

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Zentrum der Inneren Medizin  
Medizinischen Klinik 2  
Direktor: Prof. Dr. Hubert Serve

**Herstellung eines *in vitro* Zellmodells für die Entwicklung einer  
CRISPR/SaCas9-vermittelten Gentherapie zur Behandlung der  
Hämophilie A**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von Nadin Hodroj  
aus Lindenfels

Frankfurt am Main, [2021]

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	PD Dr. Frank Schnütgen
Korreferent/in:	Prof. Dr. Evelyn Ullrich
Tag der mündlichen Prüfung:	17.01.2022

*„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat.“  
Johann Wolfgang von Goethe (1749 – 1832)*

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Blutstillung (Hämostase).....	5
1.2 Blutgerinnungsfaktor VIII (FVIII).....	7
1.2.1 Einführung.....	7
1.2.2 FVIII-kodierendes Gen ( <i>F8</i> ).....	7
1.2.3 FVIII-Prozessierung und -Struktur.....	8
1.2.4 Aktivierung, Funktion und Inaktivierung von FVIII.....	9
1.2.5 <i>F8</i> -Genmutationen.....	10
1.3 Hämophilie A (HA).....	12
1.3.1 Klinik und Symptomatik.....	12
1.3.2 Therapie und Handlungsbedarf.....	14
1.3.3 Aktueller Forschungsstand zur HA-Gentherapie.....	16
1.4 Gentransfer-Systeme.....	17
1.4.1 Einführung.....	17
1.4.2 Retroviren und lentivirale Vektoren.....	19
1.4.3 Integrase-defekte lentivirale Vektoren (IDLV).....	21
1.4.4 Adeno-assoziierte virale (AAV) Vektoren.....	22
1.5 CRISPR/Cas.....	22
1.5.1 Einführung.....	22
1.5.2 Das mikrobielle CRISPR/Cas-System.....	23
1.5.3 Die molekularbiologische CRISPR/Cas9-Methode.....	24
1.6 Hämophilie-Gentherapieprojekt.....	26
1.6.1 Grundidee.....	26
1.6.2 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	28

2 Material.....	29
2.1 Softwares & online Programme .....	29
2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	29
2.3 Chemikalien und Reagenzien .....	33
2.4 Enzyme.....	36
2.5 Antikörper .....	36
2.6 Kommerzielle Kits .....	37
2.7 Humane Zelllinien .....	38
2.8 Bakterien.....	39
2.9 Oligonukleotide .....	39
2.10 Plasmide .....	41
3 Methoden .....	43
3.1 Auswahl patientenspezifischer <i>F8</i> -Mutationen.....	43
3.2 Molekularbiologische Methoden .....	44
3.2.1 Kultivierung von Bakterien.....	44
3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	44
3.2.3 Arbeiten mit DNA.....	45
3.3.2 Produktion von rLV .....	51
3.3 Zellbiologische & virologische Methoden .....	52
3.3.1 Arbeiten mit humanen Zelllinien .....	52
3.3.3 Immortalisierung & Charakterisierung der HHSEC-Linie .....	53
3.3.4 Generierung von <i>F8</i> -Mutations-Zelllinien .....	56
3.4 FVIII-Detektionsmethoden .....	59
3.4.1 Western Blot (WB).....	59
3.4.2 ELISA .....	63
3.4.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	66
3.4.4 aPTT-basierter FVIII-Aktivitätstest.....	67

3.5 Statistische Auswertung.....	68
4 Ergebnisse .....	69
4.1 Immortalisierung & Charakterisierung der HHSEC-Linie .....	69
4.1.1 Immortalisierung mit <i>large T (LT)</i> .....	69
4.1.2 Charakterisierung der immortalisierten HHSEC_LT .....	70
4.2 FVIII-Messung in HHSEC .....	73
4.2.1 Western Blot zur FVIII-Detektion.....	73
4.2.2 ELISA zur FVIII-Detektion .....	76
4.2.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie zur FVIII-Detektion.....	78
4.3 Generierung und Analysierung stabil transduzierter HHSEC- <i>F8</i> - Mutations-Zelllinien.....	78
4.3.1 Transduktionseffizienz.....	78
4.3.2 Analyse der eingebrachten <i>F8</i> -Genmutationen.....	79
4.3.3 FVIII-Messung.....	83
4.3.4 Wachstumsverhalten und Beeinflussung der VWF-Expression .....	85
5 Diskussion.....	88
5.1 Verwendbarkeit von HHSEC als Hämophilie A-Zellmodell .....	88
5.2 FVIII-Detektion in HHSEC.....	91
5.3 Stabil transduzierte HHSEC- <i>F8</i> -Mutations-Zelllinien .....	99
5.4 Vermuteter Mechanismus der 7bp-Deletion.....	103
5.5 Auswirkungen der <i>F8</i> -Mutationen auf HHSEC.....	104
5.6 Ausblick .....	107
Referenzen.....	109
Anhang.....	122
Danksagung .....	140
Schriftliche Erklärung .....	141
Lebenslauf.....	142

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der plasmatischen Gerinnungskaskade. ....	6
Abb. 2: Schematische Darstellung des Faktor VIII-kodierendes Gens ( <i>F8</i> ). ....	8
Abb. 3: Schematische Darstellung der FVIII-Prozessierung und -Struktur. ....	9
Abb. 4: Schematische Darstellung der Intron-22-Inversion des <i>F8</i> -Gens. ....	11
Abb. 5: Schematische Darstellung von viralen Vektoren. ....	20
Abb. 6: CRISPR/cas9-erzeugte Doppelstrangbrüche und ihre Reparaturmechanismen. ....	25
Abb. 7: Übersichtsdarstellung des <i>in vitro</i> Hämophilie A-Gentherapieprojektes.	27
Abb. 8: Funktionalität des <i>large T</i> -Onkogens in der immortalisierten HHSEC- Linie (HHSEC_LT). ....	69
Abb. 9: Geschlechtsdetermination der HHSEC. ....	70
Abb. 10: Mikroskopische Darstellung von HHSEC. ....	71
Abb. 11: Kumulatives Wachstumsassay der immortalisierten HHSEC_LT. ....	72
Abb. 12: aPTT-basierte FVIII-Aktivitätsmessung der HHSEC_LT. ....	73
Abb. 13: Western Blot zur FVIII-Detektion. ....	75
Abb. 14: Kovaltry-Standardkurve. ....	76
Abb. 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HHSEC. ....	78
Abb. 16: Western Blot zur SaCas9-Detektion in HHSEC- <i>F8</i> -Mutations-Linien.	79
Abb. 17: Sequenzierungen der stabil transduzierten HHSEC- <i>F8</i> -Mutations- Zelllinien. ....	82
Abb. 18: Immunfluoreszenz-Mikroskopie der stabil transduzierten HHSEC- <i>F8</i> - Mutations-Zelllinien. ....	83
Abb. 19: Arithmetische Mittelwerte der FVIII-Fluoreszenzintensität. ....	84
Abb. 20: aPTT-basierte FVIII-Aktivitätsmessung der stabil transduzierten HHSEC- <i>F8</i> -Mutations-Zelllinien. ....	85
Abb. 21: Wachstumsverhalten der stabil transduzierten HHSEC_KO_F8_2- und HHSEC_KO_F8_3-Zelllinien. ....	86
Abb. 22: VWF-Expression stabil transduzierter HHSEC- <i>F8</i> -Mutations-Zelllinien. .....	87
Abb. 23: Vermuteter MMEJ-Mechanismus der 7bp-Deletion in HHSEC_KO_F8_2. ....	104

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Schweregrad der Hämophilie A basierend auf der FVIII-Restaktivität..	14
Tab. 2: Vergleich der Eigenschaften viraler Vektoren für die Gentherapie. ....	19
Tab. 3: Beispiele von patientenspezifischen <i>F8</i> -Mutationen aus der Hämophilie A-Datenbank. ....	43
Tab. 4: ELISA zur FVIII-Detektion in HHSEC. ....	77
Tab. 5: ELISA zur FVIII-Detektion in Blutproben. ....	77

## Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
APC	aktiviertem Protein C
aPTT	aktivierten Thromboplastinzeit
AS	Aminosäure
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
Cas	CRISPR-associated Protein
Cascade	CRISPR-associated complex for antiviral defence
CMV	Cytomegalievirus
cPPT	zentraler Polypurintrakt
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR-RNA
Cu	Kupfer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxycyclin
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
EAHAD	European Association for Haemophilia and Allied Disorders
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	endoplasmatischen Retikulum
<i>F8</i>	Gen, das für FVIII codiert
FVIII	Gerinnungsfaktor VIII (Protein)
FVIII:C	FVIII-Aktivität
FIX	Gerinnungsfaktor IX (Protein)
GT	Gentherapie
HA	Hämophilie A (FVIII-Mangel)
HB	Hämophilie B (FIX-Mangel)
HDR	homology-directed repair
HHSEC	humane, hepatische, sinusoidale Endothelzellen
HIV	Humane Immundefizienz Virus
HWZ	Halbwertszeit
IDLV	Integrase-defekter lentiviraler Vektor
IF	Immunfluoreszenz
INR	International Normalized Ratio

ITR	inverted terminal repeats
LT	großes T-Antigen (large T)
LTR	Long Terminal Repeats
MFI <sub>[FVIII]</sub>	arithmetischer Mittelwert der FVIII-Fluoreszenzintensität
MFI <sub>[VWF]</sub>	arithmetischer Mittelwert der VWF-Fluoreszenzintensität
MMEJ	Microhomology-mediated end joining
MN	Meganuklease
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NHEJ	Non-Homologous End Joining
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rAVV	Rekombinanter AAV-Vektor
rLV	Rekombinanter lentiviraler Vektor
RNA	Ribonukleinsäure
RRE	Rev Responsive Element
RT	Raumtemperatur
Sa	Staphylococcus aureus
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sgRNA	single guide RNA
Sp	Streptococcus pyogenes
TALEN	Transcription Activator-like Effector Nucleases
TF	Tissue Factor (Gewebethromboplastin)
TPZ	Thromboplastinzeit
tracrRNA	trans-acting-CRISPR-RNA
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i> (dt. ungefaltete Protein-Antwort)
VSV-G	Protein G des Vesicular Stomatitis Virus
VWF	von-Willebrand-Faktor
WB	Western Blot
WT	Wildtypzellen
ZFN	Zinkfinger-Nukleasen
ZÜ	Zellüberstand

## Zusammenfassung

Hämophilie A (HA) ist eine X-chromosomal-rezessiv vererbte Blutgerinnungsstörung mit einem vollständigen Fehlen oder einem funktionellen Defizit des Gerinnungsfaktors VIII (FVIII). Trotz der Therapiefortschritte innerhalb der letzten Jahre, zeigen HA-Patienten auch unter der regelmäßigen FVIII-Substitutionstherapie weiterhin multiple Komplikationen, einschließlich Gelenkschäden, Entstehung einer Immunantwort (Hemmkörper) und reduzierter Lebensqualität. Im Gegensatz zu den bisherigen Therapieoptionen stellt die Gentherapie (GT) die vielversprechende Möglichkeit einer dauerhaften Anhebung des FVIII-Spiegels bis hin zur Heilung der HA in Aussicht.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein geeignetes HA-Zellmodell auf Basis der primären humanen hepatischen sinusoidalen Endothelzellen (HHSEC) etabliert werden, um die zukünftige Erforschung einer SaCas-CRISPR-basierten HA-GT *in vitro* zu evaluieren, sowie wichtige Erkenntnisse für weiterführende Arbeiten gewonnen werden.

Mittels stabiler Integration des Doxycyclin-induzierbaren *large T*-Onkogens konnte eine gut charakterisierte, immortale HHSEC\_LT-Zelllinie hergestellt werden, welche funktionalen FVIII exprimiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Immortalisierung in Abhängigkeit von Doxycyclin für weiterführende Experimente in der Zellkultur essenziell ist, um Stressreaktionen der HHSEC, aufgrund rascher Seneszenz und Apoptose, zu umgehen.

Im weiteren Verlauf des GT-Projektes sollten verschiedene HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinien hergestellt werden. Neben der Gensequenzierung wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere in Betracht kommende FVIII-Detektionsverfahren getestet, um den Erfolg einer eingeführten *F8*-Genmutation in HHSEC sowie ihrer anschließenden Reparatur im weiteren Verlauf des GT-Projektes auch auf Proteinebene zu demonstrieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass für die vorliegende Fragestellung sich insbesondere die Immunfluoreszenz- (IF-) Mikroskopie und die Quantifizierung der FVIII-Aktivität (FVIII:C) mittels aPTT-basierter Messung zur spezifischen Detektion von FVIII in HHSEC bewähren.

In Anlehnung an patientenspezifische *F8*-Genmutationen mit einem *Frameshift*-Effekt wurden fünf verschiedene sgRNA/SaCas9-CRISPR-Expressionsvektoren konstruiert und mittels lentiviralem Gentransfer in die immortalisierten HHSEC

stabil transduziert. Nach PCR-Amplifikation der betreffenden genomischen Loci dieser fünf verschiedenen stabil transduzierten HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinien zeigte die anschließende Sequenzierung, dass vier der fünf hergestellten Konstrukte Genveränderungen mit potenziellen *Frameshift*-Effekten in HHSEC generieren konnten, wovon zwei sehr gute Ergebnisse erzielten. Korrelierend zu den Sequenzierungsergebnissen konnten ebenfalls Verminderungen der FVIII-Fluoreszenzintensität mittels mikroskopischer IF-Aufnahmen sowie der FVIII:C mittels aPTT-basierter Messung dargestellt werden.

Weiterhin konnte bei der Beurteilung des morphologischen Erscheinungsbildes der stabil transduzierten HHSECs eine optisch veränderte Zellmorphologie sowie ein Wachstumsnachteil innerhalb der beiden Zellpools mit den höchst erreichten Indel-Raten und der niedrigsten FVIII:C beobachtet werden. Diese Beobachtungen erlaubten die Formulierungen neuartiger, vielversprechender Hypothesen in Bezug auf das Grundverständnis der HA-Erkrankung.

## Abstract

Haemophilia A (HA) is an X-chromosome linked hereditary blood coagulation disorder with a functional deficit or a complete absence of clotting factor VIII (FVIII). Despite the therapeutic advances within the last few years, HA-patients continue to exhibit multiple complications, including bleeding, joint damage, development of an immune response against the exogenous protein and reduced quality of life, even with regular FVIII substitution therapy. In contrast to current therapeutic options, gene therapy (GT) holds out the promising possibility of a less intrusive and perhaps safer alternative to reach a long-term increase in FVIII levels up to the point of curing HA.

In the present work, a suitable HA cell model based on primary human hepatic sinusoidal endothelial cells (HHSEC) was established to evaluate the future exploration of a therapeutic SaCas9-CRISPR-based gene therapy approach. Therefore, we first immortalized primary HHSEC, the natural cell of FVIII synthesis in humans, by lentiviral transduction of a doxycycline-inducible SV40-Large T oncogene. Furthermore, it was shown that continuous doxycycline-dependent immortalization is essential for further experiments in cell culture to avoid stress responses of HHSECs due to rapid senescence and apoptosis.

In the further course of this project, various HHSEC-*F8*-mutation-cell lines were to be generated. In order to demonstrate the success of an introduced *F8*-gene mutation in HHSEC to subsequently evaluate CRISPR-based protein repair, several FVIII detection methods were tested. It was shown that immunofluorescence (IF) microscopy and the quantification of FVIII-activity (FVIII:C) using aPTT-based FVIII clotting assay are particularly suitable for the specific detection of FVIII in HHSEC.

Following patient-specific *F8* gene mutations with frameshift effect, five different sgRNA/SaCas9-CRISPR expression vectors were constructed and stably transduced into the immortalized HHSEC by lentiviral gene transfer. Characterization and verification of immortalized HHSEC with and without *F8* mutation were performed by PCR amplification and sequencing as well as immunofluorescence and aPTT-based FVIII activity assays. The sequencing results showed that four of these five designed sgRNA/SaCas9-CRISPR-constructs were able to generate gene changes with potential frameshift effects in HHSEC, two of which performed

very well. Correlating to the sequencing results, it was also possible to show a reduced FVIII-fluorescence intensity using IF-microscopic and a reduced FVIII:C using aPTT-based FVIII clotting assay.

Furthermore, when assessing the morphological appearance of the stably transduced HHSECs, an optically altered cell morphology as well as a growth disadvantage within the two cell pools with the highest achieved indel-rates and the lowest FVIII:C could be observed. These observations allowed the formulation of novel, promising hypotheses related to the basic understanding of HA disease.

# 1 Einleitung

## 1.1 Blutstillung (Hämostase)

Die Hämostase ist eine lebenswichtige Funktion des menschlichen Organismus. Sie befähigt den Körper, Gefäßschäden abzudichten und damit einen erheblichen Blutverlust zu reduzieren. Hierbei handelt es sich um ein komplexes Ineinandergreifen von vaskulären, zellulären und plasmatischen Komponenten. Tritt eine Gefäßläsion auf, so werden subendotheliale Strukturen z. B. Kollagen und Fibronektin freigelegt, welche über das Bindeglied von-Willebrand-Faktor (VWF), die Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten bewirken. Durch diesen Vorgang wird der erste, zunächst labile Wundverschluss erreicht. Ein dauerhafter und stabiler Wundverschluss wird durch die Ausbildung eines festen Fibrinfasernetzes in der plasmatischen Gerinnung erreicht<sup>1</sup>.

Für die Beschreibung der plasmatischen Gerinnung unterscheidet man einen *extrinsischen* und *intrinsischen* Weg, wobei jeder Weg aus der Abfolge von sich nacheinander proteolytisch aktivierenden Gerinnungsfaktoren besteht, die in eine gemeinsame Endstrecke münden (siehe Abb. 1). Trotz starker Wechselwirkungen beider Wege wird aus didaktischen Gründen dieses Modell beibehalten<sup>2</sup>. Jeder Gerinnungsfaktor, abgekürzt mit „F“, wird mit einer römischen Ziffer bezeichnet. Zur Unterscheidung der aktiven und inaktiven Form wird ein „a“ (aktiviert) an die Ziffer angefügt. Bei den Faktoren XII, XI, X, IX, VII, II handelt es sich um Serinproteasen, die in ihrer inaktiven Form frei im Plasma zirkulieren und bei Bedarf in den geschädigten Gefäßabschnitten aktiviert werden<sup>3</sup>.

Das intrinsische System besteht aus intravasalen Komponenten, welche eine Gerinnung ohne eine verletzungsbedingte Gefäßwandschädigung auslösen. Durch Kontakt zu artifiziellen Oberflächen kommt es zu einer Autoaktivierung von FXII. In der Folge werden nacheinander FXI und FIX aktiviert. FXIa bildet mit FVIIIa, Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und Phospholipiden den Tenasekomplex. Er aktiviert FX und mündet in die gemeinsame Endstrecke<sup>2</sup>.

Das extrinsische System benötigt den extravasal lokalisierten *Tissue Factor* (TF), welcher in hoher Konzentration im subendothelialen Gewebe vorkommt und erst durch die Gefäßläsion freigelegt wird. Aktiviert wird der extrinsische Weg durch

FVIIa, der im Unterschied zu den restlichen Gerinnungsfaktoren zu einem geringen Teil in der aktiven Form im Blut zirkuliert, und nach der Gefäßläsion an TF bindet. Substrat vom FVIIa-TF-Komplex ist FX<sup>1</sup>.

In der gemeinsamen Endstrecke verbinden sich FXa und FVa zum Prothrombinase-Komplex. Dieser katalysiert in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> und Phospholipiden die proteolytische Spaltung von Prothrombin zu Thrombin (FIIa). Thrombin spaltet Fibrinogenmoleküle, die sich zu Fibrinpolymeren polymerisieren und durch FXIIIa zu einem biomechanisch stabilem Fibrinnetz quervernetzt werden<sup>4</sup>. Weiterhin gehören zu den Substraten von Thrombin unter anderem FXI, FXIII, FV und FVIII. Somit stellt Thrombin über positive Rückkopplungsmechanismen den zentralen Verstärker der initialen Gerinnungsaktivierung dar. FVa und FVIIIa sind geschwindigkeitsbestimmende Kofaktoren. Ihre Konzentrationserhöhung führt unmittelbar zu einer Verstärkung der Thrombinbildung<sup>1</sup>.

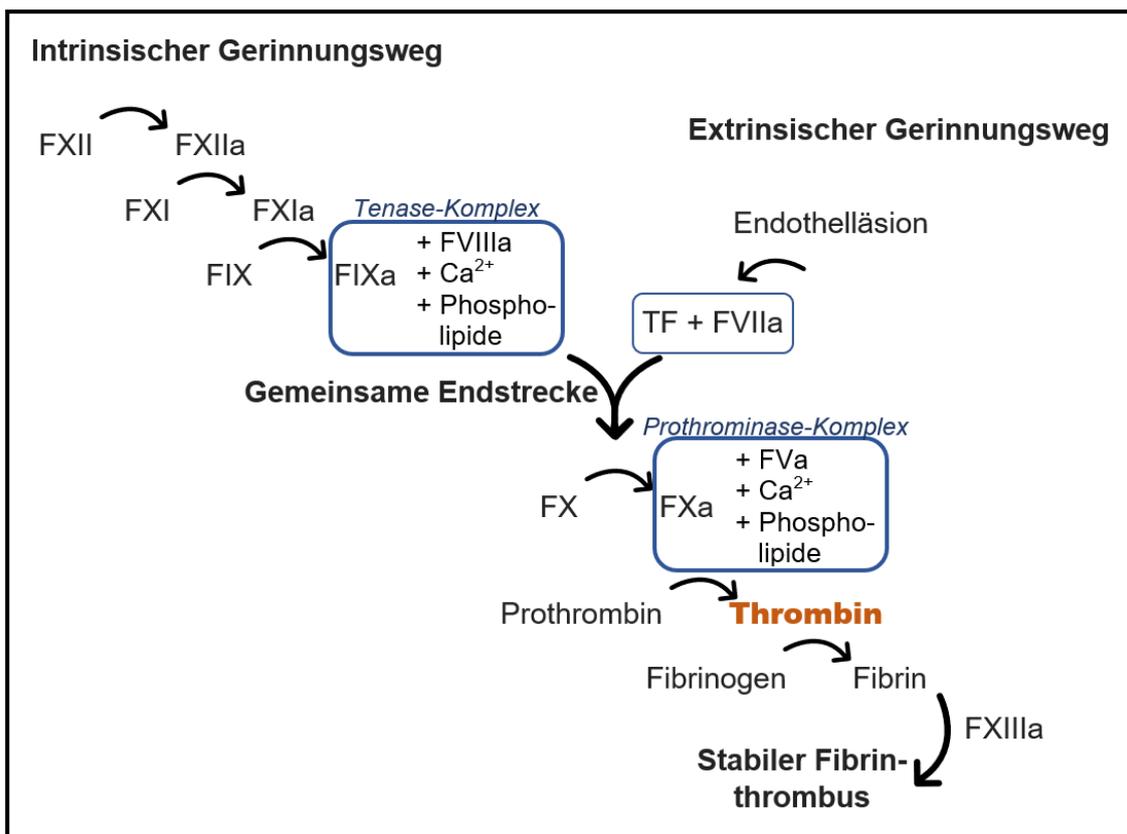


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der plasmatischen Gerinnungskaskade.

Differenziert wird zwischen einem extrinsischen und intrinsischen Weg der plasmatischen Gerinnung, wobei jeder Weg aus der Abfolge von sich nacheinander proteolytisch aktivierenden Gerinnungsfaktoren besteht, die in eine gemeinsame Endstrecke münden. Hervorgehoben sind die sich formierenden Enzymkomplexe (blaue Umrandung) sowie Thrombin (orange) als entscheidendes Enzym der plasmatischen Blutgerinnung. Modifiziert nach Pötzsch und Madlener, 2010.

## 1.2 Blutgerinnungsfaktor VIII (FVIII)

### 1.2.1 Einführung

FVIII ist ein großes multimeres Glykoprotein. Als essenzieller Kofaktor im Tensa-sekomplex, vermittelt und verstärkt FVIIIa die Aktivierung von Faktor X. Die biologische Bedeutung von FVIII bei der Bildung eines blutungsstillenden Thrombus wird bei einem akuten Mangel bzw. angeboren Fehlen des Gerinnungsfaktors verbunden mit einer lebenslang bestehenden Blutungsneigung belegt<sup>5</sup>.

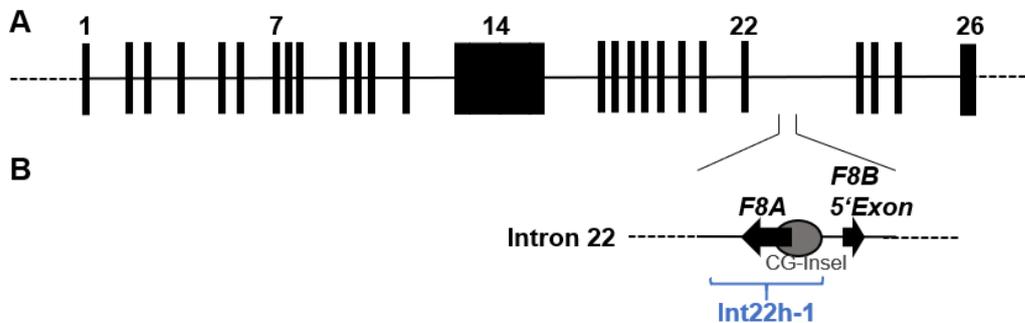
Transplantationsstudien zeigen, dass die Leber den primären Syntheseort von FVIII darstellt<sup>6-8</sup>. In der Vergangenheit wurde die FVIII-Produktion den Hepatozyten der Leber zugeschrieben<sup>9</sup>. Shahani et al. konnten jedoch zeigen, dass nicht die Hepatozyten, sondern die humanen hepatischen sinusoidalen Endothelzellen (HHSEC) für die FVIII-Produktion in der Leber zuständig sind<sup>10</sup>. Als Syntheseort wird neben den HHSEC auch das Gefäßendothel diskutiert<sup>11</sup>.

### 1.2.2 FVIII-kodierendes Gen (*F8*)

Bereits 1984 konnten Gitschier et al. das für FVIII kodierende Gen (*F8*) auf dem langen Arm des X-Chromosoms in der teleomernahen Xq28-Region lokalisieren. Es handelt sich hierbei um ein großes Gen, welches 186 kb umfasst und aus 26 Exons und 25 Introns besteht (Abb. 2A). Dabei beansprucht die kodierende Sequenz von *F8* nur 5 % des gesamten Gens, wohingegen die 25 Introns 95% des Gens ausmachen<sup>12</sup>.

Innerhalb des 32 kbp langen Intron 22 befinden sich die Transkriptionsstartpunkte zweier Gene, die als *F8A* bzw. *F8B* bezeichnet werden und über einen gemeinsamen, bidirektionalen Promotor kontrolliert werden (Abb. 2B)<sup>13</sup>. *F8A* ist intronlos und besteht aus einem einzigen Exon. Es wird in entgegengesetzter Richtung zu *F8* transkribiert, wobei eine ~ 1,8 kbp lange mRNA entsteht<sup>13</sup>. Dagegen wird *F8B* in Leserichtung von *F8* transkribiert und liefert eine ~ 2,5 kbp mRNA basierend auf einem *F8A*-spezifischen Exon und den Exons 23-26 des *F8*<sup>14</sup>. Die genaue Funktion der *F8A*- und *F8B*-Transkripte ist bisher noch nicht bekannt, allerdings ist *F8A* bei der Intron-22-Inversion, die bei etwa 50% aller schweren HA zugrunde liegt, involviert<sup>15</sup> (siehe 1.2.5). Das Besondere ist, dass Intron 22 eine 9,5-kb-Region (int22h-1) enthält, die nahezu homolog zu zwei Regionen (int22h-2 und int22h-3) außerhalb von *F8* ist. Int22h-2 und int22h-3 sind 497 kb

bzw. 562 kb in Entfernung von int22h-1 lokalisiert, wobei int22h-2 in entgegengesetzter Richtung zu int22h-1 und int22h-3 vorliegt (siehe Abb. 4A). Ähnlich wie im Intron 22 liegt im Intron 1 eine Region (int1h-1) vor, die außerhalb des Gens in einer nahezu identischen Version (int1h-2) vorkommt<sup>16</sup>.



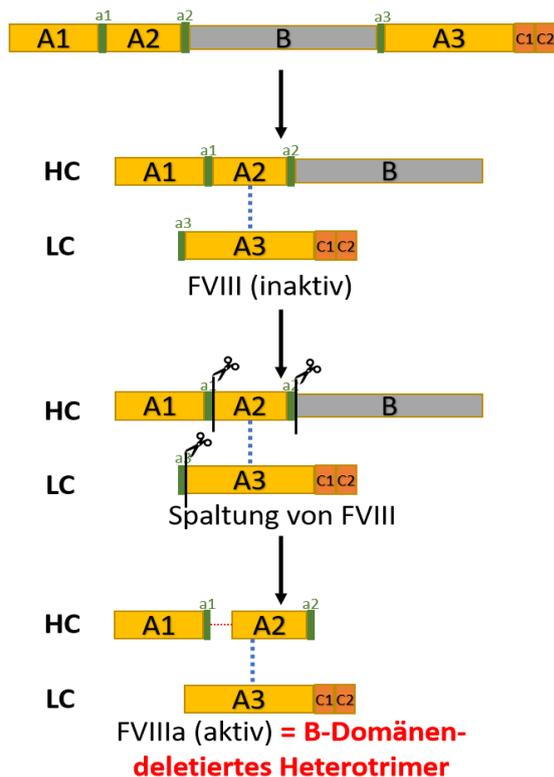
**Abb. 2: Schematische Darstellung des Faktor VIII-kodierendes Gens (*F8*).**

Modifiziert nach Bowen 2002. **(A)** Genomische Organisation des menschlichen *F8*-Gens. Die schwarzen Balken stellen Exon 1 bis 26 dar. **(B)** Vergrößerte Darstellung eines Teils des Introns 22 des *F8*, um die relativen Positionen und Orientierungen der CG-Insel (graue Blase), des *F8A*-Gens und des 5'-Exons des mutmaßlichen *F8B*-Gens zu demonstrieren. Zudem wird das Ausmaß der int22h-1-Region dargestellt.

### 1.2.3 FVIII-Prozessierung und -Struktur

Die Transkription von *F8* liefert eine 9 kbp lange mRNA<sup>12</sup>, die ein Präprotein bestehend aus 2351 Aminosäuren (AS) inklusive eines für die Sekretion in das Endoplasmatische Retikulum nötigen 19 AS langen Signalpeptids kodiert. Das sekretierte Protein besteht aus 2332 AS mit einer Masse von ~ 300 kDa. Die FVIII-Struktur (siehe Abb. 3) basiert auf drei A-Domänen (A1, A2, A3), zwei C-Domänen (C1, C2) sowie einer B-Domäne. Die A-Domänen werden von jeweils einem aus etwa 30-40 überwiegend sauren AS bestehenden Segment (a1, a2, a3) flankiert. Demnach lässt sich die FVIII-Struktur als NH<sub>2</sub>-A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2-COOH darstellen<sup>17-19</sup>.

Im Golgi-Apparat finden posttranslationalen Modifikationen von FVIII statt<sup>20, 21</sup>. Zudem unterliegt das Molekül intrazellulären proteolytischen Spaltungen am COOH-terminalen Ende und innerhalb der B-Domäne, welche schließlich ein nicht-kovalent gebundenes Heterodimer bestehend aus einer ~ 80 kDa leichten Kette (a3-A3-C1-C2) und einer ~ 200 kDa schweren Kette (A1-A2 und variablen Abschnitten der B-Domäne) liefern. Stabilisiert werden die beiden Ketten über eine metallionenvermittelte Interaktion zwischen den Domänen A1 und A3<sup>19</sup>.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der FVIII-Prozessierung und -Struktur.**

Dargestellt sind die Domänen A1-3, B und C1-2 sowie die aus sauren AS bestehenden Segment a1, a2 und a3. Die gestrichelten Linien stellen die metallionenvermittelten Interaktionen dar.

HC: schweren Kette (*heavy chain*); LC: leichte Kette (*light chain*). (Modifiziert nach Fay 2006)

#### 1.2.4 Aktivierung, Funktion und Inaktivierung von FVIII

Im Blutstrom zirkuliert FVIII als inaktiver Profaktor in einem Komplex mit VWF, welcher für die Stabilisierung von FVIII *in vivo* erforderlich ist<sup>22</sup>. Die Komplexbildung mit VWF verhindert eine vorzeitige Interaktion von FVIII mit Phospholipiden<sup>23</sup>, stabilisiert und schützt das FVIII-Molekül vor proteolytischem Abbau<sup>24</sup>, so dass eine deutlich verlängerte Halbwertszeit (HWZ) dieses Proteins resultiert. Die HWZ von FVIII im Komplex mit VWF beträgt acht bis zwölf Stunden, wobei diese in Abwesenheit von VWF auf etwa zwei Stunden reduziert ist<sup>25</sup>.

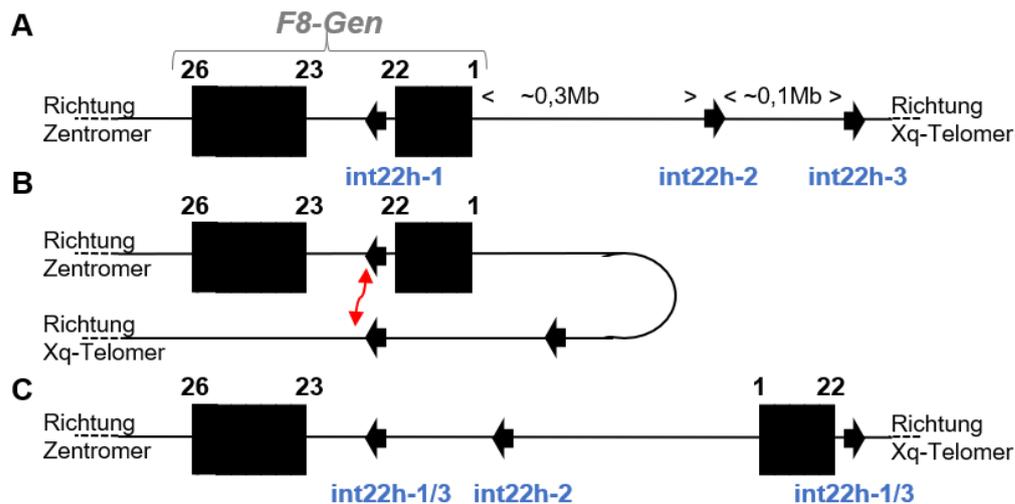
Eine thrombinvermittelte, limitierte Proteolyse aktiviert FVIII durch Spaltung an Arg372, Arg740 der schweren Kette und an Arg1689 der leichten Kette<sup>26</sup>. FXa ist ebenfalls in der Lage, FVIII durch Spaltung an den denselben Positionen zu aktivieren<sup>27</sup>. Diese Spaltungen führen schließlich zur Dissoziation von FVIIIa vom VWF aufgrund erniedrigter Affinität<sup>28</sup> sowie zu einem vollständigen Verlust der B-Domäne<sup>29</sup>. Der nun aktive Gerinnungsfaktor präsentiert sich als B-Domänen-deletiertes Heterotrimer mit einer ~ 70 kDa leichten Ketten (A3-C1-C2) und einer schweren Kette, die sich aus einer ~ 50 kDa (A1-a1) und einer ~ 40 kDa Untereinheit (A2-a2) zusammensetzt (siehe Abb. 3)<sup>27</sup>.

Nach der Dissoziation von VWF hat FVIIIa eine hohe Affinität zu Phospholipidoberflächen und bildet nun zusammen mit FIXa den membranständigen Tenasekomplex<sup>30</sup>, welcher in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$  FX aktiviert<sup>31</sup>. FVIIIa fungiert im Tenasekomplex als geschwindigkeitsbestimmender Kofaktor. Die essentielle Rolle von FVIIIa zeigt sich aus der  $10^6$ -fach verstärkten katalytischen Effizienz der Aktivierungsreaktion allein durch die Anwesenheit von FVIIIa<sup>32</sup>.

Die Inaktivierung von FVIIIa erfolgt durch limitierte Proteolyse an Arg562 sowie Arg336 und wird von aktiviertem Protein C (APC) vermittelt<sup>33</sup>. Des Weiteren können FIXa und FXa durch Spaltung an Arg336 und Lys36 eine Inaktivierung von FVIIIa bewirken<sup>34</sup>.

### 1.2.5 *F8*-Genmutationen

Bei dem Krankheitsbild Hämophilie A (HA) führen Mutationen im *F8* zu einer Verminderung oder vollständigem Fehlen von FVIII, wobei die Art der Mutation darüber entscheidet, in welchem Maße das Gen in seiner Funktion eingeschränkt ist. Die häufigste genetische Mutationen in schweren HA-Fällen sind mit einem Anteil von 45% die Intron-22-Inversion<sup>35</sup> sowie die Intron-1-Inversion, die für ca. 5% der schweren Verlaufsformen ursächlich ist<sup>36</sup>. Zwar sind Introns Genabschnitte, die beim Spleißen der DNA herausgeschnitten werden, dennoch können sie beim Ablesen der DNA zu schwerwiegenden Fehlern führen. Lakich et al. veröffentlichten 1993 ein Modell zur Erklärung des bis dahin noch unbekannt Intron-22-Mutationsmechanismus, basierend auf der Möglichkeit der intrachromosomalen homologen Rekombination zwischen int22h-1 im Intron 22 und einem der beiden homologen Regionen int22h-2 bzw. int22h-3 außerhalb des Gens (siehe Abb. 4). Int22h-1 und int22h-3 liegen in entgegengesetzter Richtung und können durch Schleifenbildung in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Durch ein einziges Crossing-over-Ereignis innerhalb der Paarungsregion kommt es zur Invertierung des Bereiches zwischen den beiden homologen Regionen int22h-1 und int22h-3 und damit der *F8*-Exons 1 bis 22. Diese daraus resultierende Inversion führt zu einem Auseinanderbrechen der *F8*-Gensequenz in zwei Teile und somit zur vollständigen Zerstörung des *F8*-Gens. Daher führt die Intron-22-Inversion immer zu einer schweren HA-Verlaufsform<sup>35</sup>.



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Intron-22-Inversion des F8-Gens.**

Modifiziert nach Bowen 2002. **(A)** Orientierende Darstellung des F8-Gens innerhalb der Xq28-Region sowie Position und Orientierung der int22h-1-Homologen int22h-2 und int22h-3 außerhalb des F8-Gens. **(B)** Durch Schleifenbildung werden die int22h-1-Homologen int22h-2 und int22h-3 in räumlicher Nähe zur in F8 gelegenen int22h-1-Region gebracht. Es findet eine homologe Rekombination statt. **(C)** Nach der homologen Rekombination zeigt die Linearisierung des X-Chromosoms ein vollständig zerstörtes F8-Gen: Die Exons 1 bis 22 sind in Richtung des Telomers verschoben und in einer Richtung ausgerichtet, die ihrer normalen Orientierung entgegengesetzt ist. Ein zusammenhängendes F8-Gentranskript von Exon 1 bis 26 ist nicht mehr möglich und es kommt zu schwerer Hämophilie A.

Weitere wichtige krankheitsauslösende Mutationen sind kleine und große Deletionen, kleine und große Insertionen sowie verschiedene Punktmutationen (Nonsense-, Missense-, Spleißstellen-Mutationen), welche über das gesamte Gen verteilt sind<sup>14, 37-39</sup>. Tritt eine Deletion oder Insertion auf, so kann sich das Leseraster für die Basentriplets hinter der Mutation verändern (*Frameshift*-Mutation), woraus schwerwiegenden Folgen für FVIII resultieren können. Sind dagegen die verlorenen oder eingefügte Basen ein Vielfaches von drei, so spricht man von *In-frame*-Deletionen oder -Insertionen, der Leseraster hinter der Mutation bleibt dabei erhalten. Patienten mit einer schweren HA weisen i. d. R. eine Inversion, Deletion, Insertion oder Nonsense-Punktmutation auf, wobei bei der zuletzt genannten Mutationsart ein einzelner Basenaustausch zur Entstehung eines Stoppcodons und damit zum vorzeitigen Abbruch der Proteintranslation führt<sup>40</sup>. Dagegen findet man Missense-Mutationen, ein einzelner Basenaustausch ohne Leserasterverschiebung, der den Einbau einer anderen AS in das Protein verursacht, fast ausschließlich bei Patienten mit leichteren Verlaufsformen<sup>39</sup>.

Die Untersuchung zahlreicher HA-Patienten in den letzten Jahren konnten eine Vielzahl von verschiedenen Mutationen im *F8* identifizieren und zeigte eine eindeutig Genotyp-Phänotyp-Korrelation, wobei der Genotyp eine vollständige Penetranz besitzt. Zurzeit sind mehr als 2000 unterschiedliche *F8*-Mutationen bekannt, welche in der EAHAD-Datenbank (*European Association for Haemophilia and Allied Disorders*) aufgelistet sind<sup>41</sup>.

## **1.3 Hämophilie A (HA)**

### **1.3.1 Klinik und Symptomatik**

Die HA ist eine angeborene oder erworbene Störung der plasmatischen Blutgerinnung mit einem vollständigen Fehlen (95% der Fälle) oder einem funktionellen Defizit (5 % der Fälle) von FVIII. Die fehlende FVIII-Aktivität (FVIII:C) äußert sich in Form einer lebenslanger Blutungsneigung. Insgesamt beträgt die Prävalenz der HA 1:10.000 Männer pro Jahr weltweit<sup>42</sup>.

Wie bereits aus Abschnitt 1.2.4 ersichtlich, können unterschiedliche Mutationen im *F8* auf dem X-Chromosom ursächlich für eine HA sein. In 40 % der Fälle treten sporadische Spontanmutationen im *F8* auf. Häufiger dagegen (60% der Fälle) wird die HA X-chromosomal-rezessiv auf die Folgegeneration vererbt und betrifft daher i. d. R. nur Männer. Frauen können Träger des Gendefekts sein (sog. Konduktorinnen), hierbei kommt es, aufgrund ihres zweiten kompensierenden gesunden X-Chromosoms, meist nicht oder nur zur leichten Ausprägungen einer Blutungsneigung<sup>43</sup>.

Jeder / jede einzelne HA-Patient / -in ist durch eine Reihe individueller Parameter gekennzeichnet, die die Variabilität und Heterogenität dieser Krankheit betonen. Zu diesen Parametern gehören die unterschiedlichen zugrundeliegenden Mutationen, die Art der Erstpräsentation (Blutungslokalisierung und -arten), die FVIII-Restaktivität und das Vorhandensein einer relevanten Familienanamnese. Besteht der Verdacht auf eine Koagulopathie, so wird zunächst eine Screeninguntersuchung (Globaltest) durchgeführt. Die am häufigsten durchgeführten Globaltests sind die Bestimmung der Thromboplastinzeit (TPZ, Synonym: Quick-Wert) bzw. International Normalized Ratio (INR) und der aktivierten Thromboplastinzeit (aPTT). Die aPTT-Messung, analysiert hierbei überwiegend die Funktionalität der Faktoren des intrinsischen Weges (FVIII, FIX, FXI und FXII) und ist damit der

wichtigste Screeningtest für HA. Hierbei zeigt die Gerinnungsdiagnostik bei der HA typischerweise eine verlängerte aPTT bei normalem Quick- bzw. INR-Wert<sup>1</sup>. Die FVIII:C korreliert unmittelbar mit dem Auftreten von erhöhter Blutungsneigung und spontanen Blutungsereignissen (siehe Tab. 1). Bei leichter HA kommt es eventuell zu vermehrten Nachblutungen nach invasiven Eingriffen, wohingegen es bei schwerer HA bereits ab der Geburt zu schwerwiegenden Symptomen kommen kann. Meistens fällt die HA mit zunehmender Mobilität der Hämophilen am Ende des ersten Lebensjahres zum ersten Mal auf, denn sie neigen zu verstärkten Blutungen nach kleineren Verletzungen und haben häufiger Hämatome<sup>44</sup>.

Typisch für eine schwere HA (FVIII:C <1%) sind Gelenkeinblutungen (80%), wobei insbesondere die großen Gelenke (Knie-, Sprung- und Ellenbogengelenke) betroffen sind. Weitere Blutungslokalisationen sind die Muskulatur (10-20%) sowie innere Organe (5-10%, z. B. gastrointestinale und intrazerebrale Blutungen)<sup>45</sup>. Bei rezidivierenden Einblutungen in ein Gelenk (Targetgelenk) entwickelt sich eine chronische Entzündung der Synovia, die wiederum zur fortschreitenden Zerstörung des Gelenkes bis hin zu einer schweren, sekundären Arthrose führt (Hämophile Arthropathie)<sup>46</sup>. Dies kann bereits in jungen Jahren zu chronischen Schmerzen, Gelenkdeformitäten, starken Bewegungseinschränkungen bis hin zur Invalidität führen<sup>47</sup>. Bei Einblutungen in die Muskulatur kann es zu einem größeren Blutverlust kommen. Ist z.B. der Musculus ileopsoas betroffen, kann dies zu uncharakteristischen Bauch- und Beinschmerzen, Schwellungen mit Kompressionen von Nachbarorganen und damit zu sekundären Symptomen führen<sup>48</sup>. Unbehandelt führt eine schwere HA zu massiven gesundheitlichen Beeinträchtigungen, welche sich entsprechend negativ auf die Lebensqualität auswirken. Häufige Krankenhausaufenthalte, aufgrund von Blutungen, Hämophile Arthropathie verbunden mit starken Schmerzen und zunehmendem Verlust der Beweglichkeit führen zu erheblichen Einschränkungen im Alltag, begrenzten Beschäftigungsmöglichkeiten und verminderter sozialer Teilhabe. Daraus können psychosoziale Probleme die Folge sein<sup>49</sup>.

**Tab. 1: Schweregrad der Hämophilie A basierend auf der FVIII-Restaktivität (FVIII:C).**

Quelle: Pötzsch und Madlener, 2010.

<b>Bezeichnung</b>	<b>FVIII:C (%)</b>	<b>Klinik</b>
Normal	> 60	
Subhämophilie	16 – 50	Meist Symptomfrei
Leichte Hämophilie	6 – 15	Hämatom nach deutlichem Trauma, Nachblutungen bei invasiven Eingriffen (z. B. Operation)
Mittelschwere Hämophilie	1 – 5	Hämatom bereits nach leichtem Trauma
Schwere Hämophilie	< 1	Spontanblutungen, Blutungen bei Bagatelltraumata

### **1.3.2 Therapie und Handlungsbedarf**

Noch vor 50 Jahren hatten an HA erkrankte Patienten durch eine erhöhte Blutungsneigung eine Lebenserwartung von durchschnittlich 12 Jahren. Seit den Anfängen der HA-Therapie in den 1930er Jahren, als durch den Einsatz von Spenderblutplasma erstmalig die fehlenden Gerinnungsfaktoren dem Patienten verabreicht werden konnten, hat es große Fortschritte in der Therapie gegeben. 1955 gelang es erstmals, den bei HA fehlenden FVIII aus Plasmaspenden zu isolieren und daraus FVIII-Präparate herzustellen. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die prophylaktische FVIII-Substitution hoch effektiv ist, um Gelenkschäden und damit einhergehende Folgeschäden vorzubeugen. So konnte die Lebenserwartung bei schwerer HA von unter 30 Jahren auf nahezu normal erhöht werden<sup>50</sup>.

Ein großes Problem in der Vergangenheit stellten die Kontaminationen von Blut- oder Plasmakonzentraten dar, sodass es bei einem Teil der HA-Patienten zur Infektionen durch HIV oder Hepatitis C kam<sup>51</sup>. Die Virussicherheit wurde durch die Einführung wirksamer Maßnahmen zur Virustestung und -inaktivierung sowie der gentechnischen Herstellung von rekombinanten FVIII-Präparaten in den 1980er Jahren erheblich verbessert. Behandlungsmethode der Wahl ist derzeit noch die intravenöse Substitutionstherapie mit rekombinant hergestellten oder hochgereinigten FVIII-Konzentraten von Menschen und Schwein. Bei leichter HA erfolgt die FVIII-Substitution bei Bedarf, während sie im Unterschied dazu bei

schwerer und mittelschwerer HA als blutungsvorbeugende Dauerbehandlung vorgesehen ist<sup>45</sup>.

Trotz Substitutionstherapie führt die HA weiterhin zu multiplen Komplikationen, einschließlich Gelenkschäden, akuten und chronischen Schmerzen, psychischen Problemen und reduzierter Lebensqualität. So ist eine solche Infusionstherapie sehr zeitintensiv und birgt Infektionsrisiken durch mehrfache wöchentliche intravenöse Applikation über eine periphere oder zentrale Vene. Rekombinante Gerinnungsfaktoren gelten zwar als sicherste Behandlungsoptionen, da eine Kontamination mit infektiösen Keimen wie HIV oder Hepatitis C praktisch ausgeschlossen werden kann, doch ein maßgebliches Problem besteht in der geringen Ausbeute und den hohen Herstellungskosten. Durch Modifikationen der rekombinanten FVIII-Präparate, insbesondere bei einer Verlängerung der HWZ, wodurch FVIII langsamer im Blut abgebaut wird, erhoffte man sich weitere Fortschritte, wie eine länger wirksame Therapie bei weniger Infusionen, sodass die Patienten ihre Therapie besser annehmen können<sup>52</sup>. Insgesamt steht jedoch eine FVIII-Substitutionstherapie weltweit nur 20% der hämophilen Patienten zur Verfügung<sup>53</sup>.

Eine der heutzutage schwerwiegendsten Komplikationen bei der Behandlung der schweren HA besteht darin, dass bis zu 30% der Patienten neutralisierende Hemmkörper gegen die verabreichten FVIII-Präparate entwickeln, sodass die Substitutionstherapie unwirksam wird und die Betroffenen dauerhaft blutungsgefährdet sind<sup>54</sup>. Im Falle einer Hemmkörperbildung kann der humanisierte monoklonale Antikörper Emicizumab (Hemlibra<sup>®</sup>) zum Einsatz kommen. Emicizumab gehört zu den bispezifischen Antikörpern und bindet sowohl an FIXa als auch an FX und vermittelt deren Aktivierung. Auf diese Weise imitiert Emicizumab die Funktion des bei der HA fehlenden FVIII und wird, aufgrund der unterschiedlichen Struktur im Vergleich zu FVIII, durch FVIII-Hemmkörper nicht beeinträchtigt<sup>55</sup>. Zwar gilt der Einsatz von Hemlibra<sup>®</sup> in der HA-Therapie als ein weiterer Fortschritt, dennoch stellt es nur eine weitere lebenslange, sehr kostspielige und nebenwirkungsreiche Alternative zur intravenösen FVIII-Substitutionstherapie dar. Die aufgeführten Einschränkungen der derzeit verfügbaren Therapieansätze verdeutlichen die Notwendigkeit einer kostengünstigeren, komplikationsärmeren und für den Patienten weniger belastenden Behandlung. Ebenso sollten sich neuere Therapieansätze stärker als bisher an den individuellen Besonderheiten der Patienten orientieren.

### 1.3.3 Aktueller Forschungsstand zur HA-Gentherapie

Eine Gentherapie (GT) eröffnet die Möglichkeit, die lebenslange und sehr kostspielige Substitutionstherapie der HA durch eine einzige Behandlung mit dem Ziel der Heilung zu ersetzen. Dabei bietet sich die HA als Modell für die GT besonders gut an, da nur ein einzelnes, gut charakterisiertes Gen betroffen ist. Prophylaktische Infusionsstudien haben gezeigt, dass bereits eine dauerhafte Erhöhung der zirkulierenden FVIII-Spiegel auf 1% zu einer Verbesserung der klinischen Symptomatik führt. Dies bedeutet, dass selbst geringe gentherapeutisch erzielte Effekte klinisch signifikant sind und sich daraus ein breites therapeutisches Fenster ergibt.

Mehrere Gentransferstrategien für die Einbringung eines therapeutischen *F8*-Transgens in bestimmte Zielzellen, um so das defekte *F8* zu ersetzen, wurden evaluiert<sup>56</sup>. Dabei zeigten sich Adeno-assoziierte virale Vektoren (AAV-Vektoren) bisher am vielversprechendsten, aufgrund ihres Sicherheitsprofils sowie der Möglichkeit, die Langzeit-Transgenexpression in postmitotischem Gewebe wie der Leber effizient zu steuern<sup>57–59</sup>.

Bei der Hämophilie B (HB, FIX-Mangel) konnte bereits in klinischen Studien gezeigt werden, dass mittels AAV-basierter GT gesunde FIX-Genkopien in die Leberzellen (Hepatozyten) eingebracht und Patienten mit schwerer HB (< 1% FIX-Aktivität) anschließend einen „milden“ Phänotyp zeigten. Dabei gelang es, endogene FIX-Aktivitäten von 5% oder mehr mit FIX-Transgen-Vektoren wie z. B. AMT-060 oder scAAV2 / 8LP1-hFIXc zu erreichen. Dies resultierte in einer Umstellung der mehrwöchentlichen FIX-Dauersubstitution dieser Patienten auf eine bedarfsgerechte FIX-Substitution im Falle von akuten Blutungsereignissen oder bei größeren operativen Eingriffen<sup>59–62</sup>.

HA ist eine weitaus häufigere Koagulopathie als HB<sup>43</sup>. Entsprechend besteht hier ein noch größeres Interesse, ein effektives gentherapeutisches Verfahren zu entwickeln. Im Gegensatz zu FIX ist aber FVIII ein sehr großes komplexes Protein, dessen cDNA mit 7,0 kb die Kapazität von AAVs (4,7 kb) deutlich überschreitet. Somit stellt eine vergleichbare AAV-vermittelte Behandlungsstrategie für HA eine große Herausforderung dar<sup>63</sup>. Mittels AAV transduzierte, verkürzte FVIII-Versionen mit reduzierter Aktivität, oder die hydrodynamische Injektion von Wildtyp-FVIII zeigten bisher nur mäßige Erfolge in verschiedenen Tiermodellen<sup>63, 64</sup>. Den-

noch gab es einige fortschrittliche Entwicklungen, welche größtenteils auf B-Domänen-deletierte humane FVIII-codierende AAV-Vektoren basieren und aktuell in klinischen Studien getestet werden<sup>53, 65</sup>.

Im Gegensatz zu den aktuellen Forschungsarbeiten, welche darauf abzielen gesunde, therapeutische *F8*-Genkopien in Zielzellen einzubringen, war das Ziel dieser vorliegenden Arbeit, eine Methode zu entwickeln, mit welcher genetische Erbkrankheiten, wie die HA, und deren zugrundeliegenden Mutationen direkt am endogenen Genlocus zu reparieren, wodurch die körpereigenen Zellen des Patienten zur Wiederherstellung des fehlenden Gerinnungsproteins befähigt werden.

## **1.4 Gentransfer-Systeme**

### **1.4.1 Einführung**

Eine der größten Herausforderungen der GT ist der effiziente und sichere Transfer des therapeutisch wirksamen genetischen Materials in die erkrankten Zellen mit dem Ziel, die benötigten spezifischen Proteine zu exprimieren. In den letzten drei Jahrzehnten wurden verschiedene Gentransferstrategien entwickelt, die von nicht-viralen bis zu viralen Vektoren reichen. Jedes dieser Systeme hat seine Vor- und Nachteile. Je nach Zellart, Rahmenbedingungen und Ziele der GT eignen sich unterschiedliche Verfahren.

Die vorherrschenden nicht-viralen Expressionsvektoren werden durch physikalische und / oder chemische Methoden in Zielzellen eingebracht (Transfektion). Hierzu zählen u. a. Calciumphosphat-Präzipitation, Lipofektion, Liposomenfusion oder Elektroporation. Nicht-virale Gentransfersysteme sind im Allgemeinen kostengünstig und ohne großen technischen Aufwand durchführbar. Ihre Hauptvorteile sind im Vergleich zu viralen Systemen ihre geringere Induktion des Immunsystems sowie keine Limitierung in der Größe des verwendeten Transgens. Nachteile sind allerdings ihre deutlich geringere Transfektionseffizienz und ihre überwiegend transiente Expression mit anschließendem Abbau des Transgens durch die Zielzelle<sup>66</sup>.

Dagegen können von verschiedenen Virenklassen abgeleitete Vektoren exogene Gene viel effizienter in Zielzellen übertragen, sodass nahezu 100 % der Zellen das fremde genetische Material erhalten, ohne dass die Lebensfähigkeit der Zel-

len nennenswert eingeschränkt wird, und so eine langfristige Genexpression induzieren. Die Infektion von Zielzellen mit viralen Vektoren (Transduktion) findet daher eine mehrheitliche Anwendung in der klinischen GT. Zahlreiche virale Vektoren mit verschiedenen Eigenschaften wurden für GT-Strategien evaluiert, zu den häufigsten gehören Retroviren, Adenoviren und adeno-assoziierte Viren (AAV). Um eine sichere Anwendung und die unkontrollierte Verbreitung des therapeutischen Vektors zu verhindern, kommen replikationsdefiziente Vektoren zum Einsatz. Diese können weiter unterteilt werden in integrierende und nicht-integrierende Vektoren. In Tab. 2 sind die wichtigsten Eigenschaften ausgewählter Vektoren zusammengefasst<sup>66</sup>.

Nicht-integrierende Vektoren z. B. von Adenoviren liegen episomal in der Zelle vor und werden bei der Zellteilung nicht repliziert. In mitotisch aktiven Zellen kommt es daher zu einer stetigen Verdünnung der Episomen, sodass nur eine transiente Expression des Transgens erreicht wird. AAV können ein breites Spektrum von sich teilenden und nicht teilenden Zelltypen transduzieren, wobei sie sowohl episomal vorliegen als auch zu einem geringen Anteil in das Wirtsgenom integrieren können (siehe 1.4.3).

Die Hauptvertreter integrierender Vektoren basieren auf Retroviren wie das HIV. Durch die stabile Integration in das Wirtsgenom kann mit diesen Vektoren in ruhende als auch mitotisch aktiven Zellen eine stabile Transgenexpression erreicht werden. Dies birgt allerdings auch Gefahren<sup>66</sup>.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bereits seit Beginn der 1990er Jahre durchgeführten verschiedenen GT-Studien, bei welche unterschiedliche virale Vektoren zum Einsatz kamen, zwar erste Erfolge zeigten, aber auch erhebliche Nebenwirkungen demonstrierten. Beispielsweise kann die Immunreaktionen des Patienten gegen z. B. den adenoviralen Vektor Komplikationen hervorrufen<sup>67</sup> oder eine ungerichtete Integration des therapeutischen Vektors in das Genom der Wirtszelle kann vorher intakte Gene der Wirtszelle unterbrechen oder stillgelegte Gene aktivieren, was im schlimmsten Fall zur Entartung der Zelle und damit zur Entstehung neuer, eventuell schwerer Krankheiten führen kann<sup>68</sup>.

Tab. 2: Vergleich der Eigenschaften viraler Vektoren für die Gentherapie.

Vektor	$\gamma$ -Retrovirus	Lentivirus	Adenovirus	AAV
Genom	ssRNA	ssRNA	dsDNA	ssDNA
Insertgröße	8,8 kb	9,6 kb	8,3 kb	4,8 kb
Integration	Ja	Ja	Nein	Nein / Ja
Transgen-expression	stabil	Stabil	transient	transient / stabil
Infizierte Zellen	Mitotisch aktive	Mitotisch aktive & ruhende	Mitotisch aktive & ruhende	Mitotisch aktive & ruhende
Nachteile	Risiko der Insertionsmutagenese; ruhende Zellen können nicht infiziert werden	Risiko der Insertionsmutagenese	Hohe Immunogenität; geringe Transgenexpression	Geringe Verpackungskapazität; Geringes Risiko der Insertionsmutagenese

#### 1.4.2 Retroviren und lentivirale Vektoren

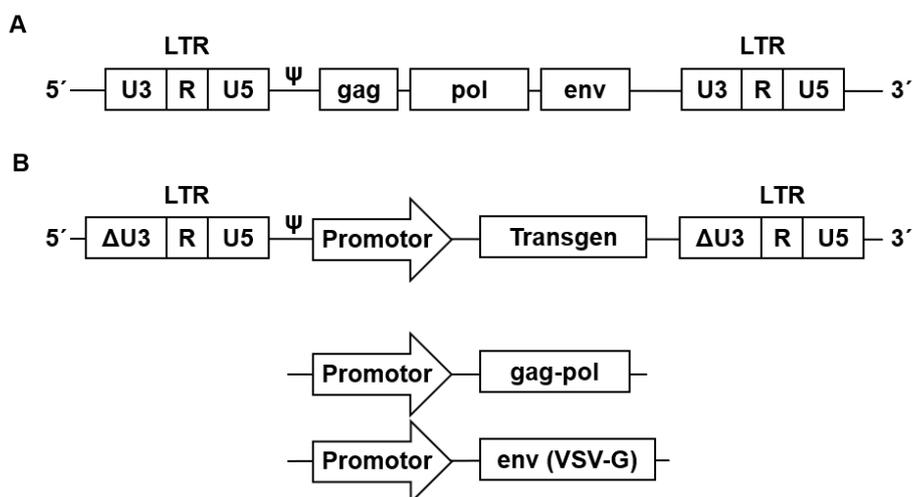
Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten lentiviralen Vektoren (rLV) basieren auf dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) Typ I und sind eine spezialisierte Klasse von Retroviren.

Retroviren sind eine große Familie behüllter Viren mit zwei identischen Einzelstrang-RNA-Molekülen, die charakteristischerweise mittels reverser Transkription über ein doppelsträngiges Intermediat in DNA-Moleküle umgeschrieben werden, bevor sie in das Genom der Wirtszelle eingebaut werden. Die Expression der viralen Gene erfolgt anschließend durch die wirtseigene Transkriptionsmaschinerie. Das provirale Genom eines einfachen Retrovirus enthält i. d. R. drei Gene „gag“, „pol“ und „env“, flankiert von jeweils *Long Terminal Repeats* (LTRs) am Anfang und am Ende (Abb. 5A). Gag codiert für interne Strukturproteine, aus denen die Matrix, das Kapsid und Nukleokapsid aufgebaut sind, pol codiert die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase, während env für die Expression der viralen Hüllproteine zuständig ist. Die zwei LTRs sind identisch und bestehen aus den Regionen U3 (*Unique 3*), R (*Redundant*) und U5 (*Unique 5*). Zur Steuerung der Transkription der viralen Gene enthalten sie Promotor- und Verstärkerelemente sowie Signale zur Termination und Polyadenylierung. Im Anschluss an den 5'-LTR befindet sich die Primerbindungsstelle, an der die reverse Transkription durch Bindung einer zellulären tRNA initiiert wird, sowie die als Verpackungssignal agierende und mit  $\psi$  (psi) bezeichnete Sequenz. Im

3'-Bereich befindet sich der Polypurintrakt, durch dessen Spaltung ein RNA-Primer für die Synthese des viralen Plusstrangs gebildet wird<sup>69</sup>.

Lentiviren sind komplexe Retroviren, die neben den gag-, pol- und env-Gene noch über weitere akzessorische Gene verfügen, von welchen *tat* (transkriptionelle Transaktivator) und *rev* (regulator of expression of the virion) essenziell für die virale Replikation sind. *Tat* codiert das *tat*-Protein, welches wiederum an die *tat activation region* (*tar*), eine cis-regulatorische Sequenz, die am 5'-Ende der viralen RNA und DNA vorliegt, bindet und dadurch die virale Transkription aktiviert. *Rev* interagiert mit dem *rev responsive element* (RRE) und vermittelt dadurch den Export einfach-gespleißter und ungespleißter viraler RNA aus dem Nukleus und deren Translation bzw. die Verpackung im Zytoplasma. Die weiteren akzessorischen Gene (*vif*, *vpr*, *vpu* und *nef*) sind für die Virusreplikation in der Zellkultur nicht entscheidend<sup>70</sup>.

Zur Herstellung replikationsdefizienter rLV werden die viralen Gene gag, pol und env deletiert und durch das therapeutische Gen ersetzt. Dagegen werden zur Gewährleistung einer effizienten Transduktion der Zielzellen die cis regulierenden Regionen (Verpackungssignal  $\psi$ , Primerbindungsstelle, 3'- und 5'-LTR) intakt gelassen. Um hohe Vektortiter zu erhalten, wird die U3 Promotorregion des 5'LTR durch einen stärkeren konstitutiven Promotor wie z.B. von dem Cytomegalievirus (CMV) ersetzt (siehe Abb. 5B)<sup>71</sup>.



**Abb. 5: Schematische Darstellung von viralen Vektoren.**

**(A)** Schema eines einfachen Retrovirusgenoms von 5' nach 3' mit den viralen Genen gag, pol und env.

**(B)** Schema eines rekombinanten SIN-Vektors von 5' nach 3' mit einem internen Promotor und einem Transgen, anstelle der viralen Gene. Zwei separate Helferplasmide stellen gag-pol sowie env von VSV-G bereit.

LTR: *long terminal repeat*, U: *unique*, R: *redundant*, SIN: selbst inaktivierend, VSV-G: Glykoprotein G des Vesicular Stomatitis Virus. (Modifiziert nach Maetzig, 2011)

Die Produktion infektiöser replikationsdefizienter rLV erfolgt in einer Verpackungszelllinie, wie z. B. der in dieser Arbeit verwendeten HEK 293T-Zelllinie, die die nötigen Strukturproteine bereitstellt. Um die Entstehung replikationskompetenter Vektoren durch homologe Rekombination zu vermindern, werden die Proteine gag-pol und env in der Verpackungszelllinie von separaten Helferplasmiden exprimiert. Die Expression der gag-pol-Gene wurde durch das RRE im gag-pol mRNA Transkript Rev abhängig gemacht. Die Addition von RRE verhindert die gag-pol-Expression in Abwesenheit von Rev. Keines dieser Helferplasmide enthält LTRs oder das  $\Psi$ -Verpackungssignal, sodass die viralen Strukturgene nicht in den rLV-Partikeln mitverpackt werden und somit auch nicht in den transduzierten Zellen exprimiert werden. Des Weiteren werden die retroviralen Hüllproteine (env) meist gegen das Glykoprotein G des *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV-G) ausgetauscht, um einen breiten Wirtstropismus zu gewährleisten. Eine Deletion im U3 ( $\Delta$ U3) führt zur Selbstinaktivierung (SIN) des rLV nach der Transduktion der Zielzelle. Daraus folgt, dass nach Integration des rLV-Genoms in die transduzierte Zielzelle, diese nicht mehr in der Lage ist, verpackungsfähige virale Genome herzustellen<sup>69</sup>.

#### **1.4.3 Integrase-defekte lentivirale Vektoren (IDLV)**

Die Integration der retroviralen cDNA wird von der viralen Integrase katalysiert<sup>72</sup>. Eingeführte Mutationen im für Integrase codierenden pol-Gen liefern Integrase-defekte retrovirale Vektoren (IDLVs). Wird die Integration der retroviralen cDNA verhindert, kommt es aufgrund der Aktivität zellulärer DNA-Reparaturenzyme zur Akkumulation zirkulärer, doppelsträngiger DNA-Formen. Eine Replikation dieser episomalen Formen findet aber nicht statt. Aufgrund ihrer hohen Stabilität werden sie jedoch erst bei fortschreitender Zellteilung durch Verdünnung aus den Zellen eliminiert. IDLVs können daher der transienten Genexpression dienen. Obwohl die Integraseaktivität dieser Vektoren inhibiert wurde, zeigen neue Studien, dass es nach wie vor zu einer Integration eines geringen Teils des Transferkonstrukts kommen kann. Grund hierfür sind die zellulären Reparaturmechanismen, die zu einer Integrase-unabhängigen Insertion des Transferkonstrukts in bestehende DSB führen können. Dennoch bietet die Entwicklung von IDLVs ein erfolgversprechendes Werkzeug für die effiziente, transiente Genexpression in mitotisch aktiven Zellen sowie für die langfristige Genexpression in ruhenden Zellen<sup>73</sup>.

#### 1.4.4 Adeno-assoziierte virale (AAV) Vektoren

Das Adeno-assoziierte Virus (AAV) gehört zu den Parvoviren. Es ist ein einzelsträngiges, nicht behülltes DNA-Virus mit einem kleinen Genom (4,7 kb), flankiert von zwei *inverted terminal repeats* (ITRs). In der befallenen Wirtszelle ist eine Replikation von AAV nur durch eine Koinfektion mit einem Helfervirus wie z. B. Adenovirus möglich. In Abwesenheit des Helfervirus verursacht AAV nur eine latente Infektion (keine Krankheitsassoziation) und persistiert meist als Episom neben dem Humanen Genom. Unveränderte AAV integrieren zusätzlich ortsspezifisch in eine Region auf dem langen Arm von Chromosom 19 ohne Risiko der Mutagenese. Diese beschriebenen Eigenschaften rückten AAV-basierte Vektoren als potenziell ideale Gentransferstrategien in den Fokus aktueller GT-Studien. Rekombinante AAV-Vektoren (rAAV) werden durch Insertion eines therapeutischen Gens zwischen den zwei ITRs hergestellt, wobei alle kodierenden Sequenzen einschließlich der *rep*- und *cap*-Gene ersetzt werden. Diese können anschließend in einer Verpackungszelllinie mit einem Helferplasmid kotransfiziert werden, welches die *rep-cap-AAV*-Gene sowie für die Expression der AAV-Gene notwendigen adenoviralen Gene bereitstellt. In den mit rAAV-Partikeln transduzierten Zielzellen erfolgt die Expression des Transgens transient durch das Episom. Ein erheblicher Nachteil von rAAV ist ihr kleines Genom. Für die Verpackung eines Transgens in einem rAAV stehen lediglich 4,7kb zur Verfügung. Des Weiteren hat sich in einigen Studien gezeigt, dass das virale Erbgut selten (ca. 0,1%) auch unspezifisch in das Genom der Wirtszelle integriert. Dennoch ist das onkogene Potential dieser GT-Vektoren im Vergleich zu anderen viralen Gentransfersystemen deutlich reduziert<sup>74</sup>.

## 1.5 CRISPR/Cas

### 1.5.1 Einführung

CRISPR/Cas (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats und **C**RISPR-**a**ssociated Protein) ist eine neue, molekularbiologische Methode, um DNA gezielt und präzise zu schneiden und zu verändern. Solche Verfahren, zu denen auch Meganukleasen (MN), Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) oder *Transcription Activator-like Effector Nucleases* (TALEN) gehören, werden zusammenfassend als Genom-Editierung bezeichnet.

MN sind Restriktionsenzyme, die DNA binden und schneiden können. Da allerdings die Bindung und Katalyse in der gleichen aktiven Domäne stattfinden, ist die Herstellung spezifischer MN sehr komplex<sup>75</sup>. ZFN und TALEN sind Fusionsproteine aus einer DNA-bindenden Domäne sowie der unspezifischen Nuklease Fok I<sup>76, 77</sup>. Im Vergleich zu MN, ZFN und TALEN ist die CRISPR/Cas9-Methode kostengünstiger, effizienter und weniger komplex in der Anwendung<sup>78</sup>.

### 1.5.2 Das mikrobielle CRISPR/Cas-System

CRISPR-Sequenzen wurde erstmals 1987 beschrieben, als im Genom von *Escherichia coli* Bakterien gruppierte, kurze und sich wiederholende Sequenzen (Repeats) mit einer Länge von 24 nt entdeckt wurden, die sich mit nichtrepetitiven Sequenzen (Spacer) abwechseln<sup>79</sup>. Mittlerweile wurden in ca. 45% der bakteriellen und ca. 87% der archaealen Genome CRISPR-Sequenzen gefunden, die als Teil des adaptiven Immunsystems das Eindringen fremder Phagen- und Plasmid-DNA verhindern<sup>80, 81</sup>. Neben den Repeats weisen die CRISPR-Loci eine Reihe von Genen auf, welche für die Cas-Proteine kodieren<sup>82, 83</sup>.

Nach einem Virusbefall wird ein Teil der viralen DNA (Protospacer) in das mikrobielle Genom integriert und verbleibt dort als Spacer<sup>80</sup>. Die Transkription der Spacerregionen liefert Vorläufer-CRISPR-RNAs (pre-crRNAs), die durch endonukleolytische Spaltung zu kurzen, reifen crRNAs prozessiert werden und komplementär zur Fremd-DNA-Sequenz sind<sup>84</sup>. Die DNA-spaltende Cas Endonuklease kann crRNA binden, woraufhin ein Ribonukleoproteinkomplex entsteht<sup>84</sup>. Die crRNA dirigiert den gesamten Komplex zur Ziel-DNA-Sequenz, welche durch das Erzeugen eines Doppelstrangbruches (DSB) gespalten wird und so der Abbau dieser DNA induziert wird. Auf diese Weise wird eine Immunität bei einer zweiten Infektion des gleichen Phagen gewährleistet<sup>85</sup>. Zur Unterscheidung von Eigen-DNA und Fremd-DNA ist das Vorhandensein eines *protospacer adjacent motif* (PAM) in der Ziel-DNA notwendig, das für die volle Funktionalität des CRISPR/Cas System zunächst von der Endonuklease erkannt und gebunden werden muss<sup>86</sup>.

Alle natürlich vorkommenden CRISPR-Systeme verwenden zwar Cas-Endonucleasen, unterscheiden sich aber in ihrer Nukleasezusammensetzung sowie in ihrem Wirkmechanismus, daher werden sie in 3 verschiedene Typen (I – III) eingeteilt<sup>87</sup>. Bei CRISPR Typ I wird die neusynthetisierte crRNA an den Cascade-Pro-

teinkomplex (*CRISPR-associated complex for antiviral defence*) gebunden, wobei die Prozessierung der crRNA sowie der Ziel-DNA von unterschiedlichen Cas Proteinen durchgeführt wird<sup>84, 88</sup>. CRISPR Typ III hingegen benötigt keine PAM-Sequenz und ist in der Lage, sowohl Fremd-DNA als auch -RNA zu schneiden<sup>89</sup>. Das am intensivsten erforschte CRISPR/Cas-System ist Typ II, dessen Prinzip auch maßgeblich im Labor Anwendung findet.

In Typ II-CRISPR-Systemen ist neben der beschriebenen crRNA nur eine katalytisch aktive Cas9-Endonuklease vorhanden, die von der PAM-Sequenz 5'NGG (mit N als beliebige Nukleinbase gefolgt von zwei Guaninen) abhängig ist. Der Schnitt der DNA erfolgt drei Nukleotide vor der erkannten PAM-Sequenz. Dabei ist Cas9 ein Multidomänen-Enzymkomplex mit zwei katalytischen Einheiten RuvC und HNH, die jeweils einen der gegenüberliegenden Stränge einer DNA-Helix schneiden<sup>90</sup>. Zudem ist noch eine weitere RNA notwendig, die *trans-acting-CRISPR-RNA* (tracrRNA), welche zum Teil komplementär zur crRNA ist und mit ihr zusammen zu einer Haarnadelstruktur hybridisiert<sup>91</sup>.

### 1.5.3 Die molekularbiologische CRISPR/Cas9-Methode

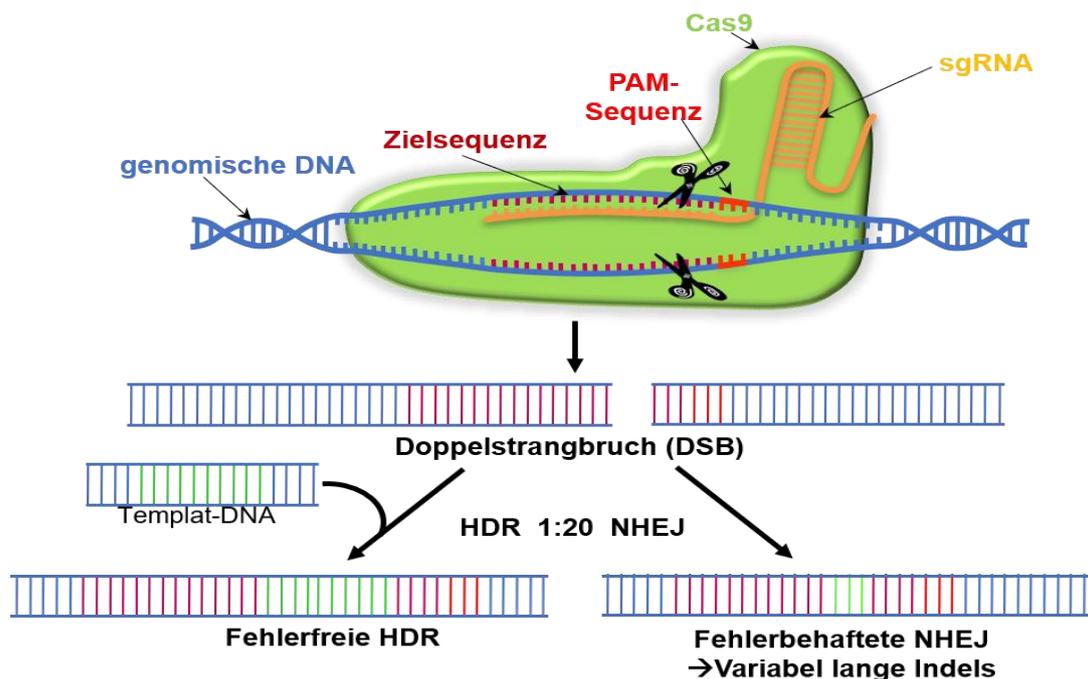
Die beiden RNA-Stränge crRNA und tracrRNA können zu einem einzelnen RNA-Strang (*single guide-RNA*, sgRNA) fusioniert werden, wobei mit dem Einsatz einer sgRNA eine 5-fach höhere Effizienz erreicht werden kann<sup>92</sup>.

Das im Labor überwiegend verwendete Cas9 des Genom-Editiersystems stammt meist entweder aus *Streptococcus pyogenes* (SpCas9, ~ 4,2 kb) oder *Staphylococcus aureus* (SaCas9), wobei die kodierende DNA-Sequenz von SaCas9 mehr als 1 kb kürzer ist<sup>93</sup>. Für eine effiziente CRISPR/SpCas9-Methode wird das Verwenden einer 20-nt langen sgRNA und 5'NGG als PAM-Sequenz empfohlen<sup>91</sup>. Dagegen konnten Ran et al. (2015) zeigen, dass SaCas9 die höchste Editiereffizienz in Säugetierzellen mit sgRNAs einer Länge von 21-23 nt und NNGRRT als PAM-Sequenz erzielt<sup>93</sup>.

Der Vorteil der CRISPR/Cas9-Methode ist, dass die DNA-Erkennung durch eine kurze Nukleinsäure stattfindet, die komplementär zur Zielregion ist und somit leicht zu konzipieren ist. Durch das Ändern der Spacer-Sequenz innerhalb der sgRNA, kann man dieses vereinfachte Zweikomponenten-System (sgRNA/Cas9) zu praktisch jeder Ziel-DNA-Sequenz mit dem PAM-Motiv im Genom dirigieren, wo dann ortsspezifisch ein DSB mit glatten Enden erzeugt wird<sup>94</sup>. In humanen

Zellen werden DSB hauptsächlich mit Hilfe des fehlerbehafteten *Non-Homologous End Joining* (NHEJ) repariert, das schnell und unabhängig vom Zellzyklus stattfinden kann<sup>95</sup>. In geringem Umfang findet auch eine Reparatur über des fehlerfreien *homology-directed repair* (HDR)<sup>96</sup> statt.

Der Mechanismus mit hoher Präzision HDR nutzt i. d. R. das Schwesterchromatid als Template, welches jedoch nur in der S- und G2-Phase des Zellzykluses vorliegt. Der fehlende Strang wird anhand dieser homologen Vorlage neu synthetisiert. Folglich ist diese Reparaturmethode in ruhenden Zellen nicht möglich<sup>97</sup>. Beim NHEJ werden die DSB ohne Verwendung einer homologen Vorlage lediglich durch reine Ligation der DNA-Enden repariert und es kommt regelhaft zu Fehlern mit Veränderungen der Ursprungssequenz. Die dabei charakteristisch auftretenden kleinen Insertionen oder Deletionen nennt man zusammenfassend Indels<sup>95</sup>. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Genom-Editierung durch das CRISPR/Cas9-System zunutze, um zielgerichtet Mutationen oder Leserasterverschiebungen in einer Zielsequenz zu erzeugen<sup>98-100</sup>.



**Abb. 6: CRISPR/cas9-erzeugte Doppelstrangbrüche und ihre Reparaturmechanismen.**

Die mithilfe der sgRNA an einer Zielsequenz dirigierten Cas9 erzeugt einen Doppelstrangbruch (DSB) drei Nucleotide vor der PAM-Sequenz. *Non-homologous end joining* (NHEJ) ist ein fehleranfälliger endogener Reparaturmechanismus, der zu Insertionen oder Deletionen führen kann und somit den Weg zu genetischer Manipulation eröffnet. Die *homology-directed repair* (HDR) ist ein präziser DNA-Reparaturmechanismus, der ein Template als Vorlage benötigt und in der Regel fehlerfrei abläuft. (Modifiziert nach Sander & Joung, Nature Biotechnology 2014).

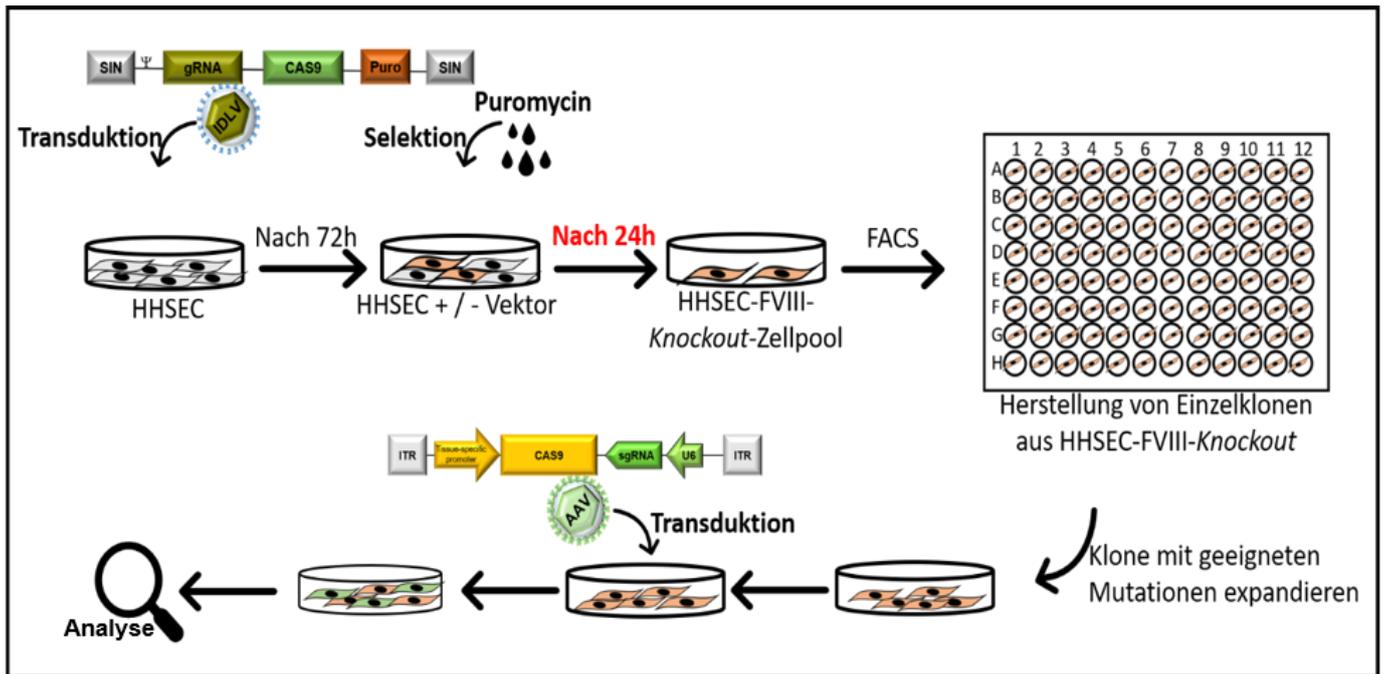
## 1.6 Hämophilie-Gentherapieprojekt

### 1.6.1 Grundidee

Unser Ansatz beruht auf der beschriebenen Ungenauigkeit des NHEJ. Hierbei sollte an der Mutationstelle des krankhaften Gens mit einer Leserasterverschiebung (*Frameshift*-Mutation) ein CRISPR/Cas9-vermittelter DSB erzeugt werden, welcher anschließend durch die zelleigenen NHEJ-Reparaturen, die in einem Drittel der Fälle zu Idels mit der Wiederherstellung des offenen Leserasters (ORF) führen, korrigiert werden. Dies würde die Proteinfunktion vollständig oder zumindest teilweise wiederherstellen. Mein Gastlabor konnte bereits die Effizienz dieser Methode in hämatopoetischen Zellen, die *Frameshift*-Mutationen in EGFP- oder CYBB-Genen enthielten, zeigen. In beiden Fällen konnte durch die Behandlung mit templatfreien CRISPR/Cas9-Endonukleasen eine Genreparaturrate von mehr als 25% erzielt werden<sup>101</sup>. *Frameshift*-Mutationen liegen bei 31% der HA-Fälle ursächlich für den FVIII-Funktionsverlust vor<sup>41</sup>. Unser GT-Projekt richtet sich primär an diese Gruppe von HA-Patienten.

Ziel ist es, HA-Patienten einen nichtpathogenen und nichtintegrierenden rAAV, der ausschließlich die HHSEC im menschlichen Organismus infiziert und die SaCas9-codierende Sequenz sowie eine patientenspezifisch-konstruierte sgRNA als Transgen enthält, zu infundieren. Die patientenspezifische sgRNA dirigiert die *in vivo* transient exprimierte SaCas9 zur *F8*-Mutation des Patienten, wo die Endonuklease in unmittelbarer Nähe einen DSB erzeugt. Durch NHEJ und der ORF-Wiederherstellung in einigen Zielzellen, soll der Patient zur Synthese des körpereigenen FVIII befähigt werden. Bereits eine Anhebung des FVIII-Spiegels auf über 1% ist klinisch von bedeutender Relevanz. Der Abbau des Episoms, samt der *in vivo* transient exprimierten SaCas9 und sgRNA durch zelleigene Reparaturmechanismen führt anschließend zu einer Entfernung der eingebrachten fremden Transgene und damit zur Minimierung des Insertionsmutagenese-Risikos. Dieses System würde folglich erstmalig eine templatfreie CRISPR/SaCas9-vermittelte Genreparatur am endogenen Locus ermöglichen.

Zur Validierung dieser GT-Strategie ist es notwendig zunächst ein *in vitro*-Zellmodell zu konstruieren (siehe Abb. 7). In weiterführende Untersuchungen soll die templatfreie CRISPR/ Cas9-Endonuklease-rAAV-Technologie *in vivo* validiert werden.



**Abb. 7: Übersichtsdarstellung des *in vitro* Hämophilie A-Gentherapieprojektes.**

HHSEC sollen isoliert und immortalisiert werden. Mittels IDLVs sollen Hämophilie A-patientenspezifische Mutationen in das *F8*-Gen der HHSEC unter Verwendung von CRISPR-Expressionsvektoren und mutationspezifischen sgRNA eingefügt werden. Ferner enthalten die konstruierten CRISPR-Vektoren eine Puromycin-Resistenz-Kassette, sodass nach der Transduktion eine Selektion mit Puromycin erfolgen kann und somit nur erfolgreich transduzierte Zellen die Selektion überleben. IDLVs integrieren nicht in die Zielzelle. Die sgRNA dirigiert die von HHSEC transient exprimierende SaCas9 an eine von uns ausgewählten Zielsequenz im *F8*, wo diese dann einen DSB erzeugt. Idealerweise wird der DSB durch den fehlerbehafteten NHEJ-Mechanismus korrigiert, wobei durch Indelgenerierung verschiedene *F8*-Mutationen und damit verbunden ein reduzierter FVIII-Spiegel resultieren. Da Zellen mit vielen unterschiedlichen *F8*-Mutationen nebeneinander in einem Zellpool vorliegen werden, ist im folgenden Schritt die Separierung und Expandierung von Einzelzellen (Generierung von Einzelklonen) notwendig. So können verschiedene HHSEC-FVIII-*Knockout*-Zelllinien mit jeweils einheitlichen *F8*-Mutationen hergestellt werden. Anschließend werden die HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinien mit den gewünschten *Frameshift*-Mutationen als Modell für die CRISPR/Cas9-vermittelte Genreparatur mithilfe von rAAV verwendet. In diesem Fall soll die spezifisch konstruierte sgRNA die SaCas9 in den Sequenzbereich der vorliegen *F8*-Mutation dirigieren. Durch einen erneut erzeugten DSB und der erneuten Reparatur mittels NHEJ wird im Idealfall das offene Leseraster wiederhergestellt und die Proteinfunktion vollständig oder zum Teil wiederhergestellt.

HHSEC: humane hepatische sinusoidale Endothelzellen, IDLV: Integrase-defekter lentiviraler Vektor, CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, sgRNA: single guide RNA, SaCas9: Cas9-Endonuklease von *Staphylococcus aureus*, Cas9: CRISPR assoziiertes Protein, FVIII: Gerinnungsfaktor VIII (Protein), *F8*: FVIII-codierendes Gen, DSB: Doppelstrangbruch, NHEJ: Non-homologous end joining, rAAV: rekombinanter Adeno-assoziiierter Vektor.

### 1.6.2 Ziele der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein geeignetes HA-Zellmodell zu entwickeln, um die zukünftigen *in vitro*-Erforschungen einer CRISPR/Cas-basierten GT zur Behandlung der HA zu ermöglichen. Die aufgeführte Grundidee unseres gesamten HA-GT-Projektes würde den Rahmen dieser medizinischen Dissertation übersteigen, daher sollen im Folgenden die konkreten Ziele dieser Arbeit beschrieben werden:

- Die kommerziell erhaltene, primäre HHSEC-Zelllinie sollte mithilfe des Onkogenes *large T* (LT) immortalisiert, charakterisiert und der Umgang mit ihr etabliert werden. Insbesondere die Ermittlung der geeigneten Kultivierungsbedingungen, das Wachstumsverhalten und die FVIII-Produktion sind als Basis für das weitere Vorgehen von großem Interesse.
- Da die genetischen *F8*-Veränderungen X-chromosomal-rezessiv kodiert sind und somit die HA vor allem Männer betrifft (siehe 1.3), sollte eine Geschlechtsdetermination der erhaltenen HHSEC erfolgen und die Verwendbarkeit dieser als HA-Modell diskutiert werden.
- Verschiedene FVIII-Detektionsmethoden (Western Blot, ELISA, Immunfluoreszenz-Mikroskopie, aPTT-basierte FVIII-Aktivitätsmessung) sollten in HHSEC getestet und für ein *in vitro* HA-Zellmodell validiert werden.
- Unsere Arbeitsgruppe hat bisher bei der Verwendung der CRISPR/Cas9-Methode stets mit der SpCas9 gearbeitet. In dieser Arbeit sollte die Verwendung der SaCas9 erstmals in unserem Labor etabliert und ihre Effizienz in HHSEC ermittelt werden.
- Aus der HA-Datenbank sollten fünf *F8*-Mutationen mit einem *Frameshift*-Effekt, welche bekanntlich eine schwere HA verursachen, ausgewählt werden. Diese *F8*-Mutationen sollten als Grundlage für die Konstruierung von fünf verschiedenen sgRNA-CRISPR/SaCas9-Expressionsvektoren zur Herstellung von patientenähnlichen *F8*-Mutationen in HHSEC dienen.
- Zur Imitierung eines Patienten mit schwerer HA *in vitro* als Grundlage für die Evaluierung der CRISPR/SaCas9-vermittelten GT sollten die immortalisierten HHSEC mit den hergestellten sgRNA-CRISPR/SaCas9-Vektoren mittels lentiviralem Gentransfer stabil transduziert und die so generierten verschiedenen HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinien analysiert und auf ihre FVIII-Expression hin überprüft werden.

## 2 Material

### 2.1 Softwares & online Programme

Name	Anwendung	Hersteller
ApE-A plasmid Editor	Archivierung von DNA-Sequenzen, Primer-Design	Mikel Wayne Davis (University of Utah)
Citavi	Literaturverwaltungsprogramm	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
Diva7 FACS-Software	Messung, Auswertung, Zellsortieren (FACS Aria III)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
GraphPad Prism 5	Grafische & statistische Auswertung	GraphPad software, La Jolla, USA
i-control 1.11.1.0 Software	Einstellung & Auswertung des Plattenlesegerätes (MTT, ELISA)	Tecan Trading AG, Schweiz
Microsoft Excel 2016	Tabellenkalkulationsprogramm	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Office 2016	Textverarbeitungsprogramm	Microsoft, Redmond, USA
Zeiss ZEN 2.3 (blue edition)	Bearbeitung & Archivierung von Immunfluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

### 2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller
ACL TOP 700	Instrumentation Laboratory Company, Bedford, USA
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Agarosegel Detektor - E.A.S.Y.RH-3	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Agarose-Gelelektrophorese Netzteil – EPS 500/400	Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden

Agarose-Gelelektrophorese Kammer – 40-0911	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Autoklav	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Bakterien Schüttler – Roth KS 15A	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bakterie-Falcon (14 mL)	Greiner, Flickenhausen, Deutschland
Blutabnahmeröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Durchflusszytometer – BD FACSAria <sup>T</sup> <sub>MIII</sub>	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Durchflusszytometer – BD LSRFortessa <sup>TM</sup>	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Einfrierbox	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
FACS-Gefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcon (15 mL / 50 mL)	Greiner, Flickenhausen, Deutschland
Filterspitzen (10 / 20 / 200/ 1000µL)	Starlab, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank (- 20°C)	Liebherr, Bieberach, Deutschland
Gefrierschrank (- 80°C)	New Brunswick Scientific, Eppendorf, Hamburg
Gel- / Blotkammer Netzteil – Power Pac 1000	Bio-Rad, Hercules, USA
Gel- / Blotkammer – XCELL SureLock <sup>TM</sup>	Invitrogen, Carlsbad, USA
Geldokumentationssystem (WB) – Odyssey FC LI-COR	Bioscience, Bad Homburg, Deutschland
Gel-Kassetten 1.0 mm	Invitrogen, Carlsbad, USA
Inkubator Heraeus B6030 (Bakterien)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Inkubator Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Kanülen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kryohandschuhe	Tempshield Inc., München, Deutschland

Kryotube (2 mL)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Kühlschrank (4°C)	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrofilter (0,45µm)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Mikroskop Zeiss ID03	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikrotitrierplatten (96-Well)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Mikrowelle	LG, Ratingen, Deutschland
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare, München, Deutschland
Objektträger	Superfrost Menzel, Braunschweig, Deutschland
PCR-Maschine – Mastercycler® pro	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Maschine – T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad, Hercules, USA
PCR Tubes	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Petrischale (10 cm)	Greiner, Flickenhausen, Deutschland
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland
Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten (10µL, 20µL, 200µL, 1000µL)	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitzen (10 / 20 / 200/ 1000µL)	Starlab, Hamburg, Deutschland
Plattenlesesystem – Infinite M200 PRO	Tecan Trading AG, Schweiz
Reaktionsgefäße (0,5 / 1,0 / 2,0 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Schwämmchen (WB)	Invitrogen, Carlsbad, USA
SDS-PAGE Protein Gele – NuPAGE™ 4-8 % Tris-Acet Gel	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sicherheitswerkbank Heraeus LaminAir®	Heraeus, Hanau, Deutschland
Sonifizierer – VW 2070	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Spektrophotometer – NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Spritzen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Sterilbank Class II Nuaire	Zapf Instruments, Sarsted, Deutschland
Tischzentrifuge - Himac CT15RE	Hitachi, Tokio, Japan
Thermocycler – MastercyclerRPro	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexmischer – REAX 2000	Heidolph
Wasserbad GFL1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Whatman Filterpapier (WB)	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturplatten (96-Well /12-Well / 6-Well)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschalen (10 / 15 cm)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellsieb	Merck Milipore, Billerica, USA
Zählkammern	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 800)	Zeiss, Jena, Deutschland
Zentrifugalsäulen Vivaspin 2 (10.000 / 100.000 MWCO)	Sartorius Stedim Lab Ltd, Stonehouse, Vereinigtes Königreich
Zentrifuge – Rotina 35	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge – Rotanta 460	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge – Microcentrifuges 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Name	Firma
1 kB plus DNA-Marker	NEB, Frankfurt, Deutschland
2-Propanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid 40%	Amresco, Solon, USA
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bis-Tris	Serva, Heidelberg, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Carbonat-Bicarbonat-Puffer – Kapseln	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chloroform	Fluka, Deisenhofen, Deutschland
ddH <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Decklösung (Immunfluoreszenz)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Digitonin	Roth, Karlsruhe, Germany
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMEM	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Gel-Ladepuffer (6x)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
dNTP mix (10 µM)	NEB, Frankfurt, Deutschland

Doxycyclin (Dox) 1mg/mL	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Endothelial cell Medium (ECM)	ScienCell Research Laboratories™, Carlsbad, USA
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Etramethylethylenediamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FVIII-Mangelplasma – HemosIL™	Instrumentation Laboratory Company, Bedford, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
HDGreen Plus	Intas, Göttingen, Deutschland
Isopropanol	Fluka, Deisenhofen, Deutschland
Kovaltry – rekombinanter humaner FVIII	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
LB-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lowry A (Proteinkonzentrationsbestimmung – Lösung A)	Biorad, Richmond, USA
Lowry B (Proteinkonzentrationsbestimmung – Lösung B)	Biorad, Richmond, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methylenblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Milchpulver (fettfrei)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

o-Phenylendiamin dihydrochlorid (OPD) – Tabletten (5mg)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
OPTIMEM (1x)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Roti-Load 1 reduzierend, 4x konzentriert (WB)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Restriktionspuffer 1,2,3,4,5 (10x)	NEB, Frankfurt, Deutschland
Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phosphate-buffered saline (PBS) (1x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Phosphat-Citrat-Puffer – Tabletten	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Polybren (8mg/mL)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Proteinstandardmarker – Precision	Biorad, Richmond, USA
Puromycin (1µg/µL)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (2,5 M)	Honeywell I Fluka™, Seelze, Deutschland
SuperSignal® West Femto Luminol/Enhancer Solution	Thermo Scientific, Rockford, USA
SuperSignal® West Femto Stable Peroxide Solution	Thermo Scientific, Rockford, USA
SuperSignal® West Pico Luminol/Enhancer Solution	Thermo Scientific, Rockford, USA

SuperSignal® West Pico Stable Peroxide Solution	Thermo Scientific, Rockford, USA
T4 DNA Ligase Puffer	NEB, Frankfurt, Deutschland
Transferpuffer (20x) – NuPAGE™	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Acetat-Puffer (20x) – NuPAGE™	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypsin (10x)	PAA Laboratories, Parsching, Österreich
Tween-20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid-Lösung 30% (w/w) in H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

## 2.4 Enzyme

Enzym	Firma
BsmBI	NEB, Frankfurt, Deutschland
Dream Taq Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
HindIII	NEB, Frankfurt, Deutschland
RNase A	NEB, Frankfurt, Deutschland
Proteinase inhibitor cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt, Deutschland

## 2.5 Antikörper

Primäre Antikörper	Quelle	WB	IF	Firma
β-Tubulin	Maus	1:1000	1:100	ProteinTech, Manchester, Großbritannien
Flag	Maus	1:1000	/	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FVIII	Hase	1:500	1:50	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

FVIII	Hase	1:500	/	Novus biologicals, Wiesbaden, Deutschland
Anti-Cas9	Hase	1:1000	/	Thermo Fischer, Massachusetts, USA
SV40 large T	Maus	1:500		Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Vinculin	Maus	1:1000	1:100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
VWF (H-300)	Hase	1:500	1:50	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
<b>Sekundäre Antikörper</b>	<b>Quelle</b>	<b>WB</b>	<b>IF</b>	<b>Firma</b>
Anti mouse-HRP	Ziege	1:10.000	/	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Anti rabbit-HRP	Ziege	1:10.000	/	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Anti mouse-Alexa Fluor 488	Ziege		1:300	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti rabbit-Cy3	Ziege	/	1:300	Dianova, Hamburg, Deutschland
Phalloidin-Alexa Fluor 555			1:25	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

## 2.6 Kommerzielle Kits

Name	Verwendung	Hersteller
NucleoBond Xtra Midi	Plasmidisolierung	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Gelextraktion	Zymo Research, Irvine, USA
Matched-Pair Antibody Set – F8C-EIA	Detektion des FVIII Antigens mittels ELISA	Affinity Biologicals™ INC., Ontario, Kanada

## 2.7 Humane Zelllinien

Zelllinie	Genotyp	Medium	Referenz
HEK293T	Genetisch modifizierte humane embryonale Nierenzellen, welche das SV40 large T-Antigen exprimieren (immortalisierte Zelllinie).	DMEM 10% FCS 1% P/S	DSMZ: ACC 635
HHSEC	Humane hepatische sinusoidale Endothelzellen.	ECM	ScienCell Research Laboratories™, Carlsbad, USA
HHSEC_LT	Genetisch modifizierte HHSEC, welche das SV40 large T-Antigen Dox-induziert exprimieren (immortalisierte Zelllinie).	DMEM 20% FCS 1% P/S 1 µg/mL Dox	Vorliegende Arbeit
HHSEC_KO_F8_1	Mit pLCv2-Sa-F8-1 stabil transduzierte HHSEC_LT, welche die SaCas9, eine gRNA sowie eine Puromycin-resistenz enthalten.	DMEM 20% FCS 1% P/S 1 µg/mL Dox	Vorliegende Arbeit
HHSEC_KO_F8_2	Mit pLCv2-Sa-F8-2 stabil transduzierte HHSEC_LT, welche die SaCas9, eine gRNA sowie eine Puromycin-resistenz enthalten.	DMEM 20% FCS 1% P/S 1 µg/mL Dox	Vorliegende Arbeit
HHSEC_KO_F8_3	Mit pLCv2-Sa-F8-3 stabil transduzierte HHSEC_LT, welche die SaCas9, eine gRNA sowie eine Puromycin-resistenz enthalten.	DMEM 20% FCS 1% P/S 1 µg/mL Dox	Vorliegende Arbeit
HHSEC_KO_F8_4	Mit pLCv2-Sa-F8-4 stabil transduzierte HHSEC_LT, welche die SaCas9, eine gRNA sowie eine Puromycin-resistenz enthalten.	DMEM 20% FCS 1% P/S 1 µg/mL Dox	Vorliegende Arbeit

HHSEC_ KO_F8_5	Mit pLCv2-Sa-F8-5 stabil transduzierte HHSEC_LT, welche die SaCas9, eine gRNA sowie eine Puromycin-resistenz enthalten.	DMEM 20% FCS 1% P/S 1 µg/mL Dox	Vorliegende Arbeit
HHSEC_ KO_F8_1 /3/5	Mit pLCv2-Sa-F8-1, pLCv2-Sa-F8-3 und pLCv2-Sa-F8-5 transduzierte HHSEC_LT, welche die SaCas9, 3 verschiedene gRNAs sowie eine Puromycin-resistenz enthalten.	DMEM 20% FCS 1% P/S 1 µg/mL Dox	Vorliegende Arbeit
HHSEC_ KO_F8_ NTC	Mit pLCv2-Sa-F8-NTC stabil transduzierte HHSEC_LT, welche die SaCas9, eine gRNA sowie eine Puromycin-resistenz enthalten.	DMEM 20% FCS 1% P/S 1 µg/mL Dox	Vorliegende Arbeit
MOLM- 13	Von einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) abgeleitete Zelllinie.	/	Von meinem Gastlabor

## 2.8 Bakterien

Bakterienstamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F-φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-,mK+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1

## 2.9 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
NH_1	caccgTTCCGGGCTAACAAG- TCCTGT	Sense-sgRNA für NTC
NH_2	aaacACAGGACTTGTTAGCC- CGGAAC	Antisense-sgRNA für NTC
NH_3	caccgAGTGCCACCAGAAGA- TACTAC	Sense-sgRNA für Exon 1 des F8-Gens

NH_4	aaacGTAGTATCTTCTGGTG-GCACTc	Antisense-sgRNA für Exon 1 des <i>F8</i> -Gens
NH_5	caccgGCGATGTTGAAAAGG-TGATCC	Sense-sgRNA für Exon 2 des <i>F8</i> -Gens
NH_6	aaacGGATCACCTTTTCAAC-ATCGCc	Antisense-sgRNA für Exon 2 des <i>F8</i> -Gens
NH_7	caccgTGATTCATGCTGAATA-GCTTC	Sense-sgRNA für Exon 9 des <i>F8</i> -Gens
NH_8	aaacGAAGCTATTCAGCATG-AATCAc	Antisense-sgRNA für Exon 9 des <i>F8</i> -Gens
NH_9	caccgTAGGTGTTCTGTGTG-CAAACC	Sense-sgRNA für Exon 14 des <i>F8</i> -Gens
NH_10	aaacGGTTTGCACACAGAAC-ACCTAc	Antisense-sgRNA für Exon 14 des <i>F8</i> -Gens
NH_11	caccgTTTGTCCATAAGCATT-CTGTC	Sense-sgRNA für Exon 14 des <i>F8</i> -Gens
NH_12	aaacGACAGAATGCTTATGG-ACAAAc	Antisense-sgRNA für Exon 14 des <i>F8</i> -Gens
NH_13	CCCTCCTGGGAGCTAAAG	Sense-Primer zum Nachweis von Mutationen in Exon 1
NH_14	CTCTACTCCAGTCTCTAGATTCTG	Antisense-Primer zum Nachweis von Mutationen in Exon 1
NH_15	TCCTTTCTTCACGCAGATT-TC	Sense-Primer zum Nachweis von Mutationen in Exon 2
NH_16	ATAAGGGGATACTTCCCACC	Antisense-Primer zum Nachweis von Mutationen in Exon 2
NH_17	ATGGCATGGAAGCTTATGTC	Sense-Primer zum Nachweis von Mutationen in Exon 9
NH_18	ATTCTAGGTAGGCTCAAAT-CC	Antisense-Primer zum Nachweis von Mutationen in Exon 9
NH_19	TATCTGGGAATGGGAGAGAC	Sense-Primer zum Nachweis von Mutationen in Exon 14

NH_20	TCCAGGTGATGGATCATCAG	Antisense-Primer zum Nachweis von Mutationen in Exon 14
NH_21	CTGAGTCTGGTGGACCTC	Sense-Primer zum Nachweis von Mutationen in Exon 14
NH_22	GAATAGCATCTTAAAGAAC-GACATATC	Antisense-Primer zum Nachweis von Mutationen in Exon 14
DS-B-9	AGAATATTCCCGCTCTCCG-GAG	Sense-Primer zum Nachweis von Mutationen hSRY
DS-B-10	GCAAAGTCAATTCTTCGG-CAG	Antisense-Primer zum Nachweis von Mutationen hSRY
DS-B-11	GGACCTCAGCAAAATCTCC-AGC	Sense-Primer zum Nachweis von Mutationen hARAF
DS-B-12	GCTCAATCTTGGGGAGTGA-CC	Antisense-Primer zum Nachweis von Mutationen hARAF

## 2.10 Plasmide

Plasmid	Funktion	Quelle
psPAX2	HIV-1-Verpackungsplasmid, das für gag, pol, rev und tat unter Kontrolle des CMV-Promotors codiert und zur Herstellung von lentiviralen Vektoren dient.	Addgene (ID: 12260)
pMD2.G	Verpackungsplasmid, das das VSV-G-Hüllprotein unter Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert.	Addgene (ID:12259)
pLentiCRISPRv2	Universelles CRISPR-Expressionsplasmid mit 2 Expressionskassetten: SpCas9 + Puromycin-Resistenz, unter Kontrolle des EF1 $\alpha$ -Promotors und sgRNA unter Kontrolle des hU6-Promotors.	Addgene (ID:52961)
pLentiCRIS-PRv2_SaCas9_Puro	Derivat von pLentiCRISPRv2, das die SaCas9 und eine Puromycin-Resistenz enthält.	Erhalten von meinem Gastlabor

pRRL-ppT-SV40LT	Lentivirales Plasmid, das für die Expression des SV40 Large T Antigens zur Immortalisierung von primären Zellen sorgt. Das Large T Antigen wird unter Kontrolle eines Doxycyclin abhängigen Promotors exprimiert.	Erhalten von Özlem Demirel (Uniklinik Frankfurt, Hämatologie/Onkologie, AG Brandts)
pLCv2-Sa-F8-NTC	Golden Gate Klonierung von hybridisierten NH_1 / NH_2 in pLentiCRIPSRv2_SaCas9_Puro unter Verwendung von BsmBI.	Vorliegende Arbeit
pLCv2-Sa-F8-1	Golden Gate Klonierung von hybridisierten NH_3 / NH_4 in pLentiCRIPSRv2_SaCas9_Puro unter Verwendung von BsmBI.	Vorliegende Arbeit
pLCv2-Sa-F8-2	Golden Gate Klonierung von hybridisierten NH_5 / NH_6 in pLentiCRIPSRv2_SaCas9_Puro unter Verwendung von BsmBI.	Vorliegende Arbeit
pLCv2-Sa-F8-3	Golden Gate Klonierung von hybridisierten NH_7 / NH_8 in pLentiCRIPSRv2_SaCas9_Puro unter Verwendung von BsmBI.	Vorliegende Arbeit
pLCv2-Sa-F8-4	Golden Gate Klonierung von hybridisierten NH_9 / NH_10 in pLentiCRIPSRv2_SaCas9_Puro unter Verwendung von BsmBI.	Vorliegende Arbeit
pLCv2-Sa-F8-5	Golden Gate Klonierung von hybridisierten NH_11 / NH_12 in pLentiCRIPSRv2_SaCas9_Puro unter Verwendung von BsmBI.	Vorliegende Arbeit

### 3 Methoden

#### 3.1 Auswahl patientenspezifischer *F8*-Mutationen

Ran et al. (2015) zeigten in ihrer Publikation von 2015, dass die SaCas9 das Genom mit NNGRRT als PAM-Sequenz am effizientesten schneiden kann. Dabei erzielte die SaCas9 die höchste Editiereffizienz in Säugetierzellen mit sgRNAs zwischen 21- und 23-nt Länge, wobei das Ersetzen der ersten Base der sgRNA durch Guanin die SaCas9-Aktivität weiter verbesserte<sup>93</sup>.

Basierend auf dieser Publikation durchsuchten wir das *F8*-Gen nach der PAM-Sequenz NNGRRT (siehe Anhang). Anschließend überprüften wir in der EAHAD-Datenbank, ob patientenspezifische Mutationen drei Nukleotide vor oder hinter der gefundenen PAM-Sequenz beschrieben wurden. Von diesen patientenspezifischen *F8*-Mutationen in der Nähe der PAM-Sequenz wählten wir wiederum fünf Beispiele aus (siehe Tab. 3), welche einen *Frameshift*-Effekt aufweisen und eine schwere HA-Form mit einer FVIII:C von weniger als 1% verursachen. Auf Grundlage dieser fünf ausgewählten Beispiele konstruierten wir in der vorliegenden Arbeit sgRNA für die Richtung der SaCas9 zu den ermittelten patientenspezifischen Sequenzen, um auf diese Weise möglichst patientenähnliche *F8*-Mutationen in HHSEC, zur Imitierung eines Patienten mit schwerer HA und *Frameshift*-Effekt *in vitro*, einzuführen.

**Tab. 3: Beispiele von patientenspezifischen *F8*-Mutationen aus der Hämophilie A-Datenbank.**

Aufgelistet sind fünf verschiedene *F8*-Mutationen mit einem *Frameshift*-Effekt aus Patienten mit einer schweren HA-Form (FVIII:C < 1%). Es handelt sich dabei um Deletionen. Quelle: <http://www.factorviii-db.org/>, 01.06.2021. HA: Hämophilie A, FVIII:C: FVIII-Aktivität.

Name	Mutation	Exon	HA-Form	FVIII:C (%)
F8_1	c73delT	1	schwer	< 1
F8_2	c224delA	2	schwer	< 1
F8_3	c1579delG	9	schwer	< 1
F8_4	c2374delT	14	schwer	< 1
F8_5	c3202_3203delAG	14	schwer	< 1

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Kultivierung von Bakterien

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Aufnahme freier DNA chemisch kompetente DH5 $\alpha$ -*Escherichia coli*-Bakterien verwendet, welche in Aliquots bei -80°C gelagert wurden. Zur Kultivierung dieser Bakterien in einer Flüssigkultur wurde dem LB-Medium das Selektionsantibiotikum Ampicillin (Amp) in einer finalen Konzentration von 100  $\mu$ g/ml zugesetzt. Die Bakterien wurden in diesem Amp-LB-Medium bei 37°C über Nacht (~ 16 h) und 220 rpm in einem Bakterienrüttler gezüchtet.

Für die Kultivierung in Platten wurde eine Reinkultur mit einer Impföse oder einem Drigalskispatel gleichmäßig auf eine Amp-LB-Agar-Platte (enthielt 100  $\mu$ g/mL Amp) verteilt und über Nacht (~ 16 h) bei 37°C in einem Inkubator bebrütet. Die Bakterienplatten wurden bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert.

LB Agar	35 g Agarpulver in 1 l H <sub>2</sub> O
LB medium	20 g LB broth in 1 l H <sub>2</sub> O

### 3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation aller DNA-Sequenzen erfolgt durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mithilfe der hitzebeständigen DreamTaq-DNA-Polymerase nach Herstellerangaben. Das Gesamtvolumen einer PCR-Reaktion betrug 50  $\mu$ L. Das PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, Hybridisierungsschritt sowie einem Elongationsschritt. Denaturiert wird bei 98°C, dabei trennen sich die beiden Stränge der Template-DNA. Anschließend wird die Temperatur auf 57°C gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA kommt. Anschließend ermöglicht die Temperaturerhöhung auf 72°C, das Temperaturoptimum der thermostabilen DreamTaq-Polymerase, die Verlängerung des Primers bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht. Durch Wiederholen dieser Schritte für mehrere Zyklen wird die spezifische DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert.

#### Standard-PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	2 min	98°C	} 32 Zyklen
Denaturierung	20 s	98°C	
Hybridisierung	20 s	57°C	
Elongation	1 min	72°C	
Finale Elongation	7 min	72°C	
Kühlen	∞	4°C	

#### Komponenten für einen Standard-PCR-Ansatz:

DNA (~ 0,1 µg)	1 µL
dNTPs (2,5 mM)	2 µL
DreamTaq Puffer	5 µL
Oligonukleotid s. (10µM)	2,5 µL
Oligonukleotid as. (10µM)	2,5 µL
DreamTaq-Polymerase	0,3 µL
Mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen	
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µL</b>

### 3.2.3 Arbeiten mit DNA

#### Genomische DNA-Isolierung

Die Isolierung der genomischen DNA aus Zellen erfolgte unter Anwendung der Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode. Die kultivierten adhärenenten Zellen wurden mit PBS gewaschen, pelletiert (5 min, 1200 rpm, RT) und anschließend in 400 µL SDS-Zellysepuffer, welchem 150 µg/mL Proteinase K zugesetzt wurde, resuspendiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 60°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf RT wurden 400 µL Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, mithilfe eines Vortexmischer gründlich geschüttelt und dann zentrifugiert (RT, 15000 rpm, 5 min). Nach der Zentrifugation entstanden 3 Phasen. Die wässrige Phase oben enthielt die DNA. Diese wurde vorsichtig unter Vermeidung der Interphase abgenommen und in ein neues Reagenzgefäß überführt. Es wurden 400 µL Chloroform hinzugegeben, gründlich durchmischt und anschließend erneut zentrifugiert (RT, 15000 rpm, 5 min). Die obere Phase wurde wieder in ein neues Reagenzgefäß überführt und mit 1 mL Ethanol (100%) gemischt.

Nach dem Schütteln und Zentrifugieren (RT, 15000 rpm, 5 min) wurde die DNA ausgefällt. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet wurde mit 150 µL Ethanol (70%) gewaschen und anschließend zentrifugiert (RT, 15000 rpm, 5 min). Das DNA-Pellet wurde getrocknet (~ 5 min) und in ddH<sub>2</sub>O zu einer Konzentration von 200 ng/µl gelöst.

SDS-Zellyse Puffer für genomische DNA	50 mM Tris-HCl pH 8 100 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8 0,5% SDS
---------------------------------------	--

### **DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte am NanoDrop-Spektralphotometer über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäure. Die verwendete Probenmenge betrug 1 µL. Die DNA-Konzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm, der Verdünnung und einem für DNA, RNA bzw. Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor. Bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen. Aus dem Verhältnis der OD<sub>260nm</sub> und der OD<sub>280nm</sub> erhält man zusätzlich eine Aussage über DNA-Reinheit in der Lösung, welche ungefähr bei 1,8 liegen sollte.

### **Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarosegel-Elektrophorese ist die einfachste und effektivste Methode, DNA-Fragmente ihrer Größe nach voneinander zu trennen und zu identifizieren. Hierbei wurden 1 – 2% Agarosegele eingesetzt. Die erforderliche Menge an Agarosepulver wurde mit 1×TAE-Puffer gemischt und durch Erhitzen der Emulsion in einer Mikrowelle gelöst. Zur DNA-Färbung wurde 1 µL HD-Green Plus pro 20 mL Agarosegel zugegeben und dann in eine Gelkammer gegossen. HD-Green Plus interkaliert in die DNA und ermöglicht so die Visualisierung von DNA unter UV-Licht. Nach der Aushärtung des Gels wurde die Kammer mit 1×TAE-Elektrophoresepuffer gefüllt, bis das Gel knapp bedeckt war. Die Proben wurden mit 6×DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels geladen. Zur Identifizierung der Fragmentlängen wurde ein DNA-Größenmarker (1 kB plus DNA-Marker) mitgeführt. Durch Anlegen einer Spannung von 120 V für 30 – 60 min wurden die

DNA-Fragmente ihrer Größe nach getrennt. Danach wurden die DNA-Fragmente durch UV-Licht unter einem Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert. In einigen Fällen wurde ein getrenntes DNA-Fragment mithilfe eines Skalpell aus dem Gel geschnitten und unter Verwendung des "Zymoclean™ Gel DNA-Recovery"-Kit (Zymo Research) isoliert.

TAE Puffer (50X)	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml EDTA (0.5M) pH 8.0
------------------	---

### **Gelextraktion von DNA-Fragmenten**

Um ein DNA-Fragment aus einem Agarosegel zu isolieren, wurde die DNA-Bande des Interesses unter UV-Licht aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Extraktion aus dem Agarosegel wurde unter Verwendung des Zymoclean™ Gel DNA-Recovery"-Kit (Zymo Research) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dieses Kit basiert auf der Bindung von DNA an eine Silica-Membran in Gegenwart einer hohen Konzentration an chaotropem Salz. Das ausgeschnittene Agarosegel-Stück wurde in dem im Kit enthaltenem Agarose-Auflösungspuffer (ADB) bei 50°C für 5 – 10 min gelöst und dann in die im Kit enthaltene Filtersäule gegeben und zentrifugiert (1 min, 15000 rpm, RT). Nach zwei Waschschrritten wurde die reine DNA unter Verwendung von 50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### **DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der SeqLab Company (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die zu sequenzierende DNA-Probe wurde in einem Reaktionsgefäß vorbereitet. Dabei wurden 1 µg Plasmid oder 0,1 µg PCR-Fragment mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 15 µL gebracht. Selbst designte Primer wurden als Sequenzierprimer in einer Konzentration von 10 µM in einem separaten Reaktionsgefäß mitverschickt. Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden elektronisch zugesendet und mit dem ApE Programm analysiert.

### **Generierung von Plasmiden**

Bei der Klonierung wird ein gewünschtes DNA-Fragment in einen Vektor eingeführt, der die massenhafte Vermehrung dieses DNA-Fragmentes ermöglicht. Für

alle in dieser vorliegenden Arbeit generierten Plasmide wurde die *Golden-Gate*-Klonierungsmethode angewendet. Hierbei wurden alle Restriktionsansätze mit kommerziell erhältliche Restriktionsendonukleasen von *New England Biolabs* (NEB) nach Herstellerangaben durchgeführt. Komplementäre Oligonukleotide (Oligo 1 und 2) wurden bei 98°C für 5 min inkubiert. Die Hybridisierung dieser Oligonukleotide erfolgte dann durch langsames Abkühlen der Oligonukleotidmischung für mindestens 20 min bei RT.

<b>Oligonukleotid-Gemisch:</b>		<b>Golden Gate Reaktionsgemisch:</b>	
Oligo 1 (100 µM)	5 µL	Vektor	150 ng
Oligo 2 (100 µM)	5 µL	Hybridisierte Oligos	6 µL
ddH <sub>2</sub> O	30 µL	10 × T4-Ligasepuffer	2 µL
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>40 µL</b>	T4-DNA-Ligase	1 µL
		BsmBI	1 µL
		Mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen	
		<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µL</b>

Die Golden Gate Methode stellt eine einstufige Klonierungsmethode dar, die sowohl die Restriktions- als auch Ligationsreaktion in einem Reaktionsbehälter kombiniert. Alle für diese Reaktion benötigten Bestandteile wurden in einem Reaktionsgefäß angesetzt (siehe Golden Gate Reaktionsgemisch) und nach folgendem PCR-Programm inkubiert:

Schritt 1	5 min	37°C	} 5 Zyklen
Schritt 2	10 min	16°C	
Schritt 3	15 min	37°C	
Schritt 4	5 min	80°C	
Schritt 5	∞	4°C	

Die bei dieser Methode eingesetzten Typ-II-S-Restriktionsenzymen, wie BsmBI, besitzen räumlich voneinander getrennte Erkennungs- und Schnittstellen. Sie generieren nicht-palindromische, vier Basenpaar lange Überhänge. Über sequenzspezifische Ligation können gewünschte DNA-Fragmente (hybridisierte Oligos) in definierter Reihenfolge und übergangslos, das heißt ohne zusätzliche Nukleotide, an den entstandenen kompatiblen Überhängen verknüpft werden. Nach der Ligation des gewünschten DNA-Fragmentes enthält das Ligationsprodukt keine

Typ IIS-Erkennungsstelle mehr, sodass die Restriktionsenzyme das entstandene Produkt nicht erneut schneiden können und somit Restriktionsverdau und Ligation simultan in einem Reaktionsgefäß vereinbar sind.

### **Transformation von DH5 $\alpha$ Bakterien**

Ein Aliquot chemisch kompetenter DH5 $\alpha$ - *Escherichia coli*-Bakterien wurde 20 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 10 ng Plasmid-DNA oder 20  $\mu$ L eines Ligationsansatzes zugegeben und durch vorsichtiges hoch und runter pipetieren kurz gemischt. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurde ein Hitzeschock für 1 min bei 42°C in einem Wasserbad durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde sofort für 5 min auf Eis gestellt und dann auf einer 10 cm LB-Agarplatte, die 100  $\mu$ g/L Ampicillin enthielt, ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht (~ 16 h) bei 37°C inkubiert, bis die Bakterienkolonien sichtbar waren.

### **Plasmidisolierung**

Für die Plasmid-DNA-Präparationen wurden zwei Größen angewendet. Methodisch besteht allerdings kein Unterschied. Im ersten Schritt stellt man ein Bakterienlysat her, in dem man die bakterielle Zellwand aufbricht. Im nächsten Schritt folgt die Reinigung, um sich der bakteriellen Proteine und Membranbestandteile sowie des bakteriellen Genoms zu entledigen. Die kleineren und freieren Plasmid-Moleküle bleiben im Überstand erhalten.

Für die Sequenzierung und Überprüfung der Plasmide auf ihre Richtigkeit wurde die Mini-Präparation angewendet. Aus einer Bakterien-Flüssigkultur wurden 1,5 mL in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei 15000 rpm und RT für 5 min statt. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 100  $\mu$ L P1-Puffer resuspendiert. Dann wurden 200  $\mu$ L P2-Puffer zugegeben und durch Schwenken des Reaktionsgefäßes gemischt. Nach Zugabe von 150  $\mu$ L P3-Puffer und Mischen wurden das Reaktionsgefäß zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Fällen der DNA wurden 1 mL Ethanol (100%) hinzugegeben, gründlich durchmischt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. In einem folgendem Waschschrift wurden dem DNA-Pellet 150 $\mu$ L Etha-

nol (70%) zugegeben. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet kurz getrocknet (ca. 5 min) und in ca. 50 µL ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

P1 Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM EDTA 100 µg/mL RNase A
P2 Puffer	200 mM NaOH 1% SDS
P3 Puffer	3 M Kaliumacetat pH 5,5

Die Herstellung von Plasmiden in größeren Maßstäben bspw. für die Virusherstellung erfolgte dagegen mithilfe des "NucleoBond PC 500"-Kit von Macherey-Nagel nach dem Midi-Präparationsprotokoll des Herstellers. 200 mL einer Übernachtskultur wurden in 50 mL Falcon-Gefäße überführt, zentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4 ° C) und in 8 ml PES-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurde 8 mL LYS-Puffer zugegeben und durch Invertieren gemischt. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 8 mL NEU-Puffer hinzugefügt. Die Filtersäulen aus dem Kit wurden mit 5 mL EQU-Puffer benetzt. Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig in die Filtersäule gegossen. Nach dem Waschen mit 8 mL WASH-Puffer wurde die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gegeben und DNA mit 5 mL ELU-Puffer aus der Säule eluiert. Anschließend wurden 3,5 mL Isopropanol zugegeben und das Gemisch wurde zentrifugiert (5000 rpm, 30 min, 4 ° C). Nach dem Verwerfen des Überstands wurde das DNA-Pellet mit 2 mL Ethanol (70%) gewaschen und zentrifugiert (15000 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet kurz getrocknet. Die DNA wurde in 50 – 250 µL ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

Die DNA-Konzentration wurde mithilfe des NanoDrop-Spektrometers bestimmt. Alle aus der Midi-Präparation gewonnenen Plasmide wurden auf eine finale Konzentration von 1 µg/µL verdünnt.

### **Analytischer Restriktionsverdau**

Für den analytischen Restriktionsverdau wurden 0,2 –1 µg DNA eingesetzt und das Restriktionsenzym HindIII von *New England Biolabs* (NEB) verwendet. Aus der Enzymaktivitätsliste des Herstellers wurde der passenden Puffer ausgewählt.

Alle Komponenten des HindIII-Verdau wurden dem Reaktionsansatz hinzugegeben und anschließend für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt, auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch analysiert.

Komponenten des HindIII-Verdau:

DNA	0,2 – 1 µg
NEB Puffer 2	2 µL
HindIII	1 µL
Mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen	
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µL</b>

### 3.3.2 Produktion von rLV

Die Virusproduktion erfolgte durch Transfektion von Hek293T-Zellen mit den Helferplasmiden (psPax2: Gag-Pol; pMD2.G: VSV.G Env) zusammen mit einem Transferplasmid. Hierbei wurde für die Transfektion Polyethylenimin (PEI) eingesetzt. Sowohl die beiden Helfervektoren als auch das Transferplasmid enthielten jeweils einen SV40-Replikationsursprung. Aufgrund der stabilen Expression des *large T*-Antigen (LT) durch die HEK293T-Zelllinie, wurden die eingebrachten Plasmide repliziert, was in der Erhöhung der produzierten viralen Partikelanzahl resultierte. Der Transfervektor enthielt das Verpackungssignal ( $\psi$ ), sodass die von diesem Plasmid generierte RNA als einziges in die viralen Partikel verpackt werden kann. Die Helferplasmide dagegen enthielten lediglich Strukturgene und wurden für die Virusproduktion bereitgestellt, jedoch nicht in die viralen Partikel verpackt. Das Strukturgen gag codiert für Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine, pol codiert die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase während env für das virale VSV-G Hüllprotein codiert. Das synthetische Polymer PEI ermöglichte die Aufnahme und Verpackung von negativ geladener DNA (Transfervektor) in positiv geladene Partikel.

Ein Tag vor der Transfektion wurden  $11 \times 10^6$  HEK293T-Zellen in 19 mL Kulturmedium in einer 15 cm Schale ausgesät. Am Tag der Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von etwa 70 – 80% haben. Der Zellüberstand (ZÜ) wurde gegen 14 mL frisches Kulturmedium ausgetauscht. Für die Transfektion wurde die Plasmidmischung (Lösung A) zunächst getrennt von der PEI-Mischung (Lösung B) unter Verwendung von DMEM ohne Zusätze angesetzt:

<b>Lösung A</b>		<b>Lösung B</b>	
DMEM	1900 µL	DMEM	1760 µL
Transfervektor	11,3 µg	PEI (1 µg/µL)	140 µL
psPAX2	10,5 µg		
pMD2.G	5,8 µg		

Beide Lösungen wurden bei RT für 5 min inkubiert. Anschließend wurde Lösung B zu Lösung A gegeben, gut gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung vorsichtig tropfenweise auf die HEK293T-Zellen pipettiert, die Schale mehrmals vorsichtig geschwenkt und anschließend bei 37°C gelagert. Am nächsten Tag fand ein erneuter Mediumwechsel statt, wobei 14 mL des Kulturmediums von HHSEC\_LT ohne Doxycyclin zugegeben wurden. Nach 48 h wurde der virushaltige ZÜ vorsichtig abgenommen, mit einem 0,45 µm Filter sterilfiltriert, anschließend in 2,0 mL Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert wurden.

### **3.3 Zellbiologische & virologische Methoden**

#### **3.3.1 Arbeiten mit humanen Zelllinien**

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Züchtung und Haltung der Zelllinien erfolgte im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit.

#### **Konservierung und Auftauen von Zellen**

Für die Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden die Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gründlich gewaschen und anschließend bei 1200 rpm und RT für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Gefäße wurden zunächst für mindestens 48 h bei -80°C in vorgekühlten Einfrierboxen gelagert und anschließend in die Stickstoff-Kryobank überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurde der Inhalt der Kryoröhrchen mit dem vorgewärmten Kulturmedium der jeweiligen Zelllinie gespült und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Zentrifugieren (1200 rpm, RT, 5 min), wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen und dann in frisches Medium resuspendiert und eine geeignete Zellschale gegeben.

Einfriermedium	90% FCS 10% DMSO
----------------	---------------------

### Kultivierung von humanen Zelllinien

Adhärente Zelllinien wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) von Gibco kultiviert. Für HEK293T wurde DMEM mit 10% inaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) und 100 U/mL Penicillin/Streptomycin (P/S) supplementiert. Die immortalisierte HHSEC\_LT-Zelllinie ebenso wie alle transduzierten HHSEC-F8-Mutations-Zelllinien wurden in DMEM supplementiert mit 20% FCS, 100 U/mL P/S sowie 1 µg/mL Doxycyclin gezüchtet.

Für das Passagieren der adhärenter Zelllinien wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mithilfe einer Trypsinlösung (1:10 verdünntes Trypsin) abgelöst. Hierbei wurden die mit der Trypsinlösung benetzten Zellen kurz bei 37°C inkubiert, bis sie sich von der Oberfläche der Zellkulturschale lösten (~ 1 min). Die Zugabe von Kulturmedium mit FCS inaktivierte die enzymatische Aktivität von Trypsin. Alle Zellen wurden in Abhängigkeit ihrer Verdopplungszeit und Konfluenz zwei- bis dreimal pro Woche in einem Verhältnis zwischen 1: 3 bis 1: 10 auf neue Kulturschale aufgeteilt.

### Zellzählung und Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Zellen wurden geerntet und eine kleine Probe (20 µl Zellsuspension) wurde mit einem gleichen Volumen (1:1) Trypanblau-Lösung gemischt. Da der negativ geladene Farbstoff Trypanblau keine intakte Zellmembran passieren kann, färbt er selektiv nur tote Zellen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zell-Trypanblau-Mischung auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen und lediglich lebende Zellen wurden durch ein Mikroskop gezählt. Die Gesamtzahl lebensfähiger Zellen wurden nachfolgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/mL} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadrate}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4$$

### 3.3.3 Immortalisierung & Charakterisierung der HHSEC-Linie

#### Immortalisierung mit dem *large T*-Antigen (LT)

Die Transgenexpression des *Large T*-Antigens (LT) vom Simian-Virus 40 (SV40) ist eines der am häufigsten angewendeten Methoden zur Herstellung unbegrenzt

kultivierbarer Zelllinien. LT bindet an die Tumorsuppressor-Proteine pRB und p53 und bewirkt dadurch die Transformation von ruhenden in entarteten Zellen<sup>102</sup>.

Um die Transgenexpression in den genetisch manipulierten Zellen kontrollieren zu können, wurden Transgen-Regulationssysteme, wie das am besten charakterisierte Tetracyclin-induzierbare Expressionssystem (Tet-System), entwickelt. Das Tet-System besteht i. d. R. aus zwei Komponenten: Das für den *tetracycline-responsive transcriptional activator* (tTA) kodierte Gen steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und wird daher konstitutiv exprimiert. Die zweite Komponente enthält die zu exprimierende cDNA, die unter der Kontrolle des *tet responsive element* (TRE) steht. Beide Komponenten werden mittels Gentransfer stabil in eine Zelllinie transfiziert. In der Abwesenheit von Tetracyclin bindet tTA an TRE und aktiviert die Transkription des dahinterliegenden Transgens. Gibt man dagegen Tetracyclin hinzu, entsteht ein Tetracyclin-tTA-Komplex, der nicht mehr an TRE bindet, und die Transgenexpression sinkt (*Tet-Off-System*).

Das hier in dieser Arbeit angewandte *Tet-On-System* basiert auf einer mutierten Version von tTA, welches nur in Anwesenheit von Doxycyclin (Dox), einem Tetracyclinderivat, an das TRE bindet und damit die Transkription des Transgens, in diesem Fall des Onkogens LT aktiviert. Somit kann die Anwesenheit von Dox im Kultiviermedium die stabile Expression von LT und damit die unbegrenzte Zellteilung der primären HHESC ermöglichen.

Entsprechend dem Protokoll von Zalvide, Stubdal und DeCaprio (1998) wurden die kommerziell erhaltenen HHSEC von ScienCell (Artikelnummer: SC1001) mit dem Dox-induzierbaren pRRL-ppT-SV40-LT (Quelle: Özlem Demirel) stabil mittels rLV transduziert. Dabei wurden in jeder Vertiefung einer 6-Well-Platte jeweils 50.000 Zellen in 2 ml *Endothelial Cell Medium* (ECM) ausgesät. Am nächsten Tag wurde der ZÜ durch jeweils 1 ml frisches ECM supplementiert mit Polybren mit einer finalen Konzentration von 8 µg/mL pro Well ersetzt. Von zuvor transfizierten Hek293T-Zellen wurde 1 mL rLV-ZÜ, der pRRL-ppT-SV40-LT enthielt, in jedes Well zugegeben und sorgfältig gemischt. Die Zellen wurden für 48 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde der ZÜ verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches ECM supplementiert mit 1 µg/mL Dox zugegeben. Die immortalisierten HHSEC\_LT wurden anschließend schrittweise an ihr neues Kulturmedium (DMEM, 20% FCS, 1% P/S) adaptiert. Hierbei wurde bei jedem Passagieren der Zellen der Anteil an neuem Kulturmedium wie folgt erhöht:

Passage	ECM	DMEM, 20% FCS, 1% P/S	Doxycyclin
P1	$\frac{3}{4}$	$\frac{1}{4}$	+ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
P2	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	+ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
P3	$\frac{1}{4}$	$\frac{3}{4}$	+ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
P4	-	1	+ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

### Überprüfung der Immortalisierung

Bei der Adaption der HHSEC\_LT an ihr neues Kulturmedium nach der Transduktion, wurden die Zellen für ca. 3 Wochen in Kultur gehalten. Durch das Kultivieren in dieser Zeit wurden alle nicht-transduzierte HHSEC-Wildtypzellen, aufgrund ihrer fehlenden Eigenschaft zum unbegrenzten Zellwachstum, eliminiert. Anschließend erfolgte die Überprüfung der LT-Expression. Hierfür wurden in einer 6-Well-Platte 200.000 HHSEC\_LT in jede Vertiefung ausgelegt. Jeweils 3 Vertiefungen wurden in Kulturmedium supplementiert mit 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Doxycyclin für 4 Tage oder in Kulturmedium ohne Doxycyclin für 2, 4 oder 7 Tage gehalten. Anschließend wurden Zelllysate aus den jeweiligen gleichbehandelten Wells hergestellt. Mittels Western Blot wurde das LT detektiert und analysiert.

### Kumulatives Wachstumsassay

Um das Wachstumsverhalten von immortalisierten HHSEC\_LT in Anwesenheit und Abwesenheit von Doxycyclin zu analysieren, wurde ein kumulatives Wachstumsassay durchgeführt. Hierbei wurden in einer 6-Well-Platte in jede Vertiefung jeweils 50.000 HHSEC\_LT in 2 mL HHSEC-Kulturmedium ausgesät. Zur Erstellung von Replikaten wurden die Zellen in drei Vertiefungen in 2 mL Medium supplementiert mit 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Doxycyclin und in den restlichen drei Vertiefungen ohne Doxycyclin durchgehend kultiviert. An Tag 3, 7, 10, 13 und 17 wurden die Zellen gezählt. Hierbei wurden die Zellen stets gleichbehandelt. Sie wurden mit 2 mL PBS gewaschen. Zum Suspendieren der Zellen wurden 500  $\mu\text{L}$  1x-Trypsinlösung hinzugefügt und für 2 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 500  $\mu\text{L}$  Kulturmedium ergänzt und die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Von den gezählten Zellen wurden jeweils 50.000 wieder in 2 mL Kulturmedium in eine neue Platte ausgesät und bis zum nächsten geplanten Zähltag bei 37°C inkubiert. Durch Ermittlung eines Wachstumsfaktors konnten die Gesamtzahlen für jede Vertiefung über die Zeit hochgerechnet werden.

## **Geschlechtsdetermination der HHSEC**

Für die Geschlechtsdetermination der kommerziell erhaltenen HHSEC wurden entsprechend den aufgeführten Protokollen (siehe 3.2.2 und 3.2.3) die genomische DNA isoliert, mittels PCR amplifiziert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die hierbei verwendeten Oligonukleotide (DS-B-9, DS-B-10, DS-B-11, DS-B-12) dienten dem Nachweis zum einen des SRY-Gens, das auf dem Y-Chromosom lokalisiert ist, und zum anderen des ARAF-Gens, das wiederum auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Als Negativkontrolle wurde Wasser ohne genomische DNA verwendet. Als Positivkontrolle stellte mir mein Gastlabor eine MOLM-13-Zelllinie (einer von akuter myeloischer Leukämie abgeleiteten Zelllinie) zur Verfügung, bei welcher aus der Literatur bekannt ist, dass es sich hierbei um eine männliche Linie mit dem Karyotyp XY handelte.

### **3.3.4 Generierung von *F8*-Mutations-Zelllinien**

#### **Todenskurve mit Puromycin**

Erfolgreich mit den SaCas-CRISPR-Expressionsvektoren transduzierte Zellen sollten mit Puromycin selektiert werden. Die geeignete Puromycinkonzentration für HHSEC\_LT wurde mit einer Todeskurve bestimmt. Hierfür wurden in einer 12-Well-Platte  $25 \times 10^3$  Zellen in jeweils sieben Vertiefungen der Platte ausgesät und mit steigenden Konzentrationen von Puromycin behandelt: 0,25 µg/mL – 0,5 µg/mL – 1 µg/mL – 2 µg/mL – 3 µg/mL – 4 µg/mL.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde 24 h sowie 48 h nach der Antibiotikabehandlung mit einem Mikroskop optisch überwacht. Die geeignetste Puromycin-Selektionsbedingung wurde als die niedrigste Konzentration bestimmt, bei welcher alle Zellen nach zwei Tagen Inkubation gestorben waren. Für HHSEC betrug diese ermittelte Konzentration 0,5 µg/mL Puromycin.

#### **Transduktion und Selektion von HHSEC-LT**

Für die Generierung von stabil transduzierten *F8*-Mutations-Zelllinien, wurde ein CRISPR-Cas9-basierter Ansatz verwendet. Daher wurden CRISPR-Vektoren, die eine, gegen eine spezifische *F8*-Sequenz gerichtete, sgRNA und eine Puromycin-Resistenz-Kassette trugen, mittels rLV in die Zellen gebracht. Ein Tag vor der Transduktion wurden 50.000 adhärenente HHSEC\_LT in jeweils jeder Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät. Für die Transduktion wurde das HHSEC-Kul-

turmedium frisch gewechselt und 2 µg/mL Doxycyclin hinzugefügt. Der virushaltige ZÜ wurde kurz vor der Transduktion noch am selben Tag geerntet und sterilfiltriert (0,45µm Filter). 8 µg/mL Polybren wurde zum virushaltigen ZÜ zugegeben, gut gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde dieser zu den Zellen mit Kulturmedium in einem Verhältnis von 1: 1 hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 37°C wurden die Zellen in zwei Waschschrritten mit jeweils 1 mL PBS gründlich gewaschen und daraufhin der Selektionsprozess für erfolgreich transduzierte Zellen mit der Zugabe von 0,5 µg/mL Puromycin begonnen. Während der Selektion wurde das Medium supplementiert mit Doxycyclin und Puromycin jeden Tag gewechselt. Nach 5 Tagen wurde die Puromycin-Selektion eingestellt und die Zelllinien für die weiteren Analysen expandiert.

### Bestimmung der Transduktionseffizienz

In einer 12-Well-Platte wurden jeweils  $3,3 \times 10^4$  Zellen in zehn Vertiefungen (Well 1 – 5, Well A – E) ausgesät. Nach dem Absetzen der adhärennten Zellen wurde das Zellmedium abgenommen, die Zellen mit 1 mL PBS gründlich gewaschen und anschließend mit verschiedenen Verdünnungen des rLV-ZÜ *F8\_NTC* nachfolgendem Schema für 72 h inkubiert:

	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5
<b>Frisches Zellmedium</b>	1000µL	500µL	750µL	875µL	937,5µL
<b>rLV-Zellüberstand</b>	/	500µL	250µL	125µL	62,5µL
<b>Puromycin</b>	/	/	/	/	/
	Well A	Well B	Well C	Well D	Well E
<b>Frisches Zellmedium</b>	1000µL	500µL	750µL	875µL	937,5µL
<b>rLV-Zellüberstand</b>	/	500µL	250µL	125µL	62,5µL
<b>Puromycin</b>	0,5 µg/mL				

Nach der Inkubationszeit wurden lediglich die Wells A – E mit jeweils 0,5 µg/mL Puromycin für 24 h selektiert und anschließend wurde die Gesamtzahl jeder einzelnen Vertiefung bestimmt. Die Transduktionseffizienz wurde für jede Verdünnungsstufe separat bestimmt, indem von der Gesamtzahl der mit Puromycin selektierten Verdünnungsstufe die Gesamtzahl der mit Puromycin selektierten negativ Kontrolle (Well A) subtrahiert wurde. Die Differenz wurde durch die Gesamtzahl derselben Verdünnungsstufe ohne Puromycin dividiert.

Beispiel Transduktionseffizienz (TE) für die 1:1-Verdünnungsstufe:

$$TE(1:1) = \frac{\text{Gesamtzahl (Well B)} - \text{Gesamtzahl (Well A)}}{\text{Gesamtzahl (Well 2)}}$$

### **MTT-Assay**

Das MTT-Assay ist ein Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen. Die metabolische Aktivität korreliert stark mit der Anzahl lebender (vitaler) Zellen in einer Zellpopulation (Zellviabilität), daher wird in der Forschung das MTT-Assay häufig genutzt, um die Zellviabilität zu evaluieren. Dabei werden die Zellen *in vitro* mit dem Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) behandelt, welcher in die Zellen hineindringt. Der Nachweis der Zellvitalität beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen MTTs durch die Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH in vitalen Zellen in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Die Menge des umgesetzten Farbstoffes kann mittels Absorptionsmessung quantifiziert werden.

Ermittelt man mittels MTT-Assay die metabolische Aktivität der jeweils ursprünglich gleichen Ausgangszellanzahl nach unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten, so kann man abhängig von der metabolischen Aktivität und der damit korrelierenden Anzahl lebender Zellen auf das Wachstumsverhalten dieser Population schließen. Daher wurde zur Beurteilung des Wachstumsverhalten der stabil transduzierten Zelllinien KO\_F8\_2 und KO\_F8\_3 ein MTT-Assay durchgeführt. Die Wildtypzellen HHSEC\_LT und die zwei F8-Mutations-Zelllinien KO\_F8\_2 und KO\_F8\_3 wurden jeweils in 4 verschiedene 96-Well-Platten ausgesät. Zur Erstellung von Replikaten wurden von jeder Zelllinie 800 Zellen / 100 µL Kulturmedium in jeweils 6 Vertiefungen jeder 96-Well-platte pipettiert. Zudem wurde für die Bestimmung eines Leerwertes in jeder Platte in 6 Vertiefungen reines Kulturmedium gegeben. Der MTT-Test wurde für jede Platte separat nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 37°C (0, 2, 4 oder 6 Tagen) durchgeführt. Hierfür wurden in jeder Vertiefung der 96-Well-Platte jeweils 10 µL der MTT-Salzlösung hinzugegeben. Die Platte wurde bei 37°C im dunklen Zellinkubator für genau 4 h inkubiert und dann wurden 100 µL MTT-Stopplösung in jede Vertiefung zugegeben. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C in den Inkubator gestellt und am nächsten Tag mithilfe eines Plattenlesegerätes (Infinite M200PRO – Tecan) für 30 s geschüttelt und anschließend bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen.

Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
Platte 1 + MTT (4h)	Platte 1 messen	Platte 2 + MTT (4h)	Platte 2 messen	Platte 3 + MTT (4h)	Platte 3 messen	Platte 4 + MTT (4h)	Platte 4 messen

MTT-Salzlösung	5 mg/mL MTT in PBS
MTT-Stopplösung	10% SDS 0,01 M HCl in H <sub>2</sub> O

### 3.4 FVIII-Detekionsmethoden

#### 3.4.1 Western Blot (WB)

Western Blot ist eine Technik zum Nachweis spezifischer Proteine aus einem komplexen Gemisch von Proteinen, die aus Zellen extrahiert werden. Die Technik basiert auf vier Elementen: Trennung von Protein nach Größe, Proteintransfer auf eine Membran, Bindung von spezifischen Antikörpern an das Zielprotein und Detektion der spezifischen Signale.

#### Zellyse zum Extrahieren von Protein

Für die Herstellung der Zellysate für die SDS-Gelelektrophorese wurde die gesamten Zellen einer konfluenten 10 cm Schale verwendet. Die adhärennten Zellen wurden mit 10 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µL SDS-Lysepuffer hinzugegeben. Die Zellen wurden mit einem Schaber mechanisch abgetragen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Der Lysatansatz wurde zweimal für jeweils 30 s sonifiziert (5 × 45% Leistung), kurz auf Eis gekühlt und anschließend bei 4°C und 15000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Mithilfe des Lowry-Tests wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Die Proben wurden auf die gleichen Konzentrationen verdünnt, mit reduzierendem Ladepuffer (Roti-Load 1, 4x konz.) versetzt und 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließen wurden die Lysatproben bei -20°C gelagert.

SDS-Zellyse Puffer	100 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl 10 mM EDTA pH 8 10% SDS
--------------------	---

### **Zellüberstandpräparation zum Nachweis von FVIII**

In einer 6-Well-Platte wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well in 1 mL HHSEC-Kulturmedium oder 1 mL Optimem mit 1% P/S ausgelegt. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C inkubiert, sodass sie FVIII produzieren und in das Medium sezernieren können. Nach der Inkubationszeit wurde der ZÜ abgenommen, zweimal für jeweils 30 s sonifiziert (5 x 45% Leistung), kurz auf Eis gekühlt und anschließend bei 4°C und 15000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Lowry-Proteinkonzentrationsbestimmung wurde der ZÜ mit Roti-Load (4x) versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert.

Für die FVIII-Detektion aus dem ZÜ wurde versucht, das Protein im unkonzentriertem ZÜ (DMEM mit Zusätzen oder Optimem mit 1% P/S) sowie im 20-fach konzentriertem ZÜ zu detektieren. Hierfür wurde das HHSEC-Kulturmedium in einer Zentrifugalsäule Vivaspin 2 (100.000 MWCO) bei 4°C und 4000 rpm für 10 min aufkonzentriert.

### **Lowry-Proteinkonzentrationsbestimmung**

Unter Verwendung des Lowry-Proteinassays wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Hierbei wurden 2 µL der Probe mit 200 µL Lowry-Lösung A und 798 µL Lowry-Lösung B in eine Küvette gefüllt, mittels Vortexer gemischt und bei einer Extinktion von 595 nm gemessen. Zur Kalibrierung des Photometers wurde zuvor ein Leerwert (200 µL Lowry-Lösung A + 800 µL Lowry-Lösung B) gemessen.

Der Lowry-Test beruht auf zwei Reaktionen. Im ersten Schritt kommt es zur Komplexbildung zwischen den Peptidbindungen und Cu(II)-Ionen in einer alkalischen Lösung, wobei Cu(II) durch die Peptidbindung zu Cu(I) reduziert wird. Dieses Cu(I) wiederum reduziert im zweiten Schritt das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz zu einem instabilen blauen Komplex (Molybdänblau), der als Maß der Proteinkonzentration dient.

## SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Transfer

Die Proteine wurden durch SDS-Page, bei dem die Proteine im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe unterschiedlich weit auf einem Polyacrylamid-Gel wandern, getrennt. Je nach Experiment wurden unterschiedliche Proteinmengen (20 – 150 µg) in die Polyacrylamidgeltaschen geladen. Zur Identifizierung der Proteingrößen wurde ein Proteinstandard-Marker stets mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 30 – 120 kDa erfolgte in selbst hergestellten 10% SDS-Gelen. Hierbei wurde ein 10%-iges Trenngel sowie ein 4%-iges Sammelgel in eine 1,0 mm Gelkassette gegossen.

	<b>4% Sammelgel</b>	<b>10% Trenngel</b>
Acrylamide 40%	687 µl	1500 µl
Bis-Tris Puffer	550 µl	1730 µl
ddH <sub>2</sub> O	2720 µl	2800 µl
APS 10%	40,3 µl	40 µl
TEMED	4 µl	11,2 µl

Dagegen wurden zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 120 – 300 kDa die kommerziell erhältlichen NuPAGE 3 – 8% Tris-Acetat-Gele (1,0 mm) verwendet. Als Laufpuffer für die 10% SDS-Gele wurde 1xMOPS-Puffer verwendet, wohingegen 1xTris-Acetat-Puffer für das NuPAGE 3 – 8% Tris-Acetat-Gel zum Einsatz kam. Die Proteine-Auftrennung erfolgte zunächst bei einer Spannung von 80 V. Sobald die Proteine das Trenngel erreichten (~ 20 min), wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Die Laufzeit betrug dann ca. 1 h.

Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Elektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Membran und 2 Filterpapiere wurden auf Gelgröße geschnitten. Membran, Filterpapier und Schwämme wurden in vorgekühltem (4°C) Transferpuffer eingeweicht. Das Gel wurde aus der Elektrophorese-Apparatur entfernt. In die Blotkammer wurden auf die Kathode in folgender Reihenfolge: Schwamm – Filterpapier – Gel – Nitrocellulosemembran – Filterpapier – mehrere Schwämme platziert. Die Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgte in der Blotkammer (XCELL SureLock™) in 1x Transferpuffer bei 35 V und 500 mA. Für den Transfer großer Proteine wurde eine Zeit von 3,5 h eingestellt. Die Transferzeit von kleinen Proteinen betrug 2 h.

Bis-Tris Puffer	1,25 M Bis-Tris pH 6,5 mit HCl einstellen in H <sub>2</sub> O
Mops Puffer	50 mM MOPS 50 mM Tris 0,1% SDS 1 mM EDTA pH 7,7
Transferpuffer (WB)	25 mM Bicine 25 mM Bis-Tris 1 mM EDTA pH 7,2

### **Immunfärbung von geblotteten Proteinen und Detektion**

Um einen ersten Eindruck von der Transferqualität und der Gleichheit der Proteinbeladung zu erhalten, wurde eine unspezifische Proteinfärbung mit Ponceau-Rot durchgeführt. Der mitgeführte Proteinmarker wurde in diesem Schritt mit einem Kugelschreiber markiert. Die Entfärbung der Membran erfolgte durch einen Waschschrift mit 1x TBS-T. Die Membran wurde in 5% Magermilchpulver in TBS-T bei RT für 30 min inkubiert, sodass die freien Bindungsstellen auf der Membran mit Proteinen, die nicht von Antikörpern erkannt werden können, blockiert wurden. Anschließend wurde die Membran mit einem zielproteinspezifischen primären Antikörper bei 4°C über Nacht (~ 16 h) inkubiert. Der Primärantikörper binden an das gesuchte Protein. Nach dem Entfernen unspezifisch bindender Antikörper durch mehrere Waschschriffe mit TBS-T wird die Membran mit einem Sekundärantikörper für 2 h bei RT behandelt. Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und ist an eine Peroxidase gekoppelt, welches eine Farbreaktion katalysiert. Nach erneutem Waschen mit TBS-T wurde das ECL-Substrat (SuperSignal® Lösungen von Thermo Scientific) für Meerrettich-Peroxidase gemäß Herstellerangaben auf die Membran pipettiert. Das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol wird von der an dem Sekundärantikörper gekoppelten Peroxidase oxidiert. Die dabei resultierende Lumineszenz wurde mithilfe des Geldokumentationssystems Odyssey FC detektiert.

Blockierpuffer (WB)	5% Magermilchpulver in 1X TBS-T
TBS-T	100 mM Tris-HCl pH 7.4 150 mM NaCl 0.05% Tween-20

### 3.4.2 ELISA

Für die FVIII-Detektion im HHSEC-ZÜ mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) wurde das FVIII-ELISA-Antikörper-Set von Affinity Biologicals™ kommerziell erworben und nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurden zunächst der polyklonalen affinitätsgereinigten Antikörpers gegen FVIII (*Capture*-Antikörper) in einem Verhältnis von 1:100 in Karbonatpuffer verdünnt. 100 µL hiervon wurden in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte aufgetragen und für 2 h bei 22°C inkubiert. Die Platte wurde gewaschen und 100 µL flüssige Probe oder Plasma, die FVIII enthielten, wurden aufgetragen. Es wurden stets Duplikate jeder einzelnen Probe pipettiert und gemessen. Der *Capture*-Antikörper bindet das FVIII-Protein in der Probe ein. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 22°C wurde die Platte gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. Ein Peroxidase-konjugierter zweiter Antikörper (100 µl) gegen FVIII wurde in jede Vertiefung gegeben und der Ansatz für 1 h bei 22°C inkubiert. In dieser Zeit sollte der zweite Antikörper den bereits gebundenen FVIII ebenfalls binden. Durch die folgenden Waschschrte wurden die ungebundenen konjugierten Antikörper entfernt. Die Zugabe von 100 µL einer OPD-Substratlösung bei RT ermöglichte die Katalyse einer Farbreaktion durch die Peroxidase. Nach 15 min wurde die Farbentwicklung durch Zugabe von 50 µL 2,5 M Schwefelsäure beendet und die erzeugte Farbe bei einer Wellenlänge von 490 nm am Plattenlesegerätes (Infinite M200 PRO – Tecan) quantifiziert. Die erzeugte Farbe ist proportional zur Konzentration von FVIII in der Probe.

Karbonatpuffer (50mM)	Kapselinhalt von Carbonat-Bicarbonat-Puffer in 100 mL H <sub>2</sub> O pH 9,6
OPD-Substrat-Lösung	5 mg Tablette OPD 12 mL Substrat-Puffer

	12 µL 30%-iges Wasserstoffperoxid
Substratpuffer	1 Tablette Phosphat-Citrat-Puffer in 100 mL H <sub>2</sub> O pH 5,0
Wasch-Puffer	0,1% Tween-20 in PBS (v/v)

### **Erstellung einer Standardkurve mit rekombinantem FVIII-Konzentrat**

Kovaltry® von Bayer Vital GmbH ist ein rekombinant hergestelltes FVIII-Präparat zur Behandlung und Vorbeugung von Blutungen bei der HA. Es enthält den Wirkstoff Octocog alfa, der mit dem humanen FVIII nahezu identisch ist. Dieses Arzneimittel ist als Pulver zur Herstellung einer Injektionslösung erhältlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen (IE/mL) von Kovaltry® angesetzt, welche mittels ELISA analysiert wurden. Ziel war die Erstellung einer Standardkurve, um die gemessene Absorption einer FVIII-enhaltenen Probe einer bestimmten FVIII-Konzentration zuordnen zu können. Auf diese Weise kann die Menge des von HHSEC produzierten FVIIIs ermittelt werden. Hierfür wurde das Kovaltry®-Pulver in seinem Lösungsmittel zu einer finalen Konzentration von 400 IE/mL gelöst. 4,5 µL (= 1,8 IE) dieser Lösung wurden in 1245,5 µL Optimem mit 1% P/S zu einer finalen Konzentration von 1,44 IE/mL resuspendiert. 250 µL (= 0,36 IE) hiervon wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit dem grünen ELISA-Verdünnungsmittel gemischt und seriell herunterverdünnt:

- Probe 1: 0,18 IE / 250 µL
- Probe 2: 0,09 IE / 250 µL
- Probe 3: 0,045 IE / 250 µL
- Probe 4: 0,0225 IE / 250 µL
- Probe 5: 0,01125 IE / 250 µL
- Probe 6: 0,005625 IE / 250 µL
- Probe 7: 0,0028125 IE / 250 µL
- Probe 8: 0 IE / 250 µL (Leerwert)

Für den Leerwert wurde Optimem mit 1% P/S ohne Kovaltry® mit der gleichen Menge des grünen ELISA-Verdünnungsmittel vermischt. Von jeder Probe wurden 100 µL nach dem ELISA-Protokoll gemessen.

## HHSEC-Zellüberstand-Präparation

In einer 6-Well-Platte wurden pro Well  $1 \cdot 10^6$  Zellen in Kulturmedium mit 1 µg/mL Doxycyclin ausgelegt. Am nächsten Tag wurde das Medium durch jeweils 1 mL Optimem mit 1% P/S pro Well ersetzt. Die Zellen wurden hierin für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der ZÜ vorsichtig abgenommen und unterschiedlich behandelt. Es wurde stets auf Eis gearbeitet.

- Probe 0: 200 µL Optimem mit 1% P/S, ohne jeglichen Zellkontakt, wurden mit 200 µL des grünen ELISA-Verdünnungsmittel verdünnt und zur Bestimmung eines Leerwertes gemessen.
- Probe 1: 200 µL des HHSEC\_LT-ZÜ wurden mit 200 µL des grünen ELISA-Verdünnungsmittel gemischt und gemessen.
- Probe 2: 200 µL des HHSEC\_LT-ZÜ wurden kurz zentrifugiert (15.000 rpm, RT, 2 min) und anschließend mit 200 µL des grünen ELISA-Verdünnungsmittel gemischt und gemessen.
- Probe 3: 2 mL des HHSEC\_LT-ZÜ wurde in einer Zentrifugalsäule Vivaspin 2 (10.000 MWCO) bei 4°C und 4000 rpm für 10 min aufkonzentriert. Das Konzentrat (~500 µL) wurde mit dem gleichen Volumen an grünem ELISA-Verdünnungsmittel gemischt und gemessen
- Probe 4: 2 mL des HHSEC\_LT-ZÜ wurde in einer Zentrifugalsäule Vivaspin 2 (100.000 MWCO) bei 4°C und 4000 rpm für 10 min aufkonzentriert. Das Konzentrat (~200 µL) wurde mit dem gleichen Volumen an grünem ELISA-Verdünnungsmittel gemischt und gemessen.
- Probe 5: 3 mL des HHSEC\_LT-ZÜ wurden mit einer Kanüle in ein Blutabnahmeröhrchen (Citratröhrchen), welches Trinatriumcitratlösung enthält, aufgezogen, um eine Koagulation zu verhindern. Dem ZÜ im Citratröhrchen wurde im Verhältnis von 1:10 FVIII-Mangelplasma beigemischt. Somit wurden Blutähnliche Konditionen hergestellt. 200 µL dieser Mischung wurden mit 200 µL grünem ELISA-Verdünnungsmittel gemischt und gemessen.
- Probe 6:  $10^5$  HHSEC\_LT wurden mittels Dounce-Verfahren homogenisiert. Dabei wurden die Zellen durch gleichmäßige Bewegungen eines Kolbens (ca. 100 Umdrehungen), der eng von einem stationären Gefäß ummantelt ist, durch die Scherkräfte zerstört, wobei deren Inhalt (Organelle, Proteine, DNA, mRNA oder andere Moleküle) freigelegt wurden (Homogenat).

## **Blutproben-Präparation**

Da das ELISA-Verfahren zur FVIII-Antigenbestimmung in Blutproben in der klinischen Diagnostik Anwendung findet, sollte in dieser Arbeit die Validierung des kommerziell erhaltenen FVIII-ELISA-Antikörper-Set von Affinity Biologicals™ mit Hilfe von Blutproben von 5 gesunden Probanden erfolgen. Das Blut wurde den Probanden in Citratröhrchen abgenommen und bei RT und 15000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Jede Serum-Probe wurde mit grünem ELISA-Verdünnungsmittel auf 1/8, 1/16 sowie 1/32 verdünnt und anschließend gemessen.

### **3.4.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Die Immunfluoreszenz- (IF-) Mikroskopie bietet die Möglichkeit Proteine im subzellulären Bereich zu detektieren und zu lokalisieren.

Für die IF-Färbung von Zellen müssen diese zunächst auf Deckgläsern fixiert werden. Bei der Fixierung wurde das Verfahren mit Paraformaldehyd (PFA) angewendet. Hierfür wurden in einer 12-Well-Platte mit einem Deckglas in jeder Vertiefung jeweils 50.000 Zellen in 1 mL Medium auf die Deckgläser ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C auf den Deckgläsern kultiviert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit PFA-Fixierungspuffer bei RT für 10 min inkubiert. Die nun PFA-fixierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend wurden diese unter Verwendung von 0,1% Digitonin (50 mg/mL in DMSO) und 1% Rinderserumalbumin (BSA) in PBS für 15 min bei RT permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen der später verwendeten Antikörper wurden bei diesem Schritt zusätzlich blockiert. Danach wurden die Zellen mit dem primären Antikörper verdünnt in PBS mit 1% BSA und 0,1% Digitonin für 1 h bei RT inkubiert. Primäantikörper gegen FVIII, VWF, Vinculin und  $\beta$ -Tubulin wurden verwendet. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit dem Cy3 und / oder Alexa Fluor 488-konjugierten sekundären Antikörper sowie DAPI (1:25) zur Färbung des Zellkerns für eine weitere h bei RT inkubiert. Zur Anfärbung des F-Aktin-Zytoskeletts wurden Zellen mit Phalloidin-Alexa-Fluor 555-Konjugat inkubiert. Die Deckgläser wurden einmal mit destilliertem Wasser gewaschen, dann mit ca. 20  $\mu$ L Decklösung zur Erhaltung der Fluoreszenz benetzt und auf Objektträger platziert, welche bei Dunkelheit und RT gelagert wurden. Die Proben wurden mit einem LSM 800 Mikroskop (Zeiss) analysiert.

PFA-Fixierungspuffer	80 mM PIPES pH 6,8 2 mM MgCl <sub>2</sub> 4% PFA 5 mM EGTA pH 8 In ddH <sub>2</sub> O
----------------------	---

### 3.4.4 aPTT-basierter FVIII-Aktivitätstest

#### Vorbereitungen für die FVIII-Aktivitätsmessung

In einer 6-Well-Platte wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen in Kulturmedium mit 1 µg/mL Doxycyclin ausgelegt. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen, die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und in jedes Well ein 1 mL Optimem mit 1% P/S hinzugeben, in welchem die Zellen für 24 h bei 37°C inkubiert, sodass sie genug FVIII produzieren und in das Medium sezernieren können. Nach der Inkubationszeit wurde der ZÜ vorsichtig abgenommen, auf Eis gestellt und im Gerinnungslabor der Universitätsklinik Frankfurt im vollautomatisiertem ACL TOP 700 von Instrumentation Laboratory gemessen. Die für dieses Gerät speziellen Materialien wie FVIII-Kalibrationsplasma, FVIII-Mangelplasma, Reinigungs- und Spüllösungen wurden freundlicherweise vom Gerinnungslabor bereitgestellt und sind daher in dieser Arbeit nicht aufgeführt. Eine kurze Beschreibung der Messmethode folgt.

#### Messmethode

Für die FVIII:C-Bestimmung wurde eine aPTT-basierte koagulometrische Methode gewählt. Hierbei wurde die Probe mit einem FVIII-Mangelplasma in einem Verhältnis von 1:10 gemischt. Das Mangelplasma enthielt alle Blutgerinnungsfaktoren bis auf den zu untersuchenden FVIII in ausreichenden Konzentrationen, sodass FVIII in der anschließenden Gerinnungsreaktion zur limitierenden Größe wurde. Die Zugabe eines aPTT-Reagenzes, welches Ca<sup>2+</sup>, Phospholipide und negativ geladene Oberflächenaktivatoren enthielt, aktivierte das Kontaktfaktorensystem zu einem spezifischen Zeitpunkt. Die Gerinnungszeit wurde ab diesem Zeitpunkt in Sekunden bestimmt. Eine Standardkurve wurde mit einem seriell verdünnten Standardnormalplasma ermittelt, dessen FVIII:C bekannt waren. Die ermittelten Gerinnungszeiten der Proben wurden anhand der Standardkurve in prozentuale Aktivitätswerte umgerechnet und uns übermittelt.

### **Verdünnungsreihe zur Bestimmung der FVIII-Aktivität von HHSEC\_LT**

Der im Gerinnungslabor der Universitätsklinik Frankfurt festgelegte biologische FVIII-Referenzbereich für Normalplasma beträgt 68 – 133 % Aktivität. Damit die FVIII-haltigen ZÜ von Wildtyp HHSEC\_LT Zellen eine in diesem Bereich liegende Aktivität aufweisen, wurde zunächst eine Verdünnungsreihe angefertigt, um die geeignete Inkubation einer bestimmten Zellzahl mit einem definierten Volumen an Kulturmedium zu ermitteln. Hierfür wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen mit 1,5 mL Optimem und 1% P/S für 24 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der ZÜ vorsichtig abgenommen und kurz zentrifugiert (1 min 1200 rpm, RT). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß transferiert. In einem Reaktionsgefäß wurden 500µL des unverdünnten ZÜ gegeben (Probe 1 = 100 % ZÜ). In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 500µL des ZÜ gegeben und in einem Verhältnis von 1:1 mit frischem Optimem, welches keinen Zellkontakt hatte, verdünnt (Probe 2 = 50% ZÜ). Aus Probe 2 wurden 500µL entnommen und wieder 1:1 mit frischem Optimem verdünnt (Probe 3 = 25% ZÜ). Diese seriellen 1:1-Verdünnungen wurden bis zu einer 3,125%-igen Verdünnung des ZÜ (Probe 6) fortgeführt. Die FVIII:C der Proben 1 – 6 wurden zusammen mit einer Leerwert bestehen aus reinem Optimem ohne Zellkontakt (Probe 7) im Gerinnungslabor gemessen.

### **3.5 Statistische Auswertung**

Der statistische Vergleich des Einflusses einer oder zwei unabhängiger Variablen mit verschiedenen Gruppen erfolgte mithilfe der GraphPad Prism6-Software unter Verwendung der einfachen oder zweifachen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferoni-*Post-hoc*-Test.

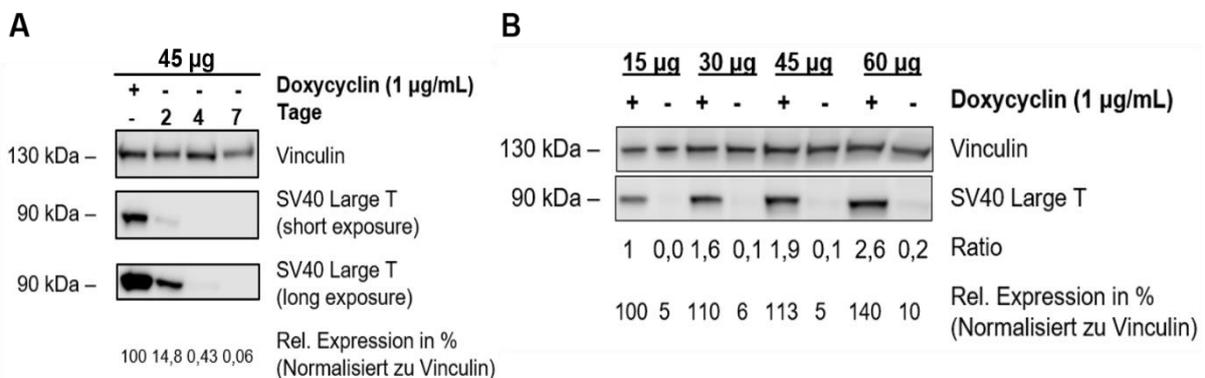
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Immortalisierung & Charakterisierung der HHSEC-Linie

#### 4.1.1 Immortalisierung mit *large T* (LT)

Für die Analyse der HHSEC über einen längeren Zeitraum im Rahmen dieses Projektes, ist es notwendig eine Zelllinie mit unbegrenztem Zellwachstum und unbegrenzter Zellteilung (Immortalisierung) herzustellen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Immortalisierung der kommerziell erhaltenen primären HHSEC von ScienCell (Artikelnummer: SC1001) durch Transfektion mit dem immortalisierenden, Doxycyclin-induzierbaren, lentiviralen Vektor pRRL-ppT-SV40 (*Large T-Onkogen*), welcher uns freundlicherweise von Özlem Demirel (Universitätsklinik Frankfurt, Hämatologie / Onkologie, AG Brandts) bereitgestellt wurde.

Um nachzuweisen, dass die Transduktion des Onkogens in die HHSEC-Wildtypzellen erfolgreich war, wurden die transduzierten HHSEC\_LT separat in Kulturmedium supplementiert mit 1 µg/mL Doxycyclin für 4 Tage oder in Kulturmedium ohne Doxycyclin für 2, 4 oder 7 Tage gezüchtet. Anschließend wurden Zellysate hergestellt und mittels Western Blot das LT-Antigen detektiert.



**Abb. 8: Funktionalität des *large T*-Onkogens in der immortalisierten HHSEC-Linie (HHSEC\_LT).**

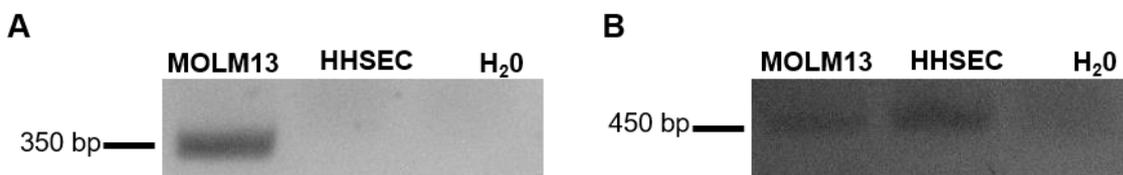
Lysate der mit dem Doxycyclin-induzierbaren pRRL-ppT-SV40-Vektor transduzierten HHSECs (HHSEC\_LT) wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach Gelelektrophorese und anschließendem Western Blotting erfolgte die Detektion der Proteine Vinculin und SV40 *Large T*. **(A)** Dargestellt sind HHSEC\_LT kultiviert mit Doxycyclin (1 µg/mL) und ohne Doxycyclin für 2, 4 und 7 Tage. Hier lässt sich in Abwesenheit von Doxycyclin eine deutliche Abnahme des SV40 *Large T*-Signals erkennen. **(B)** Dargestellt sind unterschiedliche Proteinkonzentrationen von HHSEC\_LT kultiviert mit Doxycyclin (1 µg/mL) und ohne Doxycyclin für 3 Tage. Zu erkennen ist, dass trotz erhöhter Proteinkonzentration nach 3 Tagen Kultivierung ohne Doxycyclin kein *Large T* exprimiert wird. Dagegen ist in Anwesenheit von Doxycyclin mit zunehmender Proteinkonzentration auch eine Zunahme des SV40 *Large T*-Signals zu sehen.

In Abb. 8 ist zu sehen, dass die transduzierten HHSEC\_LT in Anwesenheit von 1 µg/mL Doxycyclin das LT-Protein exprimieren. Weiterhin ist eine deutliche Abnahme von LT beim Weglassen von Doxycyclin für 2, 4 und 7 Tage erkennbar. Die relative LT-Expression (normalisiert zur Vinculin-Expression) zeigt, dass nach 2 Tagen noch 14.8% und bereits nach 4 Tagen nur noch 0,43% LT gebildet werden (Abb. 8A). Für Experimente, welche den ursprünglichen Zustand der HHSEC\_LT (Wildtyp) erfordern, empfiehlt es sich daher Doxycyclin für 3 Tage lang aus dem Kulturmedium wegzulassen. Abb. 8B zeigt, dass die Kultivierung von HHSEC\_LT ohne Doxycyclin für 3 Tage ausreichend ist, um kein bzw. nur minimale Konzentrationen von LT zu exprimieren, da trotz steigender Proteinkonzentrationen das LT-Signal nur sehr schwach ausgeprägt ist.

#### 4.1.2 Charakterisierung der immortalisierten HHSEC\_LT

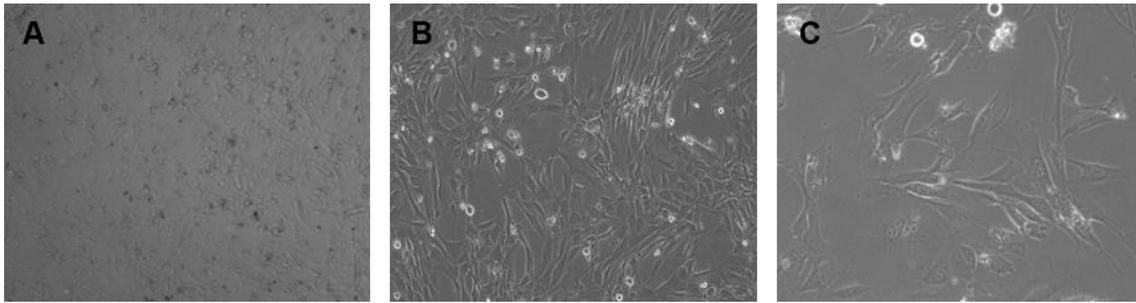
##### Geschlechtsdetermination und Zellmorphologie der HHSEC

Nach PCR-Amplifikation der genomischen DNA von HHSEC und MOLM-13 mit den Primern DS-B-9 und DS-B-10 zum Nachweis des SRY-Gens auf dem Y-Chromosom, zeigten lediglich die MOLM-13 Zellen eine deutliche Bande im erwarteten Bereich auf, während HHSEC ebenso wie die Negativkontrolle (Wasser ohne genomische DNA) keine Bande darstellten (siehe Abb. 9A). Dagegen konnte bei der Verwendung der Primer DS-B-11 und DS-B-12 zum Nachweis des ARAF-Gens auf dem X-Chromosom, eine Bande sowohl für HHSEC als auch für MOLM-13 dargestellt werden (siehe Abb. 9B). Demnach weisen die vorliegend verwendeten Zellen der MOLM-13-Zelllinie den männlichen Karyotyp XY auf, während die Zellen der HHSEC-Zelllinie den weiblichen Karyotyp XX aufweisen.



**Abb. 9: Geschlechtsdetermination der HHSEC.**

Die genomische DNA von HHSEC und MOLM-13 Zellen wurde isoliert, mittels PCR amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei kamen in **(A)** Oligonukleotide zum Nachweis des SRY-Gens auf dem Y-Chromosom und in **(B)** Oligonukleotide zum Nachweis des ARAF-Gens auf dem X-Chromosom zur Anwendung. Als Negativkontrolle diente Wasser ohne genomische DNA (H<sub>2</sub>O).



**Abb. 10: Mikroskopische Darstellung von HHSEC.**

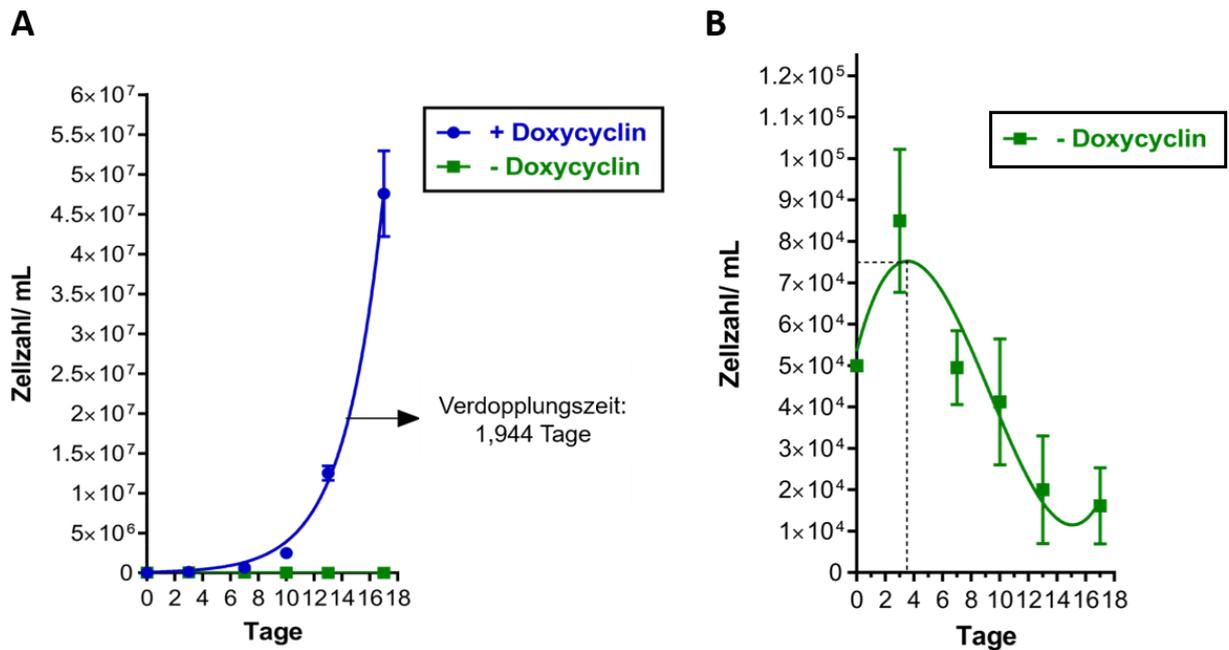
**(A)** 10-fache Vergrößerung. **(B)** 40-fache Vergrößerung. **(C)** 100-fache Vergrößerung

In Abb. 10 sind die Form und das Erscheinungsbild der HHSEC\_LT zu sehen. Es handelt sich um langausgestreckte, flache Zellen, welche über Ausläufer sich gegenseitig berühren und ein dichtes Netzwerk ausbilden.

### **Wachstumsverhalten**

Das Wachstumsverhalten der immortalisierten HHSEC\_LT wurde in An- und Abwesenheit von 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Doxycyclin über mehrere Tage mittels eines Kumulatives Wachstumsassays beobachtet und graphisch aufgetragen (siehe Abb. 11). Die immortalisierte HHSEC\_LT-Zelllinie zeigt in Anwesenheit von 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Doxycyclin (blaue Kurve) ein unbegrenztes exponentielles Wachstumsverhalten. Die Zeitspanne, in der sich die Zellzahl der HHSEC\_LT in Anwesenheit von Doxycyclin verdoppelt, beträgt 1,944 Tage. Die Betrachtung der HHSEC\_LT ohne Doxycyclin (Abb. 11B) zeigt, dass die Zellen hier zunächst bis ca. 3,5 Tage zwar langsam wachsen, aber innerhalb dieser 3,5 Tage ihre Verdopplung nicht erreichen. Anschließend fällt die Wachstumskurve rapide ab. (Abb. 11B). Zudem konnte ab Tag 3 ohne Doxycyclin mittels Mikroskopie optisch eine deutliche Verschlechterung der Zellmorphologie und Abnahme der Zelldichte bei der Kultivierung beobachtet werden.

Das kumulative Wachstumsassay bestätigt sowohl den Erfolg der Transduktion der primären HHSEC-Wildtypzellen mit dem Doxycyclin-induzierbaren lentiviralen Vektor pRRL-ppT-SV40 als auch ihre Umwandlung in eine immortalisierte Zelllinie. Weiterhin bestätigt es, dass die Kultivierung ohne Doxycyclin zur Imitierung des ursprünglichen mortalen Zellverhaltens 3 Tage nicht überschreiten sollte, andernfalls sind die Störfaktoren durch absterbende Zellen zu groß.



**Abb. 11: Kumulatives Wachstumsassay der immortalisierten HHSEC\_LT.**

Die primären HHSEC-Wildtypzellen wurden mit dem Doxycyclin-induzierbaren lentiviralen Vektor pRRL-ppT-SV40 transduziert und in eine Doxycyclin-abhängige immortale Zelllinie umgewandelt (HHSEC\_LT). **(A)** HHSEC\_LT wurden jeweils mit 1 µg/mL Doxycyclin (blaue Kurve) und ohne Doxycyclin (grüne Kurve) kultiviert und die Zellanzahl alle drei Tage bestimmt. Zu erkennen ist, dass HHSEC\_LT mit Doxycyclin unbegrenzt wachsen, während sie ohne Doxycyclin nicht wachsen. **(B)** Detaillierte Darstellung der Wachstumskurve von HHSEC\_LT ohne Doxycyclin, zur genaueren Beurteilung des Wachstumsverhalten im ursprünglichen, mortalen Zustandes.

### FVIII-Produktion und -Funktionalität in HHSEC

Zur Ermittlung, ob HHSEC *in vitro* tatsächlich FVIII produzieren und zur gleichzeitigen Überprüfung der Funktionalität des von HHSEC gebildeten FVIII wurde ein aPTT-basierter FVIII-Aktivitätstest in Zusammenarbeit mit dem Gerinnungslabor der Universitätsklinik Frankfurt durchgeführt (siehe 3.4.4). Als Negativkontrolle (Leerwert) diente reines Kultiviermedium (OPTIMEM + 1% P/S) ohne jeglichen Zellkontakt. Die gemessene Verdünnungsreihe des ZÜ von HHSEC\_LT

(siehe

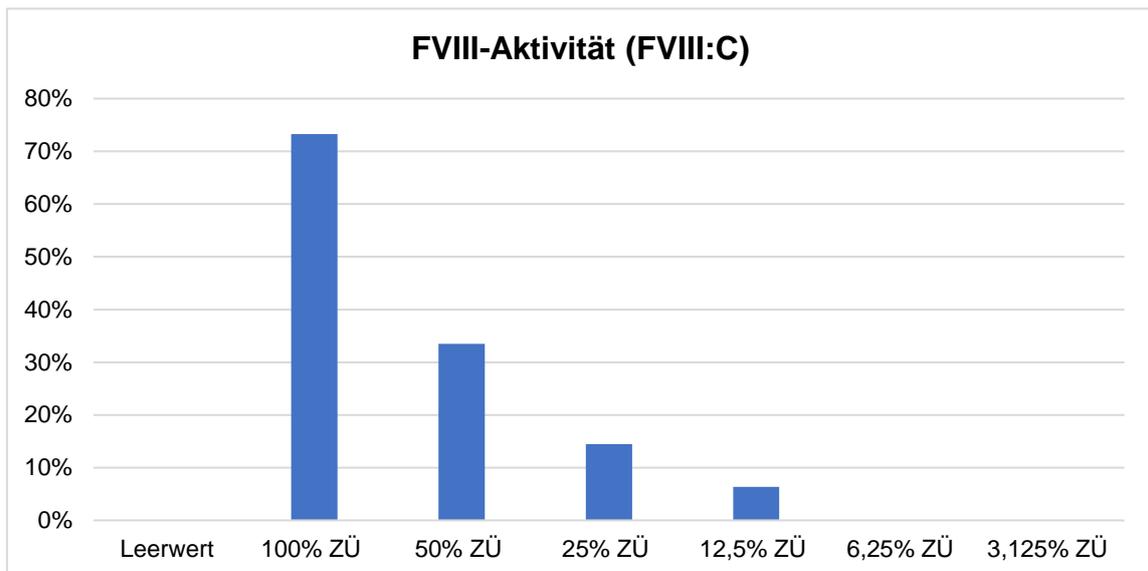
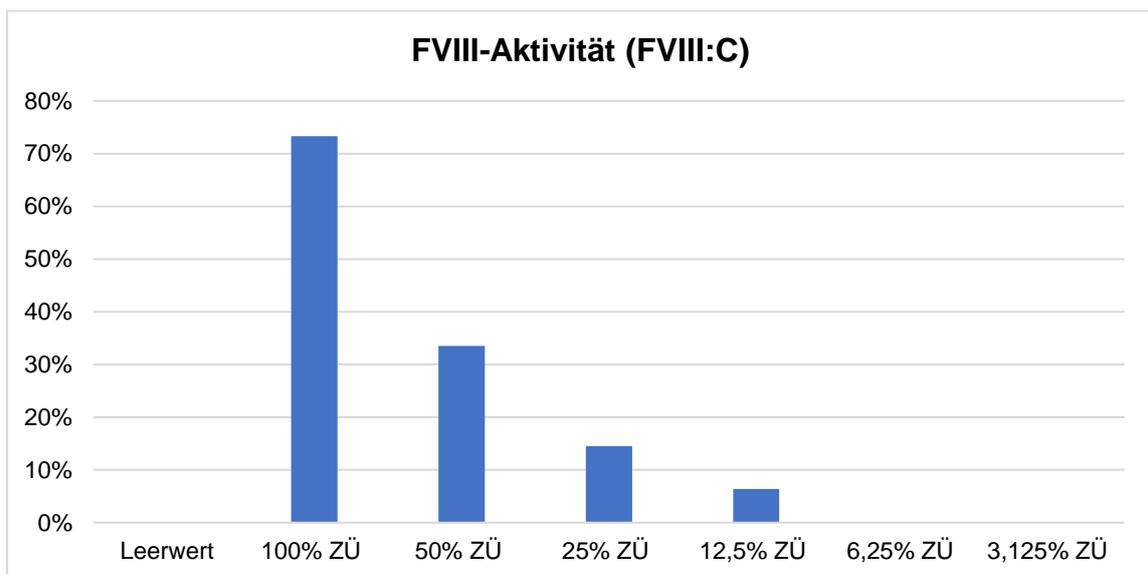


Abb. 12) zeigt eine lineare Abnahme der FVIII:C. Daraus ist zu schließen, dass der von HHSEC\_LT gebildete FVIII funktionsfähig ist und eine Koagulation bewirken kann.



**Abb. 12: aPTT-basierte FVIII-Aktivitätsmessung der HHSEC\_LT.**

$1 \cdot 10^6$  HHSEC\_LT wurden in 1,5 mL Optimem + 1% P/S für 24 h inkubiert. Anschließend wurde der FVIII-haltige Zellüberstand (ZÜ) abgenommen und daraus eine Verdünnungsreihe erstellt, deren FVIII-Aktivität (FVIII:C) zusammen mit einem Leerwert (Optimem + 1% P/S ohne Zellkontakt) gemessen. Zu sehen ist, dass mit zunehmender Verdünnung des ZÜ von HHSEC\_LT die FVIII:C linear abnimmt. Die FVIII:C der Proben 6,25% ZÜ und 3,125% ZÜ waren nicht messbar. Der Leerwert weist eine FVIII:C von 0% auf.

## 4.2 FVIII-Messung in HHSEC

### 4.2.1 Western Blot zur FVIII-Detektion

Zur Messung des großen Proteins FVIII (~ 300 kDa) in HHSEC kam zunächst das Western Blot-Verfahren, eines der meistverwendeten proteinanalytischen Methoden in der Forschung, zum Einsatz. Zur Detektion eines Proteins dieser Größe, verwendeten wir die kommerziell erhältlichen NuPAGE 3 – 8% Tris-Acetat-Gele (1,0 mm), als Laufpuffer das 1xTris-Acetat-Puffer sowie eine erhöhte Transferzeit von 3,5 h. Entsprechend des Datenblattes des polyklonalen FVIII-Antikörpers von Sigma, war eine einzelne FVIII-Bande im Bereich von etwa 300 kDa zu erwarten (siehe <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sab4500827?lang=de&region=DE>, 01.06.2021). Die Nitrozellulosemembran wurde daher im Bereich unter 250 kDa geschnitten und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt (siehe Abb. 13).

In (B) der Abb. 13 sind zwei Banden im Bereich zwischen 200 – 300 kDa zu sehen. Welche dieser Banden die FVIII-Bande repräsentiert, ist zu diesem Zeitpunkt nicht beurteilbar.

In einem zweiten Versuch (C) wurden aufsteigende Proteinkonzentrationen der HHSEC\_LT-Lysate aufgetragen. Dabei konnte eine zu erwartende Zunahme der FVIII-Bande bzw. der Ratio nicht beobachtet werden. Dieser Versuch wurde mehrmals wiederholt (n=3), wobei sich diese Erwartung weiterhin nicht darstellen ließ. Zusätzlich fiel bei den Wiederholungen von (C) auf, dass die Anzahl der Banden im Bereich von 260 kDa zwischen eins und zwei wechselte.

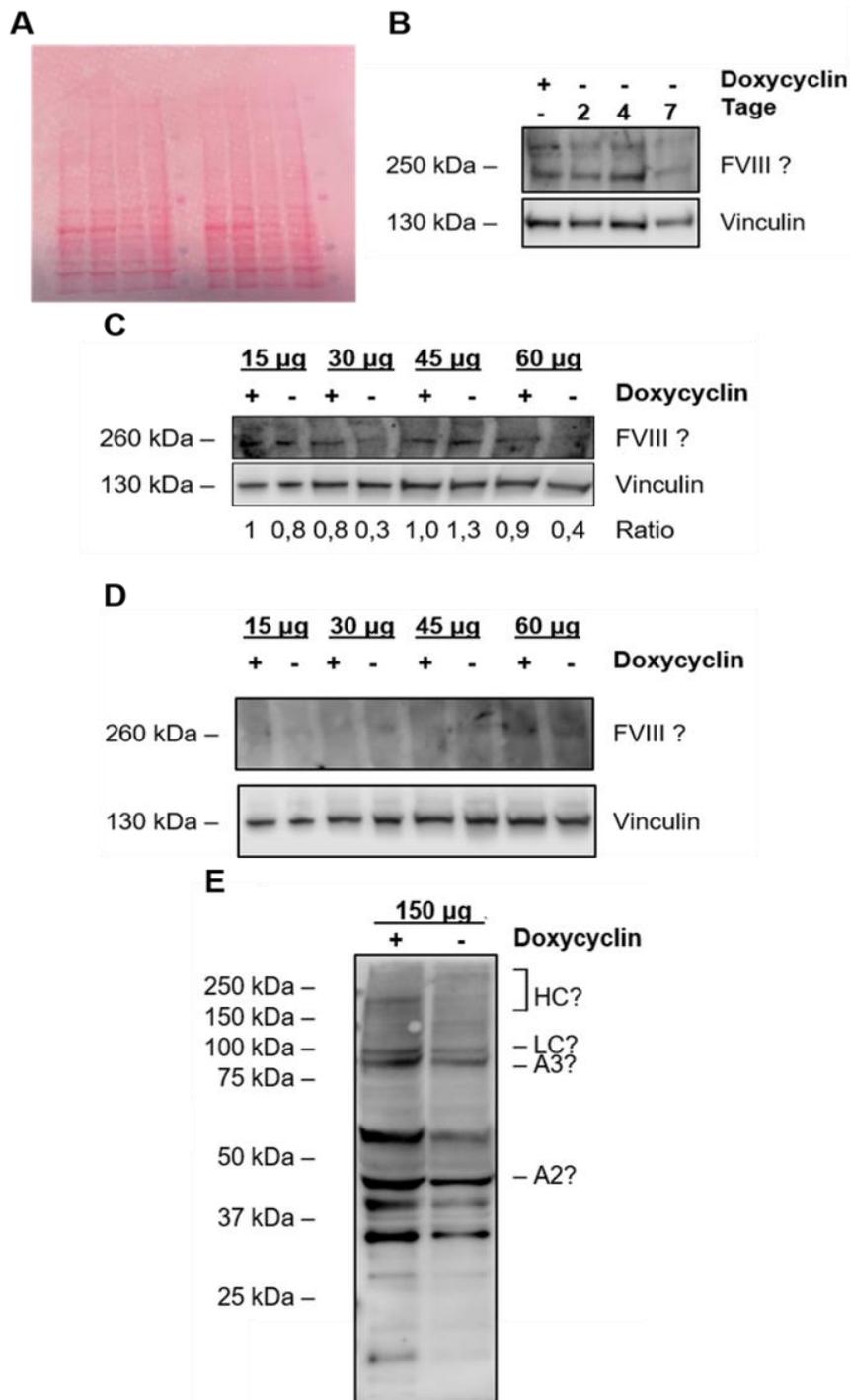
Das Experiment von (C) wurde mit einem polyklonalen Anti-FVIII-Antikörper von Novusbio wiederholt (D, n=3). Die zu erwartende FVIII-Banden im Bereich über 250 kDa waren nur sehr schwach bis kaum zu detektieren (Abb. 13D).

Da FVIII in den Zellen synthetisiert und anschließend in den menschlichen Blutkreislauf sezerniert wird, ist anzunehmen, dass die FVIII-Sezernierung im Zellmodell in den ZÜ erfolgt. Bei der Kultivierung über einen längeren Zeitraum ohne einen Austausch des ZÜ durch frisches Kultivierungsmedium sollte es entsprechend zu einer Akkumulation von FVIII im ZÜ kommen. In weiteren Experimenten wurde daher der ZÜ mit den angenommenen höheren FVIII-Konzentrationen mittels Western Bot analysiert. Die Detektion von FVIII aus dem ZÜ mithilfe des

Western Blot-Verfahrens gelang jedoch trotz mehrerer Wiederholungen ( $n = 6$ ) und Modifizierung in der Aufbereitung des ZÜ leider nicht.

Da wir ein großes Protein im Bereich von etwa 300 kDa erwarteten, wurde stets die Nitrozellulosemembran im Bereich unter 250 kDa geschnitten und weiter mit Antikörpern aufgearbeitet. In einem letzten Versuch (E) wurde die Nitrozellulosemembran nicht geschnitten und im Ganzen mit dem polyklonalen Anti-FVIII-Antikörper von Sigma behandelt. Hier waren mehrere Banden sichtbar (Abb. 13E). Die Spezifität des verwendeten Anti-FVIII-Antikörpers sowie die Aufbereitungsmethode der HHSEC-Zelllysate sollen im Weiteren diskutiert werden.

Insgesamt zeigten sich bei der Realisierung eines FVIII-Western Blots aus Zellmaterial der HHSECs keine eindeutigen Ergebnisse, sodass wir weitere Methode zur FVIII-Messung in HHSEC testeten.



**Abb. 13: Western Blot zur FVIII-Detektion.**

Western Blot mit Antikörper gegen FVIII und Vinculin. **(A)** Blotmembran nach Proteintransfer und Ponceaufärbung aller Proteine. Ein vorgefärbter Proteinstandardmarker von Biorad ist mit aufgetragen. **(B)** HHSEC\_LT mit Doxycyclin (1 µg/mL) und ohne Doxycyclin für 2, 4, 7 Tage. Verwendet wurde der polyklonale Anti-FVIII-Antikörper von Sigma. **(C)** HHSEC\_LT mit Doxycyclin (1 µg/mL) und ohne Doxycyclin für 3 Tage in unterschiedlichen Proteinmengen. Verwendet wurde der polyklonale Anti-FVIII-Antikörper von Sigma. n = 3 **(D)** Wiederholung des Versuches von C unter Verwendung des polyklonalen Anti-FVIII-Antikörper von Novusbio. n = 3. **(E)** HHSEC\_LT mit Doxycyclin (1 µg/mL) und ohne Doxycyclin für 3 Tage. Verwendet wurde der polyklonale Anti-FVIII-Antikörper von Sigma. Dargestellt sind zusätzlich die Position der erwarteten Banden für prozessiertes FVIII Protein. HC: schwere Kette, LC: leichte Kette, A2: A2-Domäne, A3: A3-Domäne.

#### 4.2.2 ELISA zur FVIII-Detektion

In der klinischen Diagnostik findet der ELISA zur FVIII-Konzentrationsbestimmung in Blutproben von Patienten bereits erfolgreich Anwendung. Daher sollte der ELISA auch auf seine Eignung als FVIII-Detektionsmethode in HHSEC im Laboralltag überprüft werden.

Eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen (IE/mL) des rekombinanten FVIII-Proteins (Kovaltry®), wurde mittels ELISA gemessen. Von jedem gemessenen Absorptionswert der Verdünnungsreihe wurde der Leerwert 0,0494 abgezogen und graphisch zu einer Standardkurve aufgetragen (Abb. 14). Die Standardkurve dient dazu, eine spezifisch gemessene Absorption einer bestimmten FVIII-Konzentration zuordnen zu können und so im späteren Verlauf, die FVIII-Konzentration im ZÜ von HHSEC ableiten zu können.

Die Primärdaten der mittels ELISA gemessenen verschieden aufbereiteten HHSEC\_LT-Proben sind in Tab. 4 aufgeführt. Die Messung des Leerwertes (Probe 0) ergab eine durchschnittliche Absorption von 0,0456, während die Messung des ZÜ von HEK293T-Zellen (Probe 7), welche normalerweise kein FVIII produzieren, eine mittlere Absorption von 0,051 lieferte. Dagegen befanden sich die Messungen der HHSEC\_LT ZÜ (Proben 1 – 4), von welchen eine FVIII-Produktion bereits aufgezeigt werden konnte (siehe Abb. 12), trotz unterschiedlicher Aufbereitung sowie Aufkonzentrierung, ebenso wie das Homogenat der gemörserte HHSEC\_LT (Probe 6) im Absorptionsbereich zwischen dem Leerwert und den nicht FVIII-produzierenden HEK293T-Zellen. Lediglich die Zugabe von FVIII-Mangelplasma zum HHSEC ZÜ (Probe 5) lieferte einen minimal höheren Absorptionswert von 0,0528 im Vergleich zu Probe 7.

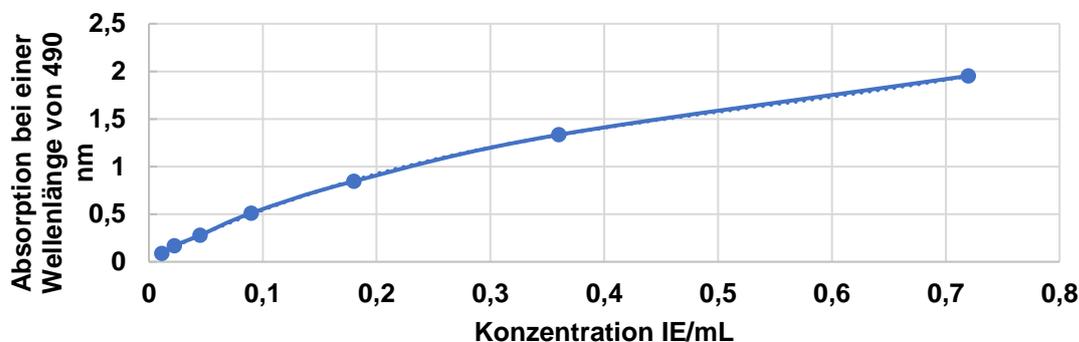


Abb. 14: Kovaltry-Standardkurve.

Kovaltry ist ein rekombinant hergestelltes FVIII-Präparat von Bayer zur therapeutischen FVIII-Substitution bei Hämophilie A Patienten. Die Absorptionen einer Verdünnungsreihe des gelösten Kovaltry-Präparates mit bekannten Konzentrationen wurden mittels ELISA gemessen und graphisch dargestellt.

**Tab. 4: ELISA zur FVIII-Detektion in HHSEC (Primärdaten).**

Unterschiedlich aufbereitete Zellüberstände (ZÜ) von HHSEC\_LT und HEK293T sowie gemörserte HHSEC\_LT und ein Leerwert wurden mittels ELISA gemessen. Es wurden stets Duplikate gemessen und daraus ein Mittelwert gebildet

Probe	Absorption (A)		
	1. Messung	2. Messung	Mittelwert
0: Leerwert (OPTIMEM)	0,0457	0,0455	0,0456
1: HHSEC_LT-ZÜ (unkonzentriert)	0,0462	0,0466	0,0464
2: HHSEC_LT-ZÜ (unkonzentriert, zentrifugiert)	0,0450	0,0438	0,0444
3: HHSEC_LT-ZÜ (aufkonzentriert mit 10.000 MWCO)	0,0460	0,0472	0,0466
4: HHSEC_LT-ZÜ (aufkonzentriert mit 100.000 MWCO)	0,0476	0,0469	0,04725
5: HHSEC_LT-ZÜ + FVIII-Mangelplasma (1:10)	0,0513	0,0543	0,0528
6: HHSEC_LT (Homogenat)	0,0460	0,0477	0,04685
7: HEK293T-ZÜ	0,0512	0,0508	0,051

Um das kommerziell erhaltene ELISA-Kit zu validieren und sicherzustellen, dass die Antikörper funktionsfähig sind, wurde entsprechend Herstellerangaben der ELISA mit fünf verschiedenen Blutproben von gesunden Probanden durchgeführt (siehe Tab. 5). Hier war eine FVIII-Detektion zuverlässig möglich. Damit zeigte sich, dass das FVIII-ELISA-Kit zwar FVIII in Blutproben detektieren kann, nicht jedoch in HHSEC.

**Tab. 5: ELISA zur FVIII-Detektion in Blutproben (Primärdaten).**

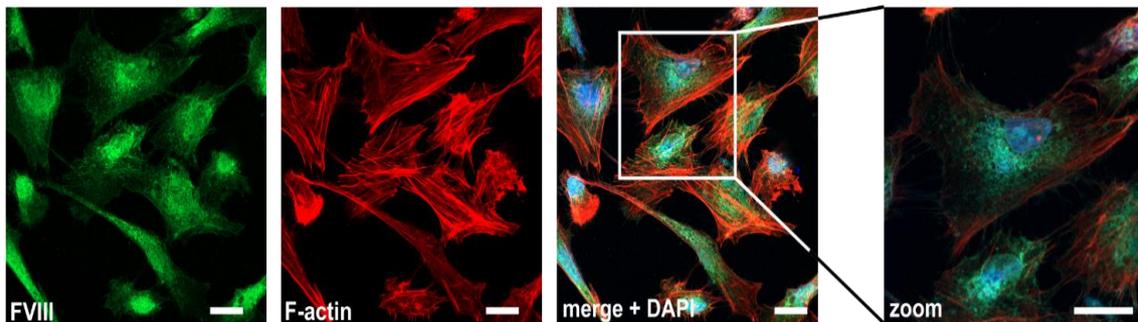
Zur FVIII-Detektion wurde das Blutserum von 5 verschiedenen, gesunden Probanden in unterschiedlichen Verdünnungen mittels ELISA gemessen. J.: Jahre

Probanden	Absorption (A)		
	1/8 Verdünnung	1/16 Verdünnung	1/32 Verdünnung
weiblich, 23 J.	0,7216	0,4474	0,2649
weiblich, 27J.	0,42995	0,23405	0,1467
männlich, 26 J.	0,5051	0,31135	0,1697
weiblich, 22 J.	0,56155	0,3168	0,17955
männlich, 49 J.	0,7297	0,47	0,26175

### 4.2.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie zur FVIII-Detektion

Mittels des gegen den gesuchten FVIII gerichteten polyklonalen Antikörpers von Sigma und einem zweiten, mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierten Antikörper (Alexa Fluor 488), welcher den ersten erkennt, konnte in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der intrazelluläre FVIII sichtbar gemacht werden und seine Lokalisation in HHSEC dargestellt werden (siehe Abbildung 15). Zum Einsatz kam dabei das Konfokalmikroskop von Zeiss (LSM 800).

In Abbildung 15 ist weiterhin zu erkennen, dass FVIII, korrelierend zur Lage des endoplasmatischen Retikulums, am dichtesten um den Zellkern herum vorliegt und seine Dichte in der Peripherie und den Ausläufern der HHSEC abnimmt. Somit konnte mit der IF-Mikroskopie die Anwesenheit und Lokalisation von FVIII in HHSEC verifiziert werden.



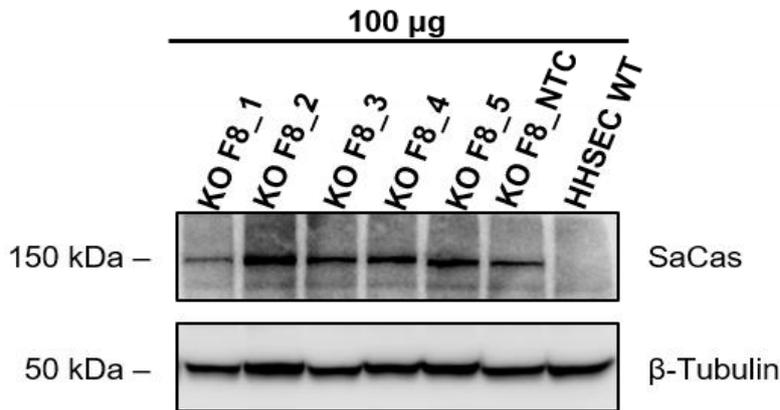
**Abb. 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HHSEC.**

Die endogenen FVIII-Proteine in HHSEC sind grün (mit Alexa Fluor 488-markiertem polyklonalem Anti-FVIII-Antikörper von Sigma), F-Aktinfilamente sind rot (mit Phalloidin-Alexa-Fluor 555) und die DNA in den Zellkernen (mit DAPI) ist blau angefärbt. Als Maßstab dient der weiße Balken, der 20  $\mu\text{m}$  entspricht. *Merge*: Vereinigung von FVIII und F-Aktin.

## 4.3 Generierung und Analysierung stabil transduzierter HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinien

### 4.3.1 Transduktionseffizienz

In das universelle SaCas9-Expressions-Plasmid mit einem Puromycinresistenzgen wurden jeweils fünf verschiedene sgRNA kloniert und mittels rLV-Gentransfer jeweils in die immortalisierten HHSEC\_LT, im Folgenden nur noch als HHSEC bezeichnet eingebracht, zur Herstellung von fünf einzelnen HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinien mit patientenähnlichen *F8*-Mutationen.



**Abb. 16: Western Blot zur SaCas9-Detektion in HHSEC-*F8*-Mutations-Linien.**

Fünf verschiedene SaCas9-CRISPR-Expressionsplasmide mit jeweils gegen unterschiedliche spezifische *F8*-Sequenzen dirigierende sgRNAs und einem Puromycinresistenzgen wurden in HHSEC eingebracht. Alle fünf HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinien exprimieren nun die SaCas9. Dagegen exprimieren die nicht transduzierten Wildtypzellen (HHSEC\_WT) als Negativkontrolle die SaCas9 nicht.

Verwendeter primäre Antikörper: Anti-Cas9 von Thermo Fischer.

Die ermittelte Transduktionseffizienz für die Integration der in dieser Arbeit hergestellten verschiedenen SaCas9/sgRNA-CRISPR-Vektoren in HHSEC betrug ca. 40% (siehe Anhang).

In Abb. 16 ist zu sehen, dass alle mit den SaCas9/sgRNA-CRISPR-Vektoren stabil transduzierten und daraufhin für fünf Tage mit Puromycin selektierten HHSEC nun erfolgreich die SaCas9 exprimieren. Als Negativkontrolle zum Vergleich dienen HHSEC-Wildtypzellen (Abb. 16).

#### 4.3.2 Analyse der eingebrachten *F8*-Genmutationen

Zur Ermittlung der realisierten Veränderungen in der Nukleotidabfolge nach Transduktion der HHSEC mit den jeweils spezifischen sgRNA/SaCas9-CRISPR-Vektoren wurde jede einzelne HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinie sequenziert und mit dem identischen Sequenzbereich der WT-Zellen verglichen. Dabei wurde jeweils der gesamte Zellpool nach der Transduktion analysiert und in Abb. 17 grafisch dargestellt.

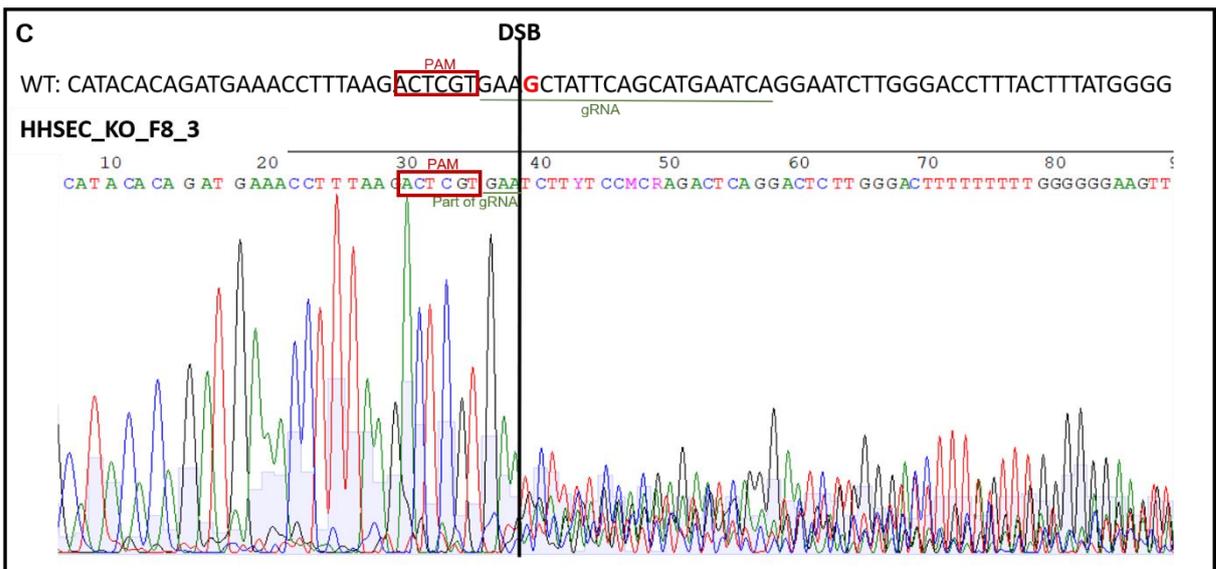
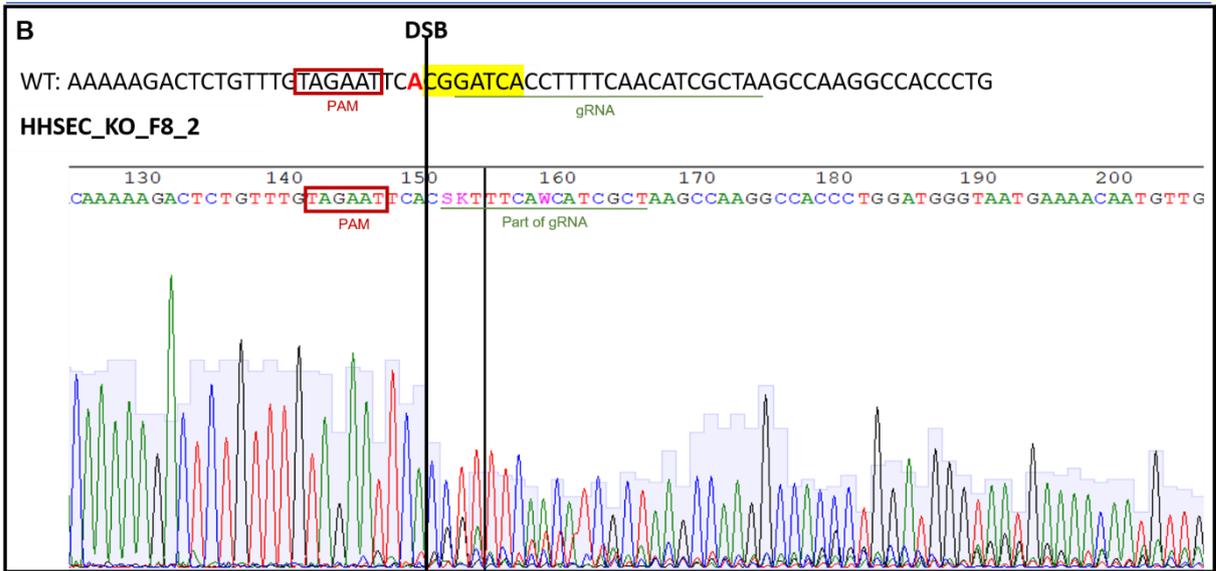
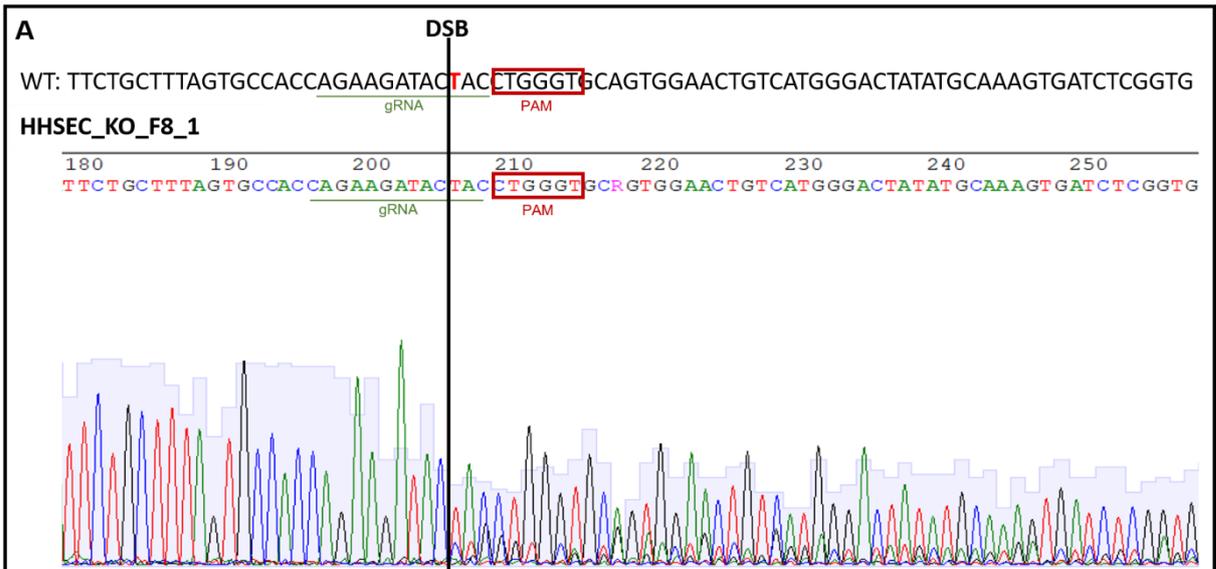
Betrachtet man in dem Zellpool HHSEC\_KO\_F8\_1 (A) die Peakhöhen vor und nach dem erwarteten DBS, so stellt man fest, dass die durchschnittliche Peakhöhe an der erwarteten Stelle auf etwa 60% abnimmt. Die Hauptsequenz

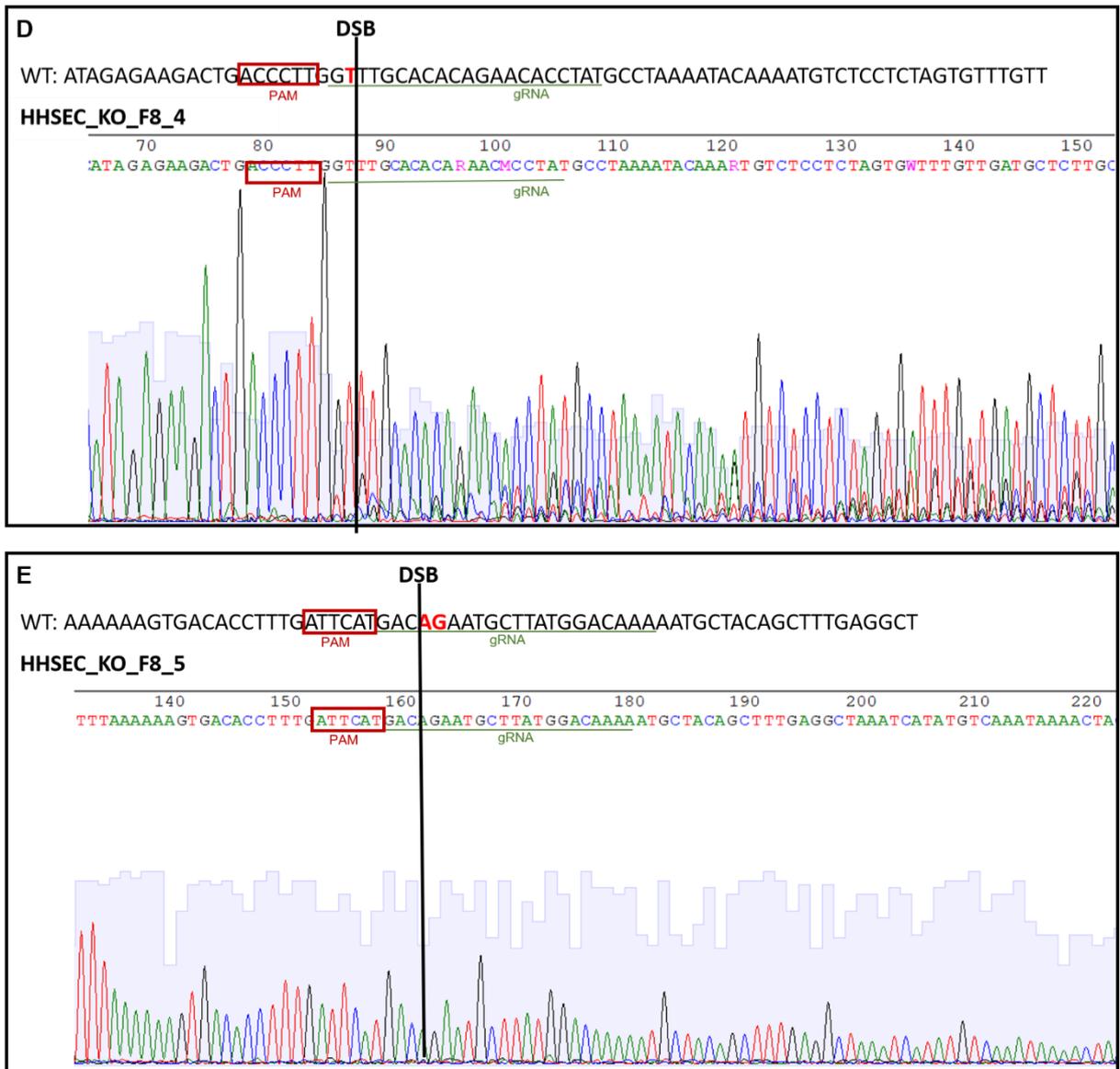
ist immer noch identisch mit der WT-Sequenz. Gleichzeitig treten nach dem erwarteten DSB Doppelsignale auf, woraus zu schließen ist, dass in ca. 40% genetische Veränderungen stattgefunden haben.

Im Zellpool HHSEC\_KO\_F8\_2-Zelllinie (B) ist die durchschnittliche Peakhöhe nach dem erwarteten DSB auf etwa die Hälfte gesunken und auch hier treten nach dem erwarteten DSB vermehrt Doppelsignale auf. Vergleicht man allerdings die Hauptsequenz dieses Zellpools mit der WT-Sequenz, so stellt man fest, dass sieben Basenpaare aus der WT-Sequenz (gelb markiert) in der HHSEC\_KO\_F8\_2-Zelllinie fehlen. Diese stattgefundenen 7bp-Deletion verursacht eine Leserasterverschiebung (*Frameshift*).

Ebenso zeigt die Sequenzierung des Zellpools HHSEC\_KO\_F8\_3 (C) unmittelbar nach dem erzeugten DSB einen deutlichen Einschnitt in der Nukleotidabfolge im Vergleich zur WT-Sequenz. Es werden viele verschiedene Signale detektiert und eine einheitliche Hauptsequenz lässt sich nicht mehr eruieren. Hier liegen somit Zellen mit vielen verschiedenen Nukleotidabfolgen nebeneinander in einem Zellpool.

Im Zellpool HHSEC\_KO\_F8\_4 (D) ist zu sehen, dass die durchschnittliche Peakhöhe nach dem erwarteten DSB auf ca. 70% gesunken ist, wobei die Hauptsequenz im Vergleich zur WT-Sequenz unverändert ist. Die Doppelsignale nach dem DSB zeigen, dass in ca. 30% Nukleotidveränderungen stattgefunden haben. Dagegen zeigt HHSEC\_KO\_F8\_5 (E), verglichen mit der WT-Sequenz, eine unveränderte Hauptsequenz und keine Doppelsignale nach dem zu erwarteten DSB.

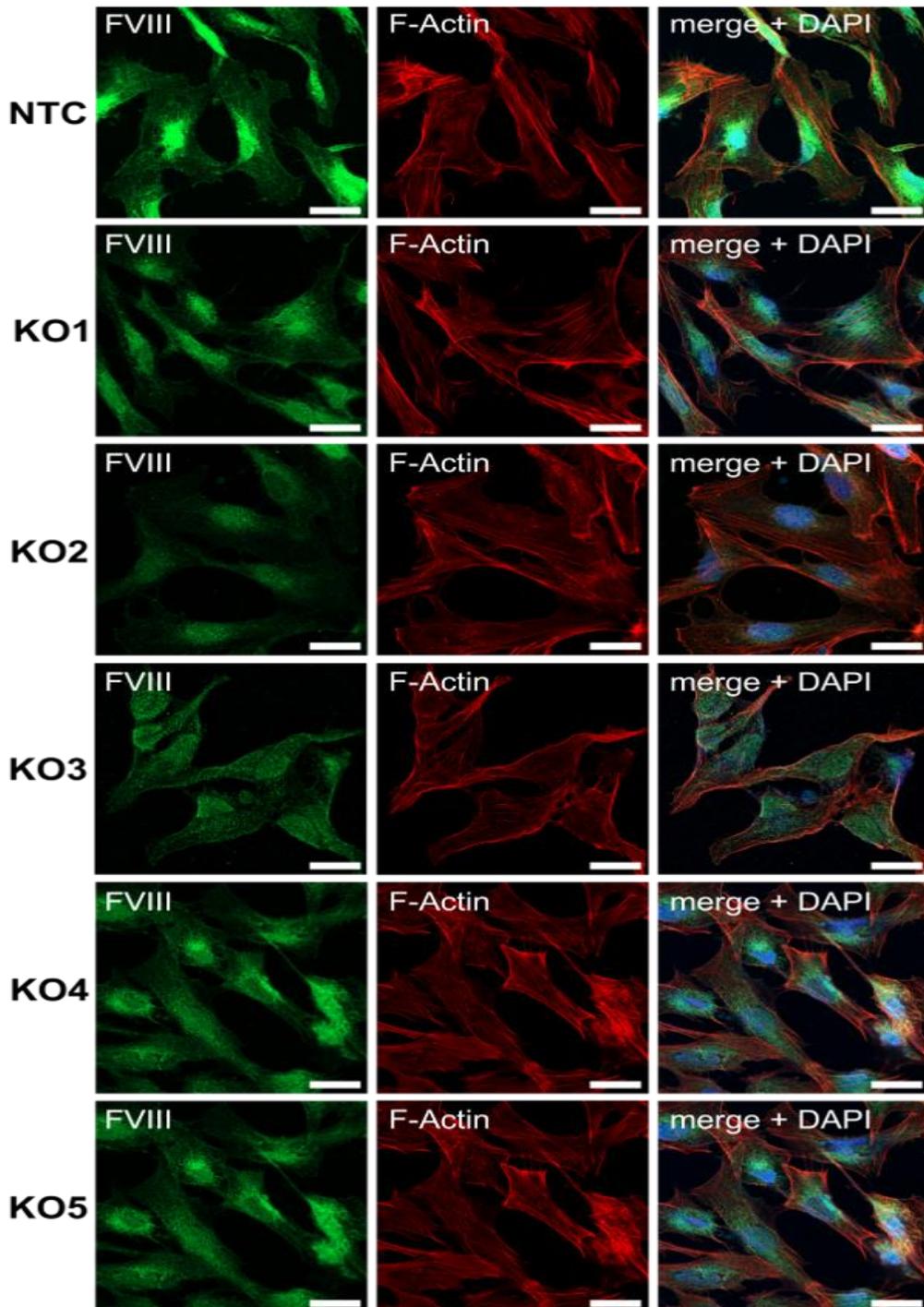




**Abb. 17: Sequenzierungen der stabil transduzierten HHSEC-F8-Mutations-Zelllinien.**

In jeder Abbildung ist zum Vergleich ein Ausschnitt der Wildtyp (WT)-Sequenz der Kontrollzellen des jeweiligen Bereichs dargestellt. Hervorgehoben sind die PAM-Sequenz (rot umrandet) und die gRNA-Sequenz (grün unterstrichen). Die schwarze Trennlinie stellt den Bereich dar, in dem die Erzeugung eines Doppelstrangbruch (DSB) durch die SaCas9 zu erwarten ist. **(A)** Sequenzierung der stabil transduzierten HHSEC\_KO\_F8\_1-Zelllinie unter Verwendung von Primer NH\_13 und NH\_14. WT: Vergleichbarer WT-Sequenzausschnitt von Exon 1. **(B)** Sequenzierung der stabil transduzierten HHSEC\_KO\_F8\_2-Zelllinie unter Verwendung von Primer NH\_15 und NH\_16. WT: Vergleichbarer WT-Sequenzausschnitt von Exon 2. **(C)** Sequenzierung der stabil transduzierten HHSEC\_KO\_F8\_3-Zelllinie unter Verwendung von Primer NH\_17 und NH\_18. WT: Vergleichbarer WT-Sequenzausschnitt von Exon 9. **(D)** Sequenzierung der stabil transduzierten HHSEC\_KO\_F8\_4-Zelllinie unter Verwendung von Primer NH\_19 und NH\_20. WT: Vergleichbarer WT-Sequenzausschnitt von Exon 14. **(E)** Sequenzierung der stabil transduzierten HHSEC\_KO\_F8\_5-Zelllinie unter Verwendung von Primer NH\_21 und NH\_22. WT: Vergleichbarer WT-Sequenzausschnitt von Exon 14.

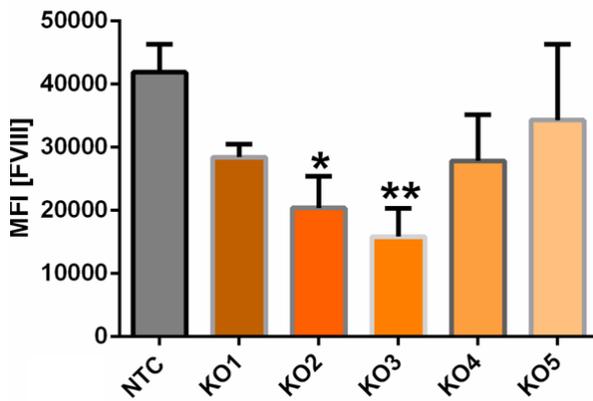
### 4.3.3 FVIII-Messung



**Abb. 18: Immunfluoreszenz-Mikroskopie der stabil transduzierten HHSEC-F8-Mutations-Zelllinien.**

Dargestellt sind in grün FVIII (mit Alexa fluor 488-markiertem polyklonalem Anti-FVIII-Antikörper von Sigma), in rot F-Aktinfilamente (mit Phalloidin-Alexa-Fluor 555) und in blau die DNA im Zellkern (mit DAPI). Als Maßstab dient der weiße Balken, welcher 20 µm entspricht.

*NTC: HHSEC\_KO\_F8\_NTC, KO1: HHSEC\_KO\_F8\_1, KO2: HHSEC\_KO\_F8\_2, KO3: HHSEC\_KO\_F8\_3, KO4: HHSEC\_KO\_F8\_4, KO5: HHSEC\_KO\_F8\_5, Merge: Vereinigung von FVIII und F-Aktin.*



**Abb. 19: Arithmetische Mittelwerte der FVIII-Fluoreszenzintensität.**

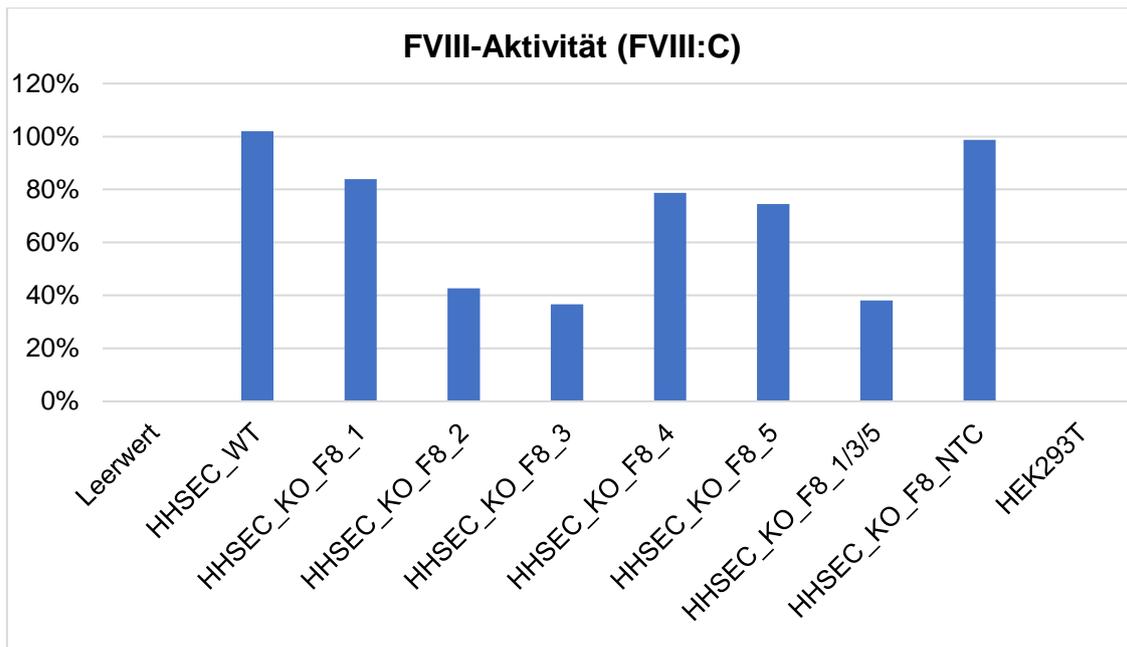
Dargestellt sind die mittels Fluoreszenzmikroskopie detektierte mittleren FVIII-Fluoreszenzintensität ( $MFI_{[FVIII]}$ ) in jeder einzelnen HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinie (Mittelwert aus Duplikaten bzw. Triplikaten  $\pm$  Standardfehler. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , einfache Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferoni-Post-hoc-Test).

Die mikroskopischen IF-aufnahmen der stabil transduzierten HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinien zeigen, dass der endogene FVIII in allen Zelllinien weiterhin anfärbbar ist (siehe Abb. 18).

In Abb. 19 ist der arithmetische Mittelwert der detektierten FVIII-Fluoreszenzintensitäten ( $MFI_{[FVIII]}$ ) jeder einzelnen transduzierten Zelllinie dargestellt. Zu erkennen ist hier, dass die  $MFI_{[FVIII]}$  der Zelllinien HHSEC\_KO\_F8\_2 (KO2) und HHSEC\_KO\_F8\_3 (KO3), in welchen auch *F8*-Genveränderungen nach der Transduktion aufgezeigt werden konnten (siehe Abb. 17), signifikant geringer ist als in den anderen Zelllinien (Abb. 19).

Zur Überprüfung der FVIII:C in den stabil transduzierten HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinien kam der aPTT-basierte FVIII-Aktivitätstest zum Einsatz (Abb. 20). Als Positivkontrolle dienten die HHSEC\_WT mit einer FVIII:C von 102% sowie HHSEC\_KO\_F8\_NTC mit einer FVIII:C von 98,9%, während der Leerwert (OPTIMEM + 1% P/S) sowie HEK293T-Zellen, welche kein FVIII exprimieren, als Negativkontrollen dienten und jeweils keine FVIII:C aufzeigten (FVIII:C 0%).

Die aPTT-FVIII-Messung in Abb. 20 zeigt eine deutliche FVIII-Aktivitätsminderung in den Zelllinien HHSEC\_KO\_F8\_2 (FVIII:C 42,7%) und HHSEC\_KO\_F8\_3 (FVIII:C 36,7%), übereinstimmend mit der mittels IF-Mikroskopie dargestellten signifikant verminderten Anwesenheit von FVIII in diesen beiden Zelllinien. Die Zelllinie HHSEC\_KO\_F8\_1/3/5, welche mit drei verschiedenen SaCas9-sgRNA-CRISPR-Vektoren gleichzeitig transduziert wurde, zeigte eine zu HHSEC\_KO\_F8\_3 vergleichbare FVIII:C von 38,1%. Dagegen konnten in den Zelllinien HHSEC\_KO\_F8\_1, HHSEC\_KO\_F8\_4 sowie HHSEC\_KO\_F8\_5 nur moderate FVIII-Aktivitätsminderung beobachtet werden.

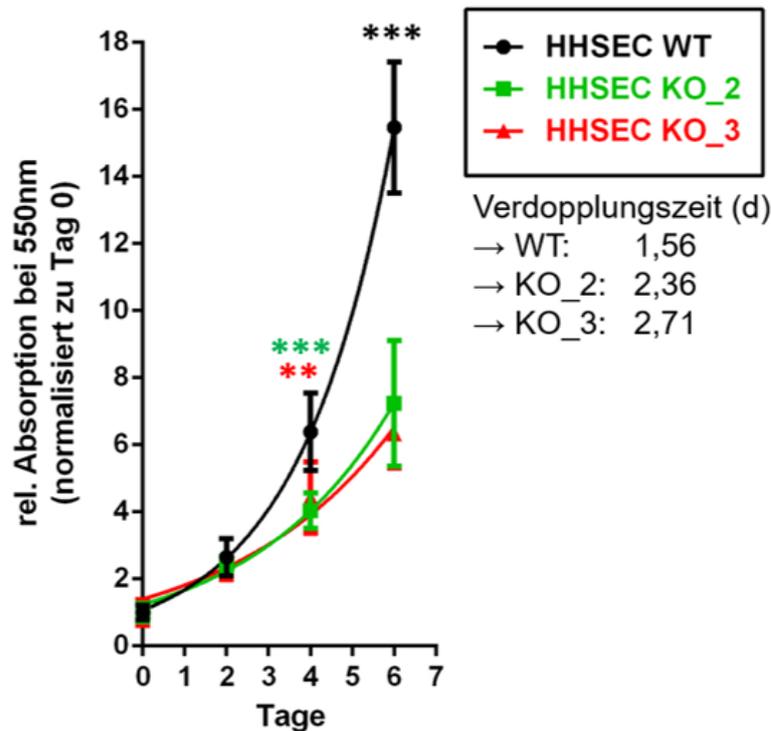


**Abb. 20: aPTT-basierte FVIII-Aktivitätsmessung der stabil transduzierten HHSEC-F8-Mutations-Zelllinien.**

Als Positivkontrolle dienen HHSEC-Wildtypzellen und als Negativkontrolle ein Leerwert (OPTIMEM + 1% P/S) sowie HEK293T-Zellen, die kein FVIII produzieren.

#### 4.3.4 Wachstumsverhalten und Beeinflussung der VWF-Expression

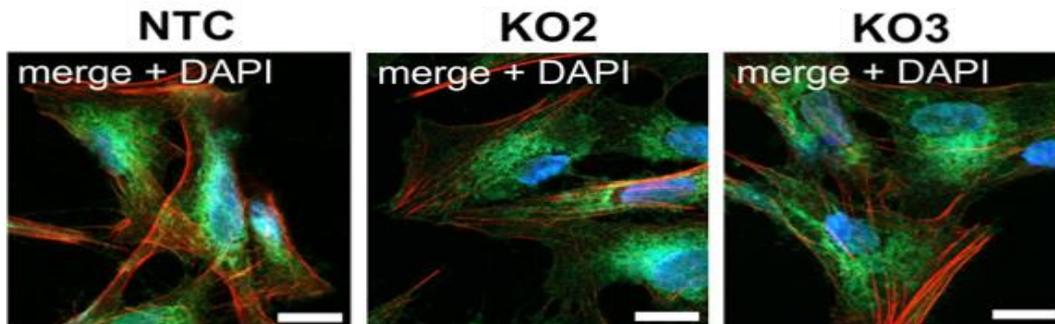
Bei der Kultivierung und mikroskopischen Beobachtung der Zelllinien HHSEC\_KO\_F8\_2 und HHSEC\_KO\_F8\_3 ist aufgefallen, dass die Zellen dieser beiden Linien morphologisch sich von den Zellen der anderen Zelllinien unterschieden. Sie zeigten im Vergleich zu den sonst langausgestreckten HHSEC eine rundlichere Zellform, deutlich mehr tote Zellen in den Kulturschalen und ein subjektiv wesentlich langsames Wachstumsverhalten. So hat es mehr Zeit in Anspruch genommen, die HHSEC\_KO\_F8\_2 und HHSEC\_KO\_F8\_3 zu expandieren und es verging mehr Zeit, bis eine Passage dieser Zelllinien notwendig wurde, obwohl alle Zelllinien stets unter gleichen Bedingungen gezüchtet wurden. Um diese Beobachtungen zu objektivieren, wurde das Wachstumsverhalten der stabil transduzierten Zelllinien HHSEC\_KO\_F8\_2 und HHSEC\_KO\_F8\_3 im Vergleich zu den Wildtypzellen HHSEC\_LT anhand der metabolischen Aktivität mithilfe eines MTT-Assay analysiert. Wie in Abb. 21 dargestellt, konnte ein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen den WT und den HHSEC\_KO\_F8\_2 sowie zwischen den WT und den HHSEC\_KO\_F8\_3 gezeigt werden.



**Abb. 21: Wachstumsverhalten der stabil transduzierten HHSEC\_KO\_F8\_2- und HHSEC\_KO\_F8\_3-Zelllinien.**

Mittels MTT-Assay ermittelte Wachstumskurven der HHSEC\_LT (WT) sowie der stabil transduzierten Zelllinien HHSEC\_KO\_F8\_2 und HHSEC\_KO\_F8\_3. (Mittelwert aus 6 Messungen  $\pm$  Standardabweichung \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , zweifache Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferoni-Post-hoc-Test,  $n = 1$ ).

Genmutationen können zur Akkumulation von Proteinen mit fehlerhafter Faltung im endoplasmatischen Retikulum (ER) führen und zu einer Stressantwort der Zellen mit Unterdrückung der Translation führen. Insbesondere VWF ist ein sehr großes Protein und kann durch seine unveränderte Expression in den stabil transduzierten HHSEC zu einer Verstärkung des ER-Stresses und damit zu einem Wachstumsnachteil führen. Um diese postulierte Hypothese zu analysieren, wurden zusätzlich mikroskopische IF-Aufnahmen der stabil transduzierten Zelllinien HHSEC\_KO\_F8\_2 und HHSEC\_KO\_F8\_3 mit dem polyklonalen VWF-Antikörper von Cell Signaling Technology angefertigt (Abb. 22). Die arithmetische Mittelwerte der VWF-Fluoreszenzintensitäten ( $MFI_{[VWF]}$  aus Triplikaten  $\pm$  Standardfehler) in diesen Zelllinien zeigen keine signifikanten Unterschiede auf ( $MFI_{[VWF \text{ in NTC}]} = 43557$ ,  $MFI_{[VWF \text{ in KO}_2]} = 40322$ ,  $MFI_{[VWF \text{ in KO}_3]} = 43124$ ).



**Abb. 22: VWF-Expression stabil transduzierter HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinien.**

Immunfluoreszenz-Mikroskopie der stabil transduzierten Zelllinien HHSEC\_KO\_F8\_NTC (NTC), HHSEC\_KO\_F8\_2 (KO2) und HHSEC\_KO\_F8\_3 (KO3) zur VWF-Darstellung (grün). Dargestellt sind in grün VWF (mit Cy3-markiertem polyklonalem Anti-VWF-Antikörper von Cell Signaling Technology), in rot F-Aktinfilamente (mit Phalloidin-Alexa-Fluor 555) und in blau die DNA im Zellkern (mit DAPI). Als Maßstab dient der weiße Balken, welcher 20 µm entspricht.

## 5 Diskussion

### 5.1 Verwendbarkeit von HHSEC als Hämophilie A-Zellmodell

Als Grundlage unseres *in vitro* Zellmodells der Hämophilie A dienten in dieser Arbeit die primären, kommerziell erhältlichen humanen hepatischen sinusoidalen Endothelzellen (HHSEC). Wie alle primären, somatischen Zellen ist die Kultivierungszeit der HHSEC jedoch begrenzt, so dass sie nach einigen Passagen seneszent werden. Daher sind sie nicht unmittelbar für die Herstellung eines HA-Zellmodells einsetzbar. Um eine gut charakterisierte HA-Zelllinie zu etablieren, die potenziell endlos in Kultur gehalten werden kann, ist es notwendig die HHSECs zunächst zu immortalisieren.

Die Immortalisierung von Säugetierzellen mithilfe des onkogenen *Large T*-Antigens (LT) vom Simian-Virus 40 (SV40) ist eines der am häufigsten angewendeten Methoden zur Herstellung unbegrenzt kultivierbarer Zelllinien. LT bindet an die Tumorsuppressor-Proteine pRB und p53 und bewirkt dadurch die Transformation von Zellen<sup>102</sup>. Aufgrund der vielen Erfahrungen und breiten Anwendungen dieser Strategie zur Immortalisierung von primären Zellen<sup>103–106</sup>, wählten wir in der vorliegenden Arbeit die stabile Integration eines Doxycyclin-induzierbaren LT-Onkogens mittels lentiviralem Gentransfer (siehe 3.3.3), um die primären HHSEC zu immortalisieren. Der Erfolg der Immortalisierung der HHSEC konnte sowohl durch die stabile Doxycyclin-abhängige Expression von LT mittels Western Blot als auch durch die Darstellung des unbegrenzten, exponentiellen Wachstumsverhalten in Anwesenheit von Doxycyclin mittels eines kumulativen Wachstumsassays demonstriert werden.

Um die LT-Expression der genetisch manipulierten HHSEC kontrollieren zu können und damit jegliche Nachteile einer anhaltenden Überexpression des Transgens auszuschließen, wurde die Transgenexpression von der Doxycyclin-Anwesenheit abhängig gemacht. Im kumulativen Wachstumsassay zeigten mit Doxycyclin kultivierte HHSEC\_LT eine Verdopplungszeit von etwa zwei Tagen, wohingegen ohne Doxycyclin kultivierte HHSEC\_LT eine Verdopplung der Ausgangszellzahl nicht erreichen und bereits nach drei Tagen eine Wachstumsinhibition zeigten. Ebenso konnte mikroskopisch ab dem dritten Tag ohne Doxycyclin eine deutliche Veränderung der Morphologie von HHSEC\_LT und ein zunehmendes Absterben der Zellen in der Kulturschale beobachtet werden. Normalerweise

werden apoptotische Zellen *in vivo* von Makrophagen erkannt und eliminiert. In der Zellkultur hingegen verbleiben die apoptotischen Abbauprodukte und freigegebenen Zytokine in der Kulturschale und können das weitere Wachstum vitaler Zellen negativ beeinflussen<sup>107</sup>. Ursprünglich war geplant, für Experimente zur FVIII-Detektion die HHSEC-Linie in ihre ursprüngliche, mortale Form zurückzuführen, um mögliche Störfaktoren durch die LT-Expression, welche im Normalfall in HHSEC *in vivo* nicht gegeben ist, zu verhindern und um möglichst ein wirklichkeitsgetreues HA-Zellmodell zu kreieren. Hiervon sahen wir allerdings, aufgrund der in dieser Arbeit beobachteten gravierenden Auswirkungen für HHSECs in Abwesenheit von Doxycyclin, ab. Schließlich stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit primär die Produktion und Ausschüttung von FVIII. Das beobachtete Wachstumsverhalten und die veränderte Zellmorphologie von HHSEC\_LT in Abwesenheit von Doxycyclin, legen nahe, dass gestresste und sterbende Zellen keine normalen Mengen an FVIII exprimieren. Mittels mikroskopischer IF-Aufnahmen und aPTT-basierter FVIII-Aktivitätsmessung konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die immortalisierten HHSEC\_LT in Anwesenheit von Doxycyclin funktionales FVIII produzieren. Dementsprechend ist auch keine Inhibition der FVIII-Produktion durch die LT-Expression anzunehmen. Daher beschlossen wir alle weiteren Experimente stets in Kulturmedium mit Doxycyclin unter kontinuierlicher LT-Expression durchzuführen.

Neben dem unbegrenzten Wachstum der HHSEC-Linie, sind weitere wichtige Voraussetzungen unseres HA-Zellmodells die natürliche FVIII-Expression durch HHSEC als auch die Funktionalität des von HHSEC *in vitro* produzierten FVIII. Diese beiden Voraussetzungen konnten in dieser Arbeit, wie zuvor auch durch andere Arbeiten z. B. von Shahani et al. (2010)<sup>10</sup> postuliert, bestätigt werden. Die Aussagekraft der dabei verwendeten mikroskopischen IF-Aufnahmen und aPTT-basierten FVIII-Aktivitätsmessungen als FVIII-Detektionsmethoden sollen im nächsten Abschnitt ausführlich diskutiert werden.

Während der Charakterisierung der HHSEC-Linie stellte sich heraus, dass die kommerziell erhaltene HHSEC-Linie weiblich ist, die zwei X-Chromosomen aufweist. Wie bereits unter 1.3 beschrieben, handelt es sich bei der HA um eine gonosomal-X-rezessiv vererbte Erkrankung, welche i. d. R. hauptsächlich Männer mit einem X-Chromosom (Karyotyp 46, XY) betrifft. Frauen (Karyotyp 46, XX) können Träger des fehlerhaften *F8*-Gens für die HA sein, ohne selbst an der

Krankheit, aufgrund ihres zweiten kompensierenden X-Chromosoms, zu leiden<sup>43</sup>. In seltenen Fällen ist die HA auch bei Frauen möglich<sup>108</sup>. Diese Fälle umfassen Frauen (I) mit zwei mutierten *F8*-Genen, welche homozygot<sup>109</sup> oder heterozygot<sup>110</sup> sein können, (II) mit einem mutiertem *F8*-Gen auf dem ersten X-Chromosom und einer weitreichenden Inaktivierung, einschließlich des *F8*-Gens, auf dem zweiten X-Chromosom<sup>111</sup>, sowie (III) mit numerischen oder strukturellen Anomalien des X-Chromosoms wie z. B. im Falle des Turner-Syndroms (Karyotyp 45, X)<sup>112</sup>. Zwar wird die Herstellung eines HA-Zellmodells mit einer weiblichen HHSEC-Zelllinie erschwert, sollte jedoch, wie die beschriebenen Fälle demonstrieren, nicht unmöglich sein.

Basierend auf der Lyon-Hypothese wird eines der beiden X-Chromosomen bei Frauen während der Embryonalentwicklung in jeder Zelle weitgehend inaktiviert. Die Auswahl des zu inaktivierenden X-Chromosoms erfolgt dabei zufällig und wird somit in jeder Zelle eigenständig getroffen<sup>113</sup>. Ein einmal inaktiviertes X-Chromosom bleibt durch epigenetische Regulation fortlaufend inaktiv und wird so von einer Zelle auf alle Tochterzellen weitergegeben. Dabei handelt es sich um eine Regulation der Genexpression, nicht etwa um eine stabile Änderung der DNA-Sequenz, sodass die X-Inaktivierung prinzipiell umkehrbar ist. Tatsächlich wird sie in bestimmten Entwicklungsstadien der Keimbahn aufgehoben. In somatischen Zellen findet jedoch keine Aufhebung statt. Die Geninaktivierung eines nahezu kompletten X-Chromosoms reduziert in der weiblichen Zelle die Gendosis auf das Gen-Niveau im männlichen Geschlecht, bei dem nur ein X-Chromosom vorhanden ist. Ausgenommen von der Geninaktivierung sind lediglich die als pseudoautosomale Region (PAR) bezeichneten Regionen des X-Chromosoms, welche vollständig homolog zur selben Regionen auf dem Y-Chromosom beim Mann sind<sup>114</sup>.

Da es sich bei den HHSECs um somatische Zellen aus der Leber handelt, ist anzunehmen, dass in jeder einzelnen Zelle *in vitro* ein inaktives X-Chromosom vorliegt. Das *F8*-Gen gehört nicht zu den PARs, welche von der X-Inaktivierung ausgeschlossen sind, und entsprechend ist zu vermuten, dass in jeder HHSEC-Zelle eines der beiden *F8*-Allele inaktiviert vorliegen sollte. Selbst wenn eines der *F8*-Allele der X-Inaktivierung entkommen sollte und somit beide *F8*-Allele im aktiven Zustand in HHSECs vorliegen, ist zu beachten, dass ihre Sequenzen iden-

tisch sind. Die sgRNA könnte somit die SaCas9 zu ihren komplementären Sequenzabschnitten in beide *F8*-Allele dirigieren und somit die Erzeugung eines DSB mit anschließender Indel-Generierung in beiden X-Chromosomen bewirken. So könnten eventuell HHSEC-Zellen mit heterozygoten *F8*-Mutationen und einem vollständigen *FVIII-Knockout* resultieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit immortalisierte HHSEC-Zelllinie mit einer natürlichen Produktion von funktionalem *FVIII*, trotz des weiblichen Karyotypes, als Zellmodell zur Imitierung eines HA-Patienten *in vitro* und zur Evaluierung der sgRNA/SaCas9-CRISPR-Methode geeignet ist. Basierend auf der vorliegenden Arbeit und den daraus gewonnenen Erkenntnissen, können zukünftige weiterführende Arbeiten modifiziert und erleichtert werden.

## 5.2 *FVIII*-Detektion in HHSEC

Im weiteren Verlauf des GT-Projektes sollen verschiedenen HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinien hergestellt werden, welche als HA-Zellmodell für die CRISPR/Cas9-vermittelte Genreparatur dienen sollen. Um den Erfolg einer eingeführten *F8*-Genmutation mit einem idealerweise *FVIII-Knockout* ( $FVIII:C < 1\%$ ) sowie der anschließenden Reparatur der *F8*-Mutation mit einer idealerweise erneuten *FVIII*-Produktion ( $FVIII:C > 1\%$ ) zu validieren, ist es notwendig, eine Methode in unserem Labor zu etablieren, die möglichst schnell und einfach aufzeigt, ob *FVIII* von der Zelllinie gebildet wird oder nicht. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere in Betracht kommende *FVIII*-Detektionsverfahren wie initial Western Blot und ELISA sowie anschließend die Immunfluoreszenz-Mikroskopie und die Quantifizierung der *FVIII*-Aktivität ( $FVIII:C$ ) mittels aPTT-basierter Messung getestet. Von den vier getesteten Methoden haben sich zwei Methoden zur spezifischen Detektion von *FVIII* in HHSEC bewährt.

Das Western Blot ist ein einfaches und in der Forschung viel angewendetes Verfahren zur Untersuchung des Vorhandenseins, der relativen Häufigkeit und der relativen Masse von Proteinen. Mit Hilfe spezifischer Antikörper kann diese Methode im Regelfall auf dem ersten Blick aufzeigen, ob das gesuchte Protein vorhanden ist oder nicht. Somit wurde initial dieses Verfahren als *FVIII*-Detektionsmethode getestet. Idealerweise sollten HHSEC\_WT im Western Blot eine *FVIII*-Bande im Bereich von ca. 300 kDa repräsentieren, während stabil transduzierte

HHSEC-*F8*-Mutations-Zellen, aufgrund der induzierten *F8*-Mutationen, entweder keine oder eine intensitätsgeminderte FVIII-Bande hervorrufen sollten.

Zur Testung des Western Blots als FVIII-Detektionsmethode in HHSEC, kam in dieser Arbeit der polyklonale FVIII-Antikörper von Sigma zur Anwendung. Im Datenblatt dieses Antikörpers ist ausschließlich eine einzelne FVIII-Bande im Bereich über 250 kDa beschrieben. Anders als erwartet zeigten allerdings unsere initialen Versuche mit HHSEC\_WT zwei Banden in dem erwarteten Größenbereich. Welche dieser Banden die FVIII-Bande repräsentiert, ließ sich zum damaligen Zeitpunkt nicht sicher erklären. Suspekt erschien ebenfalls, dass in den Wiederholungen dieses Versuchs unterschiedliche Banden-Anzahlen im Bereich von 260 kDa zu sehen waren (bis zu 3 Banden). Diese Beobachtungen erweckten zunächst Zweifel an der Spezifität des verwendeten FVIII-Antikörpers von Sigma, sodass zum Vergleich der polyklonale Anti-FVIII-Antikörper von Novusbio verwendet wurde. Doch auch die Versuchsansätze mit dem Anti-FVIII-Antikörper von Novusbio lieferten ähnliche Ergebnisse.

Weiterhin wurde versucht, FVIII aus dem unkonzentrierten ZÜ der HHSEC sowie im 20-fach aufkonzentrierten ZÜ der HHSEC zu detektieren. Wie bereits in der Einleitung beschrieben wird FVIII normalerweise in den Zellen synthetisiert und anschließend in den menschlichen Blutkreislauf sezerniert. *In vitro* ist dagegen anzunehmen, dass die FVIII-Sezernierung in den ZÜ erfolgt. Dementsprechend ist im ZÜ eine Akkumulation von FVIII und damit eine deutlich höhere Konzentration zu erwarten. Die Experimente mit dem HHSEC-ZÜ zeigten keine vielversprechenden Erfolge.

Der Erfolg der Western-Blot-Technik hängt von vielen Faktoren ab wie z. B. der Matrix des SDS-Polyacrylamid-Gels, des elektrischen Transfers der Proteine vom Trenngel auf die Nitrocellulosemembran, der Proteinbindungsfähigkeit der Membran selbst sowie der Art des Zielproteins<sup>115</sup>. Um mögliche Fehlerquellen bei der Durchführung des Western Blots zu eruieren, fanden mehrere Validierungs- und Optimierungsschritte statt. So wurden die Proben stets auf Eis gestellt (4°C) und frisch angesetzte Lösungen und zuvor unbenutzte Materialien verwendet. Nach der Zellyse zum Extrahieren von Protein bildeten in den SDS-Extrakten von HHSEC die DNA und RNA eine schleimige, geleeartige Masse, welche sich schlecht auf das Gel aufladen ließ und den Lauf der Proteine bei der elektrophoretischen Auftrennung störte. Daher wurden die HHSEC-Lysate zweimal

für jeweils 30 Sek. sonifiziert (5 × 45% Leistung). Für die Auftrennung des Proteingemisches kamen die laut Herstellerangaben speziell für große Proteine (30 – 500 kDa) geeigneten NuPAGE 3 – 8%-igen Tris-Acetat-Gele zum Einsatz. Die Erfolge der Proteinauftrennung und des Transfers vom Trenngel auf die Nitrocellulosemembran wurden mithilfe der reversiblen Ponceau S Färbung sichergestellt. Die Zeit und Anzahl der Waschschrte wurden verringert, während die Inkubationszeit des Primärantikörpers erhöht wurde.

Das Unter- oder Überladen von Proben ist ein weit verbreitetes Problem, das häufig nicht erkannt wird und die Genauigkeit der quantitativen Analyse beeinträchtigen kann<sup>116</sup>. Für eine genaue quantitative Analyse sollte die Probenbeladung experimentell bewertet und eventuell kalibriert werden. Hierfür wurden die eingesetzten Proteinkonzentrationen mittels des Lowry-Proteinassays gemessen und versuchsweise aufsteigende Proteinkonzentrationen der HHSEC-Lysate im Gel aufgetragen. Zu erwarten war eine lineare Beziehung zwischen Probenbeladung und Bandenintensität. Diese Annahme konnte für die FVIII-Bande trotz mehrerer Wiederholungen nicht bestätigt werden. Zur internen Ladekontrolle wurde ein in der Testprobe vorhandenes und von der Zelle hoch exprimiertes *Housekeeping*-Protein wie z. B. Vinculin detektiert. Im Gegensatz zur FVIII-Bande, zeigte die Vinculin-Bande mit steigender Proteinkonzentrationsauftragung wie erwartet ein stärkeres Signal auf. Die Beziehung zwischen eingesetzter Probenmenge und Bandenintensität muss allerdings sowohl für das Zielprotein als auch für die interne Beladungskontrolle sowohl linear als auch proportional sein, um eine quantitative Analyse zu ermöglichen<sup>115</sup>.

Die problemlose Darstellung des Housekeeping-Proteins als Positivkontrolle, als auch die Ponceau S Färbung der geblotteten Membran legen nahe, dass die Ausführung des Western Blots selbst nicht das marginale Signal der FVIII-Bande zu erklären vermag. Auch die anfangs erweckten Zweifeln an der Spezifität des polyklonalen FVIII-Antikörpers von Sigma konnten im Verlauf verworfen, da zum einen ähnliche Ergebnisse mit dem FVIII-Antikörper von Novusbio erzielt wurden und zum anderen die FVIII-Detektion mithilfe dieses Antikörpers sich im Nachhinein im Western Blot und in der IF-Mikroskopie als erfolgreich zeigte.

Auf der Suche nach einer möglichen Erklärung für die erschwerte FVIII-Detektion mittels Western Blot, wurde festgestellt, dass trotz der intensiven Forschung an

FVIII und HA in der Literatur die Western Blot-Methode als FVIII-Detektionsmethode in der experimentellen Grundlagenforschung kaum Anwendung findet. In den wenigen Publikationen, in welchen FVIII mittels Western Blot dargestellt wurde, ist nie das gesamte Protein als eine einzelne FVIII-Bande zusehen, sondern vielmehr die einzelnen Ketten und Fragmente von FVIII<sup>117-119</sup>. Daher wurde in einem letzten Versuch die Nitrozellulosemembran nicht im Bereich unterhalb von 260 kDa geschnitten und stattdessen im Ganzen mit dem polyklonalen Anti-FVIII-Antikörper von Sigma behandelt. Hier zeigten sich dann mehrere Banden. Am ehesten wurde FVIII bei der SDS-Lysierung in seine Fragmente zertrümmert. Nicht zu vernachlässigen ist, dass FVIII, ein nicht-kovalent gebundenes Heterodimer bestehend aus einer ~ 80 kDa leichten Kette ( $\alpha$ 3-A3-C1-C2) und einer ~ 200 kDa schweren Kette (A1-A2 und variablen Abschnitten der B-Domäne), ohnehin sehr instabil ist. Die beiden Ketten des Heterodimers werden lediglich über eine metallionenvermittelte Interaktion zwischen den Domänen A1 und A3 zusammengehalten<sup>19</sup>. So könnten die angefärbten Banden die einzelnen unterschiedlich großen Proteinfragmente z. B. die schwere Kette (HC), leichte Kette (LC) und die einzelnen Domänen darstellen. Um im Western Blot sicher aufzuzeigen, welche Bande welchem FVIII-Fragment entspricht, ist eine HHSEC-Linie mit einem vollständigem *Knockout* dieses FVIII-Fragments zum direkten Vergleich notwendig. Solche Zelllinien lagen im Rahmen dieser Arbeit nicht vor. Zudem ist folgendes entscheidendes Kriterium zu beachten. Ziel dieser Arbeit war es eine *F8*-Genmutation in HHSEC einzuführen und dadurch die FVIII-Funktionalität auf ein niedrigeres Niveau (idealerweise < 1%) zu mindern. Hierfür ist allerdings ein absoluter FVIII-*Knockout* nicht zwingend notwendig, sodass FVIII selbst weiterhin von den Zellen z. B. als verkürztes Genprodukt oder mit einer fehlerhaften AS-Abfolge exprimiert werden kann und sich entsprechend auch weiterhin mittels Western Blot detektieren lassen könnte. Zwar ist eine quantitative Analyse mittels Western Blot grundsätzlich möglich, doch da es sich nach der Einführung von *F8*-Mutationen um minimale AS-Änderungen handeln kann, ist eine Quantifizierung mittels Western Blot hierfür nicht ausreichend sensitiv. Die Tatsache, dass in unseren Versuchen mit HHSEC-Wildtypzellen FVIII-Fragmente vorliegen, welche sich ohnehin nicht eindeutig bestimmten FVIII-Domänen bzw. -Ketten zuordnen ließen, erschwert die Eruierung der Folgen von in HHSEC eingeführten *F8*-Mutationen mittels Western Blot. Aus diesem Grund wurde das

Western Blot-Verfahren als potenzielle FVIII-Detektionsmethode in HHSEC verworfen. Ähnliche Gründe führten auch zum Verwerfen der zweiten getesteten FVIII-Detektionsmethode mittels ELISA.

In der klinischen Diagnostik findet der ELISA bereits Anwendung zur Bestimmung der FVIII-Konzentration in Blutproben von Patienten<sup>120</sup>. So gibt es zahlreiche kommerziell erhältliche FVIII-ELISA-Kits. In der vorliegenden Arbeit war die Messung der Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen von dem rekombinant hergestellten FVIII-Präparat von Bayer (Kovaltry®), als auch der fünf verschiedenen Blutproben von gesunden Probanden mittels des FVIII-ELISA-Kits von Affinity Biologicals™ zuverlässig möglich. Somit ist anzunehmen, dass das kommerziell erhältliche ELISA-Kit und die darin enthaltenen Antikörper valide sind. Dagegen befanden sich alle gemessenen HHSEC-ZÜ und HHSEC-Homogenat, trotz unterschiedlicher Zubereitung und dem Versuch, den ZÜ aufzukonzentrieren, im selben Absorptionsbereich des Leerwertes sowie des ZÜ von HEK293T-Zellen, die normalerweise kein FVIII produzieren. Die FVIII-ELISA-Messungen wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt, welche allerdings für die Bestimmung von FVIII aus Blutproben angefertigt wurde. *In vitro* entsprechen die Rahmenbedingungen nicht den normalen Bedingungen, wie sie *in vivo* im Blut vorliegen. So könnten die Inhaltsstoffe des verwendeten Nährmediums für HHSEC oder ihren Zusätzen (FCS, Doxycyclin, P/S) Interaktionen mit den Inhaltsstoffen des FVIII-ELISA-Kit hervorrufen und dadurch die Messung von FVIII negativ beeinflusst haben. Zudem ist die bereits erläuterte Instabilität von FVIII nicht zu vernachlässigen. Erst die Komplexierung mit VWF sorgt für eine höhere Stabilität von FVIII *in vivo*<sup>22</sup> und verlängert die HWZ von ca. 2 h in Abwesenheit von VWF auf ca. 8 – 12 h<sup>25</sup>. Für die Probenvorbereitung der HHSEC-ZÜ bis hin zur Absorptionsmessung während der ELISA-Versuchsansätzen sind allerdings lange Inkubationszeiten (> 4 h) notwendig (siehe 3.4.2). In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass HHSEC neben FVIII auch VWF exprimieren und somit ist eine Komplexbildung zwischen FVIII und VWF *in vitro* und damit eine verlängerte HWZ von FVIII durchaus möglich. Jedoch ist VWF ein sehr großes Protein mit einer Molekülmasse von ca. 250 kDa und bildet eine hochmolekulare, multimeren Struktur, die vom Dimer (500 kDa) aufsteigend bis zu über 2000 kDa eine erhebliche Größe erreichen kann. Das stöchiometrische Verhältnis des FVIII:VWF-Komplexes beträgt 1:50<sup>1</sup>. Demnach

macht VWF ca. 98% der Molekularen Masse des Komplexes aus und ist damit in der Lage wichtige funktionelle Epitope von FVIII zu verdecken, sodass infolgedessen die Bindung des Primärantikörpers für die ELISA-Messung erschwert werden könnte. Die Dissoziation des VWF-FVIII-Komplexes, und damit die bessere Zugänglichkeit des Primärantikörpers an FVIII, erfolgt *in vivo* durch Proteasen aus dem Gerinnungssystem wie z. B. Thrombin, FIXa, FXa, aktiviertes Protein C oder durch subendotheliale Strukturen bei Gefäßläsionen<sup>1</sup>. Diese Komponenten existieren allerdings im HHSEC-ZÜ *in vitro* nicht. Interessanterweise lieferte die Zugabe von FVIII-Mangelplasma in einem Verhältnis von 1:10 zum HHSEC-ZÜ als einzige Probe einen dezent höheren Absorptionswert im Vergleich zu den anderen Proben. Dies erhärtet die Annahme, dass für eine adäquate FVIII-Messung mittels ELISA weitere Komponenten des Gerinnungssystems, wie sie *in vivo* vorliegen, erforderlich sind. Weitere Optimierungsschritte des nur versuchsweise getesteten ELISA-Verfahrens zur FVIII-Detektion in HHSEC beispielsweise durch Anpassung des Verhältnisses von FVIII-Mangelplasma zu HHSEC-ZÜ und Evaluierung der notwendigen Verdünnungsverhältnisse hätten wahrscheinlich bessere Ergebnisse erzielen können, darauf wurde allerdings in dieser Arbeit verzichtet.

Wie auch das Western Blot ist das ELISA-Verfahren als FVIII-Detektionsmethode für das vorliegende HA-Zellmodell *in vitro* ungeeignet, um die Folgen einer in HHSEC eingeführten *F8*-Genmutation zu visualisieren. Wie oben beschrieben ist eine *F8*-Mutation nicht zwingend mit einem vollständigen Fehlen von FVIII assoziiert. FVIII kann weiterhin nach einer eingeführten *F8*-Mutation als funktionsloses Protein exprimiert werden. Das ELISA-Verfahren, ebenso wie das Western Blot-Verfahren, erlaubt lediglich Aussagen über das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein des Proteins, nicht jedoch über seine Funktionalität. Die Optimierung des ELISA-Verfahrens durch Zugabe von FVIII-Mangelplasma zum HHSEC-ZÜ würde sehr viel Zeit und Aufwand in Anspruch nehmen, ohne zielführend für die weiterführenden Experimente bei der Realisierung des GT-Projektes auf Basis dieses *in vitro* HA-Zellmodells zu sein.

Diese aus den Western Blot- und ELISA-Experimenten gewonnenen Erkenntnisse zeigten, die Notwendigkeit einer Visualisierung insbesondere der FVIII-Aktivität vor und nach einer *in vitro* eingeführten *F8*-Mutation in HHSEC.

Für die FVIII-Aktivitätsmessung in HHSEC wurde eine aPTT-basierte koagulometrische Methode gewählt. Bei der HA ist von allen allgemeinen Screeningtests lediglich die aPTT, welche die Funktion des intrinsischen Systems erfasst, primär pathologisch verlängert. Der Referenzbereich für eine normale Koagulation liegt je nach dem im Labor verwendeten Reagenz zwischen 30 bis 45 s. Hierbei handelt es sich um einen Orientierungswert, da die Normwerte, aufgrund der Methodenabhängigkeit von Labor zu Labor unterschiedlich sein können und eine Standardisierung der aPTT bislang nicht erreicht werden konnte. Die in der Literatur beschriebene große Schwankungsbreite der aPTT-Werte lässt sich auf verschiedene Ursachen zurückführen. Neben präanalytischen Fehlerquellen wie z. B. während der Blutentnahme ein zu langes Stauen oder eine Gerinnungsaktivierung durch Stochern, sowie ein zu langer Transport oder eine Probenlagerung im Kühlschrank, haben auch die Testbedingungen und verwendeten Reagenzien großen Einfluss auf die Schwankungen der Messwerte<sup>1</sup>. Die Verwendung unterschiedlicher Reagenzien in den verschiedenen Laboren ist der treibende Faktor für die fehlende Standardisierung der aPTT-Methode, da sie sich sowohl hinsichtlich ihrer Oberflächenaktivatoren als auch bezüglich ihres Phospholipidgehalts unterscheiden<sup>121</sup>.

In dieser Arbeit wurde nicht mit Blutproben gearbeitet und somit von einem Vergleich der ermittelten aPTT-basierten Werten mit externen Werten abgesehen. Zum besseren Vergleich der verschiedenen FVIII-haltigen ZÜ-Proben untereinander und um in der vorliegenden Arbeit potenzielle Schwankungen der auf aPTT-basierter FVIII:C-Messung zu minimieren, wurden für alle FVIII:C-Messungen einheitliche Testrahmenbedingungen festgelegt und eingehalten. So wurden stets die gleichen Inkubationszeiten der HHSEC mit dem Kultivierungsmedium gewählt. Der ZÜ wurde entnommen, sofort auf Eis gelagert und anschließend unmittelbar im Gerinnungslabor analysiert. Die Zeit vom Abnahmezeitpunkt des ZÜ bis zur endgültigen FVIII:C-Messung betrug ca. 10 min. Dabei kamen stets dieselben Reagenzien zum Einsatz. Die Zugabe von FVIII-Mangelplasma zu den ZÜ-Proben in einem spezifischen Verhältnis stellte alle für die Koagulation notwendigen Elemente bis auf den zu untersuchenden FVIII in ausreichenden Konzentrationen bereit. Auf diese Weise wurde FVIII im HHSEC-ZÜ für die anschließende Gerinnungsreaktion zur limitierenden Größe. Die ermittelte Gerinnungszeit der Proben wurde anhand der im Gerinnungslabor der Universitätsklinik

Frankfurt festgelegten Reagenzien-spezifischen Standardkurve in Prozent des maximalen Aktivitätswerts bestimmt. Die Methodvalidierung konnte mittels der aufgezeigten Linearität der gemessenen FVIII:C der ZÜ-Verdünnungsreihe von HHSEC\_LT bestätigt werden.

Weiterhin wurde die Immunfluoreszenz-(IF-)mikroskopische Darstellung des intrazellulären FVIII in HHSEC erfolgreich in dieser Arbeit etabliert. Die IF-Mikroskopie ist eine vielseitig einsetzbare Methode, bei der bestimmte Proteine wie FVIII mit Hilfe spezifischer Antikörper markiert, angefärbt und anschließend mittels Fluoreszenzdetektion identifiziert werden können. Sie gehört mittlerweile zu den Standardmethoden in Forschungslaboren. Weiterhin erlaubt die Anwendung fluoreszenzmikroskopischer Färbungen auf Zellmembranen, Organellen und anderen subzellulären Strukturen die genaue subzelluläre Lokalisation von Proteinen<sup>122</sup>. Beispielsweise kann in weiterführenden Arbeiten auf diese Weise verfolgt werden, ob FVIII nach der eingeführten *F8*-Mutation weiterhin über die Zellmembran sezerniert wird oder als fehlerhaft erkanntes Protein vermehrt im Golgi-Apparat akkumuliert und über lysosomale Prozesse abgebaut wird.

Die in dieser Arbeit verwendeten fluoreszenzenden Antikörper wurden in Abhängigkeit der vom Hersteller bereitgestellten Fluoreszenz-Referenzdiagramme gewählt, die aufzeigen, welche Fluoreszenzbereiche vom verfügbaren Gerät tatsächlich angeregt und nachgewiesen werden können sowie die jeweiligen maximalen Anregungs- und Emissionswellenlängen des gegebenen Fluorophors.

Der Fluorophor emittiert lediglich während seiner Anregung Licht. Dadurch sind Fluorophore allerdings sehr anfällig für Photobleichung<sup>123</sup>. Um das Photobleichen in dieser Arbeit minimal zu halten, wurde eine Decklösung (Antibleichmittel) mit reduzierender Wirkung eingesetzt, die Anregungsdauer kurz und die Anregungsintensität niedrig gehalten. Jedes Präparat wurde insgesamt dreimal in folgender Reihenfolge bestrahlt und anschließend verworfen: I. Anregungslicht für FVIII bzw. VWF, II. Anregungslicht für F-Actin, III. Anregungslicht für DAPI. Auf dieser Weise wurde sichergestellt, dass das der Fluorophor, der an den Antikörper gegen das Protein des Interesses FVIII gekoppelt ist, nicht dem Photobleichen unterliegt und dass durch die konsequente Einhaltung dieser Reihenfolge die Vergleichbarkeit der FVIII-Fluoreszenzintensitäten der unterschiedlichen Präparate gewährt ist.

Zusammenfassend konnte aus den korrelierenden Sequenzierungsergebnissen, den FVIII-Fluoreszenzintensitäten und den aPTT-basierten FVIII-Aktivitätsmessungen in dieser Arbeit die IF-mikroskopische Darstellung des intrazellulären FVIII sowie die aPTT-basierte FVIII-Aktivitätsmessung als FVIII-Detektionsmethoden in HHSEC etabliert werden.

### 5.3 Stabil transduzierte HHSEC-F8-Mutations-Zelllinien

CRISPR/Cas9 ist ein wirksames Instrument zur Modifikation von DNA *in vivo* und *in vitro*, das erst seit 2013 im Labor Anwendung findet<sup>124</sup>. Diese Technik wurde in dieser Arbeit angewandt, um an gezielt ausgewählten Sequenzbereichen im *F8*-Gen einen DSB zu erzeugen, welcher mithilfe der zelleigenen Reparaturmechanismen wie HDR oder NHEJ repariert werden sollte. Insbesondere eine fehlerbehaftete Reparatur mittels NHEJ und der damit verbundenen Indel-Generierung war von großem Interesse. Auf diese Weise sollte es möglich sein, *F8*-Mutationen mit einem *Frameshift*-Effekt in HHSEC zu erzeugen und damit einen *FVIII-Knockout* zur Herstellung eines *in vitro* Hämophilie A-Zellmodells von der schweren Form.

In unserem Labor kam bisher ausschließlich das Cas9-Protein aus *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) zum Einsatz. Aufgrund unserer fehlenden Erfahrung im Laboralltag mit dem *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9) und der zunächst noch unbekanntem SaCas9-Effizienz in HHSEC sowie der Effizienz der HHSEC-eigenen Reparaturmechanismen wurden fünf unterschiedliche sgRNA/SaCas9-CRISPR-Vektoren mit unterschiedlichen *F8*-Exons als Zielsequenzen konstruiert und eingesetzt.

Bei der Transduktion dieser verschiedenen Vektoren in HHSEC mittels rLV ist zu beachten, dass je höher die Transduktionseffizienz ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass in einer einzelnen HHSEC mehrere rLV gleichzeitig inseriert werden. Um diese Rate möglichst klein zu halten, verzichteten wir auf die in vielen Protokollen bei der Herstellung rLV beschriebene Aufkonzentrierung des virushaltigen ZÜ mittels Ultrazentrifuge. Ziel war es, durch die geringere Dichte der rLV-Partikel im ZÜ eine moderate Transduktionseffizienz zu erreichen und somit nahezu ausschließlich Einzelintegrationen der sgRNA/SaCas9-CRISPR-Vektoren-haltigen rLV in HHSEC zu erreichen. Die transduzierten Vektoren enthielten eine

Puromycin-Resistenzkassette, sodass nach der Transduktion eine gründliche Selektion mit Puromycin alle nicht-transduzierten Zellen eliminieren sollte.

Die ermittelte Transduktionseffizienz für die in dieser Arbeit hergestellten verschiedenen SaCas9-CRISPR-Vektoren betrug ca. 40% (siehe Anhang). Somit ist davon auszugehen, dass hauptsächlich Einzelintegration der Viruspartikel stattfanden. Die Selektion mit Puromycin erfolgte anschließend für fünf Tage. Die Puromycin-Todenskurve zeigte auf, dass bei der verwendeten Konzentration von 0,5 µg/mL bereits nach zwei Tagen nahezu alle HHSEC-WT starben. Demzufolge können nur die erfolgreich mit sgRNA/SaCas9-CRISPR-Vektoren transduzierten HHSECs eine Selektion mit 0,5 µg/mL Puromycin über fünf Tage, aufgrund ihrer nun enthaltenen Puromycinresistenz, überleben. Ebenso konnte gezeigt werden, dass alle mit den sgRNA/SaCas9-CRISPR-Vektoren stabil transduzierten HHSEC-F8-Mutations-Zelllinien nun konstitutiv Cas9 exprimierten.

Die einzelnen Sequenzierungsergebnisse der mit den fünf unterschiedlichen sgRNA/SaCas9-CRISPR-Vektoren stabil transduzierten HHSEC-F8-Mutations-Zelllinien zeigten, dass vier der fünf in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte genetische Veränderungen in HHSEC erzeugten. Nach dem erwarteten DSB sind in nahezu allen Zellpools, mit Ausnahme von HHSEC\_KO\_F8\_5, kontinuierliche Doppel- bzw. Mehrfachsignale zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass der DSB mittels des fehlerbehafteten NHEJ-Mechanismus repariert wurde und so Indels unterschiedlicher Größe generiert wurden. Auf diese Weise lässt sich die Veränderung der gesamten Nukleotidabfolge nach dem zu erwartendem DSB erklären. Allerdings wurden in den einzelnen Zellpools unterschiedliche Indel-Raten erreicht. So sind in den Zellpools HHSEC\_KO\_F8\_1 und HHSEC\_KO\_F8\_4 die Hauptsequenzen immer noch identisch mit den WT-Sequenzen und die Indel-Raten dieser beiden Zellpools liegen bei ca. 30-40%. In Zellpool HHSEC\_KO\_F8\_5 ist keine Indel-Generierung nach dem zu erwartendem DSB zu verzeichnen. Dagegen konnte im Zellpool HHSEC\_KO\_F8\_3 die beste Indel-Generierungsrate von über 80% erreicht werden. Zellpool HHSEC\_KO\_F8\_2 zeigt zu ca. 50% eine um 7bp-deletierte Sequenz mit einem *Frameshift* und zu 50% verschiedene andere Nukleotidabfolgen, worunter sich Zellen mit identischer Sequenz zur WT-Sequenz (ohne Mutationen) und Zellen mit Indels befinden können.

Eine Reparatur der erzeugten DSB mittels des mit hoher Präzision assoziierten, fehlerfreien HDR-Mechanismus erscheint sehr unwahrscheinlich, da der HDR-

Mechanismus deutlich langsamer abläuft als der NHEJ-Mechanismus<sup>96</sup> und zudem ein vollständig fehlerfrei reparierter DSB die erneute Zielsequenz des stabil in der Zelle vorhandenen sgRNA/SaCas9-CRISPRs darstellt, sodass es entsprechend zu einem erneuten DSB kommen müsste. Gründe für die unterschiedlichen Indel-Raten könnten vielmehr zum einen die erschwerte Zugänglichkeit der DNA für die SaCas9 innerhalb der CRISPR-Bindungssequenzen sein. Die Struktur von Chromosomen kann stark variieren, so können Nukleosomen unterschiedlich dicht gepackt sein<sup>125</sup> und dadurch die Zugänglichkeit der DNA und die damit einhergehende effiziente Bindung des CRISPR/SaCas9-Komplexen beeinflussen. Zudem kann eine instabile Hybridisierung der sgRNA an die Ziel-DNA-Sequenz die Effizienz der SaCas9 beeinflussen. Insbesondere ein höherer CG-Gehalt in der sgRNA führt zu stabileren RNA-DNA-Hybriden, allerdings auch zu einer größeren Tolerierbarkeit von Fehlpaarungen (*off-Targets*)<sup>126</sup>. Weiterhin ist eine entscheidende Limitierung des CRISPR/Cas9-Systems die Abhängigkeit von der PAM-Sequenz<sup>86</sup>. Wird die PAM-Sequenz nicht erkannt, so kann die SaCas9 auch keinen DSB erzeugen. Basierend auf der Arbeit von Ran et al. (2015) wurden in der vorliegenden Arbeit die sgRNAs jedes einzelnen CRISPR-Konstruktes mit einer Länge von 21 – 23 nt und NNGRRT als PAM-Sequenz konstruiert. Allerdings wird in der Arbeit von Ran et al. ebenfalls eine gute Spaltung der Ziel-DNA bei einem NNGRR-PAM beschrieben<sup>93</sup>. Die Berücksichtigung all dieser feinen Kriterien erschwerte das Design eines idealen SaCas9/sgRNA-CRISPR-Systems und vermag die unterschiedlichen Effizienzen der fünf getesteten Konstrukte zu erklären. Dennoch konnten vier dieser Konstrukte genetische Veränderungen in HHSEC erzeugen, wovon zwei sehr gute Ergebnisse erzielten. Korrelierend zu den Sequenzierungsergebnissen der HHSEC-F8-Mutations-Zelllinien konnten ebenfalls Verminderungen des FVIII-Proteins mittels mikroskopischer IF-Aufnahmen sowie der FVIII-Restaktivität mittels aPTT-basierter Messung nachgewiesen werden.

In den Zelllinien HHSEC\_KO\_F8\_1, HHSEC\_KO\_F8\_4 und HHSEC\_KO\_F8\_5 konnten zwar im Vergleich zu HHSEC\_KO\_F8\_NTC sowohl in den mikroskopischen IF-Aufnahmen eine geringe Reduktion von FVIII als auch in den FVIII:C-Messungen mittels aPTT-basierter Methode eine moderate Minderung der FVIII-Restaktivität gezeigt werden, jedoch jeweils ohne Signifikanz. Die Sequenzierung

des Zellpools HHSEC\_KO\_F8\_5 zeigte im ausgewählten Zielbereich des konstruierten sgRNA/SaCas-Konstruktes keine Hinweise auf eine Indel-Generierung nach dem erwarteten DSB, jedoch wurden mögliche *off-Target*-Ereignisse außerhalb dieses Bereiches bei der Sequenzierung nicht ermittelt. Möglicherweise konnte der sgRNA/SaCas9-Komplex in einigen Zellen dieses Zellpools außerhalb der ausgewählten Ziel-Sequenz binden und Indels generieren.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen gewonnen Erkenntnissen schließen, dass die Separierung der Zelllinien HHSEC\_KO\_F8\_1, HHSEC\_KO\_F8\_4 und insbesondere HHSEC\_KO\_F8\_5 in Einzelzellen, deren Expandierung in Hinblick auf ihrem in dieser Arbeit beobachteten sehr langsamen Wachstumsverhalten zur Generierung von Einzelklonen sowie die erneute genetische Analysierung jedes Einzelklones auf eine mögliche *F8*-Mutation, sehr viel Zeit und Aufwand in Anspruch nehmen würden ohne sich unseres erachtens nach, aufgrund der geringen Indel-Generierung, zu rentieren. Diese in der vorliegenden Arbeit gewonnen Beobachtungen führten zu dem Schluss, von einem weiteren Arbeiten mit diesen drei Zelllinien abzusehen.

Dagegen konnten in den beiden Zelllinien HHSEC\_KO\_F8\_2 und HHSEC\_KO\_F8\_3 signifikante Verminderungen von FVIII mittels IF-Aufnahmen sowie der FVIII-Restaktivität mittels aPTT-basierter Messung dargestellt werden. Die gemessene FVIII-Restaktivität lässt sich dadurch begründen, dass nach der Transduktion mit dem sgRNA/SaCas9-CRISPR-Konstrukt der gesamte Zellpool analysiert wurde. Die Reparatur des DSB erfolgt in jeder einzelnen Zelle unabhängig vom restlichen Zellverband, somit liegen in den Zellpools Zellen mit vielen unterschiedlichen Mutationsarten wie z. B. stille *in-frame*-Mutationen mit FVIII-Restaktivität oder *loss-of function* Mutationen mit einem vollständigem FVIII-*Knockout* nebeneinander vor. Die Separierung dieser beiden Zellpools in Einzelzellen, deren Expandierung und anschließend erneute Analysierung sind sehr zu empfehlen. Aus diesen beiden Zelllinien gezüchtete Einzelklone mit jeweils einer einheitlichen genetischen *F8*-Mutation liefern mit größter Wahrscheinlichkeit verschiedene HHSEC-FVIII-*Knockout*-Linien mit einer FVIII:C von weniger als 1%, welche als HA-Modell dienen können. Insbesondere die beobachtete 7bp-Deletion des Zellpools HHSEC\_KO\_F8\_2 mit einem erzielten *Framshift*-Effekt ist von großem Interesse. Der möglicherweise zugrundeliegende

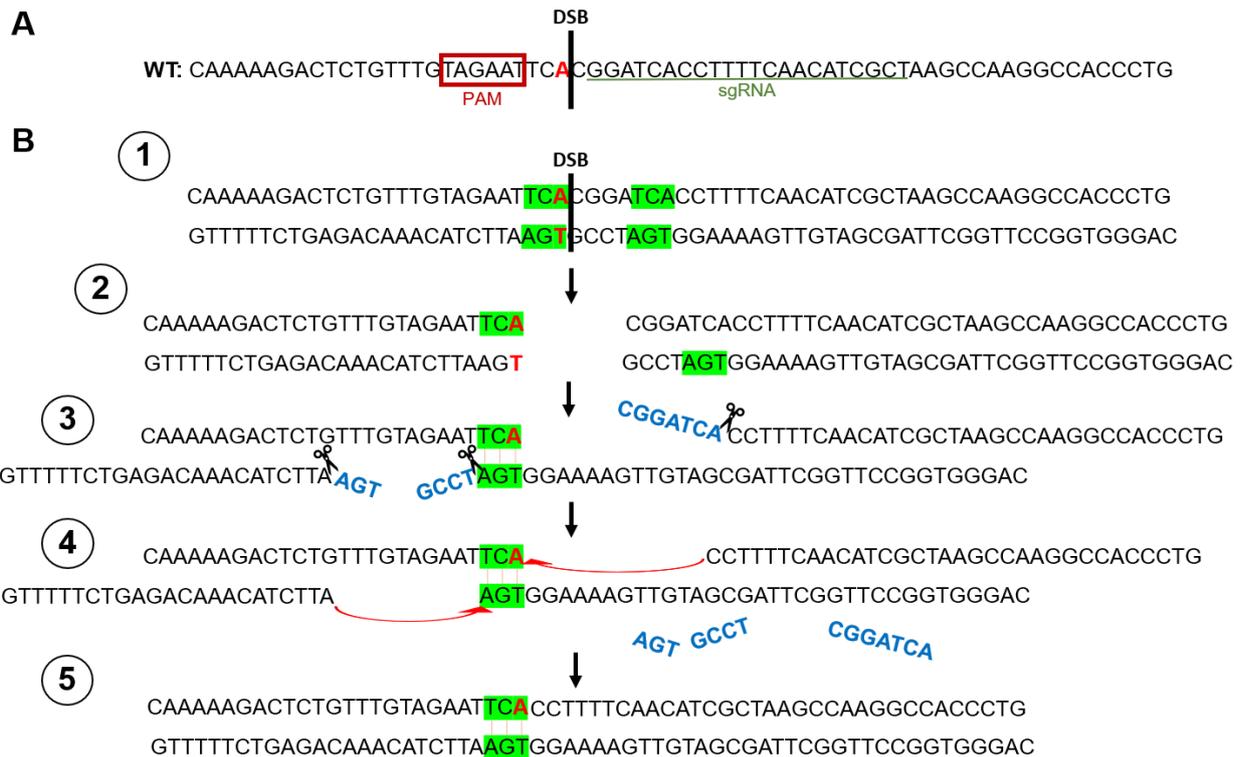
Mechanismus bei der Entstehung dieser 7bp-Deletion soll im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

#### 5.4 Vermuteter Mechanismus der 7bp-Deletion

Die meist angewendeten Reparaturmechanismen von DSB in Zellen sind NHEJ und HR, welche bereits in dieser Arbeit ausführlich eingeleitet wurden. Daneben ist seit jüngerer Zeit ein weiterer DNA-Reparaturmechanismus für DSB namens *Microhomology-mediated end joining* (MMEJ) bekannt. Wie McVey und Lee 2008 beschreiben, ist die wichtigste Voraussetzung von MMEJ die Verwendung einer kurzen, 5 – 25 bp langen homologen Sequenz als Ausgangspunkt der Strangreparatur. Nach Paarung der beiden komplementären homologen einzelsträngigen DNA-Bereiche zu einem doppelsträngigen Polynukleotid, werden die überstehenden Einzelstränge (*flaps*) durch die Nukleasefunktion des ERCC1-XPF-Komplexes entfernt. Die verbleibenden DNA-Bruchlücken werden durch Ligase I und Ligase IV geschlossen. Auf diese Weise können sehr große Deletionen auftreten, da der MMEJ-Mechanismus alle Sequenzen zwischen Bruchstelle und Mikrohomologie entfernt. Somit ist der MMEJ auch der fehleranfälligste Reparaturmechanismus von DSB<sup>127</sup>.

Betrachtet man in Zellpool HHSEC\_KO\_F8\_2 zunächst die WT-Sequenz, so stellt man fest, dass in unmittelbarer Nähe zum erwarteten DSB ein Sequenzbereich (TCA) zweifach vorkommt (grün markiert). Kommt es zum Annealing der homologen Sequenzen der in

Abb. 23B grün hervorgehobenen komplementären Sequenzbereichen mit Entfernung der blau markierten *flaps* und anschließender Ligierung der Bruchstücke, so resultiert ein um CGGATCA-deletierte Reparatur des DSB im *F8*-Gen. Dieser 7bp-lange Sequenzbereich entspricht exakt der in der Hauptsequenz des Sequenzierungsergebnis vom Zellpool HHSEC\_KO\_F8\_2 fehlenden Bereiches. Daher ist am ehesten davon auszugehen, dass der Reparaturmechanismus dieses in HHSEC\_KO\_F8\_2 erzeugten DSB auf den MMEJ-Mechanismus beruht.



**Abb. 23: Vermuteter MMEJ-Mechanismus der 7bp-Deletion in HHSEC\_KO\_F8\_2.**

(A) Dargestellt ist ein Sequenzbereich aus Exon 2 des *F8*-Gens. Der grün unterstrichene Bereich ist komplementär zu der in dieser Arbeit designten sgRNA des pLCv2-Sa-F8-2-Konstruktes. Die sgRNA dirigiert die SaCas9 zu diesem ausgewählten Sequenzbereiches des Exons 2. Im roten Kasten ist die PAM-Sequenz hervorgehoben. Der schwarze Balken drei Nukleotide vor der PAM demonstriert die Stelle, an der SaCas9 die DNA schneidet und ein Doppelstrangbruch (DSB) zu erwarten ist. (B) In Schritt 1 sind die beiden komplementären DNA-Stränge aus A dargestellt. In grün hervorgehoben sind die in unmittelbarer Nähe zum erwarteten DSB gelegenen homologen Sequenzbereiche. Kommt es zu einem DSB an der erwarteten Stelle, so kann dieser, basierend auf dem Microhomology-mediated end joining (MMEJ) Mechanismus, repariert werden, indem die beiden in Schritt 2 grün markierten komplementären DNA-Bereiche paaren. Die überstehenden Einzelstränge ("flaps" in blau) werden in Schritt 3 entfernt. Anschließend werden die verbleibenden Bruchlücken in Schritt 4 ligiert. Es resultiert eine 7-Basenpaar-Deletion mit *Frameshift*-Effekt im *F8*-Gen.

## 5.5 Auswirkungen der *F8*-Mutationen auf HHSEC

Die mikroskopischen IF-Aufnahmen der HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinien zeigen, dass der endogene FVIII in allen stabil transduzierten HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinien weiterhin anfärbbar ist. Korrelierend zu den gemessenen FVIII:C, ist die detektierte FVIII-Fluoreszenzintensität in den Zelllinien HHSEC\_KO\_F8\_2 und HHSEC\_KO\_F8\_3 mit den höchsten Indel-Generierungsraten signifikant geringer als in den anderen Zelllinien.

Weiterhin konnte bei der Kultivierung und der mikroskopischen Beobachtung dieser beiden Zelllinien eine optisch veränderte Zellmorphologie sowie ein langsames Zellwachstum verglichen mit den restlichen Zelllinien beobachtet werden. Mittels des MTT-Assay konnte tatsächlich ein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen Wildtypzellen und HHSEC\_KO\_F8\_2 sowie zwischen Wildtypzellen und HHSEC\_KO\_F8\_3 aufgezeigt werden. Die mittels MTT-Assay ermittelte metabolische Aktivität korreliert mit der Anzahl vitaler Zellen in einer Zellpopulation und erlaubt Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten dieser Population. Somit scheinen diese beiden *F8*-Mutationen enthaltenen Zelllinien mit reduzierter FVIII:C auf den ersten Blick einen Wachstumsnachteil aufzuweisen.

Es stellte sich zunächst die Frage, ob diese Ergebnisse möglicherweise auf eine zellregulierende Funktion des FVIII in Sinusoidalen Endothelzellen hinweist. Allerdings ist zu beachten, dass diese beiden stabil transduzierten Zelllinien mit gesunden, nicht transduzierten HHSEC\_WT verglichen wurden. Dieser Vergleich hat somit weniger Aussagekraft. Schließlich unterliegen die stabil transduzierten HHSECs durch den rLV-Gentransfer der großen sgRNA/SaCas9-CRISPR-Vektoren, deren stabiler Integration in das Zellgenom sowie deren konstitutiver Expression deutlich mehr Stressfaktoren als die nicht transduzierten WT-Zellen. Nicht zu vergessen sind weiterhin die Generierung von DSB innerhalb der DNA, die zum Einsatz kommenden zelleigenen Reparaturmechanismen sowie die Akkumulation fehlgefalteter FVIII-Proteine. All diese Aspekte führten zum raschen Verwerfen des initial postulierten Zusammenhangs zwischen der zellregulierenden FVIII-Funktion und dem Wachstumsnachteil.

Des Weiteren ist es interessant zu diskutieren, ob die eingeführten *F8*-Genmutationen in den stabil transduzierten HHSEC\_KO\_F8\_2- sowie HHSEC\_KO\_F8\_3-Zelllinien und damit einhergehenden Fehlfaltungen von FVIII im ER Einfluss auf die VWF-Expression aufweisen. Genmutationen können nämlich zur fehlerhaften Faltung von Proteinen führen, welche sich dann im ER ansammeln und zur sog. *Unfolded Protein Response* (UPR), einer Stressantwort der Zellen, führen. Ziel der UPR ist die Wiederherstellung der normalen Zellfunktion durch die selektive Unterdrückung von Translationsprozessen, den Abbau falsch gefalteter Proteine sowie durch die Aktivierung der verstärkten Synthese von Chaperonen, welche für eine fehlerfreien Proteinfaltung notwendig sind<sup>128</sup>. Allerdings scheint die VWF-

Expression in den stabil transduzierten und mit *F8*-Mutationen behafteten Linien HHSEC\_KO\_F8\_2 und HHSEC\_KO\_F8\_3 im Vergleich zu HHSEC\_KO\_F8\_NTC ohne *F8*-Mutationen unbeeinflusst zu bleiben. So zeigten die arithmetischen Mittelwerte der VWF-Fluoreszenzintensitäten in diesen Zelllinien keine signifikanten Unterschiede auf. Die unverändert fortgeführte Expression eines solch großen Proteins neben den fehlgefalteten FVIII-Proteinen in den stabil transduzierten HHSEC könnte den ER-Stress verstärken und so zu einem weiteren Wachstumsnachteil der transduzierten HHSEC-*F8*-Mutations-Linie führen.

Ferner lieferte die routinemäßige optische Beurteilung des morphologischen Erscheinungsbildes der HHSEC mittels Mikroskopie eine sehr interessante Erkenntnis. Morphologische Veränderungen der kultivierten Zellen sind oft die ersten Anzeichen für auftretende Stressreaktionen, wie ungleichmäßiges Wachstums- und Proliferationsverhalten, Zellveränderungen durch Transformation, plötzlicher Zelltod oder Seneszenz der Kultur<sup>107</sup>. Im Vergleich zu den anderen stabil transduzierten HHSECs zeigten insbesondere die beiden Linien HHSEC\_KO\_F8\_2 und HHSEC\_KO\_F8\_3 eine solche Veränderung der Zellmorphologie auf. Die optische Dichte dieser sonst langgestreckten, spindelförmigen HHSEC nahm in diesen beiden Zelllinien zu (rundlicheres Erscheinungsbild) und die Zellen schrumpften. Zudem waren im Kulturmedium deutlich mehr kleine membranumschlossene Abschnürungen zu sehen. Diese Beobachtungen entsprechen den distinkten morphologischen Veränderungen des Apoptoseprozesses in der Zellkultur<sup>107</sup>. Zwar erfolgte in dieser Arbeit keine direkte Nachweismethoden der Apoptose, doch auch die vorliegenden MTT-Assay-Ergebnisse korrelieren mit der Anzahl vitaler Zellen und zeigen ein Stagnieren im Wachstumsverhalten dieser Zelllinien.

Interessant ist diese Erkenntnis insofern, dass anzunehmen ist, dass *in vivo* ebenfalls die *F8*-Mutationen bei Hämophilen zur Akkumulation von fehlgefalteten FVIII im ER führen und demnach auch die Endothelzellen *in vivo* einer solchen ständigen Stressreaktion mit Veränderung der Zellmorphologie ausgesetzt sein müssen. Endothelzellen kleiden als einschichtige Plattenepithelzellen unter anderem Blut- und Lymphgefäße aus. Eines der wichtigsten Funktionen von Endothelzellen ist die Bildung dichter Barrieren mittels Zell-Zell-Interaktionen zwischen dem Blutgefäß und dem Extravasalraum<sup>129</sup>. Aktuelle Forschungsarbeiten

zeigen, dass die FVIII-Synthese in erster Linie und möglicherweise ausschließlich eine Endothelfunktion ist<sup>11</sup>. Langzeitstudien zum Verlauf der Hämophilie weisen darauf hin, dass trotz frühzeitig einsetzender regelmäßiger prophylaktischer FVIII-Substitution spontane Blutungsereignisse dennoch auftreten und die Entwicklung einer hämophilen Arthropathie nicht gänzlich verhindert werden kann<sup>130</sup>. Eine Veränderung der Endothelzellmorphologie, aufgrund zugrundeliegender *F8*-Mutationen und Akkumulation fehlgefalteter FVIII-Proteine bei Hämophilen, könnte die notwendigen Zell-Zell-Interaktionen zur Aufrechterhaltung der Unversehrtheit von Gefäßwänden behindern und zu Leckagen führen. Derartige „vorgeschädigte“ Gefäßwände könnten eine mögliche Erklärung für die vermehrten Blutungsereignisse in insbesondere mechanisch beanspruchten Regionen bei Hämophilie A-Betroffenen darstellen.

## 5.6 Ausblick

Die Gentherapie stellt im Gegensatz zu den bisherigen Therapieoptionen eine möglichst dauerhafte Anhebung des FVIII-Spiegels bis zur Normalisierung und damit Heilung der Hämophilie A in Aussicht. Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten wichtige Voraussetzungen für die Entwicklung einer CRISPR/Cas9-basierten HA-Gentherapiestrategie etabliert werden.

Als Grundlage unseres *in vitro* HA-Zellmodells dienten in dieser Arbeit die primären humanen hepatischen sinusoidalen Endothelzellen (HHSEC). Mittels stabiler Integration des Doxycyclin-induzierbaren LT-Onkogen konnte eine gut charakterisierte, immortale HHSEC\_LT-Zelllinie hergestellt werden, welche funktionales FVIII-Protein exprimiert. Weiterhin konnte aufgezeigt werden, dass die Immortalisierung in Abhängigkeit von Doxycyclin für weiterführende Experimente in der Zellkultur essenziell ist, um Stressreaktionen der HHSEC, aufgrund rascher Seneszenz und Apoptose, zu umgehen.

In Anlehnung an patientenspezifische *F8*-Mutationen mit *Frameshift*-Effekt wurden fünf verschiedene SaCas9/sgRNA-CRISPR-Expressionsvektoren konstruiert und erfolgreich mittels rLV-Gentransfer in die immortalisierten HHSEC zur Herstellung von HHSEC-*F8*-Mutations-Zelllinien transduziert. Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung der stabil transduzierten HHSEC-*F8*-Mutations-

Zelllinien ermöglichte das Erlernen des Umganges mit der SaCas9/sgRNA-CRISPR-Methode und die Ermittlung ihrer Effizienz in HHSEC.

In Zusammenschau aller vorliegenden Erkenntnissen empfehlen wir für weiterführende Arbeiten im Rahmen dieses HA-GT-Projektes die transiente Transduktion ausschließlich der beiden Konstrukte pLCv2-Sa-F8-2 und pLCv2-Sa-F8-3 mittels IDLVs, deren Separierung in Einzelzellen und Expansion sowie erneute Analyse. Auf diese Weise können mit großer Wahrscheinlichkeit HA-Zelllinien mit jeweils einheitlichen genetischen *F8*-Mutationen ohne die konstitutive SaCas9-Expression gewonnen werden, an welchen wiederum die SaCas9-CRISPR-vermittelte Genreparatur mittels rAAV getestet werden kann. Mithilfe der in dieser vorliegenden Arbeit etablierten FVIII-Detektionsmethoden, der IF-Mikroskopie und der aPTT-basierten FVIII-Aktivitätsmessung, kann anschließend eine einfache Validierung der GT-Strategie erfolgen.

Weiterhin konnte bei der Beurteilung des morphologischen Erscheinungsbildes der stabil transduzierten HHSECs eine optisch veränderte Zellmorphologie sowie ein Wachstumsnachteil innerhalb der beiden Zellpools mit den höchsten Indel-Generierungsraten und der am stärksten verminderten FVIII:C beobachtet werden, am ehesten aufgrund der erhöhten Stressreaktion dieser Zellen bei fehlgefalteten, akkumulierenden FVIII-Proteinen. Die vorliegenden Beobachtungen lassen auch eine Veränderung der Endothelzellmorphologie *in vivo* aus denselben Gründen erwarten. Eine solche möglicherweise im menschlichen Organismus vorliegende „Vorschädigung“ der Gefäßwände bei HA-Patienten führt zur Formulierung neuer Annahmen im Grundverständnis der Erkrankung. Handelt es sich bei der Hämophilie A nicht nur um eine Gerinnungsstörung, sondern auch um eine vaskuläre Erkrankung? Die Untersuchung dieser postulierten Hypothese eröffnet vielversprechende, neuartige Optionen in der Hämophilie-Geschichte und den Therapiemöglichkeiten.

## Referenzen

1. Pötzsch B, Gawaz MP. *Hämostaseologie*. 2nd ed. Berlin: Springer; 2010.
2. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(6):958–965.
3. McMichael M. New models of hemostasis. *Top Companion Anim Med*. 2012;27(2):40–45. doi:10.1053/j.tcam.2012.07.005.
4. Philippou H, Rance J, Myles T, et al. Roles of low specificity and cofactor interaction sites on thrombin during factor XIII activation. Competition for cofactor sites on thrombin determines its fate. *J Biol Chem*. 2003;278(34):32020–32026. doi:10.1074/jbc.M305364200.
5. Tuddenham EG, Trabold NC, Collins JA, Hoyer LW. The properties of factor VIII coagulant activity prepared by immunoadsorbent chromatography. *J Lab Clin Med*. 1979;93(1):40–53.
6. Bontempo FA, Lewis JH, Gorenc TJ, et al. Liver Transplantation in Hemophilia A. *Blood*. 1987;69(6):1721–1724.
7. Madeira CL, Layman ME, Vera RE de, Fontes PA, Ragni MV. Extrahepatic factor VIII production in transplant recipient of hemophilia donor liver. *Blood*. 2009;113(21):5364–5365. doi:10.1182/blood-2009-02-206979.
8. Lamont PA, Ragni MV. Lack of desmopressin (DDAVP) response in men with hemophilia A following liver transplantation. *J Thromb Haemost*. 2005;3(10):2259–2263. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01553.x.
9. Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EG, Lawn RM. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature*. 1985;317(6039):726–729.
10. Shahani T, Covens K, Lavend'homme R, et al. Human liver sinusoidal endothelial cells but not hepatocytes contain factor VIII. *J Thromb Haemost*. 2014;12(1):36–42. doi:10.1111/jth.12412.
11. Fahs SA, Hille MT, Shi Q, Weiler H, Montgomery RR. A conditional knock-out mouse model reveals endothelial cells as the principal and possibly exclusive source of plasma factor VIII. *Blood*. 2014;123(24):3706–3713. doi:10.1182/blood-2014-02-555151.
12. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*. 1984;312(5992):326–330.

13. Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G, Gitschier J. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics*. 1990;7(1):1–11. doi:10.1016/0888-7543(90)90512-S.
14. Levinson B, Kenwrick S, Gamel P, Fisher K, Gitschier J. Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene. *Genomics*. 1992;14(3):585–589. doi:10.1016/S0888-7543(05)80155-7.
15. Oldenburg J, El-Maarri O. New insight into the molecular basis of hemophilia A. *Int J Hematol*. 2006;83(2):96–102. doi:10.1532/IJH97.06012.
16. Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *MP, Mol Pathol*. 2002;55(2):127–144. doi:10.1136/mp.55.2.127.
17. Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature*. 1984;312(5992):342–347.
18. Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, et al. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature*. 1984;312(5992):330–337.
19. Vehar GA, Keyt B, Eaton D, et al. Structure of human factor VIII. *Nature*. 1984;312(5992):337–342.
20. Kaufman RJ, Wasley LC, Dorner AJ. Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem*. 1988;263(13):6352–6362.
21. Michnick DA, Pittman DD, Wise RJ, Kaufman RJ. Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage. *J. Biol. Chem*. 1994;269(31):20095–20102.
22. HAMER RJ, KOEDAM JA, BEESER-VISSER NH, SIXMA JJ, BERTINA RM, MOURIK JA. Factor VIII binds to von Willebrand factor via its Mr-80000 light chain. *Eur J Biochem*. 1987;166(1):37–43. doi:10.1111/j.1432-1033.1987.tb13480.x.
23. Andersson LO, Brown JE. Interaction of factor VIII-von Willebrand Factor with phospholipid vesicles. *Biochem. J*. 1981;200(1):161–167. doi:10.1042/bj2000161.
24. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*. 1998;92(11):3983–3996.
25. Tuddenham EG, Lane RS, Rotblat F, et al. Response to infusions of poly-electrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human hemophilia A and von Willebrand's disease. *Br J Haematol*. 1982;52(2):259–267.

26. Newell JL, Fay PJ. Proteolysis at Arg740 facilitates subsequent bond cleavages during thrombin-catalyzed activation of factor VIII. *J Biol Chem.* 2007;282(35):25367–25375. doi:10.1074/jbc.M703433200.
27. Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry.* 1986;25(2):505–512.
28. Saenko EL, Scandella D. The Acidic Region of the Factor VIII Light Chain and the C2 Domain Together Form the High Affinity Binding Site for von Willebrand Factor. *J. Biol. Chem.* 1997;272(29):18007–18014. doi:10.1074/jbc.272.29.18007.
29. Fay PJ, Matri M, Koszelak ME, Wakabayashi H. Cleavage of factor VIII heavy chain is required for the functional interaction of  $\alpha_2$  subunit with factor IXA. *J. Biol. Chem.* 2001;276(15):12434–12439. doi:10.1074/jbc.M009539200.
30. Mathur A, Zhong D, Sabharwal AK, Smith KJ, Bajaj SP. Interaction of factor IXa with factor VIIIa. Effects of protease domain  $\text{Ca}^{2+}$  binding site, proteolysis in the autolysis loop, phospholipid, and factor X. *J. Biol. Chem.* 1997;272(37):23418–23426.
31. Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood.* 1990;76(1):1–16.
32. Rawala-Sheikh R, Ahmad SS, Ashby B, Walsh PN. Kinetics of coagulation factor X activation by platelet-bound factor IXa. *Biochemistry.* 1990;29(10):2606–2611.
33. Varfaj F, Neuberg J, Jenkins PV, Wakabayashi H, Fay PJ. Role of P1 residues Arg336 and Arg562 in the activated-Protein-C-catalysed inactivation of Factor VIIIa. *Biochem J.* 2006;396(2):355–362. doi:10.1042/BJ20060117.
34. Nogami K, Wakabayashi H, Fay PJ. Mechanisms of factor Xa-catalyzed cleavage of the factor VIIIa A1 subunit resulting in cofactor inactivation. *J. Biol. Chem.* 2003;278(19):16502–16509. doi:10.1074/jbc.M213044200.
35. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet.* 1993;5(3):236–241. doi:10.1038/ng1193-236.

36. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*. 2002;99(1):168–174.
37. Higuchi M, Antonarakis SE, Kasch L, et al. Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(19):8307–8311.
38. Millar DS, Steinbrecher RA, Wieland K, et al. The molecular genetic analysis of haemophilia A; characterization of six partial deletions in the factor VIII gene. *Hum Genet*. 1990;86(2):219–227.
39. Tuddenham EG, Cooper DN, Gitschier J, et al. Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(18):4821–4833.
40. Becker J, Schwaab R, Möller-Taube A, et al. Characterization of the factor VIII defect in 147 patients with sporadic hemophilia A: family studies indicate a mutation type-dependent sex ratio of mutation frequencies. *Am J Hum Genet*. 1996;58(4):657–670.
41. Factor VIII Variant Database. <http://www.factorviii-db.org/>. Accessed November 28, 2019.
42. Stonebraker JS, Bolton-Maggs PHB, Soucie JM, Walker I, Brooker M. A study of variations in the reported haemophilia A prevalence around the world. *Haemophilia*. 2010;16(1):20–32. doi:10.1111/j.1365-2516.2009.02127.x.
43. Miesbach W., Müller M. M., Geisen C., Seifried E. Die „Krankheit der Könige“ verstehen und behandeln. Am Frankfurter Hämophilie-Zentrum sind Forschung und Therapie eng verzahnt. *Forschung Frankfurt*. 2010:54–58.
44. White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(3):560.
45. Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*. 2013;19(1):e1-47. doi:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x.



57. Nathwani AC, Gray JT, McIntosh J, et al. Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates. *Blood*. 2007;109(4):1414–1421. doi:10.1182/blood-2006-03-010181.
58. Nathwani AC, Gray JT, Ng CYC, et al. Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood*. 2006;107(7):2653–2661. doi:10.1182/blood-2005-10-4035.
59. Nathwani AC, Tuddenham EGD, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2011;365(25):2357–2365. doi:10.1056/NEJMoa1108046.
60. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EGD, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2014;371(21):1994–2004. doi:10.1056/NEJMoa1407309.
61. George LA, Sullivan SK, Giermasz A, et al. Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant. *N Engl J Med*. 2017;377(23):2215–2227. doi:10.1056/NEJMoa1708538.
62. Miesbach W, Meijer K, Coppens M, et al. Gene therapy with adeno-associated virus vector 5-human factor IX in adults with hemophilia B. *Blood*. 2018;131(9):1022–1031. doi:10.1182/blood-2017-09-804419.
63. McIntosh J, Lenting PJ, Rosales C, et al. Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. *Blood*. 2013;121(17):3335–3344. doi:10.1182/blood-2012-10-462200.
64. Matsui H, Fujimoto N, Sasakawa N, et al. Delivery of full-length factor VIII using a piggyBac transposon vector to correct a mouse model of hemophilia A. *PLoS ONE*. 2014;9(8):e104957. doi:10.1371/journal.pone.0104957.
65. Rangarajan S, Walsh L, Lester W, et al. AAV5-Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2519–2530. doi:10.1056/NEJMoa1708483.
66. Gardlík R, Pálffy R, Hodosy J, Lukács J, Turna J, Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit*. 2005;11(4):RA110-21.

67. Christ M, Lusky M, Stoeckel F, et al. Gene therapy with recombinant adeno-virus vectors: evaluation of the host immune response. *Immunol Lett.* 1997;57(1-3):19–25. doi:10.1016/s0165-2478(97)00049-7.
68. Fischer A, Hacein-Bey Abina S, Touzot F, Cavazzana M. Gene therapy for primary immunodeficiencies. *Clin Genet.* 2015;88(6):507–515. doi:10.1111/cge.12576.
69. Maetzig T, Galla M, Baum C, Schambach A. Gammaretroviral vectors: biology, technology and application. *Viruses.* 2011;3(6):677–713. doi:10.3390/v3060677.
70. Delenda C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med.* 2004;6 Suppl 1:S125-38. doi:10.1002/jgm.501.
71. Naldini L, Blömer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 1996;272(5259):263–267. doi:10.1126/science.272.5259.263.
72. Lewinski MK, Yamashita M, Emerman M, et al. Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Pathog.* 2006;2(6):e60. doi:10.1371/journal.ppat.0020060.
73. Wanisch K, Yáñez-Muñoz RJ. Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age. *Mol Ther.* 2009;17(8):1316–1332. doi:10.1038/mt.2009.122.
74. Deyle DR, Russell DW. Adeno-associated virus vector integration. *Curr Opin Mol Ther.* 2009;11(4):442–447.
75. Silva G, Poirot L, Galetto R, et al. Meganucleases and Other Tools for Targeted Genome Engineering: Perspectives and Challenges for Gene Therapy. *Curr Gene Ther.* 2011;11(1):11–27. doi:10.2174/156652311794520111.
76. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):636–646. doi:10.1038/nrg2842.
77. Reyon D, Maeder ML, Khayter C, et al. Engineering Customized TALE Nucleases (TALENs) and TALE Transcription Factors by Fast Ligation-based Automatable Solid-phase High-throughput (FLASH) Assembly. *Curr Protoc Mol Biol.* 2013;0 12:Unit-12.16. doi:10.1002/0471142727.mb1216s103.

78. Osborn MJ, Belanto JJ, Tolar J, Voytas DF. Gene editing and its application for hematological diseases. *Int J Hematol*. 2016;104(1):18–28. doi:10.1007/s12185-016-2017-z.
79. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169(12):5429–5433. doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.
80. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315(5819):1709–1712. doi:10.1126/science.1138140.
81. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W52-7. doi:10.1093/nar/gkm360.
82. Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*. 2002;43(6):1565–1575. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
83. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*. 2005;1(6):e60. doi:10.1371/journal.pcbi.0010060.
84. Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. 2008;321(5891):960–964. doi:10.1126/science.1159689.
85. Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010;468(7320):67–71. doi:10.1038/nature09523.
86. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2009;155(Pt 3):733–740. doi:10.1099/mic.0.023960-0.
87. van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(7):479–492. doi:10.1038/nrmicro3279.

88. Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, Zhou K, Doudna JA. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*. 2010;329(5997):1355–1358. doi:10.1126/science.1192272.
89. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*. 2008;322(5909):1843–1845. doi:10.1126/science.1165771.
90. Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(21):9275–9282. doi:10.1093/nar/gkr606.
91. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011;471(7340):602–607. doi:10.1038/nature09886.
92. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. 2013;31(9):827–832. doi:10.1038/nbt.2647.
93. Ran FA, Le Cong, Yan WX, et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 2015;520(7546):186–191. doi:10.1038/nature14299.
94. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816–821. doi:10.1126/science.1225829.
95. Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the non-homologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:181–211. doi:10.1146/annurev.biochem.052308.093131.
96. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:229–257. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255.
97. Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol*. 2003;23(16):5706–5715. doi:10.1128/mcb.23.16.5706-5715.2003.
98. Hart T, Chandrashekhar M, Aregger M, et al. High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities. *Cell*. 2015;163(6):1515–1526. doi:10.1016/j.cell.2015.11.015.

99. Tzelepis K, Koike-Yusa H, Braekeleer E de, et al. A CRISPR Dropout Screen Identifies Genetic Vulnerabilities and Therapeutic Targets in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Rep.* 2016;17(4):1193–1205. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.079.
100. Wang T, Yu H, Hughes NW, et al. Gene Essentiality Profiling Reveals Gene Networks and Synthetic Lethal Interactions with Oncogenic Ras. *Cell.* 2017;168(5):890-903.e15. doi:10.1016/j.cell.2017.01.013.
101. Sürün D, Schwäble J, Tomasovic A, et al. High Efficiency Gene Correction in Hematopoietic Cells by Donor-Template-Free CRISPR/Cas9 Genome Editing. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018;10:1–8. doi:10.1016/j.omtn.2017.11.001.
102. Cheng J, DeCaprio JA, Fluck MM, Schaffhausen BS. Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Semin Cancer Biol.* 2009;19(4):218–228. doi:10.1016/j.semcancer.2009.03.002.
103. Zhu JY, Abate M, Rice PW, Cole CN. The ability of simian virus 40 large T antigen to immortalize primary mouse embryo fibroblasts cosegregates with its ability to bind to p53. *J Virol.* 1991;65(12):6872–6880. doi:10.1128/JVI.65.12.6872-6880.1991.
104. Huang E, Bi Y, Jiang W, et al. Conditionally Immortalized Mouse Embryonic Fibroblasts Retain Proliferative Activity without Compromising Multipotent Differentiation Potential. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e32428. doi:10.1371/journal.pone.0032428.
105. Li M, Chen Y, Bi Y, et al. Establishment and Characterization of the Reversibly Immortalized Mouse Fetal Heart Progenitors. *Int. J. Med. Sci.* 2013;10(8):1035–1046. doi:10.7150/ijms.6639.
106. Wang N, Zhang W, Cui J, et al. The piggyBac transposon-mediated expression of SV40 T antigen efficiently immortalizes mouse embryonic fibroblasts (MEFs). *PLoS ONE.* 2014;9(5):e97316. doi:10.1371/journal.pone.0097316.
107. Gstraunthaler G, Lindl T. *Zell- und Gewebekultur.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
108. Pavlova A, Brondke H, Müsebeck J, Pollmann H, Srivastava A, Oldenburg J. Molecular mechanisms underlying hemophilia A phenotype in seven

- females. *J Thromb Haemost.* 2009;7(6):976–982. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03346.x.
109. David D, Morais S, Ventura C, Campos M. Female haemophilic homozygous for the factor VIII intron 22 inversion mutation, with transcriptional inactivation of one of the factor VIII alleles. *Haemophilia.* 2003;9(1):125–130. doi:10.1046/j.1365-2516.2003.00704.x.
110. Cai X-H, Wang X-F, Dai J, et al. Female hemophilia A heterozygous for a de novo frameshift and a novel missense mutation of factor VIII. *J Thromb Haemost.* 2006;4(9):1969–1974. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02105.x.
111. Favier R, Lavergne JM, Costa JM, et al. Unbalanced X-chromosome inactivation with a novel FVIII gene mutation resulting in severe hemophilia A in a female. *Blood.* 2000;96(13):4373–4375.
112. Panarello C, Acquila M, Caprino D, Gimelli G, Pecorara M, Mori PG. Concomitant Turner syndrome and hemophilia A in a female with an idic(X)(p11) heterozygous at locus DXS52. *Cytogenet Cell Genet.* 1992;59(4):241–242. doi:10.1159/000133259.
113. LYON MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* 1961;190:372–373. doi:10.1038/190372a0.
114. Heard E, Distèche CM. Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Genes Dev.* 2006;20(14):1848–1867. doi:10.1101/gad.1422906.
115. Pillai-Kastoori L, Schutz-Geschwender AR, Harford JA. A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Anal Biochem.* 2020;593:113608. doi:10.1016/j.ab.2020.113608.
116. Eaton SL, Hurtado ML, Oldknow KJ, et al. A guide to modern quantitative fluorescent western blotting with troubleshooting strategies. *J Vis Exp.* 2014(93):e52099. doi:10.3791/52099.
117. Oh SH, Kim HW, Kim YJ. Structure of heavy and light chains of blood coagulation factor VIII (FVIII) involved in the activation of FVIII. *Exp Mol Med.* 1997;29(2):97–102. doi:10.1038/emm.1997.14.
118. Wakabayashi H, Griffiths AE, Fay PJ. Factor VIII lacking the C2 domain retains cofactor activity in vitro. *J. Biol. Chem.* 2010;285(33):25176–25184. doi:10.1074/jbc.M110.106906.

119. Choi SJ, Jang KJ, Lim J-A, Kim HS. Human coagulation factor VIII domain-specific recombinant polypeptide expression. *Blood Res.* 2015;50(2):103–108. doi:10.5045/br.2015.50.2.103.
120. Schmitt C, Oldenburg J, Haack A, Poller W, Brackmann HH, Schwaab R. Ein neuer, hochsensitiver „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) zur Quantifizierung des Faktor VIII-Antigens und sein Einsatz in der Patientendiagnostik. In: Scharrer I, Schramm W, eds. *27. Hämophilie-Symposium Hamburg 1996*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1998:303–305.
121. Bowyer A, Kitchen S, Makris M. The responsiveness of different APTT reagents to mild factor VIII, IX and XI deficiencies. *Int J Lab Hematol.* 2011;33(2):154–158. doi:10.1111/j.1751-553X.2010.01261.x.
122. Dunst S, Tomancak P. Imaging Flies by Fluorescence Microscopy: Principles, Technologies, and Applications. *Genetics.* 2019;211(1):15–34. doi:10.1534/genetics.118.300227.
123. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:299–311. doi:10.1007/978-1-4939-8935-5\_26.
124. Le Cong, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science.* 2013;339(6121):819–823. doi:10.1126/science.1231143.
125. Richmond TJ, Davey CA. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature.* 2003;423(6936):145–150. doi:10.1038/nature01595.
126. Lin Y, Cradick TJ, Brown MT, et al. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(11):7473–7485. doi:10.1093/nar/gku402.
127. McVey M, Lee SE. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.* 2008;24(11):529–538. doi:10.1016/j.tig.2008.08.007.
128. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(2):89–102. doi:10.1038/nrm3270.

129. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(4):261–270. doi:10.1038/nrm1357.
130. Mazepa MA, Monahan PE, Baker JR, Riske BK, Soucie JM. Men with severe hemophilia in the United States: birth cohort analysis of a large national database. *Blood.* 2016;127(24):3073–3081. doi:10.1182/blood-2015-10-675140.

# Anhang

## 1 cDNA des F8-Gens

GATAAAAAGGAAGCAATCCTATCGTTACTGCTTAGTGCTGAGCACATCCAGTGGGTAAAG<sup>Exon 14</sup>  
TTCCTTAAATGCTCTGCAAAGAAATTGGGACTTTTCATTAAATCAGAAATTTTACTTTTTTC<sup>Exon 14</sup>  
CCCTCCTGGGAGCTAAAGATATTTAGAGAAGAATTAACCTTTTGCTTCTCCAGTTGAACAT<sup>Exon 1</sup>  
TTGTAGCAATAAGTCatgcaaatagagctctccacctgctctttctgtgccttttgcgattctgcttttagtccaccagaagatac<sup>Exon 1</sup>  
TacttgggtgcagtggaactgcatggactatatgcaaagtgatCtcggtgagctgctgtggacgcaag<sup>Exon 2</sup> atttctctctagagtgc<sup>Exon 2</sup>  
caaaatcttttccattcaaacacctcagctgtgtaaaaaagactctgtttgtagaattcacggA<sup>Exon 2</sup>tcacctttcaacatcgctaagccaag<sup>Exon 2</sup>  
gccaccctggatgg<sup>Exon 2</sup>gtctGctagctctacc<sup>Exon 3</sup>atccaggctgaggtttatgatacagtggtcattacacttaagaacatggcttccc<sup>Exon 3</sup>atcc<sup>Exon 3</sup>  
gtcagctctcatgctgttggtgatccta<sup>Exon 3</sup>ctggaaagcttctgagg<sup>Exon 4</sup>gagctgaat<sup>Exon 4</sup>atgatgatcagaccagtc<sup>Exon 4</sup>aaaggagaaagaa<sup>Exon 4</sup>  
gatgataaagtctccC<sup>Exon 4</sup>tggtggaagccatacatatgtctggcaggctgtaa<sup>Exon 4</sup>gagaat<sup>Exon 4</sup>ggccaatggcctctg<sup>Exon 5</sup>accac<sup>Exon 5</sup>tgtgcct<sup>Exon 5</sup>  
tacct<sup>Exon 4</sup>actcat<sup>Exon 4</sup>atctttctcatgtggacctgtaaaagactgaa<sup>Exon 4</sup>attcaggcctcattggagccctactagatgtagagaag<sup>Exon 5</sup> ggagtc<sup>Exon 5</sup>  
tgccaaggaaaagacacagacctgcaaaaattatactacttttctgtattt<sup>Exon 6</sup>gatgaag<sup>Exon 6</sup> ggaaaagtggc<sup>Exon 6</sup>actcag<sup>Exon 6</sup>aaacaaa<sup>Exon 6</sup>  
gaactcct<sup>Exon 6</sup>gat<sup>Exon 6</sup>caggatagggat<sup>Exon 6</sup>gctgcatc<sup>Exon 6</sup>T<sup>Exon 6</sup>gctcggcctggcctaaaatgcacacagtcaatggtatgtaaacaggctctg<sup>Exon 6</sup>  
ccag<sup>Exon 7</sup>gtctgat<sup>Exon 7</sup>ggat<sup>Exon 7</sup>gccacaggaaatcagctattggcatgtgat<sup>Exon 7</sup>ggaatgggacc<sup>Exon 7</sup>actcct<sup>Exon 7</sup>gaagtgc<sup>Exon 7</sup>actcaat<sup>Exon 7</sup>tattcctcga<sup>Exon 7</sup>  
aggtcacacatttctgtgaggaacctcgcagcgtccttggA<sup>Exon 7</sup>atctcgcaataacttcttactgctcaaac<sup>Exon 7</sup>actctt<sup>Exon 7</sup>gatggac<sup>Exon 7</sup>  
ctggacagtttctactgtttgtcatatctctccaccaacatg<sup>Exon 7</sup> atggcatggaagcttatgcaaaagtagacagctgtccagaggaac<sup>Exon 8</sup>  
ccca<sup>Exon 8</sup>actacgaa<sup>Exon 8</sup>tgaaaaaataatgaagaagcggaaagactatgatgatcttactgattctg<sup>Exon 8</sup>aaatggat<sup>Exon 8</sup>gtggtcaggttt<sup>Exon 8</sup>gatgat<sup>Exon 8</sup>  
gacaactctc<sup>Exon 8</sup>cttctttatccaa<sup>Exon 8</sup>attcgc<sup>Exon 8</sup>tca<sup>Exon 8</sup>G<sup>Exon 8</sup>tggcaagaagcatccta<sup>Exon 8</sup>aaact<sup>Exon 8</sup>gggt<sup>Exon 8</sup>acattacattgctgctgaagaggaggac<sup>Exon 8</sup>  
tggactatgctcccttagctctcgcctccgatgacag<sup>Exon 8</sup> aagtataaaagtcaatattgacaatggcctca<sup>Exon 9</sup>g<sup>Exon 9</sup>cgga<sup>Exon 9</sup>t<sup>Exon 9</sup>ggttaggaa<sup>Exon 9</sup>  
gtacaaaaaagtccgattatgacatacacagatgaaaccttaag<sup>Exon 9</sup>actcgt<sup>Exon 9</sup>gaagct<sup>Exon 9</sup>attcag<sup>Exon 9</sup>catgaat<sup>Exon 9</sup>aggaat<sup>Exon 9</sup>cttgggacctt<sup>Exon 9</sup>  
actttatgggaagt<sup>Exon 9</sup>ggagacacactgtt<sup>Exon 10</sup> attatatta<sup>Exon 10</sup>aagaat<sup>Exon 10</sup>caagcaagcagaccatataacatcta<sup>Exon 10</sup>C<sup>Exon 10</sup>cctca<sup>Exon 10</sup>c<sup>Exon 10</sup>ggaat<sup>Exon 10</sup>act<sup>Exon 10</sup>  
gatgtccgtcctt<sup>Exon 10</sup>g<sup>Exon 10</sup>attca<sup>Exon 10</sup>aggagattacaaaag<sup>Exon 11</sup> gtgtaaaacatt<sup>Exon 11</sup>g<sup>Exon 11</sup>aaggat<sup>Exon 11</sup>tttcca<sup>Exon 11</sup>attctg<sup>Exon 11</sup>ccaggagaaat<sup>Exon 11</sup>attcaaatata<sup>Exon 11</sup>  
aatggacagt<sup>Exon 11</sup>gactgtagaagatgggccaactaaatcag<sup>Exon 11</sup>atcctc<sup>Exon 11</sup>gg<sup>Exon 11</sup>gctc<sup>Exon 11</sup>g<sup>Exon 11</sup>accg<sup>Exon 11</sup>ctatt<sup>Exon 11</sup>actcta<sup>Exon 11</sup>gtttcgtaaatatggagaga<sup>Exon 11</sup>  
gatctagctcagg<sup>Exon 11</sup>actcat<sup>Exon 11</sup>ggcctctcctcatctgctaca<sup>Exon 11</sup>aagaat<sup>Exon 11</sup>ctgtagatcaaaagaggaaaccag<sup>Exon 12</sup> ataatgtca<sup>Exon 12</sup>GACAA<sup>Exon 12</sup>  
GAGG<sup>Exon 12</sup>aatgtcatcct<sup>Exon 12</sup>gtttctgtattgatgagaaccgaagctggtacctcaca<sup>Exon 12</sup>gagaat<sup>Exon 12</sup>atacaa<sup>Exon 12</sup>CGC<sup>Exon 12</sup>tttcccccaatccagct<sup>Exon 12</sup>  
ggagt<sup>Exon 12</sup>gcagct<sup>Exon 12</sup>gaggatccag<sup>Exon 12</sup>agttccaagcctccaacatcatgcaca<sup>Exon 13</sup> gcatcaatggctatgtttt<sup>Exon 13</sup>gatagttg<sup>Exon 13</sup>cagttg<sup>Exon 13</sup>cagttt<sup>Exon 13</sup>  
gtttgcatgagg<sup>Exon 13</sup>ggcatactgg<sup>Exon 13</sup>tac<sup>Exon 13</sup>attcta<sup>Exon 13</sup>agcattggagcacagactgacttcttctgtcttctct<sup>Exon 13</sup>ctggat<sup>Exon 13</sup>atacctcaaacacaa<sup>Exon 13</sup>  
aatggtctatgaagacac<sup>Exon 13</sup>actcac<sup>Exon 13</sup>cctattccattct<sup>Exon 13</sup>aggagaaactgtcttcatgtcgtgga<sup>Exon 14</sup>aaa<sup>Exon 14</sup>accag<sup>Exon 14</sup> gtctatggattct<sup>Exon 14</sup>ggg<sup>Exon 14</sup>  
gtgccacaactcag<sup>Exon 14</sup>actttcggaacagaggcatgaccgcctactgaaggttctagttgtgacaagaacactggtgattattacgagg<sup>Exon 14</sup>

Exon 14  
acagttatgaagatatttcagcactctgctgagtaaaaacaatgccattgaaccaagaagcttctccagaattcaagacaccctagc

Exon 14  
actaggcaaaagcaatttaagccaccacaattccagaaaatgacatagagaagactgacccctggTttgcacacagaacacctat

Exon 14  
gcctaaaatacaaaatgtctcctctagtgatttggatgctcttgcgacagagtcctactccacatgggctatccttatctgatctccaaga

Exon 14  
agccaaatagagacttttctgatgatccatcacctggagcaatagacagtaataacagcctgtctgaaatgacacacttcaggccac

Exon 14  
agctccatcacagtgaggacatggtattaccctgagtcaggcctccaattaagattaaatgagaaaactggggacaactgcagcaa

Exon 14  
cagagttgaagaaactgattcaaagttctagtacatcaaataatctgattcaacaattccatcagacaattggcagcaggtactgat

Exon 14  
aatacaggtcccttaggacccccaaatgatgccagttcattatgatgtaattagataccactctattggcaaaaagtcatctccccttac

Exon 14  
tgagtctggtggacctctgagcttgagtgaaagaaaataatgattcaagttgtagaatcaggttaatgaatagccaagaaagttcatg

Exon 14  
gggaaaaaatgtatcgtcaacagagagtggtaggtatttaaagggaaaagagctcatggacctgcttggtagtaaaagataatgcc

Exon 14  
ttattcaagtttagcatctcttggtaaagacaaaacttccaataattcagcaactaatagaagactcacattgatggccatcat

Exon 14  
tattaattgagaatagttccatcagctggcaaaatattagaaagtgacactgagtttaaaaaagtgacaccttggattcatgacAGa

Exon 14  
atgcttatggacaaaatgctacagcttgaggctaaatcatatgcaataaaactctcatcaaaaaacatggaaatggtccaaca

Exon 14  
gaaaaaagaggggccccattccaccagatgcacaaaatccagatatgtcgtctttaagatgctattcttgcagaatcagcaaggtgg

Exon 14  
atacaaaaggactcatggaagaactctctgaactctggcaaggccccagtccaaagcaattagatccttaggaccagaaaaatct

Exon 14  
gtggaaggtcagaatttctgtctgagaaaaacaaagtgtaggaaaggggaatttacaaggacgtaggactcaaagagat

Exon 14  
ggttttccaagcagcagaaaacctatttctactaacctggatatttaccatgaaaataatacacacaatcaagaaaaaaaaAttcagg

Exon 14  
aagaaatagaaaagaaggaaacattaatccaagagaatgtagtttgcctcagatacatacagtgactggcactaagaatttcatga

Exon 14  
agaaccttttctactgagcactaggcaaaatgtagaaggtcatatgacggggcatatgctccagttcaagatttaggtcattaat

Exon 14  
gattcaacaaatagaacaaagaacacacagctcatttctcaaaaaaggggaggaagaaaactggaaggcttgggaaatcaa

Exon 14  
accaagcaaattgtagaagaatgcatgcaccacaaggatattccttaatacaagccagcagaatttgtcacgcaacgtagtaag

Exon 14  
agagctttgaaacaattcagactcccactagaagaacagaactgaaaaaaggataattgtggatgacacctcaaccagtggtc

Exon 14  
caaaaacatgaaacatttgaccccgagcacctcacacagatagactacaatgagaaggagaaagggccattactcagctccc

Exon 14  
ttatcagattgccttacgaggagtcatagcatccctcaagcaaatagatctccattaccattgcaaagggtatcatcttccatctattag

Exon 14  
acctatatactgacaggggtctattccaaagacaactcttctcatctccagcagcatcttatagaagaagattctgggtccaaga

Exon 14  
aagcagtcatttctacaaggagccaaaaaaataaccttctttagccattctaaccttgagatgactggtgatcaaagagaggtg

Exon 14  
gctccctggggacaagtgccacaaattcagtcacatacaagaagttgagaacactgttctcccgaaccagactgcccacaaaca

Exon 14  
tctggcaaagtgaattgcttcaaaaagttcacatttaccagaaggacctattccctacggaaactagcaatgggtctcctgqccatctgg

Exon 14  
atctcgtggaaggagccttctcagggaacagagggagcattaagtggaaatgaagcaaacagacctggaaaagttcccttctga

Exon 14  
gagtagcaacagaaagctctgcaaagactccctccaagctattgactcttctgggataaccactatggtactcagataccaaa

Exon 14  
agaagagtggaatcccaagagaagtcaccagaaaaaacagctttaaagaaaaggataccatttctcctgaacgcttgtgaaa

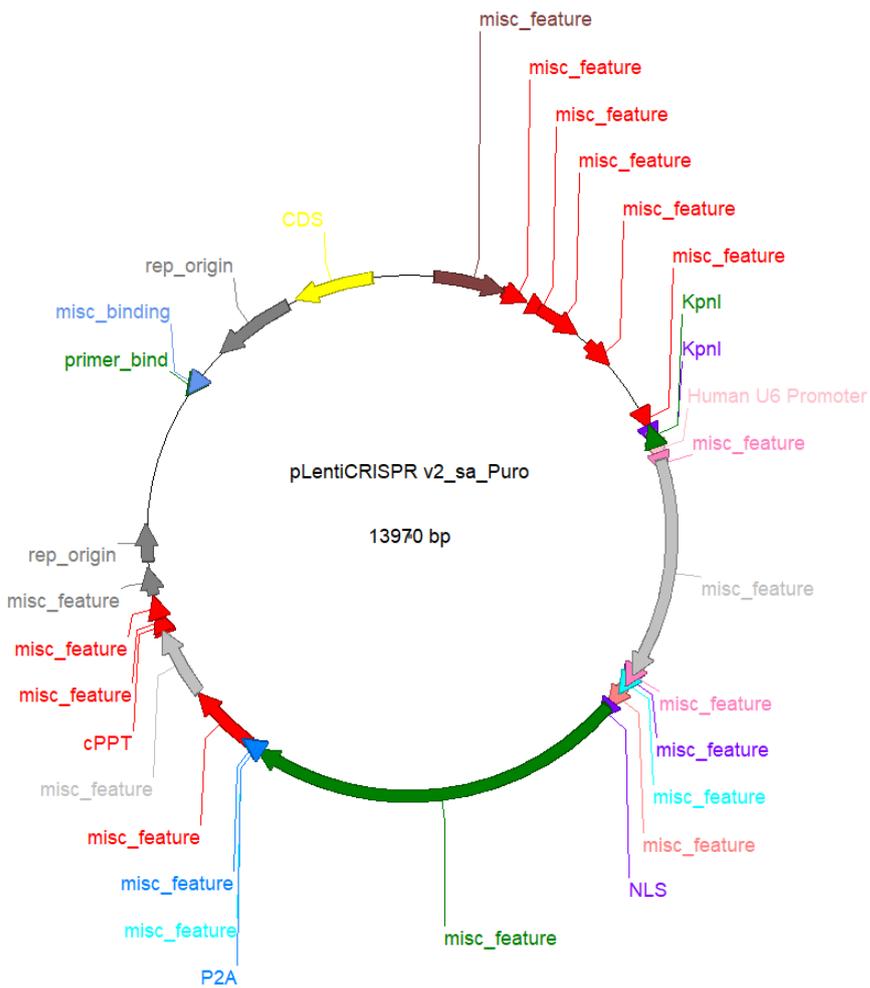
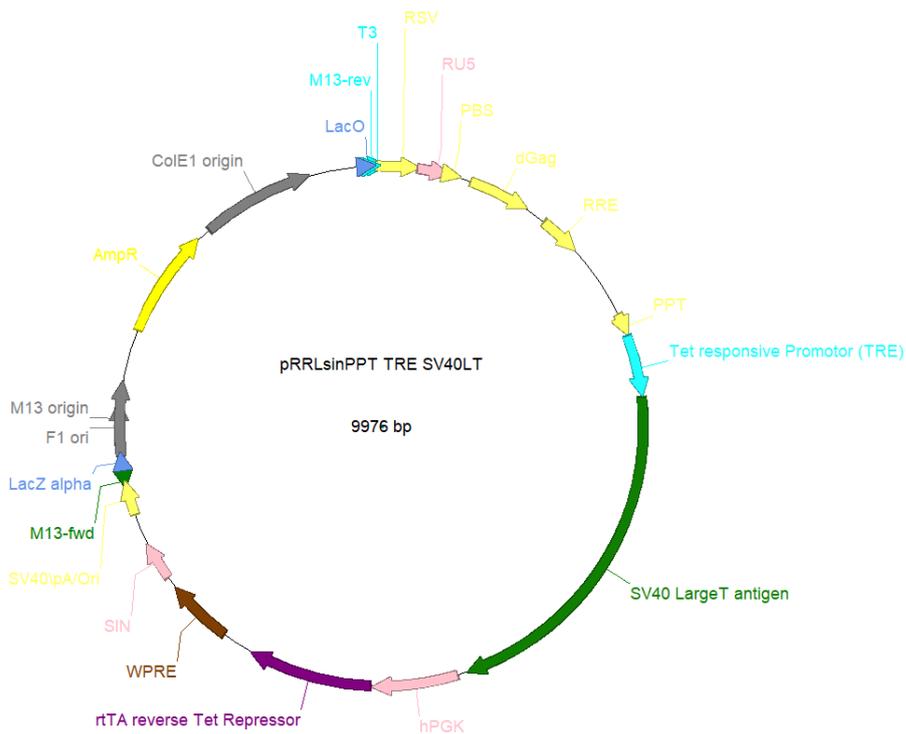
gcaatcatgcaatagcagcaataaatgagggacaaaataagccccgaaatagaagtcacctgggcaaagcaaggtaggactgaa  
aggctgtgctctcaaaa**accac**cagctctgaaacgcatcaacgggaaata**actcgtactactctt**cagtcagatcaagaggaaattg  
actatgatgataccatatcagttgaaatgaagaaggaagatttgacattatgat**gaggat**gaaaatcagagccccgcagcttcaa  
aagaaaacacgacactattttattgctgcag**tgag**aggctctgggatt**gggatgag**ttagctcccatgttctaagaaacag gg  
ct**cagag**ggcagtgctccctcagttcaagaaagttgtttcc**agga**attactgatggctcctt**actcag**ccctataccgtggagaacta  
aatgaacatttgg**actcct**ggggccatatataagagcagaagttgaagataatcatg gtaacttfcagaatcaggcctctctgctc  
ct**attcct**ct**attcta**gcttatttctatgaggaagatcagaggcaaggagcagaacctag aaaaaacttgcagcctaataa  
caaaacttactttgaaagtgaacatcatatggc**accac**taaaag**atgag**ttgactgcaaagcctgggctatttctctgatgtgac  
ctg gaaaaagatgtgc**actcag**gcctgattgg**accct**ctgtctgccacactaacactga**accct**gctatgggagacaagt  
acag**facagga**attgctctgttttcaccatctttgatgagacaaaagctgttacttactgaaaatgaaagaaactgcagggct  
ccctgcaat**atccag**atggaag**atccca**cttttaa**gaga**attatcgttccatg caatca**atggct**acataatggatacactacctgg  
cttagtaatggct**caggat**caaagg**atcga**tgtatctgtcagcatgggcagcaatgaaaac**atccattctattca**ttcagtgacat  
gtgttactgtacgaaaaa**Agaggag**tataaaatggcactgtacaatctct**atccag** gtgttttgagacagtggaaatgttaccatc  
caaagctggaatttggcgggtggaatgccttattggcgagcatctacatgctgggatgac**cacact**tttctggtgtacagcaata agtg  
tcagactcccctgggaatggcttctggacacattagagatttcagattacagcttcaggacaatatg gacagtgggcccaaa**gctg**  
gccagactcattattccggatcaatcaatgcctggagcaccaaggagcccttttctggatcaag g**ttggat**ctgtggcaccaatgatt  
attcacggcatcaagaccagggtgcccgtcagaagttctccagcctctacatctcagttatcat**catgtatagctt**gatgggaaga  
agtggcagactatcgaggaaatccactggaacctaatg g**ttct**tttggcaatgtggattcatctgggataaaacacaatattttaa  
cctccaattattgctcgatacatccgtttgcaccaactcatt**agcattcgcagcactcttcgatggagttgatgggctgtgatt**aaat  
a gttgcagcatgccattgggaatggagagtaaagcaatatcagatgcacagattactgcttcatcctactttaccaatatgtttgccacc  
ggtctcctcaaaagctgcactcactccaagggaggagtaatgcctggagacctcag g**tga**ataatccaaaagatggctgcaa  
gtggactccagaagacaatgaaagtcacaggagtaactactcaggagtaaaatctc**gcttaccag**catgtatgtgaaggagtcc  
tcatctccagcagtcagatggccatcagtgactctcttttcagaatggcaaagtaaag g**ttttcag**gaaatcaagactccttcac  
acctgtgtgaactcttagaccaccgttactgactcgtaccttgaattcaccaccagag**ttgggtgc**caccagattgcctgaggat  
ggaggttctgggctgcgaggcacaggacctactga GGGTGGCCACTGCAGCACCTGCCACTGCCGTCA  
CCTCTCCCTCCTCAGTCCAGGGCAG**TGTCCCTCCCTGGCTTGCTTCTACCTTTGTGCTA**  
AATCCTAGCAGACACTGCCTTGAAGCCTCCTGAATTA  
ACTATCATCAGTCCTGCATTTCTTT  
GGTGGGGGGCCAGGAGGGTGCATCCAATTTAACTTAACTCTTACCTATTTTCTGCAGCTGC  
TCCCAGATTACTCCTTCCCTTCCAATATAACTAGGCAAAAAGAAGTGAGGAGAAACCTGCAT  
GAAAGCATTCTTCCCTGAAAAGTTAGGCCTCTCAGAGTCACCACTTCCCTCTGTTGTAGAAA

AACTATGTGATGAAACTTTGAAAAAGATATTTATGATGTTAACATTTTCAGGTTAAGCCTCATA  
CGTTTAAAATAAAACTCTCAGTTGTTTATTATCCTGATCAAGCATGGAACAAAGCATGTTTCA  
GGATCAGATCAATACAATCTTGGAGTCAAAGGCAAATCATTGGACAATCTGCAAAATGG  
AGAGAATACAATAACTACTACAGTAAAGTCTGTTTCTGCTTCCTTACACATAGATATAATTAT  
GTTATTTAGTCATTATGAGGGGCACATTCTTATCTCCAAAAGTAGCATTCTTAAACTGAGAAT  
TATAGATGGGGTTCAAGAATCCCTAAGTCCCCTGAAATTATATAAGGCATTCTGTATAAATG  
CAAATGTGCATTTTTCTGACGAGTGTCCATAGATATAAAGCCATTTGGTCTTAATTCTGACC  
AATAAAAAAATAAGTCAGGAGGATGCAATTGTTGAAAGCTTTGAAATAAAATAACAATGTCT  
TCTTGAAATTTGTGATGGCCAAGAAAGAAAATGATGATGACATTAGGCTTCTAAAGGACATA  
CATTTAATATTTCTGTGGAAATATGAGGAAAATCCATGGTTATCTGAGATAGGAGATACAAA  
CTTTGTAATTCTAATAATGCACTCAGTTTACTCTCTCCCTCTACTAATTTCTGCTGAAAATA  
ACACAACAAAAATGTAACAGGGGAAATTATATACCGTGACTGAAAAGTAGAGTCCTACTTAC  
ATAGTTGAAATATCAAGGAGGTCAGAAGAAAATTGGACTGGTGAAAACAGAAAAACACTC  
CAGTCTGCCATATCACCACACAATAGGATCCCCCTTCTTGCCCTCCACCCCCATAAGATTG  
TGAAGGGTTTACTGCTCCTTCCATCTGCCTGACCCCTTCACTATGACTACACAGAATCTCCT  
GATAGTAAAGGGGGCTGGAGACAAGGATAAGTTATAGAGCAGTTGGAGGAAGCATCCAAA  
GATTGCAACCCAGGGCAAATGGAAAACAGGAGATCCTAATATGAAAGAAAAATGGATCCCA  
ATCTGAGAAAAGGCAAAGAATGGCTACTTTTTTCTATGCTGGAGTATTTTCTAATAATCCT  
GCTTGACCCTTATCTGACCTCTTTGGAAACTATAACATAGCTGTCCAGTATAGTCACAATCC  
ACAAATGATGCAGGTGCAAATGGTTTATAGCCCTGTGAAGTTCTTAAAGTTTAGAGGCTAAC  
TTACAGAAATGAATAAGTTGTTTTGTTTTATAGCCCGGTAGAGGAGTTAACCCCAAAGGTGA  
TATGGTTTTATTTCTGTTATGTTTAACTTGATAATCTTATTTTGGCATTCTTTTCCCATTGAC  
TATATACATCTCTATTTCTCAAATGTTTCATGGAAGTAGCTCTTTTATTTTCTGCTGGTTTTTC  
AGTAATGAGTTAATAAAAACATTGACACATAC

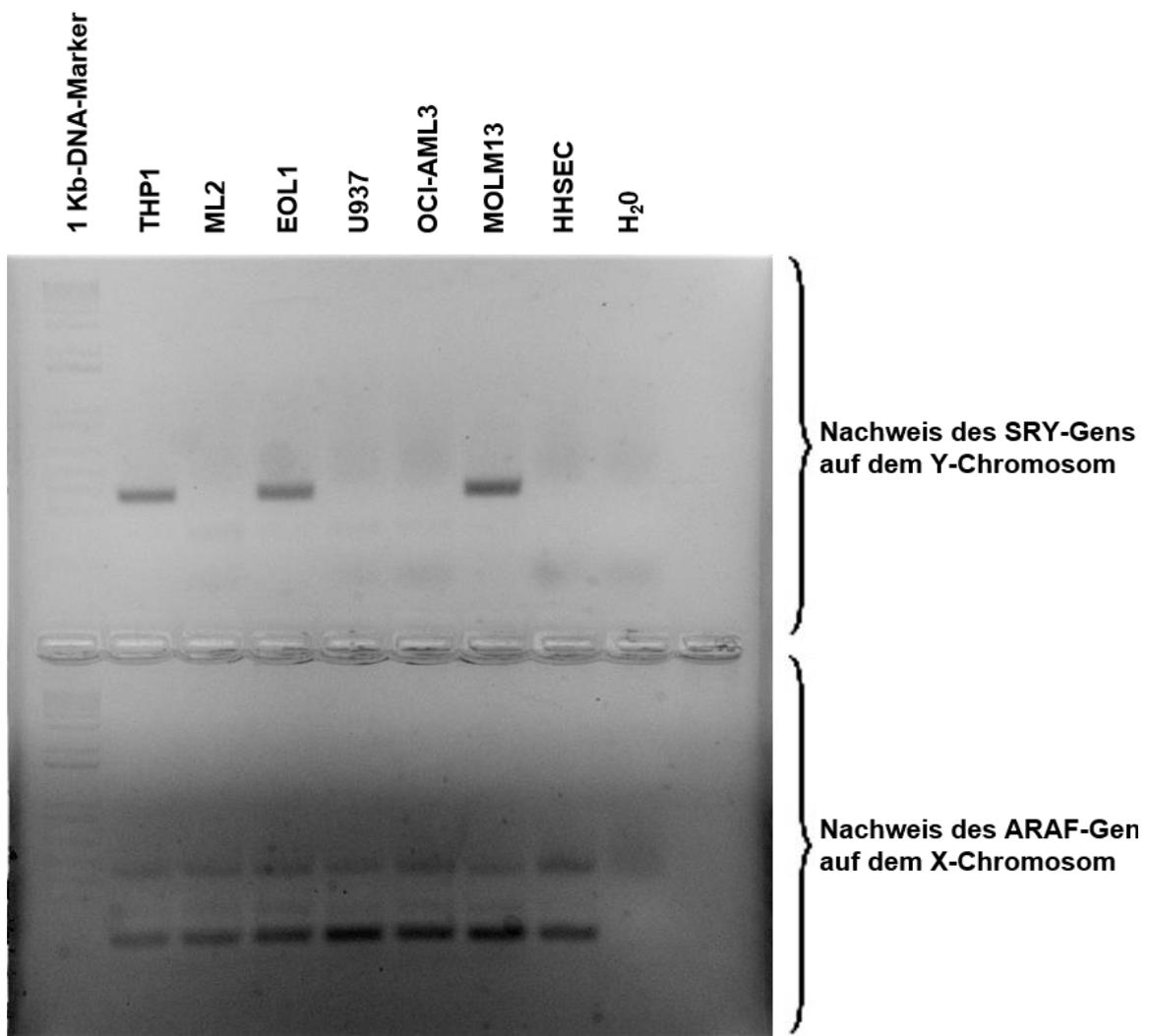
**In Rot hervorgehobene Großbuchstaben:** Regionen bekannter patienten-spezifischer *F8*-Mutationen (Quelle: EAHAD-Datenbank).

**In Gelb hervorgehoben:** PAM-Sequenz (NNGRRT).

## 2 Plasmidkarten



### 3 Geschlechtsdetermination



#### 4 Kumulatives Wachstumsassay der HHSEC\_LT (Primärdaten)

<b>HHSEC mit Doxycyclin</b>						
Tag	N1	N2	N3	Mittelwert = (N1 + N2 + N3) / 3	Faktor-Berechnung	Wachstum
0	50000	50000	50000	50000	50000/50000 = 1	0
3	115000	170000	170000	151666,667	151666,667/50000 = 3,033	50000 * 3,033 = 151650
7	529000	697000	782000	739500	739500/50000 = 14,79	2151666,667 * 14,79 = 243150
10	2116000	1951600	3440800	2778400	2778400/50000 = 55,568	739500 * 55,568 = 124647359
13	10791600	13075720	13763200	13419460	13419460/50000 = 268,3892	2778400 * 268,3892 = 3,3454E+10
17	57195480	47072592	38536960	42804776	42804776/50000 = 856,09552	13419460 * 856,09552 = 2,864E+13
<b>HHSEC ohne Doxycyclin</b>						
Tag	N1	N2	N3	Mittelwert = (N1 + N2 + N3) / 3	Faktor-Berechnung	Wachstum
0	50000	50000	50000	50000	50000/50000 = 1	0
3	115000	115000	85000	105000	105000/50000 = 2,1	50000 * 2,1 = 105000
7	51750	63750	33000	57750	57750/50000 = 1,155	105000 * 1,155 = 121275
10	30000	30000	22500	26250	26250/50000 = 0,525	57750 * 0,525 = 63669,375
13	20000	20000	5000	12500	12500/50000 = 0,25	26250 * 0,25 = 15917,34375
17	15000	15000	5000	10000	10000/50000 = 0,2	12500 * 0,2 = 3183,46875

## 5 aPTT-basierte FVIII-Aktivitätsmessung der HHSEC

### Protokoll: aPTT-basierte FVIII:C im HHSEC-Zellüberstand

In einer 6-Well-Platte wurden  $1 \cdot 10^6$  HHSEC in Kulturmedium mit 1 µg/mL Doxycyclin ausgelegt. Am nächsten Tag wurde das Medium vorsichtig abgenommen, die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und in jedes Well ein 1 mL Optimem mit 1% P/S hinzugeben, in welchem die Zellen für 24 h bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden drei nachfolgend aufgeführte Verfahren getestet. Die Messung der FVIII:C erfolgte stets im Gerinnungslabor der Universitätsklinik Frankfurt im vollautomatisiertem ACL TOP 700 von Instrumentation Laboratory.

- (1) Nach der Inkubationszeit wurde der ZÜ vorsichtig abgenommen, unverändert auf Eis gestellt und anschließend sofort die FVIII:C bestimmt.
- (2) Nach der Inkubationszeit wurde der ZÜ vorsichtig abgenommen, über einen Mikrofilter (0,45µm) in ein neues Reaktionsgefäß filtriert, auf Eis gestellt und anschließend sofort die FVIII:C bestimmt.
- (3) Nach der Inkubationszeit wurde der ZÜ vorsichtig abgenommen, zentrifugiert (15000 rpm, 5Min., RT), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, auf Eis gestellt und anschließend sofort die FVIII:C bestimmt.

	FVIII-Aktivität (FVIII:C) in %		
	(1)	(2)	(3)
HHSEC_KO_NTC	91,9 %	2,6	8,9
HHSEC_KO_F8_1	65,1 %	1,6 %	7,4 %
HHSEC_KO_F8_2	51,1 %	1,4 %	6,4 %
HHSEC_KO_F8_3	35,2 %	1,2 %	6,2 %
HHSEC_KO_F8_4	67,5 %	1,8 %	6,9 %
HHSEC_KO_F8_5	76 %	2,0 %	6,9 %
HHSEC_KO_F8_1/3/5	38,1 %	1,3 %	6,2 %
HEK293T	0 %	0 %	0 %
Leerwert	0 %	0 %	0 %

⇒ (1) lieferte die besten Ergebnisse!

**aPTT-basierte FVIII:C-Messung der ZÜ-Verdünnungsreihe von HHSEC\_WT**

	<b>FVIII-Aktivität (%)</b>
<b>Leerwert</b>	0
<b>100% Zellüberstand</b>	73,3
<b>50% Zellüberstand</b>	33,5
<b>25% Zellüberstand</b>	14,5
<b>12,5% Zellüberstand</b>	6,37
<b>6,25% Zellüberstand</b>	Nicht messbar
<b>3,125% Zellüberstand</b>	Nicht messbar

**aPTT-basierte FVIII:C-Messung der stabil transduzierten FVIII-F8-Mutations-Zelllinien**

	<b>FVIII-Aktivität (%)</b>
<b>Leerwert</b>	0
<b>HHSEC_WT</b>	102
<b>HHSEC_KO_F8_1</b>	84,1
<b>HHSEC_KO_F8_2</b>	42,7
<b>HHSEC_KO_F8_3</b>	36,7
<b>HHSEC_KO_F8_4</b>	78,7
<b>HHSEC_KO_F8_5</b>	74,5
<b>HHSEC_KO_F8_1/3/5</b>	38,1
<b>HHSEC_KO_NTC</b>	98,9
<b>HEK293T</b>	0

## 6 Detektion des FVIII-Antigens mittels ELISA

Verwendetes Kit: Matched-Pair Antibody Set – F8C-EIA von Affinity Biologicals™ INC., Ontario, Kanada

Standard-Einstellungen bei allen Absorptions-Messungen:

- Shaking (Orbital) Duration: 60 s
- Shaking (Orbital) Amplitude: 1 mm
- Label: MTT
- Mode: Absorbance
- Wavelength: 490 nm
- Bandwidth: 9 nm
- Number of Flashes: 25
- Settle Time: 0 ms

### Koaltry-Standardkurve (Primärdaten)

FVIII-Menge (IE/ml)	Absorption (A)		Mittelwert = (N1 + N2) / 2	Mittelwert - Leerwert
	N1	N2		
<b>0,72</b>	2,030200005	1,973500013	2,00185	2,00185 - 0,0494 = 1,95245
<b>0,36</b>	1,352599978	1,413900018	1,38325	1,38325 - 0,0494 = 1,33385
<b>0,18</b>	0,897199988	0,89200002	0,8946	0,8946 - 0,0494 = 0,8452
<b>0,09</b>	0,560199976	0,0502	0,5602	0,5602 - 0,0494 = 0,5108
<b>0,045</b>	0,326499999	0,330599993	0,32855	0,32855 - 0,0494 = 0,27915
<b>0,0225</b>	0,221599996	0,215700001	0,21865	0,21865 - 0,0494 = 0,16925
<b>0,01125</b>	0,138099998	0,134800002	0,13645	0,13645 - 0,0494 = 0,08705
<b>0 (Leerwert)</b>	0,050099999	0,048700001	<b>0,0494</b>	

## Blutproben (Primärdaten)

Blutprobe	Absorption (A)											
	1/8-Verdünnung				1/16-Verdünnung				1/32-Verdünnung			
	B1	B2	Mittelwert = (B1 + B2) / 2	B3	B4	Mittelwert = (B3 + B4) / 2	B5	B6	Mittelwert = (B5 + B6) / 2			
Proband 1	0,722899973	0,720300019	0,7216	0,446999997	0,44780001	0,4474	0,263799995	0,266000003	0,2649			
Proband 2	0,43689999	0,423000008	0,42995	0,233099997	0,234999999	0,23405	0,149200007	0,144199997	0,1467			
Proband 3	0,505800009	0,504400015	0,5051	0,312000006	0,310699999	0,31135	0,176400006	0,163000003	0,1697			
Proband 4	0,559899986	0,563199997	0,56155	0,317099988	0,316500008	0,3168	0,180099994	0,179000005	0,17955			
Proband 5	0,740499973	0,718900025	0,7297	0,47240001	0,46759999	0,47	0,272899985	0,25060001	0,26175			

$$\text{Mittelwert}_{1/8\text{-Verdünnung}} = (0,7216 + 0,42995 + 0,5051 + 0,56155 + 0,7297) / 5 = 0,58958$$

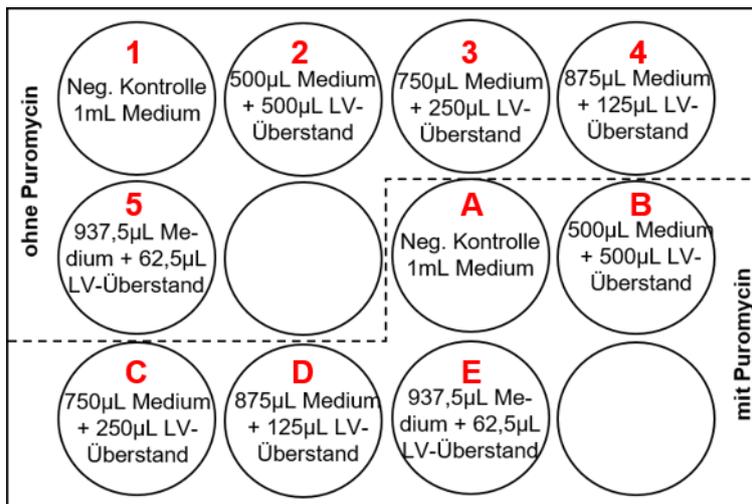
$$\text{Mittelwert}_{1/16\text{-Verdünnung}} = (0,4474 + 0,23405 + 0,31135 + 0,3168 + 0,47) / 5 = 0,35592$$

$$\text{Mittelwert}_{1/32\text{-Verdünnung}} = (0,2649 + 0,1467 + 0,1697 + 0,17955 + 0,26175) / 5 = 0,20452$$

## 7 Transduktionseffizienz der SaCas9-CRISPR-Vektoren in HHSEC mittels lentiviralen Gentransfer

**Tag 0:** In einer 12-Well-Platte wurden  $3,3 \times 10^4$  Zellen in jeweils zehn Vertiefung ausgesät.

**Tag 1:** Nach dem Absetzen der adhärennten Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 1 mL PBS gründlich gewaschen und anschließend mit verschiedenen Verdünnungen des rLV-ZÜ *F8\_NTC* nachfolgendem Schema für 72 h inkubiert:



**Tag 4:** Nach der Inkubationszeit wurden die Zellüberstände vorsichtig entnommen, jedes Well gründlich mit PBS gewaschen und anschließend jeweils 1 mL frisches Kulturmedium in jedes Well hinzugegeben. In den Wells A – E wurde zusätzlich jeweils 0,5 µg/mL Puromycin hinzugefügt und für 24 h inkubiert.

**Tag 5:** Nach der Inkubationszeit von 24 h wurde die Gesamtzahl jeder einzelnen Vertiefung bestimmt:

Ohne Puromycin-Selektion		Mit Puromycin-Selektion	
Well	Gesamt-Zellzahl	Well	Gesamt-Zellzahl
1	300000	A	130000
2	280000	B	240000
3	275000	C	220000
4	230000	D	180000
5	305000	E	170000

**Berechnung der Transduktionseffizienz:** Die Transduktionseffizienz wurde für jede Verdünnungsstufe separat bestimmt, indem von der Gesamtzahl der mit

Puromycin selektierten Verdünnungsstufe die Gesamtzahl der mit Puromycin selektierten negativ Kontrolle (Well A) subtrahiert wurde. Die Differenz wurde durch die Gesamtzahl derselben Verdünnungsstufe ohne Puromycin dividiert.

<b>1:1-Verdünnungsstufe:</b>	$TE (1:1) = \frac{Gesamtzahl (B) - Gesamtzahl (A)}{Gesamtzahl (2)}$ $= \frac{240000 - 130000}{280000} = 0,3929$
<b>3:1-Verdünnungsstufe:</b>	$TE (3:1) = \frac{Gesamtzahl (C) - Gesamtzahl (A)}{Gesamtzahl (3)}$ $= \frac{220000 - 130000}{275000} = 0,3273$
<b>7:1-Verdünnungsstufe:</b>	$TE (3:1) = \frac{Gesamtzahl (D) - Gesamtzahl (A)}{Gesamtzahl (4)}$ $= \frac{180000 - 130000}{230000} = 0,2174$
<b>15:1-Verdünnungsstufe :</b>	$TE (3:1) = \frac{Gesamtzahl (E) - Gesamtzahl (A)}{Gesamtzahl (5)}$ $= \frac{170000 - 130000}{305000} = 0,1311$

**Ergebnis:** In dieser Arbeit wurden die hergestellten verschiedenen SaCas9-CRISPR-Vektoren mittels lentiviralen Gentransfer in einem Verhältnis von 1:1 (rLV-ZÜ : HHSEC-Kulturmedium) in HHSEC transduziert und anschließend mit 0,5 µg/mL Puromycin selektiert. Demnach betrug die Transduktionseffizienz hier ca. 40%.

## 8 FVIII-Fluoreszenzintensität der stabil transduzierten HHSEC-F8-Mutations-Zelllinien

### Primärdaten

Zelllinie	Gemessene MFI <sub>[FVIII]</sub> Duplikate / Triplikate			Mittelwert
HHSEC_WT	46740	38154	/	42447
HHSEC_KO_F8_NTC	39854	41854	/	40854
HHSEC_KO_F8_1	26955	29888	/	28421,5
HHSEC_KO_F8_2	23965	16844	/	20404,5
HHSEC_KO_F8_3	10756	18348	18499	15867,7
HHSEC_KO_F8_4	34562	20116	28934	18226,3
HHSEC_KO_F8_5	20411	41247	33512	31723,3

### Statistische Auswertung

Der statistische Vergleich erfolgte in diesem Fall mithilfe der GraphPad Prism6-Software unter Verwendung der einfachen Varianzanalyse (ANOVA):

- Number of families: 1
- Number of comparisons per family: 5
- Alpha: 0,05

Holm-Sidak's multiple comparisons test			
	Mean Diff.	Significant?	Summary
NTC vs. KO1	13,49	No	ns
NTC vs. KO2	21,51	Yes	*
NTC vs. KO3	26,05	Yes	**
NTC vs. KO4	14,05	No	ns
NTC vs. KO5	7,614	No	ns

Test details								
	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	t	DF
NTC vs. KO1	41,92	28,42	13,49	6,474	3	2	2,085	10
NTC vs. KO2	41,92	20,4	21,51	6,474	3	2	3,323	10
NTC vs. KO3	41,92	15,87	26,05	5,79	3	3	4,499	10
NTC vs. KO4	41,92	27,87	14,05	5,79	3	3	2,426	10
NTC vs. KO5	41,92	34,3	7,614	5,79	3	3	1,315	10

## 9 MTT-Assay

### Absorptionsmessung mittels Infinite 200Pro (Primärdaten)

Standard-Einstellungen bei allen Absorptions-Messungen:

- Shaking (Orbital) Duration: 30 s
- Shaking (Orbital) Amplitude: 1 mm
- Label: MTT
- Mode: Absorbance
- Wavelength: 550 nm
- Bandwidth: 9 nm
- Number of Flashes: 25
- Settle Time: 0 ms

<b>TAG 0</b>				
Replikate	Leerwert	WT	KO_2	KO_3
1	0,123999998	0,143900007	0,177300006	0,176699996
2	0,124099998	0,146500006	0,181999996	0,150299996
3	0,122599997	0,137799993	0,184499994	0,159999996
4	0,116700001	0,143099993	0,183599994	0,139799997
5	0,117299996	0,152199998	0,160199996	0,150499993
6	0,123699997	0,140100002	0,149700001	0,151199996
Mittelwert <sub>Replikate</sub>	<b>0,121399998</b>	0,143933333	0,172883331	0,154749996
Mittelwert <sub>Replikate</sub> - Mittelwert <sub>Leerwert</sub>	0	<b>0,022533335</b>	<b>0,051483333</b>	<b>0,033349998</b>
<b>TAG 2</b>				
Replikate	Leerwert	WT	KO_2	KO_3
1	0,118900001	0,187399998	0,230800003	0,187099993
2	0,112999998	0,182799995	0,262400001	0,205599993
3	0,116700001	0,183699995	0,244200006	0,190500006
4	0,117200002	0,175400004	0,243499994	0,204500005
5	0,116800003	0,178599998	0,246600002	0,179100007
6	0,120399997	0,152799994	0,229300007	0,193100005
Mittelwert <sub>Replikate</sub>	<b>0,117166667</b>	0,176783331	0,242800002	0,193316668
Mittelwert <sub>Replikate</sub> - Mittelwert <sub>Leerwert</sub>	0	<b>0,059616664</b>	<b>0,125633335</b>	<b>0,076150001</b>

<b>TAG 4</b>				
Replikate	Leerwert	WT	KO_2	KO_3
1	0,113600001	0,288100004	0,279199988	0,324000001
2	0,108499996	0,283600003	0,109300002	0,244599998
3	0,110399999	0,221699998	0,320199996	0,248300001
4	0,105400003	0,250999987	0,310699999	0,273699999
5	0,112699997	0,248600006	0,333999991	0,237100005
6	0,117200002	0,238000005	0,360900015	0,225500003
Mittelwert <sub>Replikate</sub>	<b>0,111300001</b>	0,255166667	0,285716665	0,258866668
Mittelwert <sub>Replikate</sub> - Mittelwert <sub>Leerwert</sub>	0	<b>0,143866668</b>	<b>0,174416666</b>	<b>0,147566668</b>
<b>TAG 6</b>				
Replikate	Leerwert	WT	KO_2	KO_3
1	0,164800003	0,500699997	0,726700008	0,424899995
2	0,157600001	0,586799979	0,520799994	0,322400004
3	0,167500004	0,486099988	0,453799993	0,35800001
4	0,162200004	0,466100007	0,518299997	0,390100002
5	0,164100006	0,539900005	0,502399981	0,377099991
6	0,163200006	0,490999997	0,494700015	0,374599993
Mittelwert <sub>Replikate</sub>	<b>0,163233337</b>	0,511766662	0,536116665	0,374516666
Mittelwert <sub>Replikate</sub> - Mittelwert <sub>Leerwert</sub>	0	<b>0,348533325</b>	<b>0,372883327</b>	<b>0,211283329</b>

### Normalisierung der Absorptionsmessungen

<b>Mittelwerte der Absorption (A) bei 550 nm</b>			
Tag	WT	KO_2	KO_3
0	0,022533335*	0,051483333*	0,033349998*
2	0,059616664*	0,125633335*	0,076150001*
4	0,143866668*	0,174416666*	0,147566668*
6	0,348533325*	0,372883327*	0,211283329*
<b>Relative Absorption bei 550 nm (normalisiert zu Tag 0)</b>			
Tag	WT	KO_2	KO_3
0	0,022533335 / 0,022533335 = 1	0,051483333 / 0,051483333 = 1	0,033349998 / 0,033349998 = 1

<b>2</b>	0,059616664 / 0,022533335 = 2,64571015	0,125633335 / 0,051483333 = 2,44027222	0,076150001 / 0,033349998 = 2,28335832
<b>4</b>	0,143866668 / 0,022533335 = 6,38461648	0,174416666 / 0,051483333 = 4,03528676	0,147566668 / 0,033349998 = 4,42478771
<b>6</b>	0,348533325 / 0,022533335 = 15,4674573	0,372883327 / 0,051483333 = 7,24279743	0,211283329 / 0,033349998 = 6,33533223

\*  $\text{Mittelwert}_{\text{Replikate}} - \text{Mittelwert}_{\text{Leerwert}}$

## Statistische Auswertung

Der statistische Vergleich des Einflusses einer Variablen mit verschiedenen Gruppen erfolgte in diesem Fall mithilfe der GraphPad Prism6-Software unter Verwendung der zweifachen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferoni-*Post-hoc*-Test:

- Number of families: 4
- Number of comparisons per family: 3
- Alpha: 0,05

Test details				
	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,
<b>Row 1</b>				
WT vs. KO_2	1	1	7,95E-08	0,5738
WT vs. KO_3	1	1	4,97E-08	0,5738
KO_2 vs. KO_3	1	1	-2,98E-08	0,5738
<b>Row 2</b>				
WT vs. KO_2	2,646	2,44	0,2054	0,5738
WT vs. KO_3	2,646	2,283	0,3624	0,5738
KO_2 vs. KO_3	2,44	2,283	0,1569	0,5738
<b>Row 3</b>				
WT vs. KO_2	6,385	4,035	2,349	0,5738
WT vs. KO_3	6,385	4,425	1,96	0,5738
KO_2 vs. KO_3	4,035	4,425	-0,3895	0,5738
<b>Row 4</b>				
WT vs. KO_2	15,47	7,243	8,225	0,5738
WT vs. KO_3	15,47	6,335	9,132	0,5738
KO_2 vs. KO_3	0,9075	-0,5059 to 2,321	No	ns

Test details								
	Mean 1	Mean 2	Mean Diff	SE of diff	N1	N2	t	DF
<b>Row 1</b>								
WT vs. KO_2	1	1	7,95E-08	0,5738	6	6	1,39E-07	60
WT vs. KO_3	1	1	4,97E-08	0,5738	6	6	8,66E-08	60
KO_2 vs. KO_3	1	1	-2,98E-08	0,5738	6	6	5,19E-08	60
<b>Row 2</b>								
WT vs. KO_2	2,646	2,44	0,2054	0,5738	6	6	0,358	60
WT vs. KO_3	2,646	2,283	0,3624	0,5738	6	6	0,6314	60
KO_2 vs. KO_3	2,44	2,283	0,1569	0,5738	6	6	0,2734	60
<b>Row 3</b>								
WT vs. KO_2	6,385	4,035	2,349	0,5738	6	6	4,094	60
WT vs. KO_3	6,385	4,425	1,96	0,5738	6	6	3,415	60
KO_2 vs. KO_3	4,035	4,425	-0,3895	0,5738	6	6	0,6788	60
<b>Row 4</b>								
WT vs. KO_2	15,47	7,243	8,225	0,5738	6	6	14,33	60
WT vs. KO_3	15,47	6,335	9,132	0,5738	6	6	15,91	60

## **Danksagung**

In erster Linie möchte ich mich herzlich bei Herr Prof. Dr. Hubert Serve für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik 2 (Hämatologie / Onkologie) der Universitätsklinik in Frankfurt anfertigen zu dürfen.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Frank Schnütgen, Dr. Nina Kurrle und Dr. med. Rosa Toenges für die intensive Betreuung, tatkräftige Unterstützung im Labor und die vielen konstruktiven Anregungen. Vielen Dank, dass ihr mir stets mit Rat und Tat zur Seite standet.

Auch gilt mein Dank Dr. Duran Sürün für die Beratungen und Einarbeitung zu Beginn und allen Mitarbeitern der AG Serve, darunter insbesondere Dr. Frank Wempe für die Hilfsbereitschaft, netten Ratschlägen sowie praktischen Hilfestellungen.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Miesbach bedanken, der mir zu jeder Zeit ein guter Ansprechpartner zur Hämophilie war, mich persönlich unterstützte und mir eine Hospitation in seiner Ambulanz ermöglichte. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei dem gesamten Team des Hämophilie-Zentrums und des Gerinnungslabors der Universitätsklinik Frankfurt für die hervorragende Kooperation und der liebevollen Aufnahme bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung und das Vertrauen in jeder Lebenslage bedanken.

## Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Herstellung eines *in vitro* Zellmodells für die Entwicklung einer CRISPR/SaCas9-vermittelten Gentherapie zur Behandlung der Hämophilie A.

in dem Universitätsklinikum Frankfurt, Medizinischen Klinik 2 (Hämatologie / Onkologie, AG Serve) unter Betreuung und Anleitung von PD Dr. Frank Schnütgen mit Unterstützung durch Dr. Nina Kurrle und Dr. med. Rosa Toenges ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht\*. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt am Main, 01.06.2021

(Ort, Datum)

\_\_\_\_\_  
(Unterschrift)

\*) im Falle des Nichtzutreffens

## Lebenslauf

### *Persönliche Daten*

---

Name: Nadin Hodroj  
Geburtsdatum: XXXX  
Geburtsort: XXXX  
Familienstand: XXXX  
Staatsangehörigkeit: XXXX  
E-Mail: XXXX

### *Schulbildung*

---

08/2001 – 07/2005 XXXX  
09/2005 – 07/2014 XXXX

### *Studium*

---

10/2014 – 05/2021: Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main  
1. Staatsexamen (Physikum) im Herbst 2016  
2. Staatsexamen im Frühjahr 2020  
3. Staatsexamen im Frühjahr 2021  
04/2015 – 03/2018 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes  
04/2018 – 09/2018 Stipendiatin der Frankfurter Promotionsförderung (FPF)  
04/2018 – 04/2019 medizinische Doktorandin in der hämatologisch-onkologischen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Serve an der Universitätsklinik in Frankfurt a.M.

Nadin Hodroj, 01.06.2021