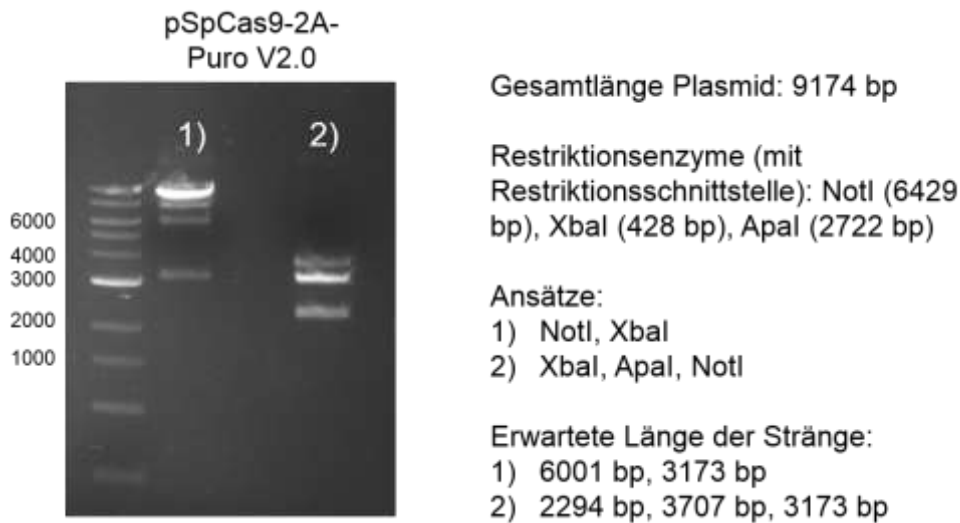
Zu Beginn mussten die CRISPR/Cas9-Konstrukte für die Connexin 43-Defektmutanten mit Hilfe eines CRISPR Design Tools geplant und anschließend ein entsprechender Vektor kloniert werden. Dann sollte eine Transfektion von Zellen mit dem CRISPR/Cas9-Plasmid erfolgen. Um die Methode zu etablieren, wurden die knockouts zuerst in HEK293T-Zellen vollzogen. Nachdem die Methode gesichert und erfolgreich in HEK293T-Zellen durchgeführt werden konnte, wurde dieses Protokoll an die pluripotenten Stammzellen (FSiPS) angepasst und schließlich angewendet. Anschließend erfolgte der Nachweis der Cx43-Defektmutanten. Zuletzt wurden die Cx43-defizienten FSiPS-Zellen in Kardiomyozyten und Neurone differenziert und mittels Immunofluoreszenzfärbung charakterisiert (**Abbildung 7**).



**Abbildung 7: Programmablaufplan zur Erstellung der Cx43-Defektmutanten in FSiPS-Zellen.** A Planung und Konstruktion der single guide RNAs (sgRNAs) mit Hilfe des CRISPR Design Tools und eines Plasmid Editors, Klonieren der sgRNA in das CRISPR/Cas9-Konstrukt. B Testen der Transfektionsmethoden und Analyse der Cx43-knockouts in HEK-293T-Zellen. C Erzeugung der Cx43-Defektmutanten in FSiPS-Zellen. D Analyse der FSiPS-Defektmutanten. E Differenzierung der Cx43-defizienten FSiPS-Zellen in Kardiomyozyten und Neurone.

### 3.1. Die Erstellung eines funktionsfähigen CRISPR/Cas9-Konstruktes

Das Plasmid pSpCas9(BB)-2A-Puro V2.0 wurde von der Firma Addgene erworben (Ran et al. 2013b). Zur Überprüfung des gelieferten Plasmids wurde ein Restriktionsverdau mit verschiedenen Enzymen durchgeführt. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe Gelelektrophorese (**Abbildung 8**). Die Banden, die die Länge der Plasmid-Fragmente widerspiegeln wurden mit den zu erwartenden Bandenlängen verglichen.



**Abbildung 8: Probe-Restriktion von pSpCas9(BB)-2A-Puro V2.0.** Bei dem Restriktionsverdau wurden zwei verschiedene Proben (1 und 2) angesetzt. Das Plasmid wurde im Ansatz 1 mit den Restriktionsenzymen NotI und XbaI versetzt, beim Ansatz 2 zusätzlich mit dem Enzym ApaI. Die Banden zeigen, dass die erwartete Länge der einzelnen Stränge mit den zuvor berechneten Längen übereinstimmt. Bei der Bande bei Ansatz 1, welche ein Signal auf der Höhe von ca. 9000 bp zeigt, handelt es sich wahrscheinlich um das unverdaute Plasmid oder das Plasmid in der supercoiled Formation.

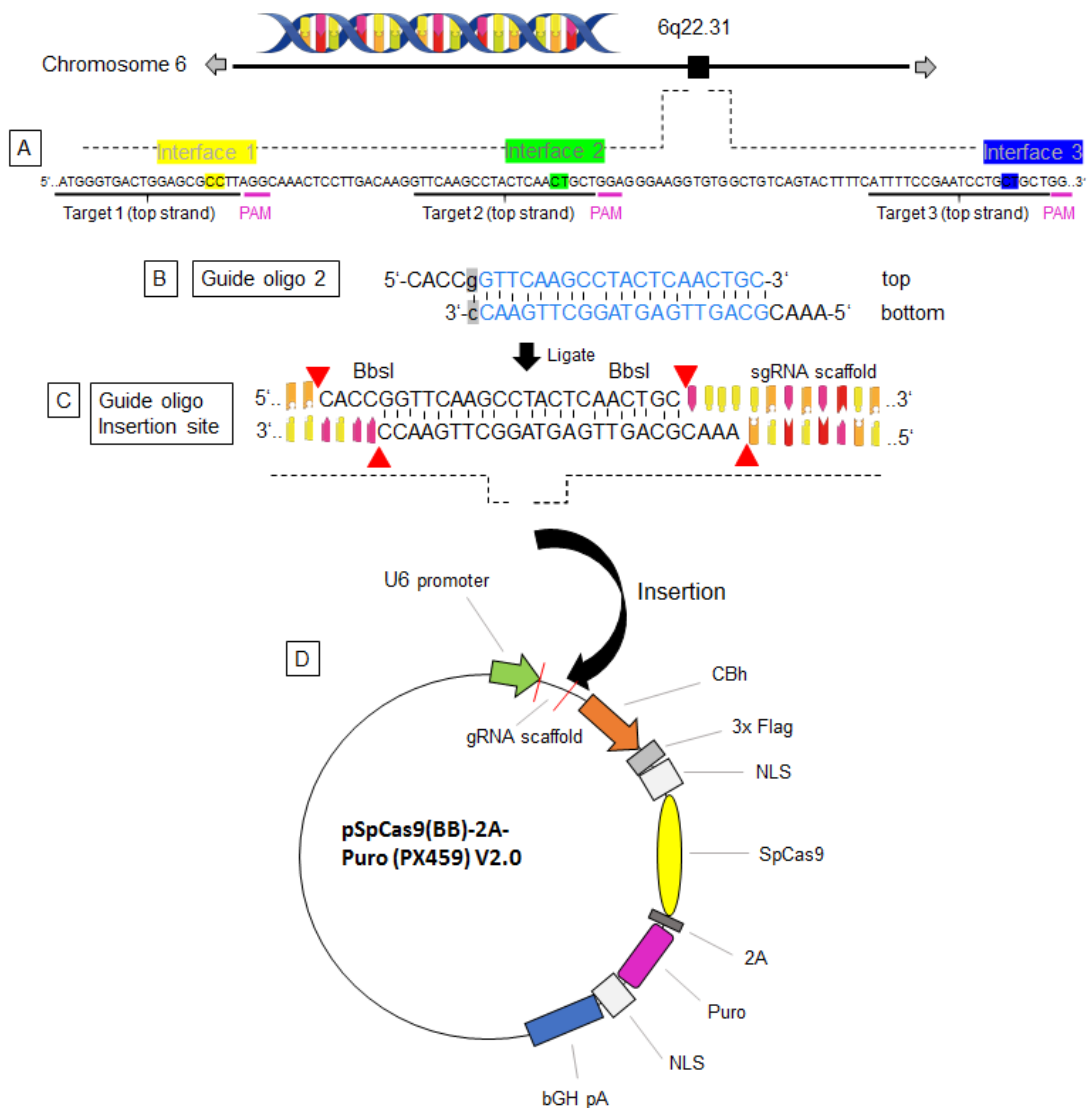
Nach der Sicherstellung, dass es sich um das Plasmid pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 handelt, konnte dieses nun für die Erzeugung der Cx43-Defektmutanten eingesetzt werden.

Zur Erzeugung der Cx43-Defektmutanten in FSiPS-Zellen wurde nach dem Protokoll „Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system“ verfahren (Ran et al. 2013b).

Als Erstes wurde die Gensequenz von Cx43 aus der Gendatenbank des NCBI extrahiert (NCBI 2016) und mit Hilfe eines CRISPR Design Tools (Zhang 2019) mögliche guide RNA-Sequenzen ermittelt. Dabei wurden diese so gewählt, dass bei der Verwendung von je 2 sgRNA-Paaren gezielte Deletionen im Anfangsabschnitt der kodierenden Region von Cx43 auf Exon 2 entstehen (Seite 45). Die Deletionen führen in der Folge entweder zu einer Leserasterverschiebung und der Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Codons bzw. eines Nonsense-Peptids oder zur gezielten Deletion von 13 Aminosäuren

im Bereich des N-Terminus. Am Ende wurden Guide #1, Guide #2 und Guide #3 ausgewählt und wie folgt modifiziert. Da der U6 RNA-Polymerase III Promoter, welcher die Expression der sgRNA kontrolliert, Guanin (G) als erste Nukleinbase bevorzugt (Guschin et al. 2010), wurde ein zusätzliches Guanin an die 20-nt Sequenz (guide-Sequenz) angehängt. Zusätzlich wurden Überhänge für die Integration in das pSpCas9(BB)-2A-Puro Plasmid angehängt (sticky ends). Diese Überhänge lauten jeweils für den Leitstrang 5'-CACCC-3' und für den Folgestrang 5'-AAAC-3' (**Abbildung 9 B**) und sind komplementär zu den Überhängen des linearisierten pSpCas9(BB)-2A-Puro-Plasmids, welche durch den BbsI-Verdau entstehen. Um die finalen sgRNA-Inserts zu erhalten, wurden zunächst die separat synthetisierten top und bottom Stränge erhitzt und durch langsames Abkühlen komplementär gepaart.





**Abbildung 9: Design der sgRNAs und Klonierung in pSpCas9 Plasmid (Beispiel anhand sgRNA 2).** A Geplante Schnittstellen (1 in gelb, 2 in grün, 3 in blau) und die dazugehörigen Zielsequenzen. Den Zielsequenzen geht jeweils eine PAM-Sequenz voraus (5'-NGG-3' für *S. pyogenes*). Zur besseren Übersicht ist nur der Leitstrang dargestellt. Guide Oligonukleotide mit Überhängen für die Verknüpfung mit dem pSpCas9(BB)-Plasmid. Ein zusätzliches G-C-Paar (grau) wird am 5'-Ende für den U6 RNA Polymerase III Promoter hinzugefügt. Die Überhänge an den 5'-Enden entstehen durch den Verdau mit BbsI. C und D Insertion der sgRNA in das pSpCas9(BB)-2A-Puro Plasmid. Teile dieses Schemas bestehen aus grafischen Elementen der Bilddatenbank Servier Medical Art, die unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (CC BY 3.0) lizenziert sind (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0>).

Im Anschluss erfolgte der Restriktionsverdau des Plasmides mittels BbsI und die Ligation der doppelsträngigen sgRNA-Matrize in das Plasmid. Zur

Vervielfältigung des CRISPR/Cas9-Konstrukts wurde dieses in kompetente Zellen (*E. coli* DH5- $\alpha$ ) transformiert. Dabei wird ausgenutzt, dass Prokaryonten fremde DNA aufnehmen und sowohl ihre eigene DNA wie auch die Fremde replizieren. Die Bakterienzellen wurden nach der Transformation auf einem Nährmedium ausplattiert. Am nächsten Tag wurden Bakterienkolonien gepickt. Diese Kolonien wurden über Nacht in LB-Medium inkubiert und somit vervielfältigt. Die Isolation der DNA erfolgte schließlich über eine Maxiprep (NucleoBond Xtra). Um die Integrität der sgRNA nachzuweisen, wurde das Plasmid anschließend sequenziert.

### 3.2. Die Transfektion der Zellen via Elektroporation

Der Plasmidtransfer sowohl in HEK-, als auch in FSiPS-Zellen, erfolgte via Elektroporation. Die Elektroporation bewirkt durch Erzeugung eines elektrischen Feldes eine temporäre Permeabilisierung der Zellmembran (Neumann et al. 1982). Es wurde das Gerät und das dazugehörige Elektroporationskit Neon™ Transfection System verwendet. Um beide gewünschten Defektmutanten in einem einzigen Ansatz erzeugen zu können, wurden die 3 unterschiedlichen Plasmide im Verhältnis 1:1:1 gemischt. Zusätzlich wurde ein eGFP-kodierendes Kontrollplasmid beigemischt, um den Transfektionserfolg zu kontrollieren (Tabelle 28).

Tabelle 28: Ansätze für die Elektroporation

Ansatz	DNA (Gesamt DNA-Gehalt 25 $\mu$ g)
1	Plasmide mit sgRNA 1+ sgRNA 2+ sgRNA 3 (1:1:1)
2	Plasmide mit sgRNA 1+ sgRNA 2+ sgRNA 3 + GFP-Plasmid (1:1:1:1)
3	GFP-Plasmid
Kontrolle	H <sub>2</sub> O (ohne DNA)

Dann erfolgte direkt danach die Elektroporation mit den angegebenen Parametern (Tabelle 29).

Tabelle 29: Parameter für die Elektroporation

Zellen	Impulsspannung (V)	Impulslänge (ms)	Impulszahl	Zelldichte	Neon Tip (µL) = Puffer R
HEK293T	1150	20	2	$5 \times 10^6$	10
FSiPS	1200	20	2	$2,5 \times 10^6$	100

### Die Kultivierung der Zellen nach Elektroporation

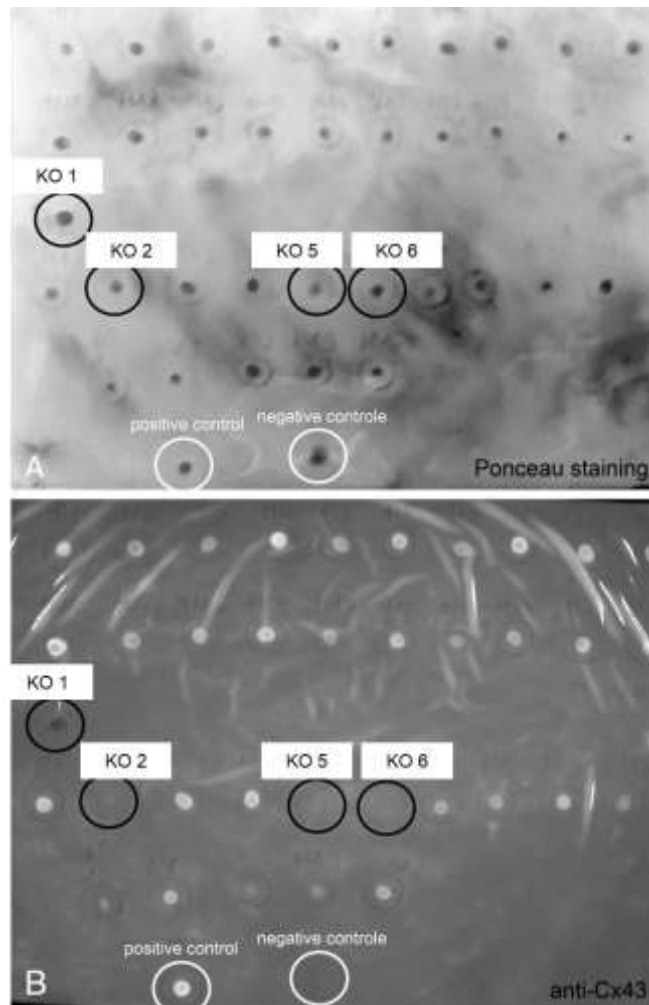
Die HEK-Zellen wurden nach der Elektroporation nach dem Verfahren des *limiting dilution cloning* vereinzelt in eine 96-well Platte gegeben. Dazu wurde die Zellsuspension so verdünnt, dass statistisch gesehen 0,8 Zellen pro Vertiefung einer 96-well Platte pipettiert werden. Ziel dieses Verfahrens war die Erzeugung monoklonaler Kolonien. Nach visueller Überprüfung nach 1 bis 2 Tagen wurden alle Vertiefungen ohne Zellen oder mit mehreren Zellen verworfen. Die Vertiefungen mit monoklonalen Kolonien konnten nach ca. 7-10 Tagen auf größere Platten gesplittet werden. Bei weiterem Wachstum wurden die Kolonien dann stetig auf größere Gewebekulturplatten gesetzt und expandiert. Für die Selektion der Cx43-negativen Kolonien wurde eine Dot Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Cx43 durchgeführt.

Bei den Stammzellen wurden sowohl für die Expansion der Kolonien als auch für die Selektion der Cx43-negativen Zellen andere Methoden angewandt. Die FSiPS Zellen wurden nach der Elektroporation in 10 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen äußerst dünn ausgesät. Dadurch kam es zum Heranwachsen monoklonaler Kolonien. Diese einzelnstehenden Kolonien wurden nach ca. 7 Tagen unter dem Mikroskop einzeln mit der Spitze einer 100 µL Pipette abgelöst und jede Kolonie

einzelnen aufgesaugt und in eine separate Vertiefung einer 96-well Platte überführt. Nachdem die 96-well Platten zu 70-100 % konfluent bewachsen waren, wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 aufgeteilt. Ein Teil wurde für die Erhaltungskultur erneut ausgesät, der andere Teil wurde sedimentiert. Die im Zellsediment erhaltene DNA wurde mittels PCR-Analyse untersucht. Dabei wurden Primer verwendet, welche bei einer Deletion im Cx43 Locus verglichen mit der Wildtyp Situation Banden in unterschiedlicher Länge generierten. Vielversprechende Kolonien wurden anschließend immunhistochemisch analysiert und deren DNA mit Hinblick auf den Cx43-Locus sequenziert.

### **3.2.1. Selektion der HEK-Kolonien mittels eines Dot Blots**

Mittels einer Dot Blot-Analyse wurden die Kolonien auf eine Cx43-Defizienz überprüft und selektiert. Die Schritte des Dot Blots sind äquivalent zu den Schritten der Immunoblot-Analyse nach dem Proteintransfer. Es wurde von jeder Kolonie ein Zelllysate hergestellt und je 1 µL punktförmig auf eine Nitrozellulose Membran aufgetragen.



**Abbildung 10: Dot Blot der transfizierten HEK293T-Kolonien.** A Ladekontrolle (Ponceau-Färbung), B Dot Blot gegen Cx43. Als Positiv-Kontrolle wurden Wildtyp HEK293T-Zellen verwendet, als Negativ-Kontrolle dienten Cx43-negative HeLa-Zellen. Die meisten Kolonien in B zeigen ein Signal für Cx43. Die ausgewählten Kolonien KO 1, KO 2, KO 5, KO 6 scheinen Cx43-negativ, die Ladekontrolle zeigt für diese Kolonien ein positives Signal.

Der vorliegende Dot Blot (**Abbildung 10**) zeigt bei 4 von 36 Proben kein Signal der Cx43-Antikörperfärbungen (KO 1, KO 2, KO 5 und KO 6). Die Ladekontrolle hingegen zeigt ein positives Signal.

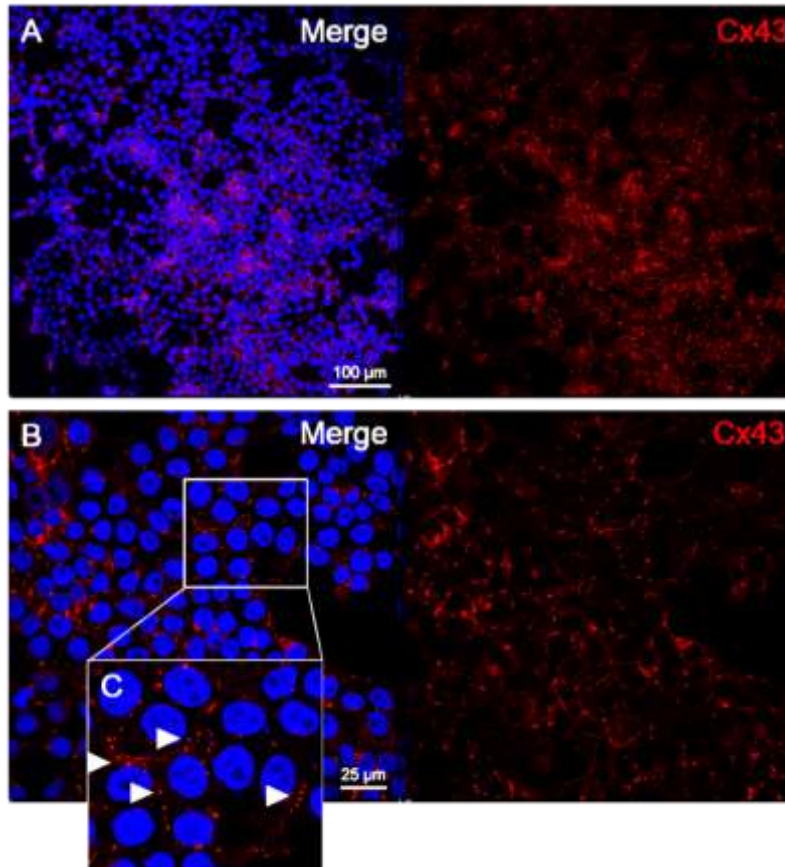
KO 2, KO 5 und KO 6 wurden schließlich für weitere Analysen ausgewählt. Außerdem wurde ein weiterer Klon (WT 1) mit vorhandenem Cx43-Signal als Wildtyp-Kontrolle ausgewählt.

### **3.2.2. Die Analyse des Cx43-KO in HEK-Zellen**

Für die Analyse der ausgewählten Klone sollten immunhistochemische Färbungen, Sequenzierungen und Western Blots zum Nachweis der Deletion im Cx43-Gen durchgeführt werden.

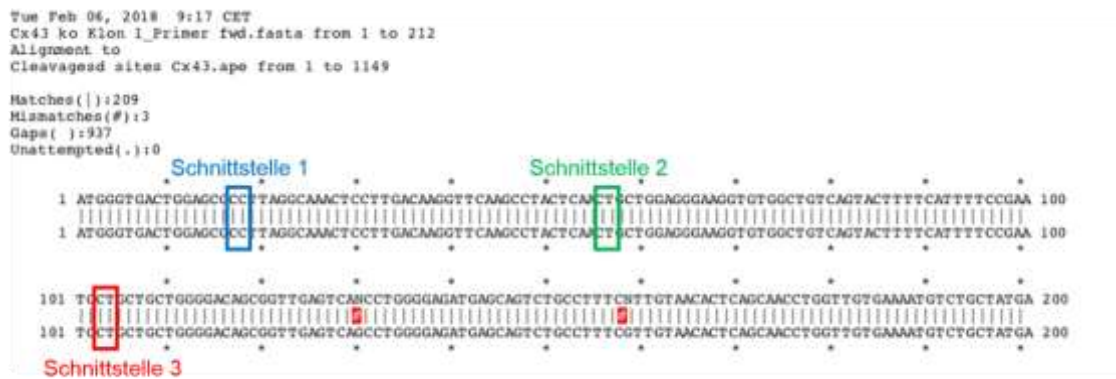
#### **Immunfluoreszenz Analyse der HEK-Klone und Sequenzierung**

Um die Ergebnisse des Dot Blots zu bestätigen, wurden zunächst Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Die Zellkerne wurden jeweils mit DAPI gegengefärbt. Die anschließende Sequenzierung des Cx43-Genlocus wurde von der Firma Seqlab Microsynth durchgeführt.



**Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung von HEK293T-Zellen (Wildtyp).** Färbung der Wildtyp HEK293T-Zellen (Positiv Kontrolle). Die Detektion der Primärantikörper erfolgte jeweils mittels eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers. Die HEK293T-Zellen zeigen das typische Erscheinungsbild von Connexin 43 mit perlschnurartig aufgereihten Cx43-positiven Gap Junctions, welche die Zellen miteinander verbinden (Pfeile).

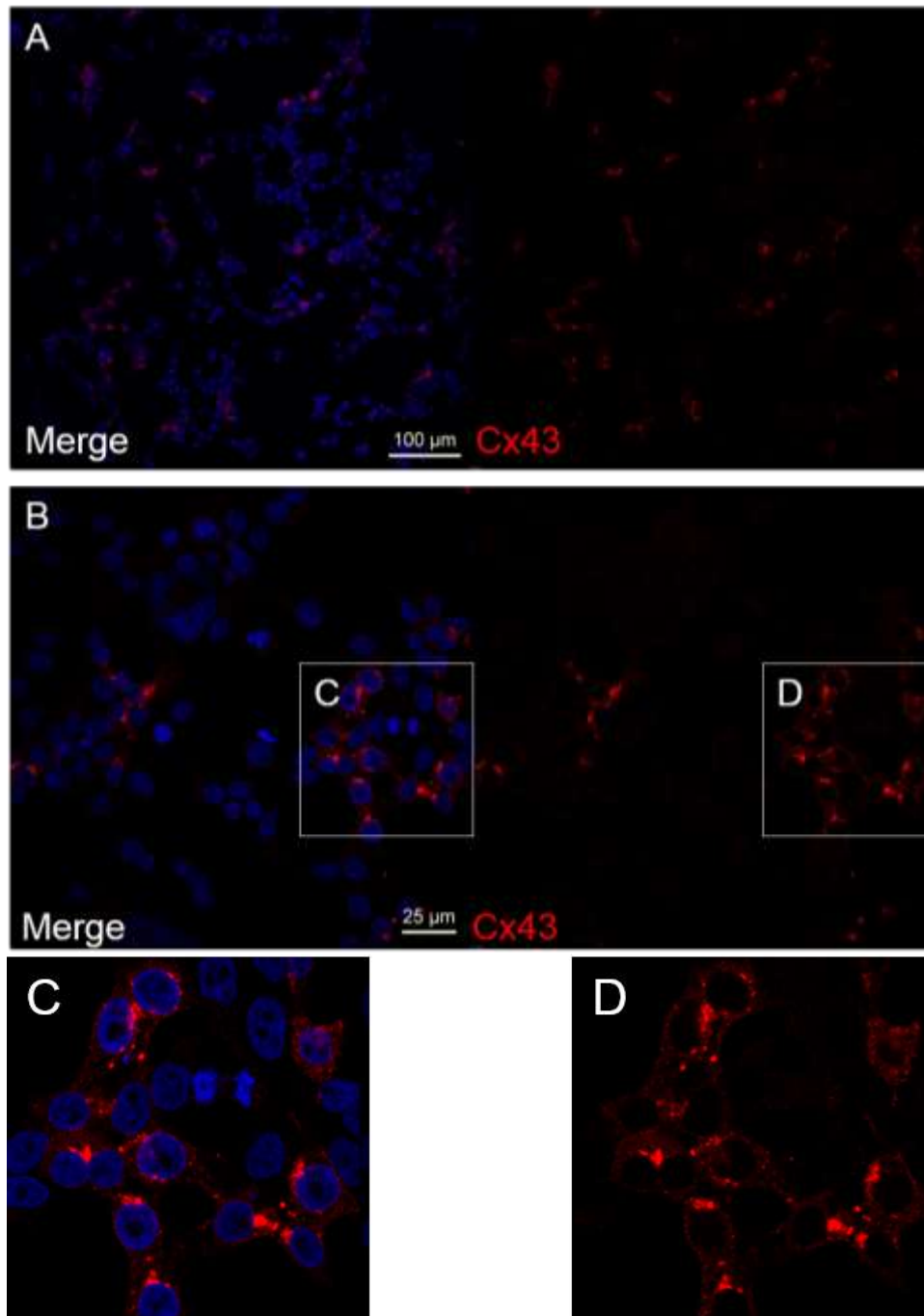
Die Wildtyp HEK293T-Zellen in **Abbildung 11** zeigen das typische Bild der Cx43-positiven Gap Junctions. Die Gap Junction Kanäle bilden Plaques in der Zellmembran woraus sich das typische punktförmige Färbemuster ergibt. Dort grenzen jeweils die Zellmembranen der Zellen aneinander und werden so durch die Kanäle zu einer funktionellen Einheit gekoppelt.



**Abbildung 12: Sequenzierungsergebnisse der HEK293T-Positiv-Kontrolle.** Der sequenzierte Abschnitt der DNA der Positiv-Kontrolle der HEK293T-Zellen (WT) zeigt, dass die Abschnitte zwischen den Schnittstellen vorhanden sind.

Das Sequenzierungsergebnis der Positiv-Kontrolle der HEK293T-Zellen (**Abbildung 12**) zeigt, dass der volle DNA-Abschnitt innerhalb des Gens, welches für Cx43 kodiert, vorhanden ist. Die Abschnitte zwischen Schnittstelle 1, 2 und 3 sind komplett zu sehen. Der Buchstabe N im Bereich der roten Raute stehen für ein beliebiges Nukleotid. Hier konnte bei der Sequenzierung kein bestimmtes Nukleotid identifiziert werden. Da dieses nicht identifizierbare Nukleotid außerhalb des Bereiches zwischen den Schnittstellen liegt, ist dies hier irrelevant.

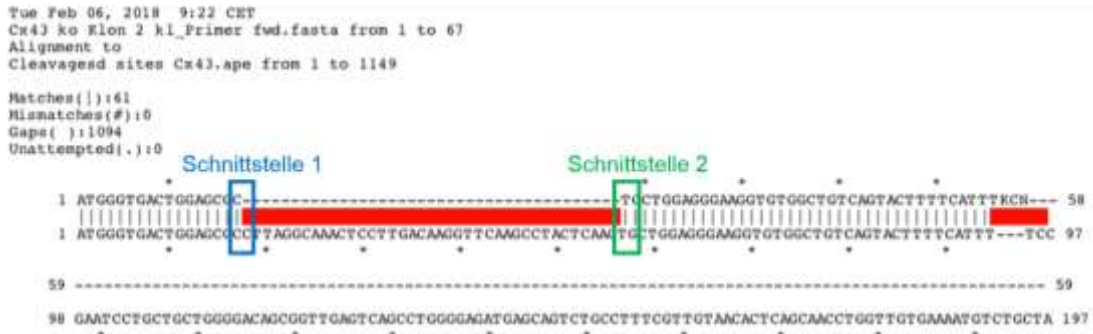




**Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung von HEK293T-Zellen Klon 2.** A Gesamtübersicht Klon 2. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte jeweils mittels eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers. B Vergrößerung mit Ausschnitten. Cx43-positive Bereiche befinden sich im Zytoplasma.

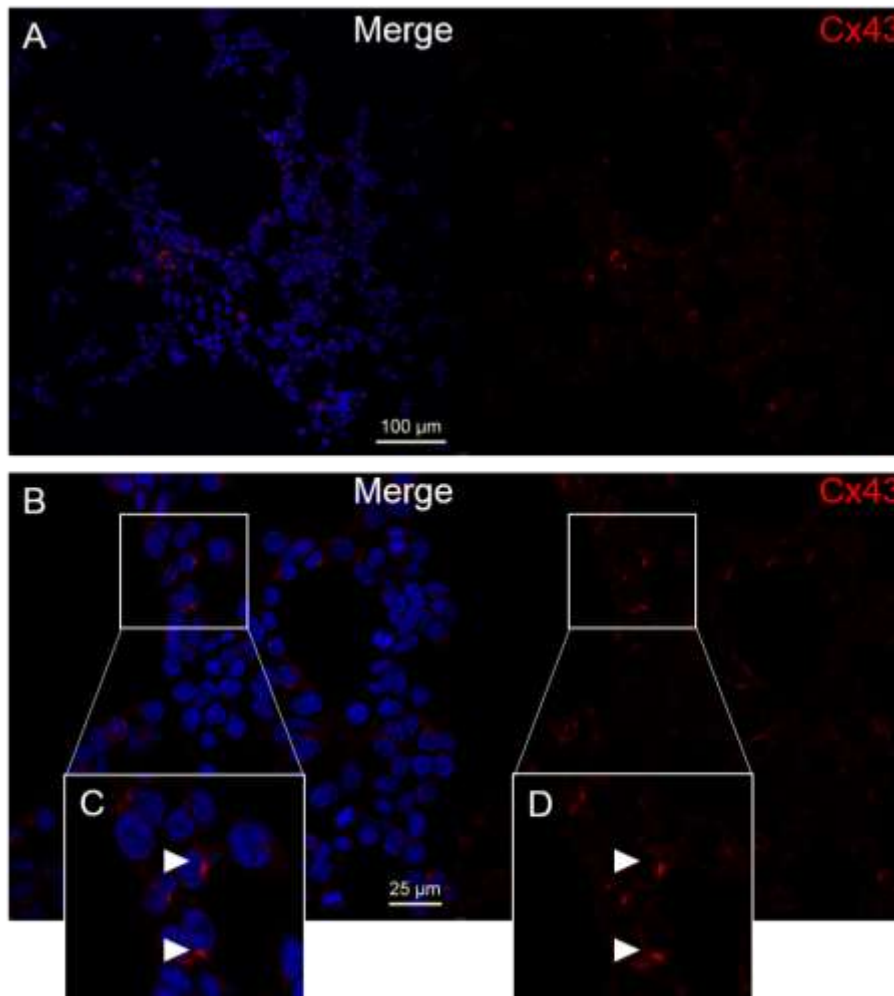
Bei Klon 2 der transfizierten HEK293T-Zellen (**Abbildung 13**) lässt sich im Vergleich zum Wildtyp kein typisches Cx43-Färbemuster erkennen. Es zeigen sich hier einzelne Gruppen von Zellen mit Cx43-positiven Signalen, andere Zellen wiederum zeigen kein Signal. In den positiven Zellen befindet sich das

Signal jedoch nicht an der Zellmembran, sondern als untypisches Färbemuster im Inneren der Zelle, meist im perinukleären Bereich lokalisiert.



**Abbildung 14: Sequenzierungsergebnisse des Klon 2 der HEK293T-Zellen.** Die Sequenz zeigt, dass der DNA-Bereich zwischen der Schnittstelle 1 und 2 fehlt.

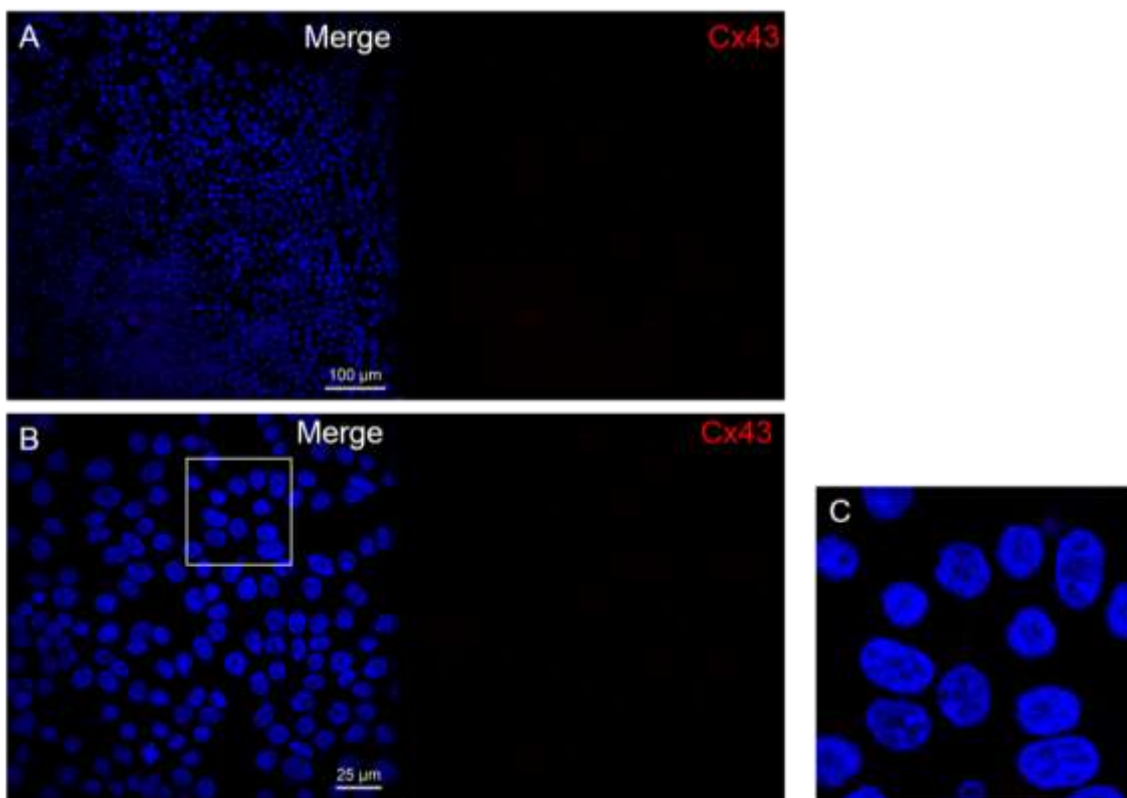
Die Sequenzierungsergebnisse des Klon 2 (**Abbildung 14**) zeigen den Verlust des Bereichs zwischen Schnittstelle 1 und Schnittstelle 2. Hierbei sind 39 Basen deletiert worden. Da 39 ein Vielfaches der Zahl 3 darstellt, führt diese Mutation nicht zu einer Leserasterverschiebung, sondern zu einer Trunkierung der N-terminalen Domäne. Die Schnittstelle 3 ist hier nicht mehr zu erkennen, da die Sequenzierung vorher abbrach.



**Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung von HEK293T-Zellen Klon 5.** A Übersichtsbild Klon 5. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte jeweils mittels eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers. C und D Vergrößerte Ansicht. Cx43-positive Bereiche sind in direkter Nähe zum Nukleus zu finden.

Bei Betrachtung der immunhistochemischen Färbung des Klon 5 der HEK293T-Zellen (**Abbildung 15**) wird sichtbar, dass die Cx43-positiven Bereiche nicht an der Zellmembran lokalisiert sind, sondern in der direkten Nähe zum Nukleus. Bei Klon 2 der HEK293T-Zellen war dies ebenfalls der Fall. Auch hier gibt es neben den Cx43-negativen Zellen auch Cx43-positive Zellen. Im Vergleich mit Klon 2 (**Abbildung 13**) fällt auf, dass bei Klon 5 mehr Zellen Cx43-positiv zu sein scheinen.

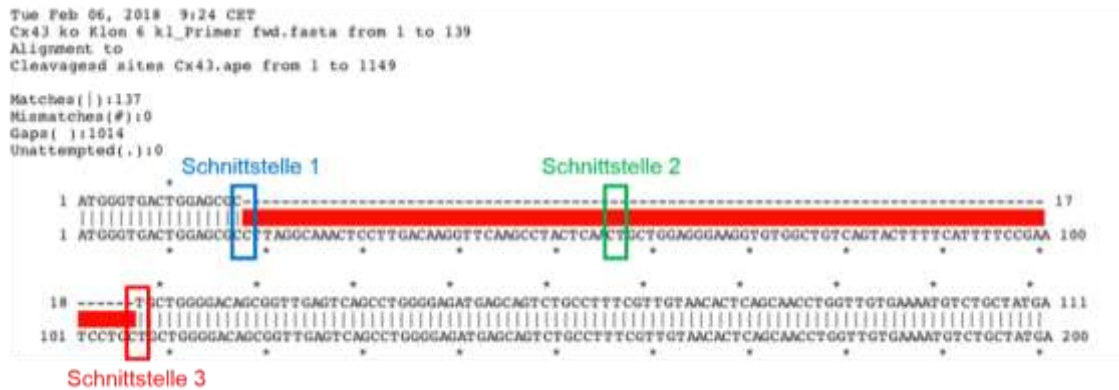
Da sowohl Klon 2 als auch Klon 5 ein sehr ähnliches Erscheinungsbild zeigen, kam der Verdacht auf, dass es sich um die gleiche Mutation handeln könnte. Bei der Sequenzierung bestätigte sich dieser Verdacht. Bei beiden Klonen fehlt der DNA-Abschnitt zwischen der Schnittstelle der sgRNA 1 und der Schnittstelle der sgRNA 2 (Deletion von 39 bp). Aus Übersichtsgründen wird hier auf die Darstellung der Sequenzierung des Klon 5 verzichtet. Trotz des kompletten Mischens der Plasmide mit sgRNA 1, sgRNA 2 und sgRNA 3 konnte keine Deletion zwischen Schnittstelle 2 und 3 provoziert werden.



**Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung von HEK293T-Zellen Klon 6.** A Übersicht Klon 6. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte jeweils mittels eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers. C Ausschnitt aus B. Es sind keine Cx43-positiven Bereiche erkennbar.

Klon 6 zeigt in der Übersicht (B) ein Cx43-negatives Erscheinungsbild (**Abbildung 16**). Cx43-positive Signale sind weder im Bereich der Zellmembran noch intrazellulär zu erkennen. Auch im vergrößerten Ausschnitt (C) bestätigt sich dieses Bild. Der Klon scheint in der immunhistochemischen Färbung

komplett Cx43-negativ zu sein. Um dies weiter zu bestätigen, wurde eine Sequenzierung durchgeführt.

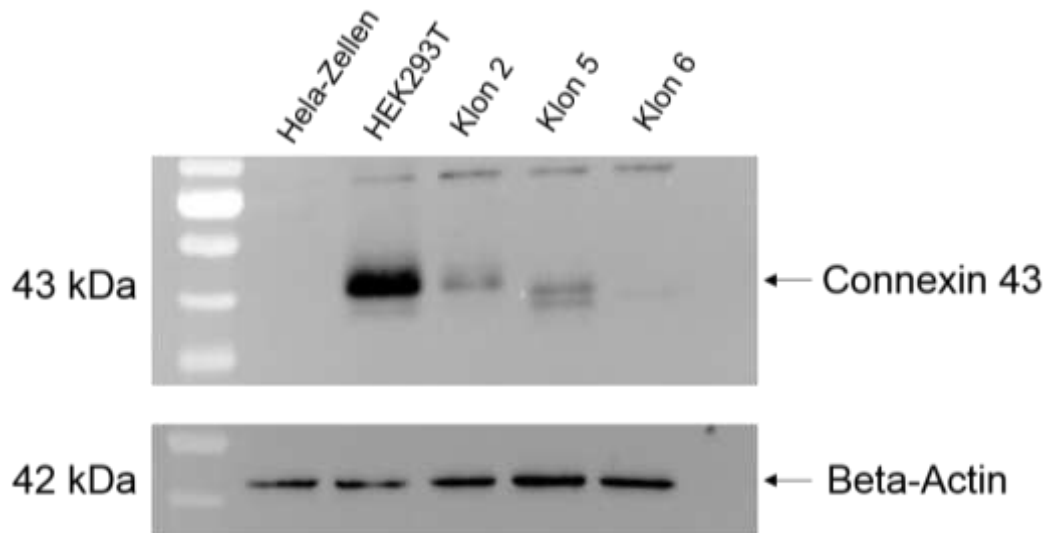


**Abbildung 17: Sequenzierungsergebnisse des Klon 6 der HEK293T-Zellen.** Aus der Sequenzierung ergibt sich, dass der DNA-Abschnitt zwischen der Schnittstelle der sgRNA 1 und der Schnittstelle der sgRNA 3 verloren gegangen ist.

Die Sequenzierung des Klon 6 (**Abbildung 17**) zeigte, dass der komplette Bereich zwischen Schnittstelle 1 und Schnittstelle 3 deletiert worden ist. Dieser Bereich umfasst 89 bp. Da 89 kein Vielfaches von 3 darstellt, führt dies zu einer Leserasterverschiebung. Somit kann kein funktionstüchtiges Protein entstehen.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde von den Klonen 2, 5 und 6 ein Proteinnachweis mittels Western Blot-Analyse durchgeführt.

## Proteinnachweis mittels Western Blot-Analyse



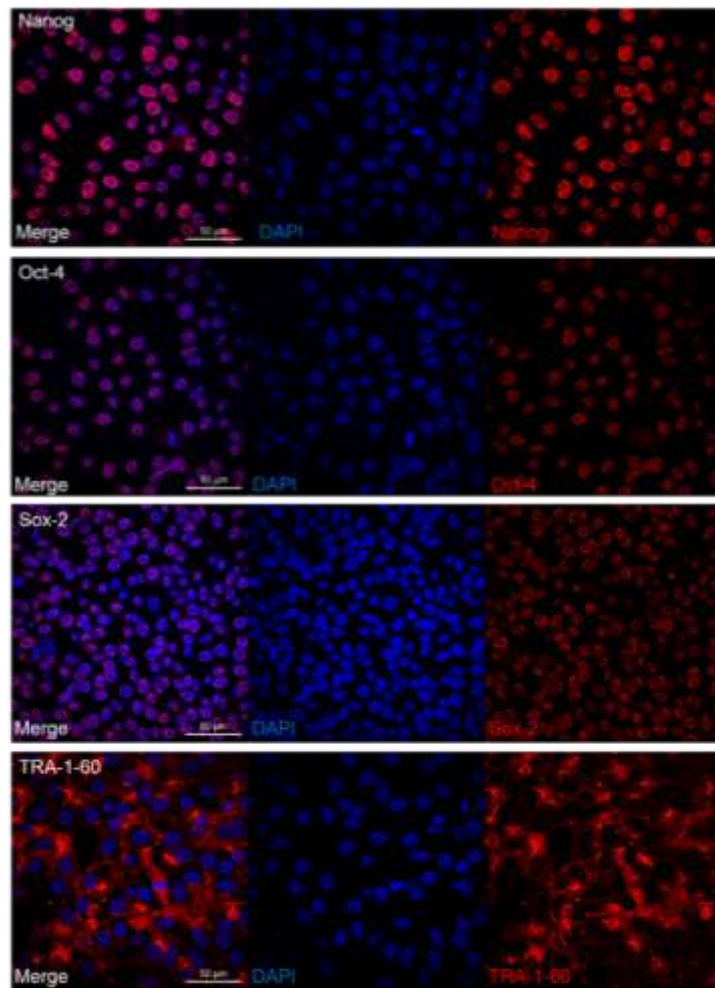
**Abbildung 18: Analyse der Cx43-Genexpression der HEK293T-Klone mittels Western Blot Analyse.** Nachweis von Cx43 durch die Western Blot Analyse. Als Negativ-Kontrolle dienten HeLa-Zellen, als Positiv-Kontrolle dienten nicht-transfizierte HEK293T-Zellen. Als Ladekontrolle diente der  $\beta$ -Aktin-Nachweis.

Die vorliegende Western Blot Analyse (**Abbildung 18**) zeigt die Cx43-Proteinexpression von HeLa-Zellen, HEK293T-Zellen und von den HEK-Klonen 2, 5 und 6. Es lässt sich erkennen, dass die Cx43-defizienten HeLa-Zellen keine Bande bei 43 kDa aufweisen, die Wildtyp-HEK-Zellen hingegen zeigen eine deutlich sichtbar breite Bande auf dieser Höhe. Weiterhin lässt sich eine weitere, schwache Bande bei ca. 39 kDa erkennen. Der Klon 2 zeigt eine blasse Bande bei 43 kDa und eine fast nicht erkennbare Bande bei ca. 39 kDa. Klon 5 zeigt ebenso zwei Banden, die Bande bei 43 kDa ist nur leicht stärker ausgeprägt als die bei ca. 39 kDa. Klon 6 zeigt eine fast nicht erkennbare Bande auf der Höhe von ca. 39 kDa. Der  $\beta$ -Aktin-Nachweis ist bei allen Zellen deutlich positiv, jedoch bei den HeLa-Zellen und HEK293T-Zellen dezent weniger deutlich ausgeprägt als bei den anderen Proben.

### 3.3. Cx43-knockout in pluripotenten Stammzellen

#### 3.3.1. Nachweis der Pluripotenz der FSiPS-Zellen

Die hier verwendeten FSiPS-Zellen wurden zunächst auf Pluripotenz getestet. Dazu wurde die Expression der nukleären Transkriptionsfaktoren Oct-4, Sox2 und Nanog überprüft sowie auf die Ausprägung des Zelloberflächenmarkers TRA-1-60 getestet.



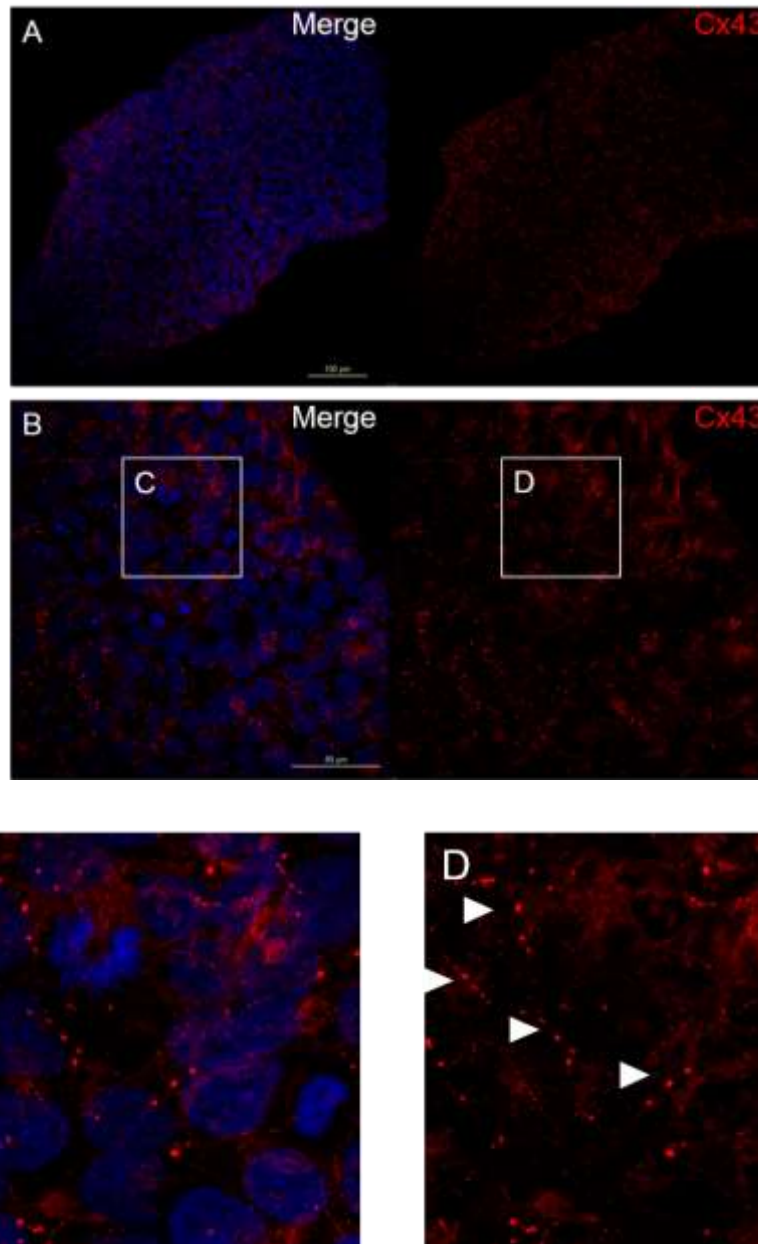
**Abbildung 19: Immunhistochemische Färbung der FSiPS-Zellen für Pluripotenzmarker.** Die FSiPS-Zellen wurden auf die Pluripotenzmarker Nanog, Oct-4, Sox2 sowie TRA-1-60 getestet. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte jeweils mittels eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers.

Die FSiPS-Zellen (**Abbildung 19**) zeigen beim Nachweis aller vier Pluripotenzmarker ein deutliches rotes Signal des Cy3-gekoppelten Antikörpers. Die Signale für Nanog, Oct-4 und Sox2 weisen eine deutliche Färbung im Zellkern auf. Die Färbung des TRA-1-60 lässt sich an der Zelloberfläche erkennen.

#### **3.3.1.1. Nachweis der Cx43-Expression in FSiPS-Zellen**

Bevor eine Cx43-Defizienz in FSiPS-Zellen generiert wurde, sollte zunächst die Expression von Cx43 in den pluripotenten Stammzellen nachgewiesen werden. Hierzu wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt (**Abbildung 20**). Die Cx43-positiven Kanäle sind deutlich als kleine Punkte entlang der Zellmembran erkennbar. Im Hintergrund lässt sich zudem eine dezente Färbung erkennen, welche sich jedoch deutlich von den Cx43-positiven Gap Junction Kanälen unterscheiden lässt.



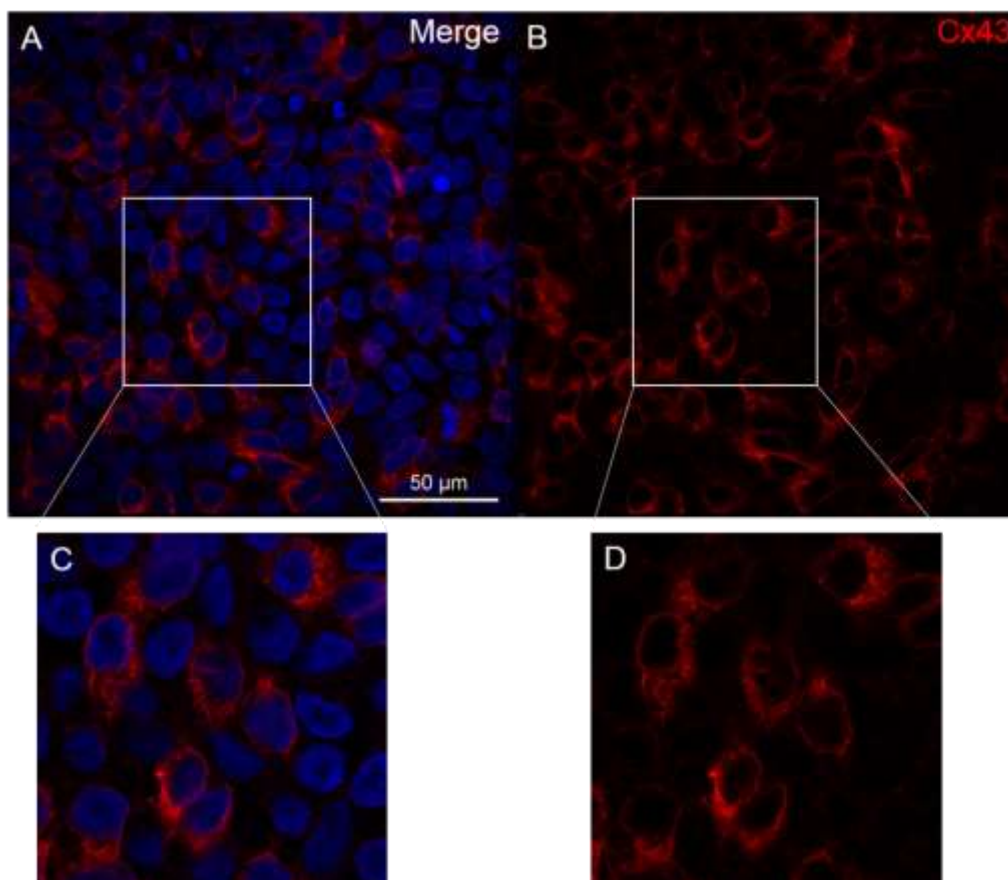


**Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung der FSiPS-Zellen (Positiv-Kontrolle).** A Übersicht der Positiv-Kontrolle der FSiPS-Zellen. B Vergrößerter Ausschnitt. C und D zeigen die markierten Ausschnitte aus B. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte jeweils mittels eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers. Die weißen Pfeile markieren Gap Junction Plaques in der Zellmembran.

### 3.3.1.2. Cx43-Defizienz in FSiPS-Zellen

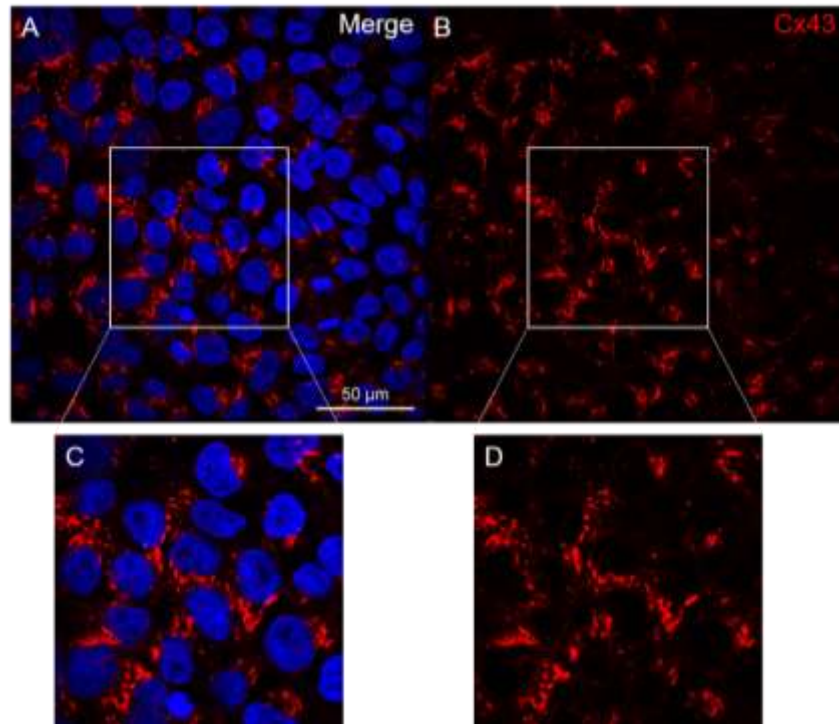
Der Plasmidtransfer zur Expression der sgRNAs sowie des Cas9-Proteins, erfolgte wie bei den HEK-Zellen via Elektroporation. Als Transfektionskontrolle diente ein GFP-Plasmid. Als Negativkontrolle wurde die Plasmid-DNA durch Wasser ersetzt. Ein Tag nach der Elektroporation erfolgte die Selektion mittels

Puromycin (0,5 µg/mL). Bei der Wasserkontrolle ließ sich nach der Puromycin-Behandlung das komplette Absterben der Zellen beobachten. Durch die Vereinzelnung der Zellen auf eine 10 cm<sup>2</sup> Zellkulturschale wuchsen diese unabhängig voneinander zu Kolonien heran. Die entstandenen, idealerweise monoklonalen Kolonien, wurden gepickt und expandiert. Ein Teil dieser Zellen wurden mittels PCR auf Cx43 getestet. Vielversprechende Kolonien wurden anschließend immunhistochemisch gefärbt und auf genomischer Ebene sequenziert.



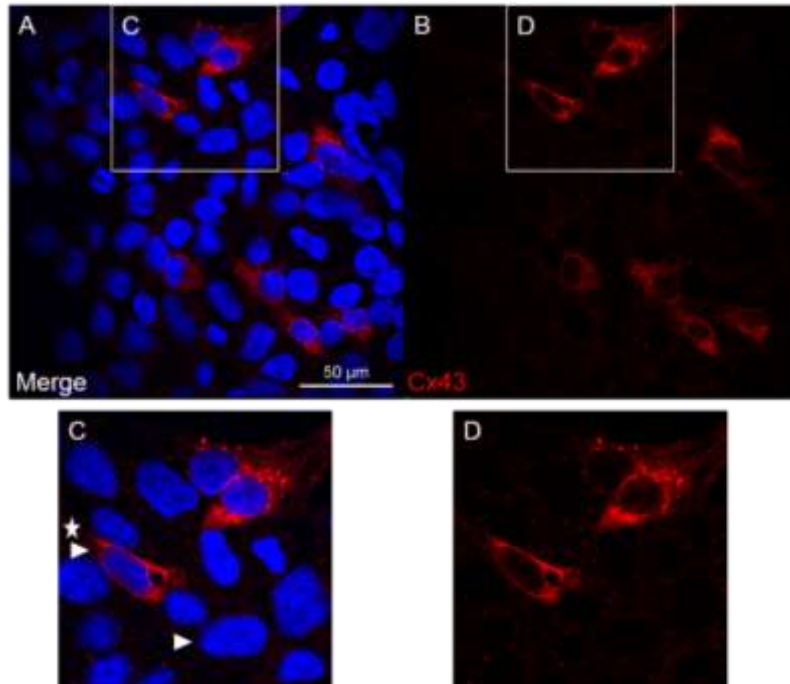
**Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung der FSiPS Klon 26.** A FSiPS Klon 26 mit Färbung der nukleären DNA (DAPI) und Cy3-gefärbte Areale (Sekundärantikörper zur Detektion des Cx43) (A und B). C und D Ausschnitt aus A und B. Einige Zellen mit im Zytoplasma lokalisierten Cx43-positiven Bereichen. Einige Zellen sind Cx43-negativ.

Bei Kolonie 26 zeigen einige Zellen kein Signal für Cx43, andere wiederum sind positiv (**Abbildung 21 C und D**). Das Cx43-positive Signal ist diffus im Zytoplasma verteilt und weist nicht die für Connexinansammlungen typische punktförmige Verteilung an der Zellmembran auf.



**Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung FSiPS Klon 28.** A Übersicht Klon 28 der FSiPS-Zellen mit DAPI-Färbung und Cx43-Färbung (Cy3-gekoppelter Sekundärantikörper). B Cx43-Färbung. C und D als vergrößernde Ausschnitte aus A und B. Cx43-positive Bereiche sind fleckförmig im Zytoplasma verteilt.

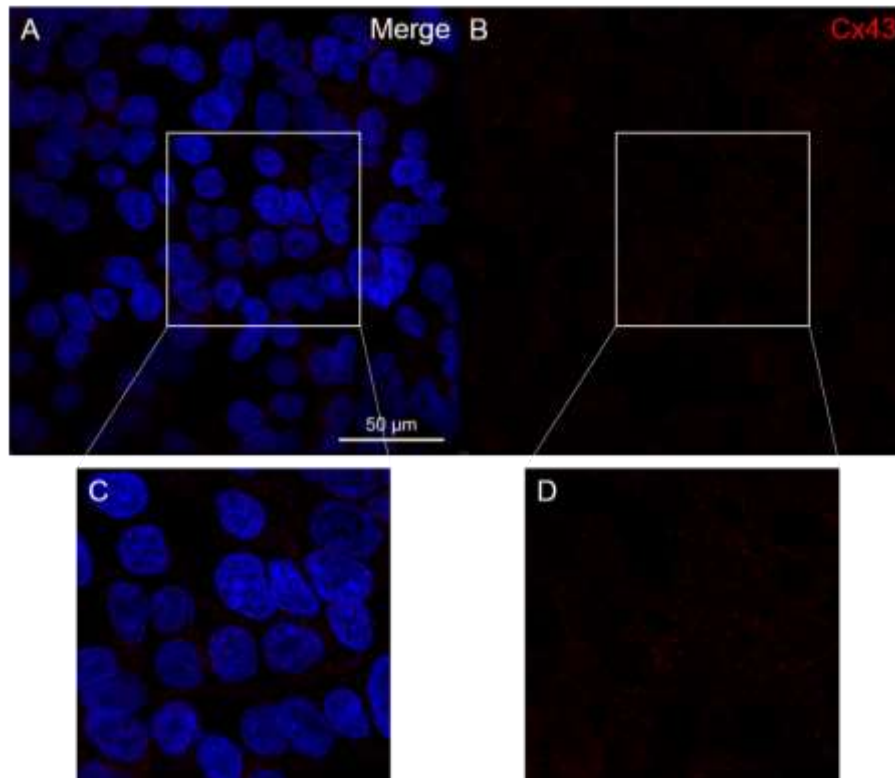
Bei Kolonie 28 imponiert ein geflecktes Erscheinungsbild des Connexin 43 (**Abbildung 22**), wobei alle Zellen homogen angefärbt erscheinen. Wie auch schon bei Kolonie 26 (**Abbildung 21**) zu beobachten, befindet sich das Connexin 43 nicht an der Zellmembran, sondern im Inneren der Zelle.



**Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung FSiPS Subklon 68.** A FSiPS Subklon 68 mit Färbung der nukleären DNA (DAPI) und Cy3-gefärbte Areale (A und B). C und D als Vergrößerungsansicht. Einige Zellen ein Cx43-gefärbtes Zytoplasma (Pfeil mit Stern), viele Zellen sind Cx43-negativ (Pfeil).

Kolonie 68 (**Abbildung 23**) weist Ähnlichkeiten zu Kolonie 26 auf. Allerdings exprimieren nur wenige Zellen Cx43. Der überwiegende Teil ist Cx43-negativ.

Da es sich bei den Zellpopulationen (26 und 68) scheinbar um Mischkolonien handelt, musste eine Subklonierung durchgeführt werden, um einen komplett Cx43-defizienten Zellklon zu isolieren. Hierzu wurde aufgrund der größeren Anzahl an Cx43-negativen Zellen Linie 68 verwendet.

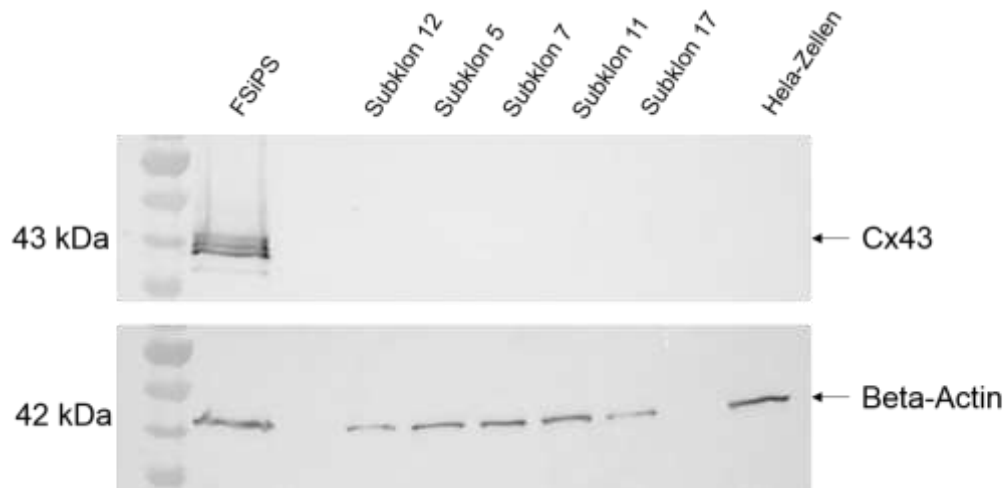


**Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung FSiPS Subklon 11.** FSiPS Subklon 11 mit Färbung der nukleären DNA (DAPI) (A) und Sekundärantikörper (Cy3) zur Detektion des Cx43 (A und B). C und D Ausschnitte aus A und B. Die Zellen schienen Cx43-negativ, es ist eine leichte unspezifische Hintergrundfärbung zu erkennen.

Mehrere Subklone wurden isoliert, expandiert und eine Charakterisierung mittels Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot Analyse durchgeführt. Beispielhaft ist Subklon 11 abgebildet, welcher eine homogen negative Färbung für Cx43 zeigt (**Abbildung 24**).

Einige Subklone erwiesen sich wie zuvor als Mischklon, andere wiederum waren ausschließlich Cx43-positiv oder Cx43-negativ. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Subklone 5, 7, 11, 12, 17 ausgewählt, welche in der Immunfluoreszenz kein Cx43 zeigten. Mit diesen Klonen wurden Western Blot Analysen und DNA-Sequenzierungen durchgeführt.

Die vorliegende Western Blot Analyse zeigt die Cx43-Genexpression der ausgewählten Subklone (**Abbildung 25**). Als Positiv-Kontrolle dienten Wildtyp FSiPS-Zellen, als Negativ-Kontrolle dienten HeLa-Zellen. Als Ladekontrolle wurde auf  $\beta$ -Aktin getestet.

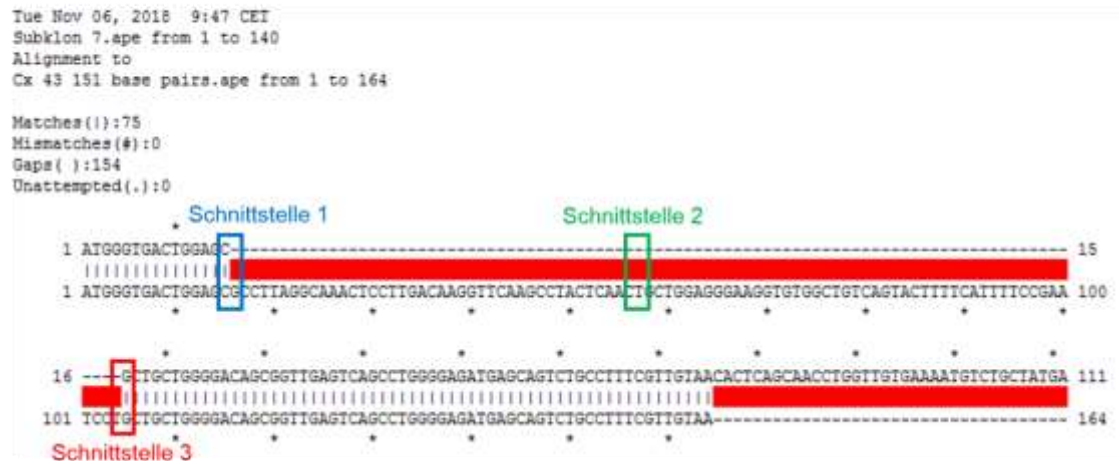


**Abbildung 25: Analyse der Cx43-Genexpression der FSiPS-Subklone mittels Western Blot.** Nachweis von Cx43 durch eine Western Blot Analyse. Die Positiv-Kontrolle besteht aus WT FSiPS-Zellen, für die Negativ-Kontrolle wurden HeLa-Zellen gewählt. Als Ladekontrolle diente der  $\beta$ -Aktin-Nachweis. Alle Subklone scheinen Cx43-negativ.

Die Bande für Cx43 im Western Blot ist bei 43 kDa zu erwarten. Im Western Blot zeigen die nicht transfizierten FSiPS-Wildtyp-Zellen (Positiv-Kontrolle) sowohl im Nachweis für Cx43 sowie in der Ladekontrolle ( $\beta$ -Aktin) ein positives Signal. Es ist auffällig, dass die Positiv-Kontrolle nicht nur eine Bande bei einem Molekulargewicht bei 43 kDa äußert, sondern weitere Banden zeigt.

HeLa-Zellen, welche als Negativ-Kontrolle dienten, zeigen kein Cx43-positives Signal. Bei allen getesteten Subklonen ist keine Bande auf der zu erwarteten Höhe detektierbar.

## FSiPS Subklon 7 und 11



**Abbildung 26: Sequenzierungsergebnisse des FSiPS Subklon 7 und 11.** Die Sequenzierung des Subklons 7 und 11 bringt eine komplette Deletion des Bereichs zwischen Schnittstelle 1 und 3 hervor.

Von diesen untersuchten Subklonen wurden die Subklone 7 und 11 für die Sequenzierung selektiert. Subklon 7 und Subklon 11 zeigten jeweils dieselben Sequenzierungsergebnisse (**Abbildung 26**). Der Abschnitt zwischen Schnittstelle 1 und Schnittstelle 3 ist deletiert (Deletion von 89 bp).

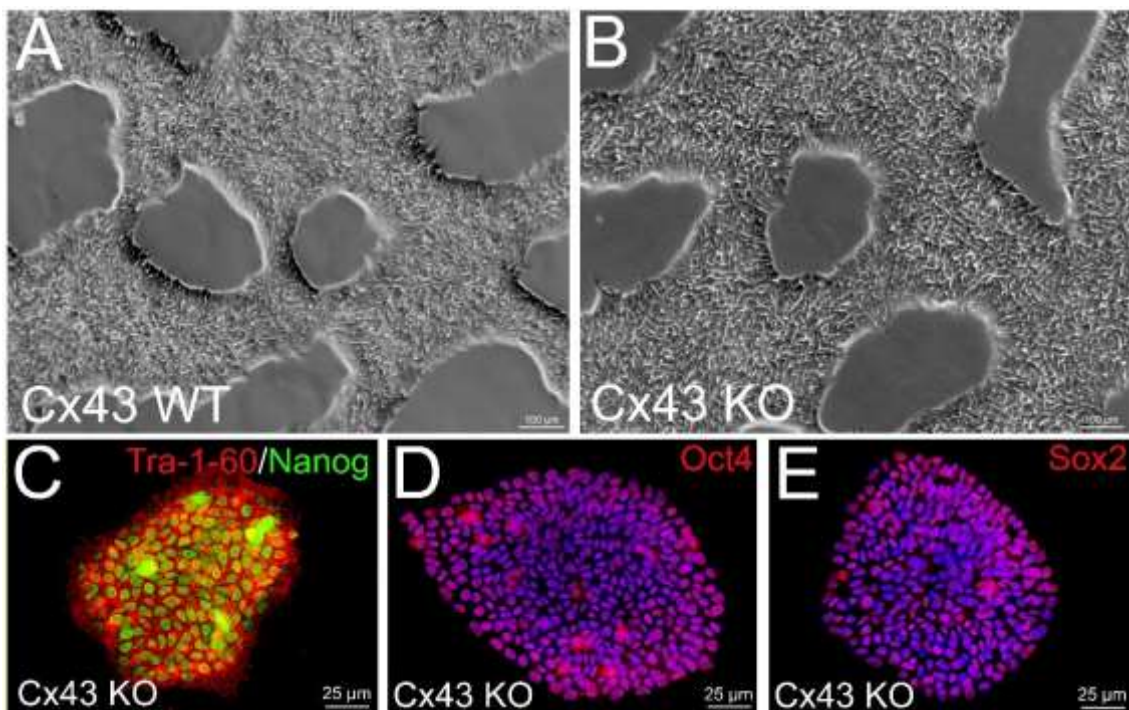


### 3.4. Differenzierungspotential der Cx43-defizienten FSiPS-Zellen

#### FSiPS-Zellen

Die generierten Cx43-defizienten FSiPS-Zellen wurden zunächst auf die Expression von Pluripotenzmarkern überprüft und nachfolgend in verschiedene Gewebetypen differenziert. Zum einen erfolgte die Differenzierung in Kardiomyozyten, zum anderen in neurale Stammzellen und anschließend in Neurone.

#### Nachweis der Pluripotenz

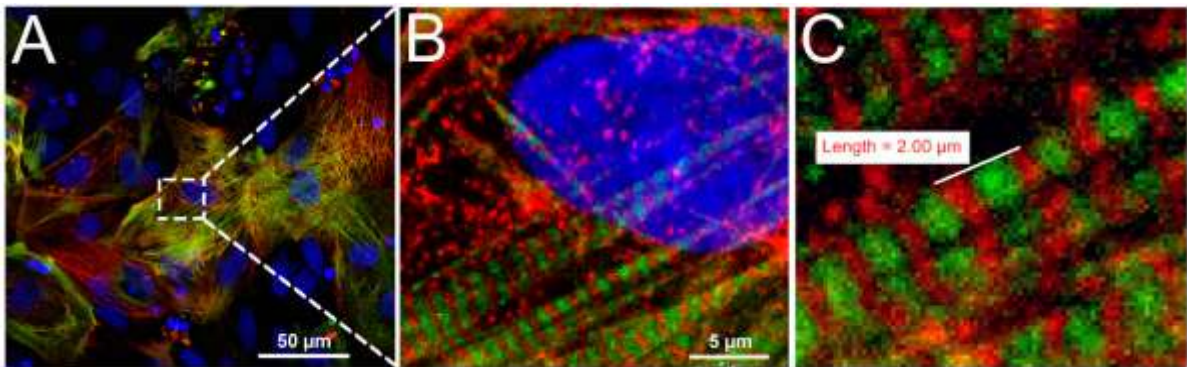


**Abbildung 27: Pluripotenzmarker zum Nachweis der Pluripotenz der Cx43-defizienten FSiPS-Zellen.** A FSiPS-Wildtyp im Durchlicht, B Cx43-defiziente FSiPS-Zellen im Durchlicht, C Tra-1-60 erscheint als monoklonaler Antikörper auf der Oberfläche der Zellen (Cy3-gekoppelter Sekundärantikörper), Nanog erscheint im Bereich der Zellkerne als grüne Färbung (Cy2-gekoppelter Sekundärantikörper), D Oct-4 Immunfluoreszenzfärbung im Bereich der Zellkerne (Cy3-gekoppelter Sekundärantikörper), die Zellkerne sind zusätzlich mit DAPI gefärbt, E Sox2-positive Zellkerne, zusätzliche Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau).

Die Immunfluoreszenzanalyse bestätigte, dass die Cx43-defizienten FSiPS-Zellen pluripotent waren. Der Nachweis erfolgte durch den Nachweis der Expression des Oberflächenantigens Tra-1-60 und der nukleären Transkriptionsfaktoren Nanog, Oct-4 und Sox2 (**Abbildung 27**).



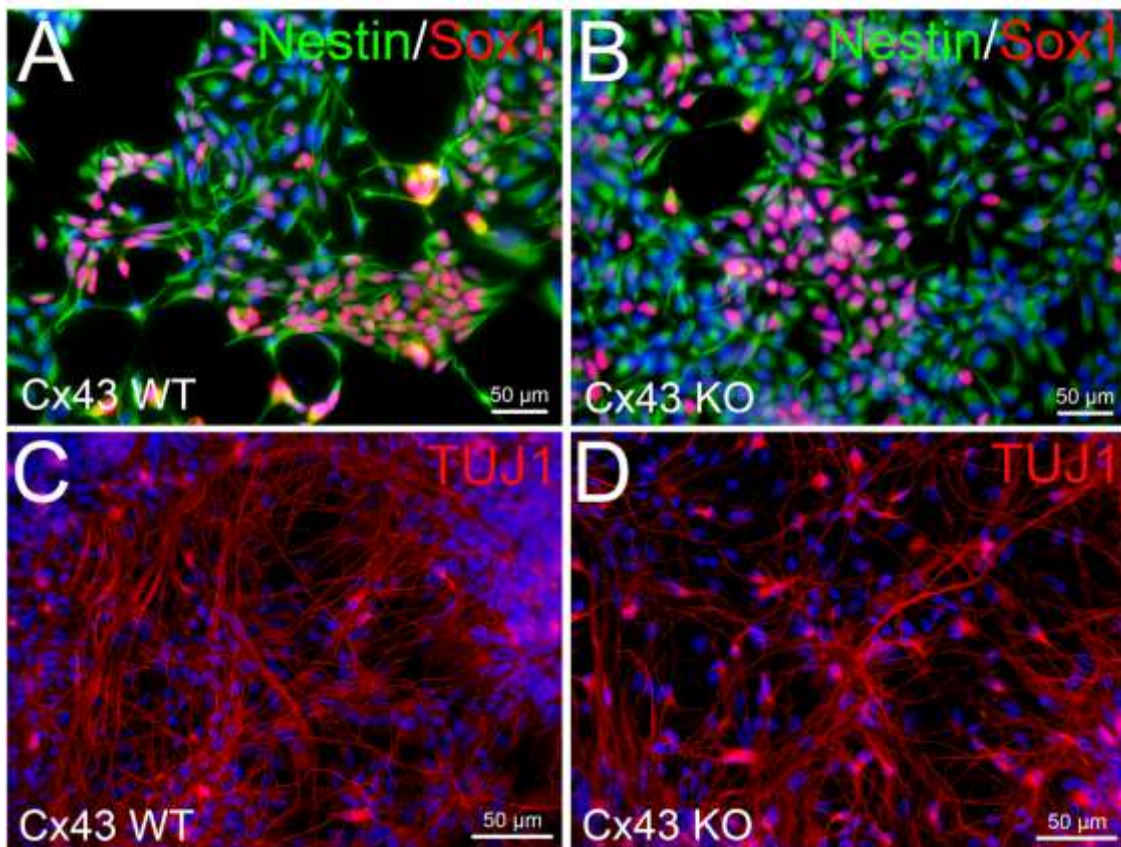
## Differenzierung in Kardiomyozyten



**Abbildung 28: Kardiomyozyten aus Cx43-defizienten FSiPS-Zellen.** A Kardiomyozyten in der Übersicht, der Cy3-gekoppelte Antikörper richtet sich gegen anti-Sarcomeric-Actinin (SRA) und der Cy2-gekoppelte Antikörper gegen anti-Cardiac-Troponin T (cTnT), B vergrößerter Ausschnitt mit einem Zellkern (DAPI) und Myofibrillen, Ausschnitt C Sarkomere (Länge ca. 2 µm).

Um die Pluripotenz der genetisch modifizierten iPS-Zellen auch funktionell nachzuweisen, wurden diese in verschiedene Zelltypen differenziert. Zunächst wurde eine Kardiomyozytendifferenzierung durchgeführt. Die Immunfluoreszenzanalyse zeigt Herzmuskelzellen, sowie deren DAPI-positiven Zellkerne und Myofibrillen in der vergrößerten Ansicht (**Abbildung 28**). Ausschnitt C zeigt Sarkomere als kleinste funktionelle Einheit der Myofibrillen. Diese sind zwischen 2 und 2,5 µm lang. In der Zellkultur sind die Kardiomyozyten durch regelmäßige Kontraktionen zu erkennen.

## Differenzierung in neurale Stammzellen und Neurone



**Abbildung 29: Immunhistochemische Färbung der Cx43-defizienten neuralen Vorläuferzellen und Neurone.** A Neurale Vorläuferzellen differenziert aus WT FSiPS-Zellen, B Neurale Vorläuferzellen differenziert aus Cx43-defizienten FSiPS-Zellen. Die Detektion des Primärantikörpers für Nestin erfolgte mittels eines Cy2-gekoppelten Antikörpers, die Detektion des Primärantikörpers für Sox1 erfolgte mittels eines Cy3-gekoppelten Antikörpers. C Neurone differenziert aus Cx43-positiven WT-Zellen, D Neurone differenziert aus Cx43-defizienten FSiPS-Zellen. Die Detektion des Primärantikörpers für TUJ1 erfolgte mittels eines Cy3-gekoppelten Antikörpers. Färbung der Zellkerne mittels DAPI (blau).

Die immunhistochemische Färbung in Abbildung 29 zeigt im Vergleich die Differenzierung von FSiPS-Wildtyp Zellen und den generierten Cx43-defizienten FSiPS-Zellen in Zelltypen des Nervensystems. Zuerst wurden die Zellen in neurale Vorläufer differenziert. Diese Zellen zeigen typischerweise eine Expression des Typ-VI-Intermediärfilamentproteins Nestin und des Transkriptionsfaktors Sox1 (Abbildung 29 A und B). Sowohl die Wildtyp-FSiPS wie auch die Cx43-defizienten FSiPS-Zellen, zeigen eine deutliche Färbung gegen Nestin (Cy2). Die Färbung gegen Sox1 (Cy3) zeigt sich im Bereich der

Zellkerne. Durch die Überlagerung der Sox1-positiven Bereiche und der DAPI-Färbung erscheinen die Zellkerne teilweise pink.

Danach wurden die Zellen in Neurone differenziert. Der Nachweis erfolgte durch eine immunhistochemische Färbung gegen TUJ1 (**Abbildung 29** C und D). TUJ1 ist ein neuronenspezifisches  $\beta$ -Tubulin der Klasse III und gilt als einer der gängigsten panneuronalen Marker. Es zeigen sich sowohl bei den Neuronen der Wildtyp-Zellen wie auch bei den Cx43-defizienten Neuronen eine deutliche rötliche Färbung. Die Cy3-positiven Bereiche ziehen sich fadenförmig durch das gesamte Areal.

Die aus Cx43-defizienten FSiPS-Zellen differenzierten Kardiomyozyten und Neurone zeigen in den Immunfluoreszenzfärbungen und in der Zellkultur keine augenfälligen Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp FSiPS-Zellen. Beide Kardiomyozyten-Kulturen zeigen regelmäßige, spontane Kontraktionen.

## **4. Diskussion**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems verschiedene Connexin43-Defektmutanten in humanen induzierten pluripotenten Stammzellen zu generieren. Im Zuge dieser Experimente sollte ein Protokoll für die Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems in Stammzellen erarbeitet werden. Darüber hinaus sollten die Zellen mit Cx43-Defizienz in verschiedene Gewebe differenziert werden, um Aussagen über die Bedeutung des Cx43 bei der direkten interzellulären Zell-Zell-Kommunikation während der Embryonalentwicklung machen zu können.

### **4.1. Die Generierung einer Cx43-Defektmutante mittels des CRISPR/Cas9-Systems**

Zur Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems wurden zunächst HEK293T-Zellen verwendet. Diese lassen sich einfach kultivieren und effizient transfizieren (Schein und Enders 1962). So sollten zunächst Transfektionsmethoden, Selektionsbedingungen und das Wachstum der Zellen nach genetischer Manipulation getestet werden. Weiterhin konnten die Immunfluoreszenz- und Immunoblot-Analysen sowie das Sequenzierungsverfahren für den Nachweis einer Cx43-Defizienz etabliert werden. Das erarbeitete Protokoll sollte anschließend auf humane pluripotente Stammzellen übertragen werden.

Eine Defizienz der Cx43-Genexpression konnte erfolgreich durch die Deletion eines Teils der für das Protein kodierenden Region auf Exon 2 des Chromosoms 6 herbeigeführt werden. Daraus resultierte zum einen eine Leserasterverschiebung, zum anderen die Erzeugung eines vorzeitigen Stopp-Codons.

#### **Connexin 43-Defektmutant in HEK293T-Zellen**

Als Vehikel für die Expression der sgRNA sowie des Cas9-Proteins wurde das Plasmid pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 verwendet (Ran et al. 2013b). Die entsprechenden sgRNAs wurden dafür zunächst in das Plasmid einkloniert. Anschließend wurde die Funktionalität des Vektors in HEK293T-Zellen getestet.

Die entsprechend ausgewählten Sequenzen der sgRNAs 1-3 (Leit- und Folgestrang) wurden kommerziell synthetisiert. Bevor die sgRNAs in das Trägerplasmid pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 eingebracht werden konnten, wurde dieses zunächst mittels Restriktionsverdau überprüft. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese zeigen, dass es sich um das korrekte Plasmid handelte. Im nächsten Schritt wurden die drei zuvor erzeugten sgRNA-Doppelstränge in das Trägerplasmid kloniert. Das wurde dafür mit Hilfe des Enzyms BbsI zwei Mal geschnitten, wobei so genannte sticky ends entstehen. Die sgRNA wurde daraufhin in das Plasmid ligiert, indem sich die Überhänge (sticky ends) des Plasmids mit denen der jeweiligen sgRNA über komplementäre Basenpaarung aneinanderlagern. Ein Ansatz mit Wasser statt sgRNA diente als Negativkontrolle. Hier sollte es zu keiner Ligation kommen, da die Überhänge, die bei der Restriktionsspaltung des Plasmids entstehen, nicht zueinander komplementär sind. Dies erklärt sich durch den Umstand, dass das Enzym BbsI 2 Basen stromabwärts (Leitstrang) bzw. 6 Basen stromaufwärts (Folgestrang) seiner Erkennungsstelle (5'-GAAGAC-3') schneidet und damit, abhängig von der umgebenden DNA Sequenz, unterschiedliche Überhänge erzeugt. Schneidet man eine Sequenz 2 Mal mit dem Enzym, sind die entstehenden Überhänge daher mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht komplementär. Das resultierende Plasmid wurde in kompetente *E. coli* Bakterien eingebracht und auf Agar-Platten, welche mit Ampicillin versetzt waren, ausgestrichen. Das ringförmige Plasmid mit den sgRNAs trägt eine Resistenzkassette gegen das Antibiotikum Ampicillin, wodurch die resultierenden *E. coli* Bakterien das Ampicillin tolerieren können und auf den Platten wachsen und Kolonien bilden. In den Kontrollansätzen mit Wasser sollte sich kein geschlossenes Plasmid bilden und somit sterben die *E. coli* Bakterien auf den Kontrollplatten ab. Danach wurden einzelne Zellklone isoliert und in Nährmedium mit Ampicillin angezogen. Aus der so entstandenen Bakteriensuspension wurden die Plasmide mittels Zellyse und Adsorption am Silicagel aufgereinigt. Mittels Sanger-Sequenzierung konnte die erfolgreiche Integration der sgRNAs in das Plasmid nachgewiesen werden.

Für den Plasmidtransfer in HEK-Zellen wurde die Elektroporation als Methode gewählt. Die Elektroporation bewirkt durch Erzeugung eines elektrischen Feldes

eine temporäre Permeabilisierung der Zellmembran (Neumann et al. 1982). Dazu wurden verschiedene Plasmide in Kombination verwendet. Der Gesamt-DNA-Gehalt pro Ansatz wurde auf jeweils 25 µg eingestellt. Zur Bestimmung der Expressionsdauer nach transienter Transfektion diente ein GFP-kodierendes Kontroll-Plasmid.

Die HEK293T-Zellen wurden nach der Elektroporation so verdünnt, dass statistisch gesehen 0,8 Zellen pro Vertiefung einer 96-well Platte pipettiert werden. Ziel hierbei war es, aus einer einzeln abgelegten Zelle eine monoklonale Kolonie zu züchten. Einen Tag nach Elektroporation erfolgte die Kontrolle visuell unter dem Mikroskop. Vertiefungen mit mehreren sowie ohne Zellen wurden verworfen. Gefahr bei dieser Methode ist, dass Zellen aneinanderhaften können und dabei als eine Zelle erscheinen. Lösung dieses Problems wäre die Verwendung eines automatischen *Cell Sorters* mit Einzelzellablagefunktion.

Die HEK-Zellen wurden schließlich mittels eines Dot Blots auf das Protein Connexin 43 getestet. Potentielle Knockout-Klone wurden zur weiteren Analyse ausgewählt. Eine Bestätigung der Connexin-Defizienz erfolgte zunächst mittels Immunfluoreszenzfärbung, dann mittels Sequenzierung. Bei Betrachtung der Immunfluoreszenzanalyse erkennt man unterschiedliche Erscheinungsbilder. Bei Klon 2 und 5 zeigten sich einige Cx43-negative Zellen, benachbarte Zellgruppen wiesen jedoch ein deutliches Signal für Cx43 auf, allerdings nicht an der Zellmembran, sondern atypisch im perinukleären Bereich (**Abbildung 13**). Es handelt sich hierbei um Mischklone aus Zellen mit verschiedenen genetischen Eigenschaften. Die Sequenzierung beider Klone ergab, dass die Basensequenz zwischen Schnittstelle 1 und 2 fehlt (**Abbildung 14**). Hierbei wurden 39 Basenpaare deletiert. Da 39 ein Vielfaches der Zahl 3 darstellt, führt dies zu keiner Leserasterverschiebung, sondern zu einer Veränderung (Verkürzung) der N-terminalen Domäne. Der Verlust von Aminosäuren im N-terminalen Bereich bewirkt, dass es dem Protein Cx43 nicht möglich ist das endoplasmatische Retikulum zu verlassen, um sich dann in die Membran einzulagern (Shao et al. 2012). Dies zeigt eindrücklich, dass die N-terminale Domäne für den Einbau in

die Zellmembran und die Funktion von großer Wichtigkeit ist (Gong et al. 2007; McLachlan et al. 2005; Roscoe et al. 2005).

Bei Klon 6 fällt auf, dass alle Zellen Cx43-negativ sind (**Abbildung 16**). Die Sequenzierung ergab, dass hier der gesamte Bereich zwischen den Schnittstellen 1 und 3 deletiert worden ist (**Abbildung 17**). Der fehlende Abschnitt umfasst 89 bp, was zu einer Verschiebung des Triplett-Leserasters (frameshift-Mutation) und zu einem nicht-funktionsfähigen Cx43 führte.

Bei Klon 2 und 5 handelt es sich um Mischklone aus Cx43-negativen Zellen und solchen mit trunkiertem Cx43-N-Terminus. Auffällig ist, dass die Sequenzierung nur das Ergebnis der Zellen mit dem fehllokalisierten Cx43 zeigt und nicht die des kompletten Knockouts. Da der Sanger-Sequenzierung eine PCR vorhergeht, besteht die Möglichkeit, dass im Mischklon eines der beiden möglichen PCR-Produkte bevorzugt gebildet wird. Die entsprechende Bande wurde dann nach gelelektrophoretischer Aufreinigung ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Sequenzierung verwendet.

Die Etablierung eines geeigneten Protokolls zur Erstellung einer Cx43-Defektmutante war geschehen. Dieses sollte nun an den pluripotenten Stammzellen angewendet werden.

### **Connexin 43-Defektmutant in FSiPS-Zellen**

Bevor das Experiment begonnen wurde, wurden die iPS-Zellen zunächst auf ihre pluripotenten Eigenschaften hin überprüft. Die Pluripotenz korreliert mit den nukleären Transkriptionsfaktoren Oct-4 und Sox2 (Avilion et al. 2003; Nichols et al. 1998; Niwa et al. 2000). Diese aktivieren wiederum den Transkriptionsfaktor Nanog, bei welchem es sich ebenso um einen Pluripotenzmarker handelt (Chambers et al. 2003; Mitsui et al. 2003; Pesce und Scholer 2001). Oct-4, Sox2 und Nanog gewährleisten im Zusammenspiel, dass die Differenzierung unterdrückt und der Zustand der Pluripotenz aufrechterhalten wird (Boyer et al. 2005). Der monoklonale Antikörper TRA-1-60, welcher ein Antigen an der

Oberfläche der Zellen nachweist, gilt ebenfalls als Marker für embryonale Stammzellen (Andrews et al. 1984).

Nanog, Oct-4 und Sox2 zeigen bei fast allen Zellen ein deutliches Signal im Bereich des Nukleus. Bei TRA-1-60 zeichnet sich ein positives Signal auf der Zelloberfläche ab (**Abbildung 19**). Dies zeigt, dass die Zellen pluripotente Eigenschaften besitzen. Des Weiteren erfolgte mittels einer Immunfluoreszenzfärbung der positive Nachweis von Cx43 in der Membran der FSiPS-Zellen.

Einen Tag nach der Elektroporation begann eine Selektion mittels Puromycin, um erfolgreich elektroporierte Zellen anzureichern. Nach dem Heranwachsen von Kolonien wurden diese auf eine 96-well Platte übertragen. Bei dieser Methode kann nicht ausgeschlossen werden, dass Zellen beim Aussäen aneinanderhaften. Außerdem können eng benachbarte Kolonien miteinander verwachsen und wie eine einzelne Kolonie erscheinen. Beides führt in der Folge zu Mischkolonien. Dies muss bei der späteren Analyse berücksichtigt werden.

Es wurden 3 vielversprechende Klone (Klon 26, Klon 28 und Klon 68) aufgrund ihres Färbemusters selektiert. Die Immunfluoreszenzfärbung von Klon 26 und 68 zeigt sowohl Cx43-positive als auch Cx43-negative Zellen (**Abbildung 21** und **Abbildung 23**). Die Zellen, die ein positives Signal für Cx43 zeigten, weisen Cy3-gefärbte Bereiche auf, die diffus im Zytoplasma verteilt sind. Es scheint sich in beiden Fällen um Mischklone zu handeln. Klon 28 hingegen zeigte ein weitestgehend homogenes Färbemuster mit perinukleär lokalisiertem Cx43, was analog zu den Beobachtungen in HEK-Zellen, auf eine Deletion von 13 Aminosäuren im N-Terminus von Cx43 hindeutet.

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Klon mit vollständiger Defizienz von Connexin 43 in Stammzellen zu erzeugen. Durch Subklonierung von Klon 68 konnten mehrere Linien isoliert werden. Die in dieser Arbeit dargestellte Immunfluoreszenzfärbung von Subklon 11 zeigt keinerlei Signal für Cx43 (**Abbildung 24**). Zur Verifizierung, dass es sich tatsächlich um einen kompletten Cx43-knockout handelt, wurde eine Western Blot Analyse



durchgeführt (**Abbildung 25**). Hierbei wurden zusätzlich zu Subklon 11 weitere potenzielle Cx43-defiziente Subklone (5, 7, 12, 17) getestet. Als Positiv-Kontrolle dienten Wildtyp FSiPS-Zellen, als Negativ-Kontrolle wurden HeLa-Zellen aufgetragen. HeLa-Zellen weisen keine endogene Expression von Cx43 auf. Als Ladekontrolle wurde eine Immunoblot-Analyse gegen  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Es ist auffällig, dass die Positiv-Kontrolle nicht nur eine Bande bei einem Molekulargewicht von 43 kDa zeigt. Zusätzlich treten weitere Banden auf. Dies liegt daran, dass Connexin 43 phosphoryliert wird (P0, P1, P2) (Musil et al. 1990), was sich in verschiedenen Banden in der Western Blot Analyse niederschlägt. Die unterschiedlichen Banden mit der Variation von 2-4 kDa kommen einerseits durch eine andere Molekularmasse sowie durch eine Konformationsänderung zustande (Solan und Lampe 2009). Sowohl Subklon 11 wie auch die anderen Subklone 5, 7, 12 und 17 zeigen auf der Höhe der Cx43-Bande kein Signal. In der Ladekontrolle ( $\beta$ -Aktin) zeigen alle Subklone, sowie die FSiPS-Zellen und HeLa-Zellen ein positives Signal. Um den Gendefekt zu bestätigen, wurden Subklon 7 und 11 einer Sanger-Sequenzierung unterzogen. Die Sequenzierungsergebnisse zeigen ein komplettes Fehlen der Basen zwischen den Schnittstellen 1 und 3 (**Abbildung 26**). Die Deletion von 89 bp verhindert die Entstehung eines intakten Proteins.

## 4.2. Connexine in der Embryonalentwicklung

Mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems konnten erfolgreich verschiedene Cx43-Defektmutanten in FSiPS-Zellen generiert werden.

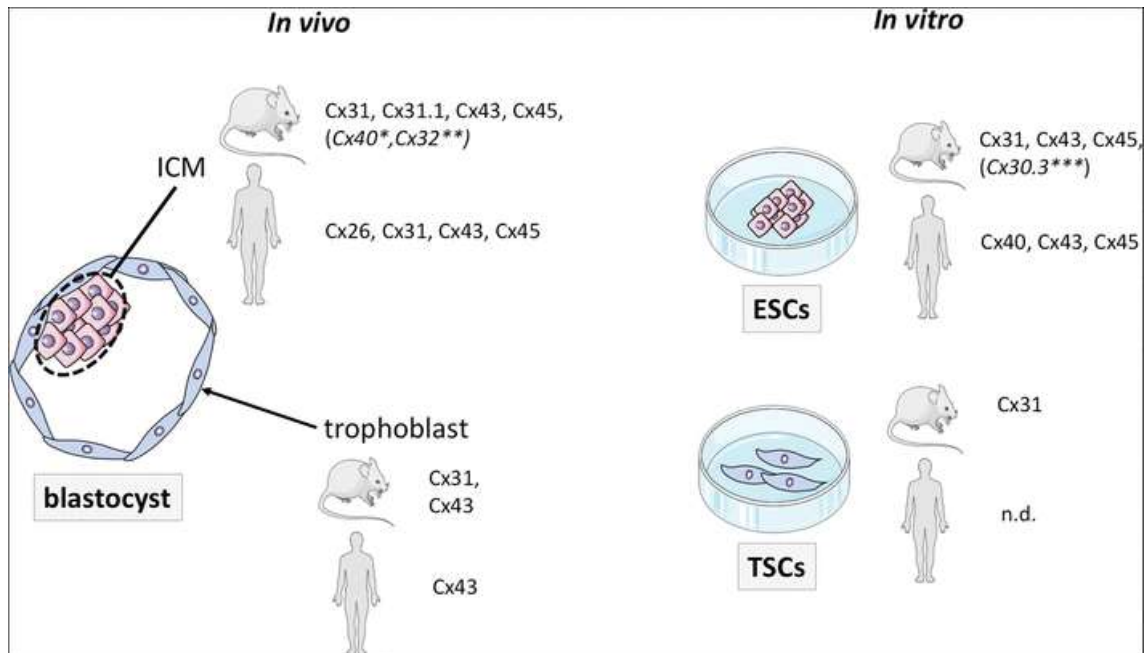
IPS Zellen bieten eine attraktive *in vitro*-Plattform, um den embryonalen Zustand nachzuahmen. Kultiviert man diese als dreidimensionale Zellaggregate, lassen sich durch die gezielte Zugabe von Wachstumsfaktoren Miniaturversionen menschlicher Gewebe erzeugen. Auch frühe Embryonalstadien lassen sich in Form von Blastoiden, Gastruloiden und Embryoidkörperchen modellhaft nachbilden (Worsdorfer et al. 2019). Diese Zellkulturmodelle bieten sie eine ausgezeichnete Möglichkeit komplexe embryonale Prozesse untersuchen zu können. Derartige Studien sind von Relevanz, da die Rolle der Connexine in der Embryonalentwicklung immer noch nicht vollständig geklärt ist.

Frühe Forschungsergebnisse an Mausembryonen (Tag 4,5 -Tag 7,5) zeigten, dass sich die niedermolekularen, fluoreszierenden Farbstoffe Fluorescein und Lucifer yellow nach Injektion durch Weitergabe via Gap Junctions an die Nachbarzellen im Mausembryo verteilen. Auch der Austausch von Ionen wurde beobachtet. Je weiter der Embryo in der Entwicklung fortschreitet, desto eingeschränkter ist der Austausch der niedermolekularen Stoffe oder Ionen (Lo und Gilula 1979a; Lo und Gilula 1979b) und es kommt zur Ausbildung von einzelnen kommunizierenden Kompartimenten (Kalimi und Lo 1988).

Hierbei stellt sich die Frage, welche der 20 Connexin-Gene im frühen Mausembryo eine Rolle spielen. Bei Untersuchungen von Maus-Blastozysten wurde festgestellt, dass 6 Connexin-Gene ausgeprägt sind. Es wurden die Transkripte von Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx40, Cx43 und Cx45 nachgewiesen. Cx31, Cx43, Cx45 finden sich im Zwei-bis Vier-Zellen Stadium, wobei Cx30.3, Cx31.1 und Cx40 zusätzlich ab dem Acht-Zellen-Stadium exprimiert werden (Davies et al. 1996). Im Jahre 2002 wurden 3 weitere Connexin-Transkripte, nämlich Cx30, Cx36 und Cx57 detektiert. Diese werden ab dem Zwei-Zellen-Stadium exprimiert (Houghton et al. 2002).

Im präimplantierten Embryo der Maus konnten Cx31 (Armiger et al. 2018), Cx31.1 (Houghton et al. 2002), Cx40 (Davies et al. 1996), Cx43 (Valdimarsson et al. 1991) und Cx45 (De Sousa et al. 1997) als Protein nachgewiesen werden. Im Blastozystenstadium befinden sich Cx31 und Cx43 in der Inneren Zellmasse und im Trophoektoderm. Nach der Implantation des Embryos befindet sich Cx31 ausschließlich im Trophoektoderm, wohingegen Cx43 vorrangig in den Zellen des Epiblasten detektiert werden konnte (Dahl et al. 1996). Cx31, Cx31.1, Cx43 und Cx45 scheinen die wichtigsten Connexine der frühen Entwicklung von Mäusen zu sein (Worsdorfer et al. 2018) (**Abbildung 30**).

Bei der Blastozyste des Menschen konnte die Anwesenheit von Cx26, Cx31, Cx40, Cx43 und Cx45 bestätigt werden (Bloor et al. 2004; Hardy et al. 1996) (**Abbildung 30**).



**Abbildung 30: Connexin-Expression in der Blastozyste, ESCs, TSCs im Vergleich Mensch und Maus.** Dargestellt ist die Connexin-Expression in der Blastozyste, embryonalen Stammzellen (ESCs), Stammzellen des Trophoblasten (TSCs) bei der Maus und beim Menschen. Gleiche Connexine wurden sowohl in der Blastozyste wie auch in den Stammzellen detektiert. In der Inneren Zellmasse (ICM) der Maus konnte Cx31.1 festgestellt werden, allerdings nicht in embryonalen Stammzellen der Maus. Beim Menschen konnten in der ICM neben Cx43 und Cx45, welche auch in den Stammzellen entdeckt wurden, auch Cx26 und Cx31 detektiert werden. Diese wurden bei den ESCs bisher nicht entdeckt, dafür konnte bei diesen Cx40 gefunden werden. Im Trophoblasten der Maus konnte Cx43 nachgewiesen werden, bei den TSCs nicht. \* Im Zytoplasma vorhanden, aber nicht an Zellmembran, \*\*persistierendes maternales Protein, \*\*\*in EB3 ESCs, nicht in HM1 ESCs (Worsdorfer et al. 2018).

Studien von Becker et. al. legten nahe, dass Gap Junctions für den präimplantierten Embryo essenziell zu sein scheinen. Ein Antikörper, der gegen die zytoplasmatische Schleife von Cx43 gerichtet ist, wurde in einen Mausembryo im Acht-Zell-Stadium injiziert. Hierdurch wurde der Transfer der niedermolekularen, fluoreszierenden Farbstoffe Lucifer Yellow und Cascade Blue unterbunden (Becker et al. 1995). Darüber hinaus wurden die injizierten Zellen von der weiteren Entwicklung ausgeschlossen.

Houghton et al. konnten im Gegensatz dazu zeigen, dass sich präimplantierte Mausembryonen, welche kein Connexin 43 besitzen, normal entwickeln und eine Schwangerschaft in Vollzeit möglich ist. Es wurde vermutet, dass eine normale Entwicklung durch eine Kompensation des Cx43 durch die 5 anderen Connexine

stattfindet (Houghton et al. 2002). Dennoch zeigt der Verlust von Cx43 einen starken Phänotyp, welcher zu einer perinatalen Letalität führt (Reaume et al. 1995). Um eine essenzielle Rolle Gap Junction-vermittelter Kommunikation während der frühen Embryonalentwicklung nachzuweisen, wurden doppel-knockouts von Cx31 und Cx43 generiert. Cx31 single-knockout Mäuse zeigen eine vorübergehende Dymorphogenese der Plazenta, was bei 60 % der Embryonen zum intrauterinen Tod führt (Plum et al. 2001). Beim Cx31/Cx43 doppel-knockout zeigten sich lediglich die für Cx31 bzw. Cx43 bereits beschriebenen, aber keine zusätzlichen, durch Kombination entstandenen Phänotypen (Kibschull et al. 2005). Es ist weiterhin bekannt, dass Cx45-defiziente Mäuse aufgrund von Fehlbildungen während der Gefäßentwicklung eine frühe embryonale Letalität aufweisen (Kruger et al. 2000). Eine Studie mit Cx43/Cx45 doppeldefizienten Embryonen zeigt allerdings, dass diese, wie die Cx31/Cx43 doppeldefizienten Tiere, keine zusätzlichen Anomalien im Vergleich zu den einzel-knockout Stämmen aufweisen (Nishii et al. 2016). Beide Studien zeigen, dass entweder weitere Connexingene beteiligt sind, die den Verlust bei Doppeldefizienz kompensieren, oder, dass die essenzielle Rolle Gap Junction vermittelter Kommunikation möglicherweise überschätzt wurde.

Um die Rolle der verschiedenen Connexine abschließend bestimmen zu können, sind multiple Connexin-knockouts nötig. In der Gentechnik waren die Möglichkeiten hierfür bislang limitiert. Aktuelle Studien allerdings zeigen diesbezüglich einen bahnbrechenden Fortschritt. So gelang es vor kurzem bspw. 25 einzelne CRISPR-RNAs durch die Stabilisierung mit Hilfe einer tertiären RNA-Struktur auf ein einziges Plasmid zu bringen (Campa et al. 2019). Somit wäre es möglich alle relevanten Connexingene im Multiplex-Verfahren auszuschalten und somit vollständig kopplungsdefiziente iPSC-Zelllinien zu erzeugen. Diese Zelllinien wiederum könnten als Basis für die Erzeugung künstlicher embryonaler Strukturen dienen. Mittels einer solchen Zellkulturplattform könnte dann die Rolle der Connexine während der Entwicklung eingehend untersucht werden.

Ein weiteres Beispiel für die Rolle von Cx43 während der embryonalen Entwicklung ist die Krankheit Okulodentodigitale Dysplasie (ODDD). Humane

iPS-Zellen bieten ein hervorragendes Modell, um ODDD-Mutationen durch Nachbildung der Defekte *in vitro* näher zu untersuchen. Dies bietet die Möglichkeit die Ursachen der Krankheit besser verstehen zu können. Im Jahr 2017 wurde eine Studie mit einer Cx43 p.V216L Mutation in iPS-Zellen publiziert (Esseltine et al. 2017). In den mutierten iPS-Zellen zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Osteoblasten- und Chondrozytendifferenzierung. Für die Erbkrankheit ODDD sind derzeit über 62 verschiedenen Cx43-Mutationen beschrieben. Diese führen zu verschiedenen Varianten der Krankheit mit teils unterschiedlichen Facetten im Krankheitsbild. Das CRISPR/Cas9-System bietet die Möglichkeit weitere ODDD-Mutationen in iPS-Zellen nachzustellen. Außerdem erlaubt die Technologie den Defekt in Patienten-abgeleiteten iPS-Zellen zu reparieren, um endogene Kontrolllinien zu erzeugen.

15 % der Mutationen, die die Krankheit ODDD verursachen, zeigen Substitutionen von einzelnen Aminosäuren in den ersten 23 Aminosäuren von Cx43 (Paznekas et al. 2009). In einer Studie zu N-terminalen Cx43-Mutanten im Zusammenhang mit ODDD wurde gezeigt, dass der Verlust von Aminosäuren im N-terminalen Bereich bewirkt, dass Cx43 im endoplasmatischen Retikulum verbleibt und daran gehindert wird sich in die Membran einzulagern (Shao et al. 2012). ODDD-Mutanten, bei welchen eine Mutation im N-terminalen Ende von Cx43 zugrunde lag, waren also nicht fähig funktionelle Gap Junctions zu bilden. Ein ähnlicher Phänotyp konnte in dieser Arbeit bei einer CRISPR/Cas9-vermittelten Deletion des N-terminalen Endes von Cx43 beobachtet werden.

### **4.3. Differenzierungspotential der FSiPS Cx43-Defektmutante**

Die Cx43-defizienten FSiPS-Zellen wurden zunächst in Kardiomyozyten und Neurone differenziert. Cx43 ist während der Differenzierung zu Kardiomyozyten sowie in schlagenden Herzmuskelzellen ausgeprägt (Oyamada et al. 1996). Außerdem wird Cx43 zusammen mit Cx45 während der neuronalen Differenzierung exprimiert (Cai et al. 2004; Rozental et al. 2000). In der Literatur sind hierzu einige Phänotypen beschrieben. Eine Studie zeigt, dass bei Cx43-mutierten Mäuseembryonen eine Schwangerschaft bis zum Ende möglich ist, sie

jedoch einen perinatalen Tod erleiden. Ursache für den Tod ist ein Versagen des Lungengasaustausches durch eine Schwellung und Blockade des rechtsventrikulären gefäßabführenden Traktes (Reaume et al. 1995). Eine weitere Studie zeigt die Wichtigkeit der Gap Junctions in neuronalen Geweben. Eine Herunterregulierung von Cx26 und Cx43 bewirkt, dass die Migration von Neuronen zur kortikalen Platte beeinträchtigt wird. Hierbei fungieren die Gap Junctions nicht als Durchtrittskanäle, sondern als dynamische, mit dem Zytoskelett interagierenden Klebekontakte, um die Kontakte der Neurone und radialen Fasern zu stabilisieren und eine Verlagerung des Kerns zu ermöglichen (Elias et al. 2007). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Defekte des Cx43 in der Angiogenese Effekte zeigen. Neugeborene Mäuse, denen ein Cx43-blockierendes Peptid injiziert wurde, zeigen eine Reduktion der Gefäßbildung in der Netzhaut (Elling et al. 2017).

Vor der Differenzierung zeigen die Zellen ein positives Signal auf die Pluripotenzmarker Nanog und Tra-1-60 (**Abbildung 27**), somit konnten die Zellen als pluripotent angesehen werden. Die Differenzierung in Kardiomyozyten resultierte in funktionellen, schlagenden Kardiomyozyten. Die Immunfluoreszenzanalyse mit der Färbung gegen Sarcomeric-Actinin (SRA) und Cardiac Troponin T (cTnT) zeigt sich das typische Bild einer Myofibrille (**Abbildung 28**). Weiterhin wurden die Cx43-defizienten FSiPS-Zellen in neuronale Stammzellen und nachfolgend in Neurone differenziert (Reinhardt et al. 2013). In der Immunfluoreszenzanalyse mit einem Antikörper gegen Nestin und Sox1 (**Abbildung 29**) konnten sowohl in den WT iPS-Zellen sowie in den Cx43-defizienten iPS-Zellen eine vergleichbare Menge an neuronalen Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigt sich kein augenscheinlicher Unterschied zwischen den Neuronen aus WT FSiPS-Zellen und den Cx43-defizienten Zellen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Zellen trotz Cx43-Defizienz normal differenzieren. Ob das Cx43 hierbei durch andere Connexine kompensiert wird oder sich ein bestimmter Phänotyp zeigt, muss weiterhin eruiert werden.

#### 4.4. Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sollen die Basis bilden, um in Zukunft weitere Erkenntnisse über das Membranprotein Connexin 43 in der humanen Embryonalentwicklung und in der Entstehung von Krankheiten zu erlangen. Aufgrund der Beteiligung von mutierten Connexinen an vielen verschiedenen Krankheiten muss die Forschung weiter vorangetrieben werden. Die Erzeugung von Connexin-Defektmutanten in pluripotenten Stammzellen und deren gezielte Differenzierung in bestimmte Zelltypen und Gewebe könnte zu neuen Erkenntnissen bezüglich bisher unbekannter Funktionen des Proteins beitragen. Zusätzlich bietet das CRISPR/Cas9-System eine hervorragende Methode, um Korrekturen in erkrankten Genen vorzunehmen.

Für zukünftige Arbeiten ist es wichtig folgende Punkte zu optimieren, um die Forschung weiter voranzutreiben.

Ein Problem des CRISPR/Cas-Systems ist das gehäufte Auftreten von off-target-Effekten (Fu et al. 2013). Bei diesen off-target-Effekten handelt es sich um unspezifische, nicht gewollte Veränderungen im Genom. Hierbei wird nicht die gewünschte Zielsequenz gespalten, sondern andere DNA-Abschnitte, die zur Zielsequenz (partiell) homolog sind. Dies führt zum einen zu Mutationen, aber auch zu unerwünschten chromosomalen Translokationen. Trotz der Ermittlung der sgRNA-Sequenzen für den Cx43-knockout mittels des CRISPR Design tools, welches mögliche unspezifische CRISPR-Schnittstellen vorhersagt, können off-target-Effekte nicht ausgeschlossen werden. Daher sollten mögliche off-target-Mutationen mit Hilfe einer der in den folgenden aufgeführten Methoden analysiert werden. Beim Digenome-seq werden off-targets durch Sequenzierung von *in vitro* Cas9-verdauten Genomen (Digenomen) sichtbar gemacht. Hierbei wird das komplette Genom sequenziert. Die Verdauung sollte viele DNA-Fragmente mit identischen 5'-Enden produzieren, was zu Sequenzlesungen führt, die an den Spaltstellen vertikal ausgerichtet sind. (Kim et al. 2015; Kim et al. 2016). Eine weitere Methode, das GUIDE-seq, basiert auf der Integration von doppelsträngigen Oligodeoxynukleotiden in die durch RNA-gesteuerte Nukleasen entstandenen Doppelstrangbrüche (Tsai et al. 2015). Abschließend



können mit Hilfe der Next Generation Sequencing-Technologie (NGS) die Doppelstrangbrüche auf Nukleotidebene abgebildet werden. Bei der Methode des LAM-HTGTS (Linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing) wird die isolierte DNA durch eine LAM-PCR mit Primern versehen, an welche sich „Adapter“ anheften (Hu et al. 2016). Es folgen eine PCR zur Amplifizierung und eine Sequenzierung. Eine dieser Methoden sollte nachfolgend angewendet werden, um ungewollte off-target-Schnitte unseres Cx43-Defektmutanten sichtbar zu machen.

Zukünftig sollten zudem Methoden angewendet werden, um off-target-Effekte von vorne herein so gering wie möglich zu halten. In der Literatur sind hierzu einige Strategien beschrieben: Zum ersten soll eine Änderung der sgRNA-Sequenz helfen, off-target-Effekte zu vermindern. Bei dieser Methode wird das 3'-Ende der sgRNA trunkiert (dieser Teil ist Part der tracrRNA), komplementär wird das 5'-Ende um bis zu 3 Nukleotide trunkiert oder es wird ein zweifaches Guanin am 5'-Ende vor die 20-nt Sequenz gesetzt (Cho et al. 2014; Fu et al. 2014; Pattanayak et al. 2013) Des Weiteren wird beschrieben, dass das genaue Titrieren der Menge an Cas9 und sgRNA off-target-Effekte minimiert. Nachteil der Methoden zur Reduktion der off-target-Aktivität kann eine reduzierte on-target-Aktivität von Cas9 sein (Cho et al. 2014).

Ein wichtiger weiterer Aspekt ist der Ersatz von Cas9 durch mutierte Nickasen (Cong et al. 2013; Gasiunas et al. 2012; Jinek et al. 2012). Hierbei handelt es sich um Varianten von Cas9. Durch eine Punktmutation der Cas9 D10A Nickase in der RuvC-Domäne verliert diese ihre Fähigkeit den nicht-komplementären Strang zu schneiden (Nishimasu et al. 2014; Ran et al. 2013a). Dies führt dazu, dass nur ein Einzelstrangbruch des komplementären Stranges erfolgt. Es können nun zwei sgRNAs selektiert werden, die in unmittelbarer Nähe beide Stränge unabhängig voneinander durchtrennen. Eine sgRNA schneidet den komplementären, die andere den nicht-komplementären Strang. So können off-target-Effekte um das 50-1500-fache reduziert werden (Ran et al. 2013a). Bei der Cas9 H840A Nickase wird aufgrund der inaktiven HNH-Domäne nur der nicht-komplementäre DNA Strang durchtrennt. Weiterhin können zwei Cas9 nicking-

Enzyme, welche von zwei sgRNAs gesteuert werden und welche auf gegenüber liegenden Strängen der Zielsequenz abzielen, unter geringerer off-target-Aktivität Doppelstrangbrüche induzieren (Ran et al. 2013a).

Eine andere Methode beschreibt die Fusion von dCas9 (inaktiv) und einer FokI-Nuklease Domäne. Das entstandene Produkt wird als fCas9 bezeichnet und zeigt ein über 14-fache Spezifität als Wildtyp Cas9 und eine 4-fach höhere als andere gepaarte Nickasen (Guilinger et al. 2014; Tsai et al. 2014). Tru-RFN (truncated RNA-guided FokI Nuclease), welches trunkeierte gRNAs und FokI-dCas9 kombiniert, zeigt eine reduzierte off-target-Aktivität um 40 % (Wyvekens et al. 2015).

Ferner wird in der Literatur beschrieben, dass chemisch modifizierte sgRNAs mit Cas9-mRNA oder Cas9 selbst in die Zelle geschleust werden können, was eine niedriges Zytotoxizitätslevel mit sich bringt als das Einbringen eines Plasmids (Hendel et al. 2015).

Zur Untersuchung der Chromosomen sollte zudem eine Karyotyp-Analyse durchgeführt werden. Dies ist ein Verfahren, um Chromosomen eines Organismus zählen zu können und auf Anomalitäten zu untersuchen. Hierbei werden folgende Punkte untersucht: relative und absolute Größe der Chromosome, Position der Telomere, Anzahl der Chromosome, Anzahl und Position von Satelliten, Grad und Verteilung der heterochromatischen Regionen.

Zur Verifizierung der vorliegenden Ergebnisse sollen in weiteren Versuchsreihen mindestens 3 weitere knockout Klone erzeugt werden. Dies ist essenziell und gilt als Standardverfahren, da es in Zellkulturen häufig zu Mutationen kommt. Mutierte Zellen haben oft einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Zellen und setzen sich in der Kultur durch. Zur Bestätigung eines Phänotyps sollten sogenannte *rescue*-Experimente durchgeführt werden. Das bedeutet in diesen Fall, dass bestätigt werden muss, dass der entstandene Phänotyp des Cx43-KO-Klons auf die Wirkung des fehlenden Connexins 43 zurück zu führen ist. Ein geeignetes Verfahren ist das der Tetracyclin-gesteuerten Transkriptionsaktivierung (Tet-OFF/TRE-CMV oder Tet-ON/Tre-CMV). Hier wird

die Transkription in Gegenwart von Tetracyclin (oder eines Derivates) reversibel ein- oder ausgeschaltet (Gossen et al. 1995).

Zukünftig sollte weiterhin über das Deletieren größerer Bereiche für den Cx43-knockout nachgedacht werden. Wie schon erwähnt, ist eine Deletion eines größeren Bereichs der DNA möglich (Campa et al. 2019; Song et al. 2017; Song et al. 2016; Zheng et al. 2014). Mit Hilfe dieser Technik ließe sich die gesamte codierende Region von Cx43 ausschneiden. Gegenüber der Leseraster-Verschiebung bietet dies den Vorteil, dass hierbei keine kurzen nonsense-Peptide entstehen, welche sich auf die Zelle auswirken könnten. Die Effizienz der Deletion großer DNA-Sequenzen kann hierbei durch die Anwendung mehrerer sgRNAs auf 33,3 % erhöht werden (Han et al. 2014). Ein weiteres Ziel ist die Erzeugung komplett kopplungsdefizienter iPSC-Zelllinien mit Hilfe Doppel- und Dreifach-knockouts von Cx40, Cx43 und Cx45 mit Hilfe des Multiplex-Verfahrens (Cong et al. 2013). Weiterhin können iPSC-Defektmutanten zum Test potentieller pharmakologischer Ansätze dienen.

Die Rolle und Funktionen von Cx43 sind bis heute nicht komplett erforscht. Bei Betrachtung der Krankheit ODDD wird klar, dass die Mutationen vielseitig sind und eine teils große Einschränkung der Lebensqualität bedeuten können. Um die Funktion des Cx43 weiter untersuchen und verstehen zu können, sollten neben dem Cx43-KO und Mehrfach-knockouts auch verschiedene ODDD-Mutationen erzeugt werden. Somit könnten mehr als 62 Mutationen (bspw. missense R76H Mutation, nonsense R33X Mutation, nonsense p.Arg148Ter Mutation) nachgeahmt werden, da viele Mutationen bekannt sind.

In weiteren Experimenten sollen die Cx43-defizienten Zellen zudem zur Untersuchung der Rolle des Cx43 bei der radialen Migration bzw. Proliferation von neuralen Stammzellen in kortikalen Organoiden dienen. Negative Auswirkungen der Cx43-Defizienz auf neuronales Gewebe wurde von einer anderen Arbeitsgruppe schon nachgewiesen (Elias et al. 2007). Anhand von Organoiden soll das Verhalten Connexin 43-defizienter Stammzellen im Zellverband untersucht werden. Organoide bieten eine ausgezeichnete Möglichkeit die komplexen embryonalen Prozesse *in vitro* nachzuahmen und zu

untersuchen. Ein Organoid besteht aus einer Ansammlung organspezifischer Zellen, die sich aus Stammzellen oder Organvorläuferzellen differenzieren und selbst organisieren (Huch und Koo 2015). Hier kann zu einen die Rolle von Cx43, aber auch von den anderen Connexinen bei der frühen Embryonalentwicklung untersucht werden. Des Weiteren können Erkrankungen nachgeahmt und untersucht werden (Drost und Clevers 2018; Fatehullah et al. 2016).

## 5. Zusammenfassung

Die Rolle von Connexinen und Gap Junction-vermittelter Kommunikation in pluripotenten Stammzellen sowie der frühen Embryonalentwicklung sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Mutationen in humanen Connexinen verursachen eine Vielzahl von Krankheiten. Allein die Proteine Cx26 und Cx43 sind für die Hälfte dieser verantwortlich. Der Krankheitskomplex ODDD, der auf Mutationen des Cx43 zurück zu führen ist, ist hierbei ein gutes Beispiel. Connexin-defiziente iPS Zellen stellen eine gute Basis für die Erforschung der Rolle von Connexinen während der Embryonalentwicklung und bei der Krankheitsentstehung dar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das CRISPR/Cas9-System in pluripotenten Stammzellen erfolgreich anzuwenden und ein Protokoll zur Erstellung verschiedener Cx43-Defektmutanten zu entwerfen. Nach der Etablierung der CRISPR/Cas9-Methode in HEK293T-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit darüber hinaus erfolgreich eine Cx43-Defizienz in FSiPS-Zellen erzeugt werden. Weiterhin wurden mehrere Cx43-Mutanten geschaffen und initial auf Pluripotenzmarker und ihr Differenzierungspotential untersucht.

Diese Arbeit bildet die Basis für weitere Untersuchungen des Cx43 in iPS-Zellklonen und davon abgeleiteten Zelltypen sowie artifiziellen 3D-Gewebekulturen. Darüber hinaus bildet sie die Grundlage für die Bildung weiterer Connexin-Defektmutanten sowie von iPS-Zellen mit krankheitsrelevanten Mutationen.

Diese Experimente ermöglichen tiefere Einblicke in entwicklungsbiologische Prozesse sowie die Entstehung humaner Krankheiten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abrams, C. K., Oh, S., Ri, Y. und Bargiello, T. A. (2000). **Mutations in connexin 32: the molecular and biophysical bases for the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease.** *Brain Res Brain Res Rev* 32, 203-214.
- Alexander, D. B. und Goldberg, G. S. (2003). **Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels.** *Curr Med Chem* 10, 2045-2058.
- Andrews, P. W., Banting, G., Damjanov, I., Arnaud, D. und Avner, P. (1984). **Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells.** *Hybridoma* 3, 347-361, doi: 10.1089/hyb.1984.3.347.
- Armiger, T. J., Lampi, M. C., Reinhart-King, C. A. und Dahl, K. N. (2018). **Determining mechanical features of modulated epithelial monolayers using subnuclear particle tracking.** *J Cell Sci* 131, doi: 10.1242/jcs.216010.
- Attig, A., Trabelsi, M., Hizem, S., Ben Jemaa, L., Maazoul, F., Chaouachi, S. und Mrad, R. (2016). **Oculo-Dento-Digital Dysplasia in a Tunisian Family with a Novel Gja1 Mutation.** *Genet Couns* 27, 433-439.
- Aucher, A., Rudnicka, D. und Davis, D. M. (2013). **MicroRNAs transfer from human macrophages to hepato-carcinoma cells and inhibit proliferation.** *J Immunol* 191, 6250-6260, doi: 10.4049/jimmunol.1301728.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N. und Lovell-Badge, R. (2003). **Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function.** *Genes Dev* 17, 126-140, doi: 10.1101/gad.224503.
- Avshalumova, L., Fabrikant, J. und Koriakos, A. (2014). **Overview of skin diseases linked to connexin gene mutations.** *Int J Dermatol* 53, 192-205, doi: 10.1111/ijd.12062.
- Bachellier, S., Clement, J. M., Hofnung, M. und Gilson, E. (1997). **Bacterial interspersed mosaic elements (BIMEs) are a major source of sequence polymorphism in Escherichia coli intergenic regions including specific associations with a new insertion sequence.** *Genetics* 145, 551-562.
- Barker, R. A., Parmar, M., Kirkeby, A., Bjorklund, A., Thompson, L. und Brundin, P. (2016). **Are Stem Cell-Based Therapies for Parkinson's Disease Ready for the Clinic in 2016? J Parkinsons Dis** 6, 57-63, doi: 10.3233/JPD-160798.

- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. und Horvath, P. (2007). **CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes**. *Science* 315, 1709-1712, doi: 10.1126/science.1138140.
- Barrangou, R. und Marraffini, L. A. (2014). **CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity**. *Mol Cell* 54, 234-244, doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.011.
- Becker, D. L., Evans, W. H., Green, C. R. und Warner, A. (1995). **Functional analysis of amino acid sequences in connexin43 involved in intercellular communication through gap junctions**. *J Cell Sci* 108 ( Pt 4), 1455-1467.
- Begandt, D., Good, M. E., Keller, A. S., DeLalio, L. J., Rowley, C., Isakson, B. E. und Figueroa, X. F. (2017). **Pannexin channel and connexin hemichannel expression in vascular function and inflammation**. *BMC Cell Biol* 18, 2, doi: 10.1186/s12860-016-0119-3.
- Belousov, A. B., Fontes, J. D., Freitas-Andrade, M. und Naus, C. C. (2017). **Gap junctions and hemichannels: communicating cell death in neurodevelopment and disease**. *BMC Cell Biol* 18, 4, doi: 10.1186/s12860-016-0120-x.
- Bergoffen, J., Scherer, S. S., Wang, S., Scott, M. O., Bone, L. J., Paul, D. L., Chen, K., Lensch, M. W., Chance, P. F. und Fischbeck, K. H. (1993). **Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease**. *Science* 262, 2039-2042.
- Berry, V., Mackay, D., Khaliq, S., Francis, P. J., Hameed, A., Anwar, K., Mehdi, S. Q., Newbold, R. J., Ionides, A., Shiels, A., Moore, T. und Bhattacharya, S. S. (1999). **Connexin 50 mutation in a family with congenital "zonular nuclear" pulverulent cataract of Pakistani origin**. *Hum Genet* 105, 168-170.
- Beyer, E. C., Davis, L. M., Saffitz, J. E. und Veenstra, R. D. (1995). **Cardiac intercellular communication: consequences of connexin distribution and diversity**. *Braz J Med Biol Res* 28, 415-425.
- Beyer, E. C., Ebihara, L. und Berthoud, V. M. (2013). **Connexin mutants and cataracts**. *Front Pharmacol* 4, 43, doi: 10.3389/fphar.2013.00043.
- Bhaya, D., Davison, M. und Barrangou, R. (2011). **CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation**. *Annu Rev Genet* 45, 273-297, doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132430.
- Bjorklund, L. M., Sanchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I. Y., McNaught, K. S., Brownell, A. L., Jenkins, B. G., Wahlestedt, C., Kim, K. S. und Isacson, O. (2002). **Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2344-2349, doi: 10.1073/pnas.022438099.

- Bloor, D. J., Wilson, Y., Kibschull, M., Traub, O., Leese, H. J., Winterhager, E. und Kimber, S. J. (2004). **Expression of connexins in human preimplantation embryos in vitro**. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 25, doi: 10.1186/1477-7827-2-25.
- Boch, J. (2011). **TALEs of genome targeting**. *Nat Biotechnol* 29, 135-136, doi: 10.1038/nbt.1767.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. und Ehrlich, S. D. (2005). **Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin**. *Microbiology* 151, 2551-2561, doi: 10.1099/mic.0.28048-0.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R. und Young, R. A. (2005). **Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells**. *Cell* 122, 947-956, doi: 10.1016/j.cell.2005.08.020.
- Bradford, M. M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Branzei, D. und Foiani, M. (2008). **Regulation of DNA repair throughout the cell cycle**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 297-308, doi: 10.1038/nrm2351.
- Brink, P. R., Cronin, K., Banach, K., Peterson, E., Westphale, E. M., Seul, K. H., Ramanan, S. V. und Beyer, E. C. (1997). **Evidence for heteromeric gap junction channels formed from rat connexin43 and human connexin37**. *Am J Physiol* 273, C1386-1396.
- Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V. und van der Oost, J. (2008). **Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes**. *Science* 321, 960-964, doi: 10.1126/science.1159689.
- Cai, J., Cheng, A., Luo, Y., Lu, C., Mattson, M. P., Rao, M. S. und Furukawa, K. (2004). **Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells**. *J Neurochem* 88, 212-226, doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02184.x.
- Campa, C. C., Weisbach, N. R., Santinha, A. J., Incarnato, D. und Platt, R. J. (2019). **Multiplexed genome engineering by Cas12a and CRISPR arrays encoded on single transcripts**. *Nat Methods* 16, 887-893, doi: 10.1038/s41592-019-0508-6.
- Carte, J., Pfister, N. T., Compton, M. M., Terns, R. M. und Terns, M. P. (2010). **Binding and cleavage of CRISPR RNA by Cas6**. *RNA* 16, 2181-2188, doi: 10.1261/rna.2230110.



- Carte, J., Wang, R., Li, H., Terns, R. M. und Terns, M. P. (2008). **Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes.** *Genes Dev* 22, 3489-3496, doi: 10.1101/gad.1742908.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. und Smith, A. (2003). **Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells.** *Cell* 113, 643-655.
- Chapman, J. R., Taylor, M. R. und Boulton, S. J. (2012). **Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice.** *Mol Cell* 47, 497-510, doi: 10.1016/j.molcel.2012.07.029.
- Cheng, J. C., Chang, H. M., Fang, L., Sun, Y. P. und Leung, P. C. (2015). **TGF-beta1 up-regulates connexin43 expression: a potential mechanism for human trophoblast cell differentiation.** *J Cell Physiol* 230, 1558-1566, doi: 10.1002/jcp.24902.
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S. und Kim, J. S. (2014). **Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases.** *Genome Res* 24, 132-141, doi: 10.1101/gr.162339.113.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. und Zhang, F. (2013). **Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.** *Science* 339, 819-823, doi: 10.1126/science.1231143.
- Cowan, A. (1959). **Leontiasis ossea; report of a case.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 12, 983-995.
- Dahl, E., Winterhager, E., Reuss, B., Traub, O., Butterweck, A. und Willecke, K. (1996). **Expression of the gap junction proteins connexin31 and connexin43 correlates with communication compartments in extraembryonic tissues and in the gastrulating mouse embryo, respectively.** *J Cell Sci* 109 ( Pt 1), 191-197.
- Davies, T. C., Barr, K. J., Jones, D. H., Zhu, D. und Kidder, G. M. (1996). **Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse.** *Dev Genet* 18, 234-243, doi: 10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:3<234::AID-DVG4>3.0.CO;2-A.
- Davis, M. W. (2003). **ApE A plasmid Editor** (M. Wayne Davis, [Stand: 2016, April 25]).
- De Sousa, P. A., Juneja, S. C., Caveney, S., Houghton, F. D., Davies, T. C., Reaume, A. G., Rossant, J. und Kidder, G. M. (1997). **Normal development of preimplantation mouse embryos deficient in gap junctional coupling.** *J Cell Sci* 110 ( Pt 15), 1751-1758.

- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J. und Charpentier, E. (2011). **CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III**. *Nature* 471, 602-607, doi: 10.1038/nature09886.
- Deshpande, D. M., Kim, Y. S., Martinez, T., Carmen, J., Dike, S., Shats, I., Rubin, L. L., Drummond, J., Krishnan, C., Hoke, A., Maragakis, N., Shefner, J., Rothstein, J. D. und Kerr, D. A. (2006). **Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells**. *Ann Neurol* 60, 32-44, doi: 10.1002/ana.20901.
- Drost, J. und Clevers, H. (2018). **Organoids in cancer research**. *Nat Rev Cancer* 18, 407-418, doi: 10.1038/s41568-018-0007-6.
- Eiberger, J., Degen, J., Romualdi, A., Deutsch, U., Willecke, K. und Sohl, G. (2001). **Connexin genes in the mouse and human genome**. *Cell Commun Adhes* 8, 163-165.
- Elias, L. A., Wang, D. D. und Kriegstein, A. R. (2007). **Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex**. *Nature* 448, 901-907, doi: 10.1038/nature06063.
- Elling, U., Wimmer, R. A., Leibbrandt, A., Burkard, T., Michlits, G., Leopoldi, A., Micheler, T., Abdeen, D., Zhuk, S., Aspalter, I. M., Handl, C., Liebergesell, J., Hubmann, M., Husa, A. M., Kinzer, M., Schuller, N., Wetzell, E., van de Loo, N., Martinez, J. A. Z., Estoppey, D., Riedl, R., Yang, F., Fu, B., Dechat, T., Ivics, Z., Agu, C. A., Bell, O., Blaas, D., Gerhardt, H., Hoepfner, D., Stark, A. und Penninger, J. M. (2017). **A reversible haploid mouse embryonic stem cell biobank resource for functional genomics**. *Nature* 550, 114-118, doi: 10.1038/nature24027.
- Esseltine, J. L. und Laird, D. W. (2016). **Next-Generation Connexin and Pannexin Cell Biology**. *Trends Cell Biol* 26, 944-955, doi: 10.1016/j.tcb.2016.06.003.
- Esseltine, J. L., Shao, Q., Brooks, C., Sampson, J., Betts, D. H., Seguin, C. A. und Laird, D. W. (2017). **Connexin43 Mutant Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Altered Differentiation Potential**. *J Bone Miner Res* 32, 1368-1385, doi: 10.1002/jbmr.3098.
- Evans, M. J. und Kaufman, M. H. (1981). **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos**. *Nature* 292, 154-156.
- Farooq, T., Rehman, K., Hameed, A. und Akash, M. S. H. (2018). **Stem Cell Therapy and Type 1 Diabetes Mellitus: Treatment Strategies and Future Perspectives**. *Adv Exp Med Biol*, doi: 10.1007/5584\_2018\_195.
- Fatehullah, A., Tan, S. H. und Barker, N. (2016). **Organoids as an in vitro model of human development and disease**. *Nat Cell Biol* 18, 246-254, doi: 10.1038/ncb3312.

- Figueroa, X. F. und Duling, B. R. (2009). **Gap junctions in the control of vascular function.** *Antioxid Redox Signal* *11*, 251-266, doi: 10.1089/ars.2008.2117.
- Fishman, G. I., Eddy, R. L., Shows, T. B., Rosenthal, L. und Leinwand, L. A. (1991). **The human connexin gene family of gap junction proteins: distinct chromosomal locations but similar structures.** *Genomics* *10*, 250-256.
- Flenniken, A. M., Osborne, L. R., Anderson, N., Ciliberti, N., Fleming, C., Gittens, J. E., Gong, X. Q., Kelsey, L. B., Lounsbury, C., Moreno, L., Nieman, B. J., Peterson, K., Qu, D., Roscoe, W., Shao, Q., Tong, D., Veitch, G. I., Voronina, I., Vukobradovic, I., Wood, G. A., Zhu, Y., Zirngibl, R. A., Aubin, J. E., Bai, D., Bruneau, B. G., Grynopas, M., Henderson, J. E., Henkelman, R. M., McKerlie, C., Sled, J. G., Stanford, W. L., Laird, D. W., Kidder, G. M., Adamson, S. L. und Rossant, J. (2005). **A Gja1 missense mutation in a mouse model of oculodentodigital dysplasia.** *Development* *132*, 4375-4386, doi: 10.1242/dev.02011.
- Forge, A., Becker, D., Casalotti, S., Edwards, J., Evans, W. H., Lench, N. und Souter, M. (1999). **Gap junctions and connexin expression in the inner ear.** *Novartis Found Symp* *219*, 134-150; discussion 151-136.
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K. und Sander, J. D. (2013). **High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells.** *Nat Biotechnol* *31*, 822-826, doi: 10.1038/nbt.2623.
- Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M. und Joung, J. K. (2014). **Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs.** *Nat Biotechnol* *32*, 279-284, doi: 10.1038/nbt.2808.
- Fuchs-Telem, D., Pessach, Y., Mevorah, B., Shirazi, I., Sarig, O. und Sprecher, E. (2011). **Erythrokeratoderma variabilis caused by a recessive mutation in GJB3.** *Clin Exp Dermatol* *36*, 406-411, doi: 10.1111/j.1365-2230.2010.03986.x.
- Garneau, J. E., Dupuis, M. E., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadan, A. H. und Moineau, S. (2010). **The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA.** *Nature* *468*, 67-71, doi: 10.1038/nature09523.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. und Siksnys, V. (2012). **Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, E2579-2586, doi: 10.1073/pnas.1208507109.
- Godde, J. S. und Bickerton, A. (2006). **The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes.** *J Mol Evol* *62*, 718-729, doi: 10.1007/s00239-005-0223-z.

- Gollob, M. H., Jones, D. L., Krahn, A. D., Danis, L., Gong, X. Q., Shao, Q., Liu, X., Veinot, J. P., Tang, A. S., Stewart, A. F., Tesson, F., Klein, G. J., Yee, R., Skanes, A. C., Guiraudon, G. M., Ebihara, L. und Bai, D. (2006). **Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation**. *N Engl J Med* 354, 2677-2688, doi: 10.1056/NEJMoa052800.
- Gong, X. Q., Shao, Q., Langlois, S., Bai, D. und Laird, D. W. (2007). **Differential potency of dominant negative connexin43 mutants in oculodigital dysplasia**. *J Biol Chem* 282, 19190-19202, doi: 10.1074/jbc.M609653200.
- Gorlin, R. J., Miskin, L. H. und St, G. J. (1963). **Oculodigital dysplasia**. *J Pediatr* 63, 69-75.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. und Bujard, H. (1995). **Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells**. *Science* 268, 1766-1769, doi: 10.1126/science.7792603.
- Gottesman, S. (2011). **Microbiology: Dicing defence in bacteria**. *Nature* 471, 588-589, doi: 10.1038/471588a.
- Grealish, S., Diguët, E., Kirkeby, A., Mattsson, B., Heuer, A., Bramouille, Y., Van Camp, N., Perrier, A. L., Hantraye, P., Bjorklund, A. und Parmar, M. (2014). **Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease**. *Cell Stem Cell* 15, 653-665, doi: 10.1016/j.stem.2014.09.017.
- Grissa, I., Vergnaud, G. und Pourcel, C. (2007). **The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats**. *BMC Bioinformatics* 8, 172, doi: 10.1186/1471-2105-8-172.
- Gros, D. B. und Jongsma, H. J. (1996). **Connexins in mammalian heart function**. *Bioessays* 18, 719-730, doi: 10.1002/bies.950180907.
- Guilinger, J. P., Thompson, D. B. und Liu, D. R. (2014). **Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification**. *Nat Biotechnol* 32, 577-582, doi: 10.1038/nbt.2909.
- Guschin, D. Y., Waite, A. J., Katibah, G. E., Miller, J. C., Holmes, M. C. und Rebar, E. J. (2010). **A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification**. *Methods Mol Biol* 649, 247-256, doi: 10.1007/978-1-60761-753-2\_15.
- Gutmann, D. H., Zackai, E. H., McDonald-McGinn, D. M., Fischbeck, K. H. und Kamholz, J. (1991). **Oculodigital dysplasia syndrome associated with abnormal cerebral white matter**. *Am J Med Genet* 41, 18-20, doi: 10.1002/ajmg.1320410106.

- Han, J., Zhang, J., Chen, L., Shen, B., Zhou, J., Hu, B., Du, Y., Tate, P. H., Huang, X. und Zhang, W. (2014). **Efficient in vivo deletion of a large imprinted lncRNA by CRISPR/Cas9**. *RNA Biol* 11, 829-835, doi: 10.4161/rna.29624.
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C. W., Meissner, A., Cassady, J. P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L. C., Townes, T. M. und Jaenisch, R. (2007). **Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin**. *Science* 318, 1920-1923, doi: 10.1126/science.1152092.
- Hardy, K., Warner, A., Winston, R. M. und Becker, D. L. (1996). **Expression of intercellular junctions during preimplantation development of the human embryo**. *Mol Hum Reprod* 2, 621-632.
- Hendel, A., Bak, R. O., Clark, J. T., Kennedy, A. B., Ryan, D. E., Roy, S., Steinfeld, I., Lunstad, B. D., Kaiser, R. J., Wilkens, A. B., Bacchetta, R., Tsalenko, A., Dellinger, D., Bruhn, L. und Porteus, M. H. (2015). **Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells**. *Nat Biotechnol* 33, 985-989, doi: 10.1038/nbt.3290.
- Hormuzdi, S. G., Filippov, M. A., Mitropoulou, G., Monyer, H. und Bruzzone, R. (2004). **Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks**. *Biochim Biophys Acta* 1662, 113-137, doi: 10.1016/j.bbamem.2003.10.023.
- Horvath, P. und Barrangou, R. (2010). **CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea**. *Science* 327, 167-170, doi: 10.1126/science.1179555.
- Houghton, F. D., Barr, K. J., Walter, G., Gabriel, H. D., Grummer, R., Traub, O., Leese, H. J., Winterhager, E. und Kidder, G. M. (2002). **Functional significance of gap junctional coupling in preimplantation development**. *Biol Reprod* 66, 1403-1412.
- Hu, J., Meyers, R. M., Dong, J., Panchakshari, R. A., Alt, F. W. und Frock, R. L. (2016). **Detecting DNA double-stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing**. *Nat Protoc* 11, 853-871, doi: 10.1038/nprot.2016.043.
- Huch, M. und Koo, B. K. (2015). **Modeling mouse and human development using organoid cultures**. *Development* 142, 3113-3125, doi: 10.1242/dev.118570.
- Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A. R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., Wu, W., Guan, J., Terzoudi, G. und Pantelias, G. (2004). **Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation**. *Cytogenet Genome Res* 104, 14-20, doi: 10.1159/000077461.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. und 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, 5429-5433.

- Jansen, R., Embden, J. D., Gastra, W. und Schouls, L. M. (2002). **Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes**. *Mol Microbiol* 43, 1565-1575.
- Jiang, J. X., Siller-Jackson, A. J. und Burra, S. (2007). **Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress**. *Front Biosci* 12, 1450-1462, doi: 10.2741/2159.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. und Charpentier, E. (2012). **A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity**. *Science* 337, 816-821, doi: 10.1126/science.1225829.
- Kalcheva, N., Qu, J., Sandeep, N., Garcia, L., Zhang, J., Wang, Z., Lampe, P. D., Suadicani, S. O., Spray, D. C. und Fishman, G. I. (2007). **Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis in a murine model of oculodentodigital dysplasia**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20512-20516, doi: 10.1073/pnas.0705472105.
- Kalimi, G. H. und Lo, C. W. (1988). **Communication compartments in the gastrulating mouse embryo**. *J Cell Biol* 107, 241-255, doi: 10.1083/jcb.107.1.241.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M. und van Embden, J. (1997). **Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology**. *J Clin Microbiol* 35, 907-914.
- Karginov, F. V. und Hannon, G. J. (2010). **The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea**. *Mol Cell* 37, 7-19, doi: 10.1016/j.molcel.2009.12.033.
- Katakowski, M., Buller, B., Wang, X., Rogers, T. und Chopp, M. (2010). **Functional microRNA is transferred between glioma cells**. *Cancer Res* 70, 8259-8263, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0604.
- Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R. F. und Leigh, I. M. (1997). **Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness**. *Nature* 387, 80-83, doi: 10.1038/387080a0.
- Kibschull, M., Gellhaus, A., Carette, D., Segretain, D., Pointis, G. und Gilleron, J. (2015). **Physiological roles of connexins and pannexins in reproductive organs**. *Cell Mol Life Sci* 72, 2879-2898, doi: 10.1007/s00018-015-1965-4.
- Kibschull, M., Magin, T. M., Traub, O. und Winterhager, E. (2005). **Cx31 and Cx43 double-deficient mice reveal independent functions in murine placental and skin development**. *Dev Dyn* 233, 853-863, doi: 10.1002/dvdy.20424.

- Kim, D., Bae, S., Park, J., Kim, E., Kim, S., Yu, H. R., Hwang, J., Kim, J. I. und Kim, J. S. (2015). **Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells.** *Nat Methods* 12, 237-243, 231 p following 243, doi: 10.1038/nmeth.3284.
- Kim, D., Kim, S., Kim, S., Park, J. und Kim, J. S. (2016). **Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq.** *Genome Res* 26, 406-415, doi: 10.1101/gr.199588.115.
- Kleinstiver, B. P., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Topkar, V. V., Nguyen, N. T., Zheng, Z., Gonzales, A. P., Li, Z., Peterson, R. T., Yeh, J. R., Aryee, M. J. und Joung, J. K. (2015). **Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities.** *Nature* 523, 481-485, doi: 10.1038/nature14592.
- Kleopa, K. A., Abrams, C. K. und Scherer, S. S. (2012). **How do mutations in GJB1 cause X-linked Charcot-Marie-Tooth disease?** *Brain Res* 1487, 198-205, doi: 10.1016/j.brainres.2012.03.068.
- Kleopa, K. A. und Scherer, S. S. (2006). **Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease.** *Neuromolecular Med* 8, 107-122, doi: 10.1385/NMM:8:1:107.
- Kruger, O., Plum, A., Kim, J. S., Winterhager, E., Maxeiner, S., Hallas, G., Kirchhoff, S., Traub, O., Lamers, W. H. und Willecke, K. (2000). **Defective vascular development in connexin 45-deficient mice.** *Development* 127, 4179-4193.
- Kumar, N. M. und Gilula, N. B. (1996). **The gap junction communication channel.** *Cell* 84, 381-388.
- Laird, D. W. (2006). **Life cycle of connexins in health and disease.** *Biochem J* 394, 527-543, doi: 10.1042/BJ20051922.
- Laird, D. W. (2008). **Closing the gap on autosomal dominant connexin-26 and connexin-43 mutants linked to human disease.** *J Biol Chem* 283, 2997-3001, doi: 10.1074/jbc.R700041200.
- Laird, D. W. und Revel, J. P. (1990). **Biochemical and immunochemical analysis of the arrangement of connexin43 in rat heart gap junction membranes.** *J Cell Sci* 97 ( Pt 1), 109-117.
- Lee, J. R. und White, T. W. (2009). **Connexin-26 mutations in deafness and skin disease.** *Expert Rev Mol Med* 11, e35, doi: 10.1017/S1462399409001276.
- Lemcke, H., Steinhoff, G. und David, R. (2015). **Gap junctional shuttling of miRNA--A novel pathway of intercellular gene regulation and its prospects in clinical application.** *Cell Signal* 27, 2506-2514, doi: 10.1016/j.cellsig.2015.09.012.

- Leybaert, L., Lampe, P. D., Dhein, S., Kwak, B. R., Ferdinandy, P., Beyer, E. C., Laird, D. W., Naus, C. C., Green, C. R. und Schulz, R. (2017). **Connexins in Cardiovascular and Neurovascular Health and Disease: Pharmacological Implications**. *Pharmacol Rev* 69, 396-478, doi: 10.1124/pr.115.012062.
- Lillestol, R. K., Redder, P., Garrett, R. A. und Brugger, K. (2006). **A putative viral defence mechanism in archaeal cells**. *Archaea* 2, 59-72.
- Lintner, N. G., Kerou, M., Brumfield, S. K., Graham, S., Liu, H., Naismith, J. H., Sdano, M., Peng, N., She, Q., Copie, V., Young, M. J., White, M. F. und Lawrence, C. M. (2011). **Structural and functional characterization of an archaeal clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated complex for antiviral defense (CASCADE)**. *J Biol Chem* 286, 21643-21656, doi: 10.1074/jbc.M111.238485.
- Lo, C. W. und Gilula, N. B. (1979a). **Gap junctional communication in the post-implantation mouse embryo**. *Cell* 18, 411-422.
- Lo, C. W. und Gilula, N. B. (1979b). **Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo**. *Cell* 18, 399-409.
- Loewenstein, W. R. (1965). **Permeability of a nuclear membrane: changes during normal development and changes induced by growth hormone**. *Science* 150, 909-910.
- Lubkemeier, I., Andrie, R., Lickfett, L., Bosen, F., Stockigt, F., Dobrowolski, R., Draffehn, A. M., Fregeac, J., Schultze, J. L., Bukauskas, F. F., Schrickel, J. W. und Willecke, K. (2013). **The Connexin40A96S mutation from a patient with atrial fibrillation causes decreased atrial conduction velocities and sustained episodes of induced atrial fibrillation in mice**. *J Mol Cell Cardiol* 65, 19-32, doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.09.008.
- Lucke, T., Choudhry, R., Thom, R., Selmer, I. S., Burden, A. D. und Hodgins, M. B. (1999). **Upregulation of connexin 26 is a feature of keratinocyte differentiation in hyperproliferative epidermis, vaginal epithelium, and buccal epithelium**. *J Invest Dermatol* 112, 354-361, doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00512.x.
- Lupski, J. R., Roth, J. R. und Weinstock, G. M. (1996). **Chromosomal duplications in bacteria, fruit flies, and humans**. *Am J Hum Genet* 58, 21-27.
- Makarova, K. S., Aravind, L., Wolf, Y. I. und Koonin, E. V. (2011a). **Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems**. *Biol Direct* 6, 38, doi: 10.1186/1745-6150-6-38.



- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., van der Oost, J. und Koonin, E. V. (2011b). **Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems.** *Nat Rev Microbiol* *9*, 467-477, doi: 10.1038/nrmicro2577.
- Marraffini, L. A. und Sontheimer, E. J. (2008). **CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA.** *Science* *322*, 1843-1845, doi: 10.1126/science.1165771.
- Martin, G. R. (1981). **Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* *78*, 7634-7638.
- Martins-Marques, T., Anjo, S. I., Pereira, P., Manadas, B. und Girao, H. (2015). **Interacting Network of the Gap Junction (GJ) Protein Connexin43 (Cx43) is Modulated by Ischemia and Reperfusion in the Heart.** *Mol Cell Proteomics* *14*, 3040-3055, doi: 10.1074/mcp.M115.052894.
- Mathias, R. T., White, T. W. und Gong, X. (2010). **Lens gap junctions in growth, differentiation, and homeostasis.** *Physiol Rev* *90*, 179-206, doi: 10.1152/physrev.00034.2009.
- McLachlan, E., Manias, J. L., Gong, X. Q., Lounsbury, C. S., Shao, Q., Bernier, S. M., Bai, D. und Laird, D. W. (2005). **Functional characterization of oculodentodigital dysplasia-associated Cx43 mutants.** *Cell Commun Adhes* *12*, 279-292, doi: 10.1080/15419060500514143.
- Meyer-Schwickerath, G., Gruterich, E. und Weyers, H. (1957). **[The microphthalmos syndrome].** *Klin Monbl Augenheilkd Augenarztl Fortbild* *131*, 18-30.
- Microsynth, S. (Microsynth Seqlab). URL: <https://www.microsynth.seqlab.de/home-de.html> [Stand:2016, April 09].
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. und Yamanaka, S. (2003). **The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells.** *Cell* *113*, 631-642.
- Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J. und Soria, E. (2005). **Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements.** *J Mol Evol* *60*, 174-182, doi: 10.1007/s00239-004-0046-3.
- Mojica, F. J., Ferrer, C., Juez, G. und Rodriguez-Valera, F. (1995). **Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning.** *Mol Microbiol* *17*, 85-93.

- Moreno, A. P. (2004). **Biophysical properties of homomeric and heteromultimeric channels formed by cardiac connexins**. *Cardiovasc Res* 62, 276-286, doi: 10.1016/j.cardiores.2004.03.003.
- Musil, L. S., Cunningham, B. A., Edelman, G. M. und Goodenough, D. A. (1990). **Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines**. *J Cell Biol* 111, 2077-2088.
- NCBI (2016). **GJA1 gap junction protein alpha 1 [ Homo sapiens (human) ]** URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2697> [Stand:2016, April 08].
- Neijssen, J., Pang, B. und Neefjes, J. (2007). **Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system**. *Prog Biophys Mol Biol* 94, 207-218, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.008.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. und Hofschneider, P. H. (1982). **Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields**. *EMBO J* 1, 841-845.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H. und Smith, A. (1998). **Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4**. *Cell* 95, 379-391.
- Nicholson, B., Dermietzel, R., Teplow, D., Traub, O., Willecke, K. und Revel, J. P. (1987). **Two homologous protein components of hepatic gap junctions**. *Nature* 329, 732-734, doi: 10.1038/329732a0.
- Nickel, R. und Forge, A. (2008). **Gap junctions and connexins in the inner ear: their roles in homeostasis and deafness**. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 16, 452-457, doi: 10.1097/MOO.0b013e32830e20b0.
- Nishii, K., Kobayashi, Y. und Shibata, Y. (2016). **Absence of connexin43 and connexin45 does not disturb pre- and peri-implantation development**. *Zygote* 24, 457-464, doi: 10.1017/S0967199415000386.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F. und Nureki, O. (2014). **Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA**. *Cell* 156, 935-949, doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001.
- Niwa, H., Miyazaki, J. und Smith, A. G. (2000). **Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells**. *Nat Genet* 24, 372-376, doi: 10.1038/74199.

- Osaka, H., Hamanoue, H., Yamamoto, R., Nezu, A., Sasaki, M., Saitsu, H., Kurosawa, K., Shimbo, H., Matsumoto, N. und Inoue, K. (2010). **Disrupted SOX10 regulation of GJC2 transcription causes Pelizaeus-Merzbacher-like disease.** *Ann Neurol* 68, 250-254, doi: 10.1002/ana.22022.
- Oyamada, Y., Komatsu, K., Kimura, H., Mori, M. und Oyamada, M. (1996). **Differential regulation of gap junction protein (connexin) genes during cardiomyocytic differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro.** *Exp Cell Res* 229, 318-326, doi: 10.1006/excr.1996.0377.
- Ozturk, S., Can, I., Eser, B. und Yazici, H. (2016). **A Deletion Mutation of the Connexin 26 (Gjb2) Gene in a Turkish Patient with Vohwinkel Syndrome.** *Genet Couns* 27, 187-191.
- Pattanayak, V., Lin, S., Guiling, J. P., Ma, E., Doudna, J. A. und Liu, D. R. (2013). **High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity.** *Nat Biotechnol* 31, 839-843, doi: 10.1038/nbt.2673.
- Paznekas, W. A., Boyadjiev, S. A., Shapiro, R. E., Daniels, O., Wollnik, B., Keegan, C. E., Innis, J. W., Dinulos, M. B., Christian, C., Hannibal, M. C. und Jabs, E. W. (2003). **Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia.** *Am J Hum Genet* 72, 408-418, doi: 10.1086/346090.
- Paznekas, W. A., Karczeski, B., Vermeer, S., Lowry, R. B., Delatycki, M., Laurence, F., Koivisto, P. A., Van Maldergem, L., Boyadjiev, S. A., Bodurtha, J. N. und Jabs, E. W. (2009). **GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the oculodentodigital dysplasia phenotype.** *Hum Mutat* 30, 724-733, doi: 10.1002/humu.20958.
- Pesce, M. und Scholer, H. R. (2001). **Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development.** *Stem Cells* 19, 271-278, doi: 10.1634/stemcells.19-4-271.
- Pitter, J. und Svejda, J. (1952). **[The effect of x-rays as a cause of fetal misdevelopment].** *Ophthalmologica* 123, 386-393, doi: 10.1159/000301209.
- Plum, A., Winterhager, E., Pesch, J., Lautermann, J., Hallas, G., Rosentreter, B., Traub, O., Herberhold, C. und Willecke, K. (2001). **Connexin31-deficiency in mice causes transient placental dysmorphogenesis but does not impair hearing and skin differentiation.** *Dev Biol* 231, 334-347, doi: 10.1006/dbio.2000.0148.
- Pourcel, C., Salvignol, G. und 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, 653-663, doi: 10.1099/mic.0.27437-0.

- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., Scott, D. A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y. und Zhang, F. (2013a). **Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity.** *Cell* 154, 1380-1389, doi: 10.1016/j.cell.2013.08.021.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A. und Zhang, F. (2013b). **Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system.** *Nat Protoc* 8, 2281-2308, doi: 10.1038/nprot.2013.143.
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A. und Lundgren, M. (2015). **The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications.** *Biochimie* 117, 119-128, doi: 10.1016/j.biochi.2015.03.025.
- Reaume, A. G., de Sousa, P. A., Kulkarni, S., Langille, B. L., Zhu, D., Davies, T. C., Juneja, S. C., Kidder, G. M. und Rossant, J. (1995). **Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43.** *Science* 267, 1831-1834, doi: 10.1126/science.7892609.
- Reinhardt, P., Glatza, M., Hemmer, K., Tsytsyura, Y., Thiel, C. S., Hoing, S., Moritz, S., Parga, J. A., Wagner, L., Bruder, J. M., Wu, G., Schmid, B., Ropke, A., Klingauf, J., Schwamborn, J. C., Gasser, T., Scholer, H. R. und Sternecker, J. (2013). **Derivation and expansion using only small molecules of human neural progenitors for neurodegenerative disease modeling.** *PLoS One* 8, e59252, doi: 10.1371/journal.pone.0059252.
- Revel, J. P. und Karnovsky, M. J. (1967). **Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver.** *J Cell Biol* 33, C7-C12.
- Richard, G., Brown, N., Ishida-Yamamoto, A. und Krol, A. (2004). **Expanding the phenotypic spectrum of Cx26 disorders: Bart-Pumphrey syndrome is caused by a novel missense mutation in GJB2.** *J Invest Dermatol* 123, 856-863, doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23470.x.
- Richard, G., Brown, N., Rouan, F., Van der Schroeff, J. G., Bijlsma, E., Eichenfield, L. F., Sybert, V. P., Greer, K. E., Hogan, P., Campanelli, C., Compton, J. G., Bale, S. J., DiGiovanna, J. J. und Uitto, J. (2003). **Genetic heterogeneity in erythrokeratoderma variabilis: novel mutations in the connexin gene GJB4 (Cx30.3) and genotype-phenotype correlations.** *J Invest Dermatol* 120, 601-609, doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12080.x.
- Richard, G., Rouan, F., Willoughby, C. E., Brown, N., Chung, P., Ryyanen, M., Jabs, E. W., Bale, S. J., DiGiovanna, J. J., Uitto, J. und Russell, L. (2002). **Missense mutations in GJB2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis-deafness syndrome.** *Am J Hum Genet* 70, 1341-1348, doi: 10.1086/339986.
- Richardson, R., Donnai, D., Meire, F. und Dixon, M. J. (2004). **Expression of Gja1 correlates with the phenotype observed in oculodentodigital syndrome/type III syndactyly.** *J Med Genet* 41, 60-67.

- Robinton, D. A. und Daley, G. Q. (2012). **The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy.** *Nature* 481, 295-305, doi: 10.1038/nature10761.
- Roscoe, W., Veitch, G. I., Gong, X. Q., Pellegrino, E., Bai, D., McLachlan, E., Shao, Q., Kidder, G. M. und Laird, D. W. (2005). **Oculodentodigital dysplasia-causing connexin43 mutants are non-functional and exhibit dominant effects on wild-type connexin43.** *J Biol Chem* 280, 11458-11466, doi: 10.1074/jbc.M409564200.
- Rozental, R., Srinivas, M., Gokhan, S., Urban, M., Dermietzel, R., Kessler, J. A., Spray, D. C. und Mehler, M. F. (2000). **Temporal expression of neuronal connexins during hippocampal ontogeny.** *Brain Res Brain Res Rev* 32, 57-71.
- Saez, J. C., Berthoud, V. M., Kadle, R., Traub, O., Nicholson, B. J., Bennett, M. V. und Dermietzel, R. (1991). **Pinealocytes in rats: connexin identification and increase in coupling caused by norepinephrine.** *Brain Res* 568, 265-275, doi: 10.1016/0006-8993(91)91407-r.
- Salomon, D., Masgrau, E., Vischer, S., Ullrich, S., Dupont, E., Sappino, P., Saurat, J. H. und Meda, P. (1994). **Topography of mammalian connexins in human skin.** *J Invest Dermatol* 103, 240-247.
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P. und Siksnys, V. (2011). **The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*.** *Nucleic Acids Res* 39, 9275-9282, doi: 10.1093/nar/gkr606.
- Scherer, S. S. und Kleopa, K. A. (2012). **X-linked Charcot-Marie-Tooth disease.** *J Peripher Nerv Syst* 17 Suppl 3, 9-13, doi: 10.1111/j.1529-8027.2012.00424.x.
- Semenova, E., Jore, M. M., Datsenko, K. A., Semenova, A., Westra, E. R., Wanner, B., van der Oost, J., Brouns, S. J. und Severinov, K. (2011). **Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10098-10103, doi: 10.1073/pnas.1104144108.
- Shao, Q., Liu, Q., Lorentz, R., Gong, X. Q., Bai, D., Shaw, G. S. und Laird, D. W. (2012). **Structure and functional studies of N-terminal Cx43 mutants linked to oculodentodigital dysplasia.** *Mol Biol Cell* 23, 3312-3321, doi: 10.1091/mbc.E12-02-0128.
- Shein, H. M. und Enders, J. F. (1962). **Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 48, 1164-1172.

- Soares, A. R., Martins-Marques, T., Ribeiro-Rodrigues, T., Ferreira, J. V., Catarino, S., Pinho, M. J., Zuzarte, M., Isabel Anjo, S., Manadas, B., J. P. G. S., Pereira, P. und Girao, H. (2015). **Gap junctional protein Cx43 is involved in the communication between extracellular vesicles and mammalian cells**. *Sci Rep* 5, 13243, doi: 10.1038/srep13243.
- Sohl, G. und Willecke, K. (2003). **An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man**. *Cell Commun Adhes* 10, 173-180.
- Sohl, G. und Willecke, K. (2004). **Gap junctions and the connexin protein family**. *Cardiovasc Res* 62, 228-232, doi: 10.1016/j.cardiores.2003.11.013.
- Solan, J. L. und Lampe, P. D. (2009). **Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects**. *Biochem J* 419, 261-272, doi: 10.1042/BJ20082319.
- Song, W. K., Park, K. M., Kim, H. J., Lee, J. H., Choi, J., Chong, S. Y., Shim, S. H., Del Priore, L. V. und Lanza, R. (2015). **Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in Asian patients**. *Stem Cell Reports* 4, 860-872, doi: 10.1016/j.stemcr.2015.04.005.
- Song, Y., Lai, L. und Li, Z. (2017). **Large-scale genomic deletions mediated by CRISPR/Cas9 system**. *Oncotarget* 8, 5647, doi: 10.18632/oncotarget.14543.
- Song, Y., Yuan, L., Wang, Y., Chen, M., Deng, J., Lv, Q., Sui, T., Li, Z. und Lai, L. (2016). **Efficient dual sgRNA-directed large gene deletion in rabbit with CRISPR/Cas9 system**. *Cell Mol Life Sci* 73, 2959-2968, doi: 10.1007/s00018-016-2143-z.
- Sorek, R., Kunin, V. und Hugenholtz, P. (2008). **CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea**. *Nat Rev Microbiol* 6, 181-186, doi: 10.1038/nrmicro1793.
- Srinivas, M., Verselis, V. K. und White, T. W. (2018). **Human diseases associated with connexin mutations**. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860, 192-201, doi: 10.1016/j.bbamem.2017.04.024.
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C. und Doudna, J. A. (2014). **DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9**. *Nature* 507, 62-67, doi: 10.1038/nature13011.
- Symington, L. S. und Gautier, J. (2011). **Double-strand break end resection and repair pathway choice**. *Annu Rev Genet* 45, 247-271, doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132435.

- Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M., Hayashi, H., Imazato, T., Kawasaki, H., Suemori, H., Omachi, S., Iida, H., Itoh, N., Nakatsuji, N., Sasai, Y. und Hashimoto, N. (2005). **Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model.** *J Clin Invest* 115, 102-109, doi: 10.1172/JCI21137.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. und Yamanaka, S. (2007). **Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.** *Cell* 131, 861-872, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Takahashi, K. und Yamanaka, S. (2006). **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.** *Cell* 126, 663-676, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Terns, M. P. und Terns, R. M. (2011). **CRISPR-based adaptive immune systems.** *Curr Opin Microbiol* 14, 321-327, doi: 10.1016/j.mib.2011.03.005.
- Tsai, S. Q., Wyvekens, N., Khayter, C., Foden, J. A., Thapar, V., Reyon, D., Goodwin, M. J., Aryee, M. J. und Joung, J. K. (2014). **Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing.** *Nat Biotechnol* 32, 569-576, doi: 10.1038/nbt.2908.
- Tsai, S. Q., Zheng, Z., Nguyen, N. T., Liebers, M., Topkar, V. V., Thapar, V., Wyvekens, N., Khayter, C., Iafrate, A. J., Le, L. P., Aryee, M. J. und Joung, J. K. (2015). **GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases.** *Nat Biotechnol* 33, 187-197, doi: 10.1038/nbt.3117.
- Uhlenberg, B., Schuelke, M., Ruschendorf, F., Ruf, N., Kaindl, A. M., Henneke, M., Thiele, H., Stoltenburg-Didinger, G., Aksu, F., Topaloglu, H., Nurnberg, P., Hubner, C., Weschke, B. und Gartner, J. (2004). **Mutations in the gene encoding gap junction protein alpha 12 (connexin 46.6) cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease.** *Am J Hum Genet* 75, 251-260, doi: 10.1086/422763.
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S. und Gregory, P. D. (2010). **Genome editing with engineered zinc finger nucleases.** *Nat Rev Genet* 11, 636-646, doi: 10.1038/nrg2842.
- Valdimarsson, G., De Sousa, P. A., Beyer, E. C., Paul, D. L. und Kidder, G. M. (1991). **Zygotic expression of the connexin43 gene supplies subunits for gap junction assembly during mouse preimplantation development.** *Mol Reprod Dev* 30, 18-26, doi: 10.1002/mrd.1080300103.
- Valiunas, V., Polosina, Y. Y., Miller, H., Potapova, I. A., Valiuniene, L., Doronin, S., Mathias, R. T., Robinson, R. B., Rosen, M. R., Cohen, I. S. und Brink, P. R. (2005). **Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions.** *J Physiol* 568, 459-468, doi: 10.1113/jphysiol.2005.090985.

- van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L. und Verbrugh, H. (1998). **Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes**. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 275-293.
- van der Oost, J., Westra, E. R., Jackson, R. N. und Wiedenheft, B. (2014). **Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems**. *Nat Rev Microbiol* 12, 479-492, doi: 10.1038/nrmicro3279.
- van Embden, J. D., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., van Der Zeijst, B. A. und Schouls, L. M. (2000). **Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria**. *J Bacteriol* 182, 2393-2401.
- van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H. und Kanaar, R. (2001). **Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection**. *Nat Rev Genet* 2, 196-206, doi: 10.1038/35056049.
- Wang, X., Veruki, M. L., Bukoreshtliev, N. V., Hartveit, E. und Gerdes, H. H. (2010). **Animal cells connected by nanotubes can be electrically coupled through interposed gap-junction channels**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17194-17199, doi: 10.1073/pnas.1006785107.
- Warner, A. E., Guthrie, S. C. und Gilula, N. B. (1984). **Antibodies to gap-junctional protein selectively disrupt junctional communication in the early amphibian embryo**. *Nature* 311, 127-131.
- Wiedenheft, B., Lander, G. C., Zhou, K., Jore, M. M., Brouns, S. J. J., van der Oost, J., Doudna, J. A. und Nogales, E. (2011a). **Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system**. *Nature* 477, 486-489, doi: 10.1038/nature10402.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S. H. und Doudna, J. A. (2012). **RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea**. *Nature* 482, 331-338, doi: 10.1038/nature10886.
- Wiedenheft, B., van Duijn, E., Bultema, J. B., Waghmare, S. P., Zhou, K., Barendregt, A., Westphal, W., Heck, A. J., Boekema, E. J., Dickman, M. J. und Doudna, J. A. (2011b). **RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10092-10097, doi: 10.1073/pnas.1102716108.
- Wittlieb-Weber, C. A., Haude, K. M., Fong, C. T. und Vinocur, J. M. (2016). **A novel GJA1 mutation causing familial oculodentodigital dysplasia with dilated cardiomyopathy and arrhythmia**. *HeartRhythm Case Rep* 2, 32-35, doi: 10.1016/j.hrcr.2015.08.013.
- Worsdorfer, P., Dalda, N., Kern, A., Kruger, S., Wagner, N., Kwok, C. K., Henke, E. und Ergun, S. (2019). **Generation of complex human organoid models including vascular networks by incorporation of mesodermal progenitor cells**. *Sci Rep* 9, 15663, doi: 10.1038/s41598-019-52204-7.



- Worsdorfer, P., Wagner, N. und Ergun, S. (2018). **The role of connexins during early embryonic development: pluripotent stem cells, gene editing, and artificial embryonic tissues as tools to close the knowledge gap.** *Histochem Cell Biol* 150, 327-339, doi: 10.1007/s00418-018-1697-2.
- Wyman, C. und Kanaar, R. (2006). **DNA double-strand break repair: all's well that ends well.** *Annu Rev Genet* 40, 363-383, doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090451.
- Wyvekens, N., Topkar, V. V., Khayter, C., Joung, J. K. und Tsai, S. Q. (2015). **Dimeric CRISPR RNA-Guided FokI-dCas9 Nucleases Directed by Truncated gRNAs for Highly Specific Genome Editing.** *Hum Gene Ther* 26, 425-431, doi: 10.1089/hum.2015.084.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. und Thomson, J. A. (2007). **Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.** *Science* 318, 1917-1920, doi: 10.1126/science.1151526.
- Zhang, F. (2019). **Zhang Lab.** URL: <https://zlab.bio/guide-design-resources> [Stand:2016, August 15].
- Zhang, J. T. und Nicholson, B. J. (1994). **The topological structure of connexin 26 and its distribution compared to connexin 32 in hepatic gap junctions.** *J Membr Biol* 139, 15-29, doi: 10.1007/bf00232671.
- Zheng, Q., Cai, X., Tan, M. H., Schaffert, S., Arnold, C. P., Gong, X., Chen, C. Z. und Huang, S. (2014). **Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells.** *Biotechniques* 57, 115-124, doi: 10.2144/000114196.
- Zlotorynski, E. (2016). **DNA repair: The cell cycle flavours of repair.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 65, doi: 10.1038/nrm.2015.24.
- Zong, L., Zhu, Y., Liang, R. und Zhao, H. B. (2016). **Gap junction mediated miRNA intercellular transfer and gene regulation: A novel mechanism for intercellular genetic communication.** *Sci Rep* 6, 19884, doi: 10.1038/srep19884.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das CRISPR/Cas-System .....	3
Abbildung 2: Die Cas9 Nuklease.....	4
Abbildung 3: Aufbau einer Blastozyste.....	7
Abbildung 4: Anwendung von iPSCs in der Medizin.....	9
Abbildung 5: Struktur der Gap Junctions und Aufbau der Connexin-Proteine ..	12
Abbildung 6: Selektion der single guide RNAs. ....	46
Abbildung 7: Programmablaufplan zur Erstellung der Cx43-Defektmutanten in FSiPS-Zellen. ....	67
Abbildung 8: Probe-Restriktion von pSpCas9(BB)-2A-Puro V2.0.....	68
Abbildung 9: Design der sgRNAs und Klonierung in pSpCas9 Plasmid (Beispiel anhand sgRNA 2) .....	70
Abbildung 10: Dot Blot der transfizierten HEK293T-Kolonien.....	74
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung von HEK293T-Zellen (Wildtyp) .....	76
Abbildung 12: Sequenzierungsergebnisse der HEK293T-Positiv-Kontrolle .....	77
Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung von HEK293T-Zellen Klon 2 ...	78
Abbildung 14: Sequenzierungsergebnisse des Klon 2 der HEK293T-Zellen....	79
Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung von HEK293T-Zellen Klon 5 ...	80
Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung von HEK293T-Zellen Klon 6 ...	81
Abbildung 17: Sequenzierungsergebnisse des Klon 6 der HEK293T-Zellen....	82
Abbildung 18: Analyse der Cx43-Genexpression der HEK293T-Klone mittels Western Blot Analyse .....	83
Abbildung 19: Immunhistochemische Färbung der FSiPS-Zellen für Pluripotenzmarker .....	84

Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung der FSiPS-Zellen (Positiv-Kontrolle) .....	86
Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung der FSiPS Klon 26 .....	87
Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung FSiPS Klon 28 .....	88
Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung FSiPS Subklon 68.....	89
Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung FSiPS Subklon 11.....	90
Abbildung 25: Analyse der Cx43-Genexpression der FSiPS-Subklone mittels Western Blot.....	91
Abbildung 26: Sequenzierungsergebnisse des FSiPS Subklon 7 und 11 .....	92
Abbildung 27: Pluripotenzmarker zum Nachweis der Pluripotenz der Cx43-defizienten FSiPS-Zellen .....	93
Abbildung 28: Kardiomyozyten aus Cx43-defizienten FSiPS-Zellen .....	94
Abbildung 29: Immunhistochemische Färbung der Cx43-defizienten neuralen Vorläuferzellen und Neurone .....	95
Abbildung 30: Connexin-Expression in der Blastozyste, ESCs, TSCs im Vergleich Mensch und Maus .....	105

Abbildung 2 besteht aus grafischen Elementen der Bilddatenbank Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>), die unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) lizenziert sind.

Die Abbildungen 1, 2, 4 und 30 sind aus den angegebenen Quellen entnommen, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

Die Abbildung 5 ist aus der angegebenen Quelle entnommen, mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien.....	20
Tabelle 2: Chemikalien, Small molecules und Wachstumsfaktoren .....	22
Tabelle 3: Sonstiges.....	28
Tabelle 4: SDS Page 4x (10 %)......	31
Tabelle 5: Cardiac Basal Medium (CBM) .....	36
Tabelle 6: Cardiac Specific Medium (CSM).....	36
Tabelle 7: Cardiac Enrichment Medium (CEM) .....	36
Tabelle 8: EB3-Medium.....	37
Tabelle 9: EB5-Medium.....	37
Tabelle 10: EBC-Medium .....	38
Tabelle 11: PNS1-Medium .....	38
Tabelle 12: PNS2-Medium .....	39
Tabelle 13: Liste der Primärantikörper .....	43
Tabelle 14: Liste der Sekundärantikörper.....	44
Tabelle 15: Kommerziell erhältliche Kits.....	45
Tabelle 16: Erstellung der sgRNA-Oligonukleotid-Inserts .....	47
Tabelle 17: Programm Thermocycler zur Erstellung des sgRNA- Oligonukleotid-Inserts .....	48
Tabelle 18: Die Restriktion des pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 Plasmids .....	48
Tabelle 19: Programm Thermocycler für den Restriktionsverdau des Plasmids .....	49
Tabelle 20: Ligation der sgRNAs in das pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 Plasmid.....	49

Tabelle 21: Programm Thermocycler zur Ligation der sgRNA in das Plasmid.....	50
Tabelle 22: Eichgerade für die Proteinbestimmung nach Bradford .....	53
Tabelle 23: Probenzusammensetzung für die Proteinbestimmung nach Bradford .....	53
Tabelle 24: Ansatz für Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	56
Tabelle 25: Programm für PCR im Thermocycler .....	56
Tabelle 26: Pipettierschema für die Sequenzierung von PCR-Proben .....	57
Tabelle 27: Parameter für die Elektroporation .....	62
Tabelle 28: Ansätze für die Elektroporation.....	71
Tabelle 29: Parameter für die Elektroporation .....	72





## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Süleyman Ergün, Leiter des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der medizinischen Fakultät Würzburg danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation im Institut anfertigen zu dürfen. Ich bedanke mich für die gute Betreuung und seine konstruktive Kritik bei unseren Meetings.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Philipp Wörsdörfer, der mir während meiner Forschungszeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand und niemals müde wurde mich bei Rückschlägen wiederaufzubauen und zu motivieren. Sein fundiertes Wissen und Spaß an der Forschung haben mich inspiriert. Für seine berufliche und private Zukunft wünsche ich ihm von Herzen alles Gute.

Weiterhin bedanke ich mich bei der gesamten Stammzell-Forschungsgruppe. Allen voran danke ich den technischen Assistentinnen Heike Arthen und Ursula Roth und Nadja Höhn für ihre großartige Betreuung und Hilfe wo immer man sie brauchte. Ein besonderer Dank gebührt TA Martina Gebhardt. Ich weiß, dass es nicht einfach ist einen Zahnmediziner in die Tiefen der Labormethoden einzuführen, aber ich denke es ist geglückt! Ich danke für die grenzenlose Geduld und die perfekten, idiotensicheren Erklärungen. Ich wünsche mir, dass Martina, Heike, Ursula und Nadja niemals ihre Leidenschaft verlieren und sie genauso weitergeben wie ich es erfahren durfte. Ein besonderer Dank gebührt Dr. Dirk Pühringer, Dr. Katharina Günther, Dr. Yuichiro Ueda, Dr. Chee Keong Kwok alias Cheek, Naoko Nose, Dr. Tobias Königer, Berin Upcin, Sven Schmidt, Sarah Krüger, Anna Kern und Anna Janz. Vielen Dank für die tolle Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und die Zeit, die ich mit ihnen verbringen durfte!

Bei Nahide Dalda, meiner Laborpartnerin, Freundin und Seelenverwandten möchte ich mich besonders bedanken. Die gemeinsame Zeit im Labor, die guten Tage und die schlechten Tage, die unzähligen Kaffeepausen und unseren gemeinsamen Urlaub werde ich nie vergessen. Ich wünsche mir, dass unsere Freundschaft niemals endet.



Für die seelisch moralische Unterstützung meiner Freunde und Kommilitonen aus dem Studium sowie die meiner Chefs und meiner Kollegin Edina Bender und meinem Team in der Praxis bedanke ich mich herzlich.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Freund Frank, der mich trotz der räumlichen Distanz während des gesamten Studiums immer unterstützt hat und immer positive Worte für mich gefunden hat, auch wenn er selbst mit Arbeit und Studium beschäftigt war. Danke für die Kraft, ich freue mich auf das, was die Zukunft noch für uns bereithält.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Großeltern, meinem Patenonkel und meiner Patentante und der gesamten Verwandtschaft für die Unterstützung und Motivation bedanken.

Die letzten Worte möchte ich meiner Familie widmen. Ich bedanke mich bei meinen Eltern Katja und Klaus Dambacher und meinen Geschwistern Christoph, Theresa und Hannes, die mich bei meinen Plänen immer unterstützt haben und immer an mich geglaubt haben. Ohne eure Geduld, Interesse an meiner Arbeit und die positiven Worte hätte ich das alles niemals erreicht! Meine Dankbarkeit übersteigt das, was ich hier mit Worten ausdrücken könnte.