

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences**

**Klonierung von CRISPR-Cas9 sgRNA-Zielsequenzen
in lentivirale Vektoren**

Bachelorarbeit
Im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Celine Pöhlking



Hamburg

26. Januar 2022

Die Arbeit wurde betreut und erstellt im Labor der Arbeitsgruppe LG-Schreiber am Bernhard-Nocht Institut für Tropenmedizin, Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

1. Gutachter: Dr. Prof. Claus-Dieter Wacker

(HAW Hamburg)

2. Gutachter: Dr. Michael Schreiber

(BNITM Hamburg)

Vorwort

Diese Arbeit ist die Abschlussarbeit des Bachelorstudiums an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften (HAW) in Hamburg im Studiengang Biotechnologie. Vor dem Beginn meiner Bachelorarbeit habe ich mich in der Laborgruppe Schreiber am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM) mit der Herstellung von pseudotypisierten Partikeln beschäftigt und Erfahrung in molekularbiologischen Methoden gesammelt. Anschließend habe ich im November 2021 meine Bachelorarbeit in der LG-Schreiber am BNITM begonnen.

Das Thema der Bachelorarbeit behandelt die Klonierung von CRISPR-Cas9 single-guide-RNA Zielsequenzen in lentivirale Vektoren. Ziel war es sgRNA-Zielsequenzen herzustellen, die gegen Gene und Mutationen des Glioblastom Multiform gerichtet sind.

Zusammen mit meinem Betreuer Dr. Michael Schreiber (BNITM) entwickelte ich die Aufgabenstellung meiner Abschlussarbeit. Durch seine Erfahrungen in der Virologie und Molekularbiologie, konnte er mir Ansatzpunkte in den Themenbereichen meiner Arbeit verschaffen. Zudem hat mich Dr. Dr. Birco Schwalbe (Neurochirurg Asklepios Klinikum Nord-Heidelberg) immer unterstützt, indem er mir wichtige Informationen und Literatur zum Glioblastom Multiform zur Verfügung stellte. Die Bachelorarbeit wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker (HAW) als Erstgutachter betreut.

Ich wünsche Ihnen Freude beim Lesen dieser Bachelorarbeit.

Celine Pöhlking

Hamburg, 26. Januar 2021

Es lohnt sich, die Entdeckungen anderer zu studieren, dass für uns selbst eine neue Quelle für Erfindungen entspringt.

Gottfried Wilhelm Leibniz

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Das Glioblastom	2
1.2.	Das CRISPR-Cas9-System.....	3
1.3.	Lentivirale Vektoren mit CRISPR-Cas9-System	7
1.4.	Auswahl von sgRNA-Zielsequenzen zur Anwendung in GBM.....	9
1.5.	Ziel der Arbeit.....	11
2.	Material und Methoden.....	12
2.1.	Material und Ausrüstung	12
2.1.1.	Geräte	12
2.1.2.	Verbrauchsmittel.....	12
2.1.3.	Chemikalien	13
2.1.4.	Reagenzien.....	13
2.1.5.	Zellen	14
2.1.6.	Plasmide.....	14
2.1.7.	Reagenzien-Kits.....	14
2.2.	Oligonukleotide für die Klonierung mit BsmBI-Überhängen.....	14
2.3.	Herstellung kompetenter DH5 α - Bakterien	15
2.4.	Transformation von Bakterien	16
2.5.	CRISPR one-step cycle ligation	16
2.6.	PCR Scan	17
2.7.	Agarose Gel Elektrophorese	18
2.8.	Mini-Plasmid Extraktion	19
2.9.	Maxi-Plasmid Extraktion.....	19
2.10.	DNA-Sequenzierung.....	20
2.11.	Ethanol Fällung.....	20
2.12.	Messung und Konzentrierung der DNA	20
3.	Ergebnisse.....	21
3.1.	Aus der Literatur entworfene sgRNA-Zielsequenzen	21
3.1.1.	sgRNA-Zielsequenzen gegen tumorfördernde Gene.....	21
3.1.2.	sgRNA-Zielsequenzen für Second-Pathway Gene	24
3.1.3.	sgRNA-Zielsequenzen spezifisch für m ⁶ A modifizierende Proteine.....	27
3.2.	In dieser Arbeit entworfene sgRNA-Zielsequenzen.....	30
3.2.1.	Das Enzym Telomerase Reverse Transkriptase.....	30
3.2.2.	sgRNA-Zielsequenzen gegen GBM spezifische parallele Mutationen	31

3.3. Klonierung der sgRNA-Zielsequenzen.....	44
4. Diskussion.....	47
5. Zusammenfassung	52
6. Literaturverzeichnis	53
7. Anhang.....	60
7.1. Lentivirale Vektoren	60
7.2. One-Step-Ligation	61
7.3. Klonierungsprotokoll.....	62
7.4. plCmc-E1 – Sequenzierung mit hU6-F-Primer bei LGCGenomics	63
8. Eidesstattliche Erklärung	64
9. Danksagung	65

Abkürzungsverzeichnis

ALKBH5	<i>AlkB Homolog 5, RNA Demethylase</i>
AmpR	Ampicillin Resistenz
BIRC5	<i>Baculoviral IAP Repeat Containing 5</i>
Cas	<i>CRISPR associated</i>
cDNA	<i>copyDNA</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR-RNA
cPPT	<i>central polypurine tract</i>
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxiribonucleinsäure
EF1 α	<i>Elongation factor 1-alpha</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
Env	<i>envelope</i>
GBM	Glioblastom Multiform
GSC	Glioblastom Stammzelle
GPD1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IDH1	Isocitratdehydrogenase 1
Kb	Kilobasen
LTR	<i>long terminal repeat</i>
METTL	<i>Methyltransferase-like proteins</i>
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NAMPT	Recombinante Nicotinamid Phosphoribosyltransferase
NaOH	Natronlauge
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKMYT1	Protein Kinase Membrane Associated Tyrosine/Threonine 1
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
RRE	<i>rev responsible element</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sgRNA	<i>single-guide-Ribonucleinsäure</i>

SVPolyA	<i>Simian virus 40 PolyA TAE Tris-Acetat-EDTA</i>
TERT	Telomerase Reversen Transkriptase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TP53	Tumor Protein 53
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WPRE	<i>Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element</i>
YT	<i>yeast tryptone</i>
YTHDF	<i>YT Homolog N6-Methyladenosine RNA Binding Protein</i>
ZIKV	Zikavirus

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Aufbau und Komponenten des CRISPR-Locus	4
Abb. 2	Aufbau und Funktion des CRISPR-Cas9-Systems	6
Abb. 3	LentiCRISPRv2-mCherry mit der GPD1-Zielsequenz	8
Abb. 4:	BsmBI-Klonierung der Zielsequenzen in die lentiviralen Vektoren.....	21
Abb. 5:	Epigenetische Regulatoren für die m ⁶ A-Modifikation von RNA	27
Abb. 6:	Mutationen auf dem TERT Promotor steigern Transkriptionsrate	30
Abb. 7:	TT2- Zielsequenz für den TERT-Promotor.....	31
Abb. 8:	sgRNA-Zielsequenz für die T2572G-Mutation des EGFR-Gens	34
Abb. 9:	sgRNA-Zielsequenz für die G1793T-Mutation des EGFR-Gens	35
Abb. 10:	sgRNA-Zielsequenz für die G2156A-Mutation des EGFR-Gens.....	36
Abb. 11:	sgRNA-Zielsequenz für die T405C-Mutation des PTEN-Gens.....	38
Abb. 12:	sgRNA-Zielsequenz für die G845T-Mutation des TP53-Gens.....	39
Abb. 13:	sgRNA-Zielsequenz für die G845A-Mutation des TP53-Gens	40
Abb. 14:	B1-Zielsequenz des BIRC5-Gens	42
Abb. 15:	B2- und B3-Zielsequenzen des BIRC5-Gens.....	43
Abb. 16:	Klonierung der sgRNA-Zielsequenzen	44
Abb. 17:	Sequenzierungsergebnis LentiCRISPRv2-mCherry mit der W1-Zielsequenz	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zielsequenzen für GPD1 spezifische sgRNAs	22
Tabelle 2:	Zielsequenzen für die TERT spezifische sgRNA.....	23
Tabelle 3:	Zielsequenzen für PKMYT1 und WEE1 spezifische sgRNAs	25
Tabelle 4:	Zielsequenzen für IDH1 spezifische sgRNAs.....	26
Tabelle 5:	sgRNA-Zielsequenzen für m ⁶ A modifizierende Proteine	29
Tabelle 6:	Zusammenfassung der hergestellten Vektoren und sgRNA-Zielsequenzen	46

1. Einleitung

Das Glioblastom Multiform (GBM, Grad IV) ist der aggressivste und häufigste Gehirntumor. Die fehlende Wirksamkeit von Therapien und das Wiederauftreten des GBM nach Resektion resultierten in einer schlechten Prognose und einer durchschnittlichen Überlebensrate von 12 bis 15 Monaten [1,2]. Die Anwendung von Standardtherapien weist auf lange Sicht nur geringe Wirksamkeiten auf, da sich die GBM-Zellen vom Tumorgewebe differenzieren und insbesondere die GBM-Stammzellen (GSC) Resistenzen gegen Chemo- und Strahlentherapien aufweisen [3]. Die Gewebeeinfiltration verhindert die vollständige operative Entfernung aller Tumorzellen, weshalb es nach der Resektion zum Wiederauftreten des Tumors kommt. Das große Problem sind die geringen phänotypischen Unterschiede des Tumorgewebes zum gesunden Gewebe. Um dies zu umgehen können genotypische Unterschiede als tumorspezifische Angriffspunkte genutzt werden. Tumor-spezifische Mutationen, überexprimierte Gene und tumorauslösende Gene sind Besonderheiten eines Tumors und eignen sich daher für einen gezielten Gen-*Knockout*.

Shankar et al. (2018) beschreiben eine Methode zur Behandlung von Glioblastomen. Dabei wird der sekundäre Weg zur Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) Synthese mit einem Medikament blockiert [4]. Tumore des Glioblastoms mit einer niedrigen Einstufung (Grad I-III) weisen ein mutiertes Isocitrat Dehydrogenase (IDH1) Enzym auf, wodurch es inaktiv bleibt und daher kein NAD umsetzt. Die Tumorzellen sind dann nur noch von dem sekundären Weg über das Enzym Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) abhängig. Der Hemmstoff wirkt zwar auch bei gesunden Zellen, diese können aber weiterhin über IDH1-Wildtyp NAD produzieren und werden daher nicht geschädigt [4]. Da bei Glioblastomen Grad IV der IDH1-Wildtyp vorliegt, ist diese Strategie nicht anwendbar.

Da die beschriebene IDH1-Mutation bei GBM Grad IV Tumoren nicht vorkommt müssen andere Mutationen, die für den Tumor spezifisch sind, identifiziert werden. Diese können dann als Target für den Einsatz des CRISPR-Cas9-System (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR associated protein 9) benutzt werden [5–7].

In dieser Arbeit sollen Target-spezifische, die sogenannten Zielsequenzen, für das CRISPR-Cas9-System definiert und in entsprechende lentivirale Vektoren kloniert werden. Da der zelluläre DNA-Reparaturmechanismus Fehlsequenzen einführt, können auf diese Weise Gene der Tumorzellen gezielt ausgeschaltet werden [8].

1.1. Das Glioblastom

Das Glioblastom Multiform (GBM, Grad IV) zählt zu einer der bösartigsten Tumorarten des zentralen Nervensystems. Als Standardtherapie erfolgt eine operative Entfernung des Tumorgewebes mit anschließender Chemo- oder Strahlentherapie. Bei der chirurgischen Entfernung kann der Tumor nicht vollständig entfernt werden, da besonders die GSC das benachbarte, gesunde Gewebe infiltrieren [3,9]. Zudem weist das GBM eine hohe Heterogenität auf, welche die Anwendung einer einheitlichen Therapie und eine klare Differenzierung im Gewebe, besonders während der Operation, erschwert [9]. Die Zellen, welche sich vom Tumorgewebe differenziert haben, können in Färbeverfahren während der Operation oder auf MRT-Scans nicht sicher lokalisiert werden [10,11]. Die GSCs sind der Hauptgrund für konsekutive Rezidive nach der Therapie, da sie zudem eine hohe Resistenz gegenüber konventioneller Strahlen- und Chemotherapie aufweisen [9,12,13]. Das Wiederauftreten des Tumors nach der chirurgischen Entfernung resultiert in einer durchschnittlichen Überlebensrate von 12 bis 15 Monaten [1,2]. Auf Grundlage dieser nur unzureichend wirkenden Therapien muss ein neuer Ansatz gefunden werden, der ein gezieltes Töten der tumorauslösenden Zellen, im Unterschied zu dem gesunden Gewebe ermöglicht. Neben der neuen Entwicklung von Chemotherapeutika in Verbindung mit Strahlentherapien entstehen zurzeit weltweit neue Ansätze zur selektiveren Bekämpfung des GBM. Spezifische Therapien mit mRNAs und gezieltes Inhibieren von Tumorproteinen durch z. B. Nanopartikel lassen auf völlig neue und effektivere Therapien hoffen [11,14,15].

Konventionelle Therapien wirken nur wenig selektiv, da sich die Tumorzellen äußerlich nur gering von den gesunden Zellen unterscheiden. Daher bieten Therapien auf genomischer Ebene einen Ansatzpunkt, welcher selektiv das Ausschalten von GBM-Zellen ermöglichen könnte [4]. Sequenzierungen von GBM-Proben ermöglichen einen Einblick und Vergleich von Mutationen auf dem Genom, die zur Bildung einer Tumorzelle führen. Mutationen können zu einer Steigerung oder Senkung der Expression des jeweiligen Gens führen und den GBM-Zellen ihre gefährliche Eigenschaft verleihen. Das Abschalten von Genen durch Mutationen kann in den Tumorzellen jedoch auch Abhängigkeiten von sekundären Synthesewegen auslösen. Anders als bei den gesunden Nervenzellen führt dies zu einer Abhängigkeit der Tumorzelle von nur einem Enzym.

So sind beispielsweise Gliome niedrigeren Grades durch das mutierte Enzym Iso-Citrat-Dehydrogenase-1 (IDH1) gekennzeichnet. Das Fehlen der IDH1-Aktivität macht die Zellen abhängig von einem sekundären Weg zur Herstellung von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) durch das Enzym Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase (NAMPTase

oder NAMPT). Shanker et al. nutzen die Mutation des IDH1 in Glioblastomen Grad I und II. In der Arbeit wurde ein System entwickelt, bei welchem ein Hemmstoff für NAMPT in einem Mischpolymer aus Milch- und Glykolsäure in die Tumorköhle injiziert werden soll und die NAD-Produktion hemmt. Diese Methode ermöglicht das Einbringen von stark wirkenden Medikamenten direkt an den Ort des Tumors, um starke Nebenwirkungen bei der Injektion in den Blutkreislauf zu vermeiden, da der Hemmstoff langsam durch die Nanopartikel im Gehirn freigesetzt wird [4]. Da das GBM jedoch den IDH1-Wildtyp aufweist, wird IDH1 exprimiert und diese Therapie ist für Grad IV Tumore nicht anwendbar. Da Mutationen im GBM Grad IV auch bestimmte Enzyme betreffen, kann nach einer ähnlichen Abhängigkeit gesucht und diese gezielt genutzt werden. CRISPR-Cas9 kann das entsprechende Gen für das Enzym inaktivieren und selektiv das Tumorstadium beeinflussen, während die gesunden Zellen den zweiten Stoffwechselweg nutzen können. Des Weiteren bieten sich auch Punktmutationen als Target an, da diese ebenfalls selektiv durch das CRISPR-Cas9-System ausgemacht und zerschnitten werden. Auf sogenannten letalen Genen kann dies den entscheidenden Unterschied zu gesunden Zellen machen, obwohl die Punktmutation keinen Einfluss auf den Phänotyp der Zelle hat.

1.2. Das CRISPR-Cas9-System

Bakterien und Archaeen besitzen die Fähigkeit, eingedrungene DNA durch das Restriktions-Modifikations-System zu zerstören oder den eigenen Zelltod einzuleiten, um die Vermehrung von Bakteriophagen zu verhindern. Dieses Abwehrsystem beruht auf einer Protein-DNA-Bindung.

Das neu entdeckte CRISPR-Cas9-System beruht dagegen auf einer RNA-DNA-Hybridisierung. Im Jahr 1987 wurden bei der Sequenzierung des *E. coli*- Genoms wieder auftretende Muster gefunden, die anschließend auch bei anderen Bakterien und Archaeen entdeckt wurden. Im Jahr 2005 zeigten sich Ähnlichkeiten zwischen diesen Abschnitten und Abschnitten aus dem Genom von Bakteriophagen. Daraus entwickelte sich die Hypothese eines noch unbekanntes Abwehrsystems. Die Hypothese wurde zwei Jahre später durch die Beobachtung der Resistenz von *Streptococcus thermophilus* gegenüber Bakteriophagen bestätigt. Die Entdeckung des CRISPR-Cas9-Systems zeigte nicht nur die Sequenz-gerichtete Immunabwehr der Prokaryoten gegen Bakteriophagen, sondern eröffnete auch neue Wege in der Gentechnik.

Die CRISPR-Cas9-Immunabwehr ist aufgrund der Sequenzspezifität besonders wirkungsvoll und hochspezifisch. Sie verleiht den Zellen die Fähigkeit, sich gegen fremde

DNA zu immunisieren, indem eine kurze Sequenz der fremden DNA in das eigene Genom integriert wird. Die Abkürzung CRISPR steht für *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* und bezeichnet die genomische Region, den sogenannten CRISPR-Locus. Dieser besteht aus kurzen palindromischen Sequenzwiederholungen, die von den kurzen variablen Sequenzen der Bakteriophagen, den sogenannten *Spacern* oder den Zielsequenzen, unterbrochen werden. Prokaryoten können mehrere CRISPR-Loci im Genom aufweisen. Der Aufbau eines CRISPR-Locus ist in Abbildung 1 dargestellt.

Bei den *Spacern* handelt es sich um kurze Sequenzabschnitte, die aus vorhergegangenen Infektionen mit Bakteriophagen stammen und in das Genom integriert wurden. Kommt es zu einem Kontakt mit einem unbekanntem Bakteriophagen, so wird ein neuer *Spacer* dem CRISPR-Locus an seinem Ende hinzugefügt. Die *Spacer* dienen als immunologisches Gedächtnis und werden an die Nachkommen weitervererbt.

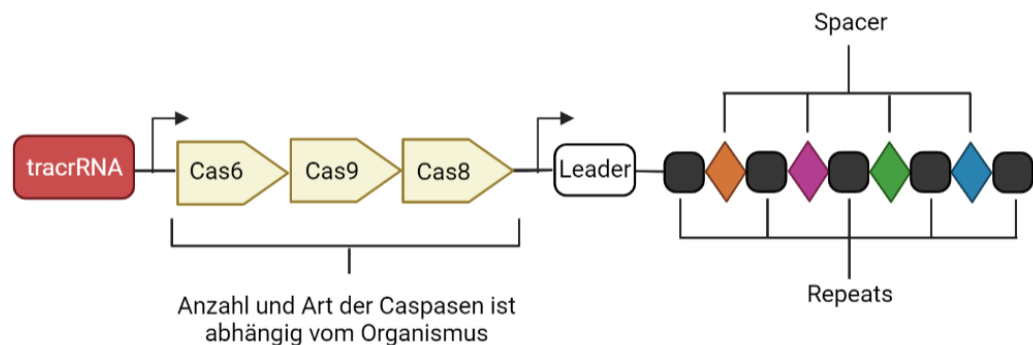


Abb. 1 Aufbau und Komponenten des CRISPR-Locus

Der CRISPR-Locus unterteilt sich in die Gene für die Caspasen-bindende *Tracer*-RNA (*tracrRNA*, rot), die Caspasen-Gene (gelb) und den CRISPR-Array. Der CRISPR-Array besteht aus Gleich, sich wiederholenden Sequenzen (*Repeats*) und den variablen Sequenzen (*Spacern*). Die AT-reiche *Leader*-Sequenz liegt vor den Repeat- und Zielsequenzen und enthält den Promotor für die Transkription des gesamten CRISPR-Arrays. Die *Spacer* kodieren für 20-25 Basenpaar lange Sequenzen fremder DNAs. Bakterien weisen unterschiedliche Caspasen auf die jeweils andere PAM-Sequenz erkennen.

Die Wirkungsweise des CRISPR-Cas-Systems lässt sich im Allgemeinen in drei Phasen unterteilen, die Immunisierung, Expression/Prozessierung und Interferenz. In der Immunisierungsphase wird fremde DNA in Form einer neuen *Spacer*-Sequenz in das Genom integriert. Dieser Schritt wird durch die Caspasen 1 und 2 und die *Leader*-DNA ermöglicht.

Die *Spacer* Fragmente werden immer in nächster Nähe zur *Leader*-Sequenz eingebaut. Während dieses Prozesses wird der letzte *Repeat* verdoppelt und das Muster verschiebt sich um eine Position. Die Abfolge der *Spacer* kann demnach wie ein Zeitstrahl der Infektionen gelesen werden. In der Gentechnologie sind *tracrRNA*, *Repeat*- und *Spacer*-RNA zu einem RNA- Molekül zusammengesetzt worden und bilden die sgRNA. Der Austausch der Zielsequenz wird durch Klonierung synthetischer Oligonukleotide durchgeführt (Abb. 2). Die Auswahl einer geeigneten Zielsequenz ist abhängig vom Vorkommen sogenannter PAM-Sequenzen (*protospacer adjacent motif*) auf dem fremden Genom. Die PAM-Sequenz muss sich direkt hinter der Zielsequenz befinden. Caspase 1 und 2 schneiden nur Zielsequenzen aus dem fremden Genom heraus, welche neben einer PAM-Sequenz liegen. Die PAM-Sequenz wird nicht mit in das Genom integriert da sonst das eigene Genom der Bakterien geschnitten würde. Cas9 erkennt die vier PAM-Sequenzen 5`-(GATC)GG-3`. Bei der Auswahl von Zielsequenzen für das Schneiden genomischer DNA muss daher eine der vier PAM-Sequenz direkt hinter der Zielsequenz liegen [16,17].

In der Expressions- und Prozessierungsphase wird der sgRNA/Caspase-Komplex gebildet. Die Expression des CRISPR-Lokus kann ständig oder erst bei Infektion der Zelle erfolgen. In der Expressionsphase wird die crRNA gebildet die aus einem *Spacer* und *Repeat* Element besteht. Die crRNA hybridisiert mit der *tracrRNA* und bildet eine RNA-Struktur, die von der Caspase erkannt wird (Abb. 2A). Für die gentechnische Anwendung wurde aus den beiden RNA Molekülen ein einziges Molekül, die sgRNA, konstruiert (Abb. 2B).

In beiden Fällen öffnet der crRNA-*tracrRNA*- oder sgRNA-Caspasekomplex die fremde DNA und sucht nach komplementären Sequenzen. Kommt es zu einer Bindung an die Zielsequenz-komplementäre Sequenz unter Vorhandensein der Caspase-spezifischen PAM-Sequenz, wird eine R-Schleife, ausgehend von der crRNA, induziert. Zusammen mit der Caspase wird anschließend, durch Hydrolyse in der Nähe der PAM-Sequenz, der Interferenzkomplex ausgebildet. Die Endonuklease-Aktivität der Caspase bewirkt den Verdau bzw. das Schneiden des DNA-Doppelstrangs.

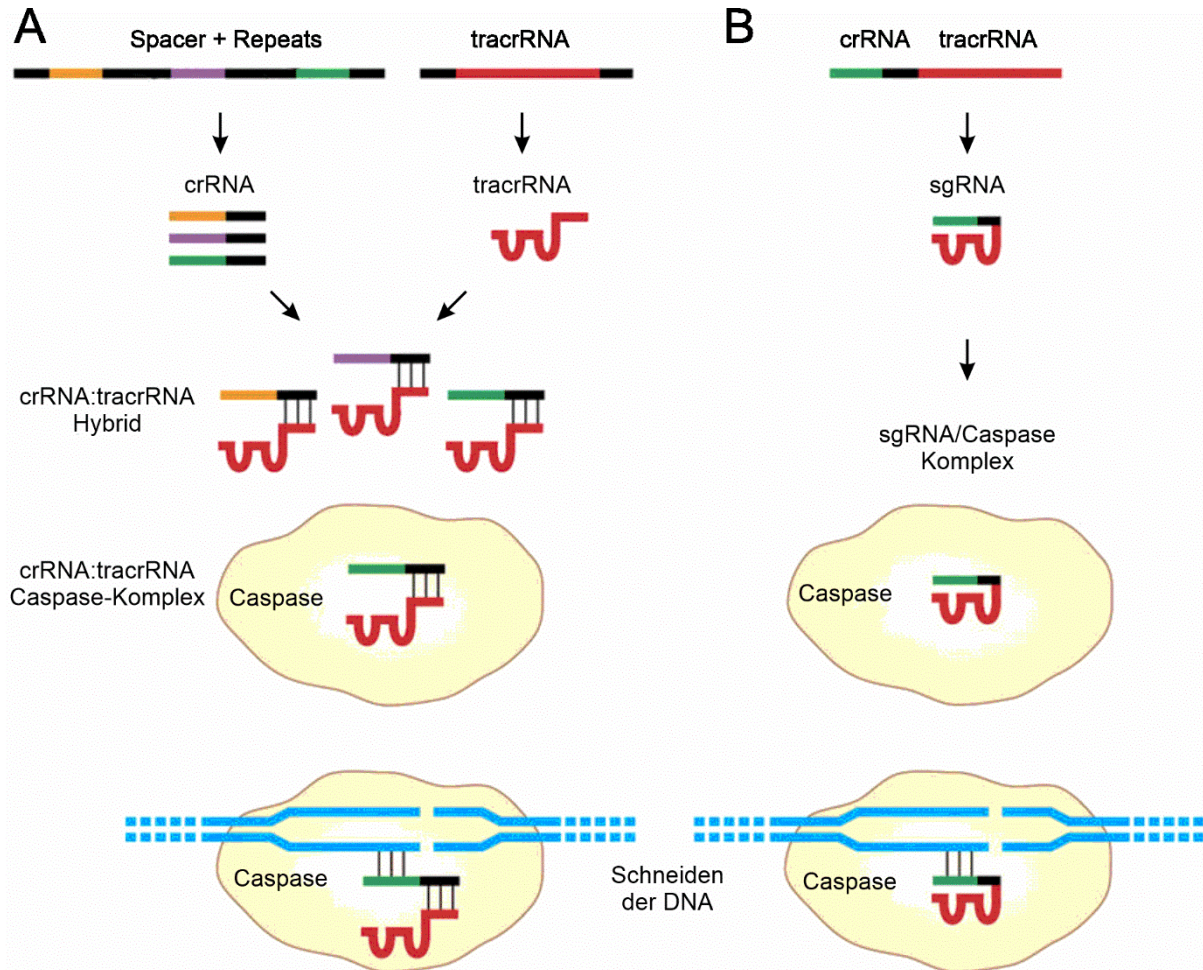


Abb. 2 Aufbau und Funktion des CRISPR-Cas9-Systems

A In Bakterien wird aus den *Spacer*- und *Repeat*-Sequenzen die crRNA gebildet. Diese hybridisiert mit der tracrRNA. An die tracrRNA bindet die Caspase. Zusammen bilden sie den Komplex für die Sequenzerkennung und das Schneiden der DNA.

B Für die gentechnische Anwendung sind die zwei RNA-Elemente, crRNA und tracrRNA zu einer *single-guide*-RNA (sgRNA) zusammengesetzt.

Nach dem Sequenz-spezifischen Schnitt wird der DNA-Doppelstrang auf zwei Weisen repariert. Bei der nicht-homologen Endverknüpfung wird die DNA mit dem fehlenden Abschnitt wieder legiert und es kommt zu einer Deletion. Bei der homologen Rekombination wird ein zweiter Doppelstrang als Vorlage verwendet und das Gen bleibt unverändert. Für die Immunabwehr mit CRISPR ist der Weg der nicht homologen Endverknüpfung entscheidend. Die entstehende Gen-Deletion kann zur Fehlfunktion des entsprechenden Proteins oder zum Verschieben des Leserasters führen, welches die Proteinfunktion dauerhaft inhibiert [8,18,19].

Für die geplante Inaktivierung der Tumorzellen müssen auf dem Genom Zielsequenzen ausgemacht werden, welche einen *Knockout* von Genen, die für das Tumorüberleben oder – deren Wachstum entscheidend sind, hervorrufen. Das CRISPR-Caspase-System muss dann gezielt in die Tumorzellen eingeschleust werden. Eine Möglichkeit besteht in der Verwendung von lentiviralen Vektoren in die das CRISPR/Caspase System integriert wurde. Ausgewählte *Spacer*- bzw. Zielsequenzen können in die sgRNA-Sequenz kloniert werden. Diese Vektoren können als Genome pseudotypisierter Viren eingesetzt werden und somit zellspezifisch in die Zielzelle transportiert zu werden [18]. In der Arbeit werden die Spacer, wie in Abb. 2 immer als die Zielsequenz der sgRNA bezeichnet.

1.3. Lentivirale Vektoren mit CRISPR-Cas9-System

Lentivirale Vektoren, die auf dem Genom des HIV-1 (Humanes Immundefizienz-Virus Typ-1) basieren, sind geeignete Werkzeuge, um beispielsweise das komplette CRISPR/Cas9-System in eukaryotische Zellen zu übertragen. In dieser Arbeit wurden in die LentiCRISPRv2-mCherry (addgene #99154, [19]) und LentiCRTISPRv2-puro (addgene #98290, [20]) Vektoren tumorspezifische Zielsequenzen kloniert (Abb. 3).

Der Vorteil dieser Vektoren besteht darin, dass die wichtigen Enzyme und Proteine des HIV-1 entfernt wurden um Platz für das CRISPR/Cas-9-System zu schaffen. Auf dem Vektor befinden sich die 5'- und 3'-HIV-1 Long Terminal Repeat (LTR) Sequenzen, zwischen denen die für die Replikation des HIV-1-RNA-Genoms wichtigen Sequenzabschnitte liegen (Abb. 3). In 5'-Richtung befindet sich das Ψ -Verpackungselement (HIV-1 Ψ), das HIV-1-Rev-Response-Element (RRE), der zentrale Polypurintrakt (cPPT/CTS), die Zielsequenz, das gRNA scaffold, Cas9, eine Puromycin-Resistenz oder mCherry und das posttranskriptionale regulatorische Element (WPRE).

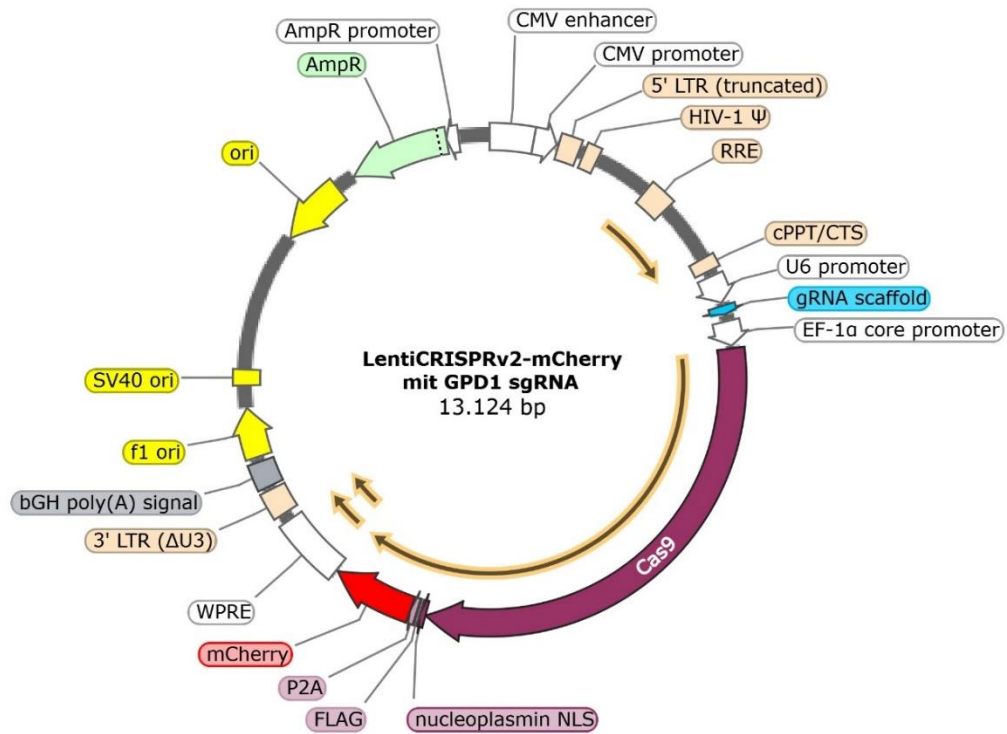


Abb. 3 LentiCRISPRv2-mCherry mit der GPD1-Zielsequenz

Die Zielsequenz für Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase 1 (GPD1) wurde in das Plasmid (addgene #99154) kloniert. Die Restriktionsstellen für BsmBI wurden an den Positionen 2615 und 4500 geschnitten und dadurch ein 1885 bp großes Fragment ausgeschnitten. Die GPD1-Zielsequenz wurde anschließend als synthetisches Oligonukleotid (25 bp) in die entsprechenden 5'- und 3'-BsmBI-Überhänge ligiert. Dargestellt ist der fertige Vektor, der zur Infektion genutzt werden kann.

Der CMV-Promotor leitet die Transkription der HIV-1-RNA am 5'-LTR ein. Diese Transkription umfasst eine RNA bis zum 3'-Ende des LTR. Hinter dem 3'-LTR wird ein Poly-A-Schwanz (SV40 PolyA) transkribiert, welcher die RNA vor dem Verdau der Zelle schützt [21,22]. Das retrovirale Ψ -Verpackungselement, auch als Ψ -RNA-Verpackungssignal bekannt ist an der Regulierung des wesentlichen Prozesses der Verpackung des retroviralen RNA-Genoms in das virale Kapsid während der Replikation beteiligt. Das endgültige Virion enthält ein Dimer aus zwei identischen Kopien des viralen Genoms. Dem Verpackungselement folgt das RRE-Element, welches ein aus etwa 350 Nukleotiden stark strukturiertes RNA-Segment bildet. In Anwesenheit des akzessorischen HIV-1-Proteins Rev wird das virale Genom aufgrund des RRE, aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert. Der Polypurintrakt (cPPT/CTS) ist die für die Synthese des zweiten cDNA Strangs benötigte RT-resistente Sequenz, die nicht durch die RNase-H Aktivität der RT abgebaut wird. Hinter dem Reportergen

liegt das posttranskriptionale regulatorische Element (WPRE), des Woodchuck Hepatitis Virus. Diese DNA-Sequenz erzeugt bei der Transkription eine Tertiärstruktur, die eine Steigerung der Expression der RNA induziert. Das HIV-1-Genom enthält somit alle für die Replikation entscheidenden Sequenz-Elemente mit Ausnahme der viralen Faktoren für den RNA-Transport zur Zellmembran.

Die sgRNA-Transkription wird durch den U6-Promotor eingeleitet. Sie besteht aus der eingesetzten Zielsequenz und dem gRNA-scaffold. Die Expression von Cas9 und dem Reporter unterliegt dem EF-1 α -Promotor. Dieser gehört zum Lenti-X-Expressionssystem, welches außergewöhnlich hohe Titer rekombinanter Lentiviren für die Expression beliebiger cDNA in allen Zelltypen herstellt, die für eine lentivirale Transduktion empfänglich sind. Die konstitutive Expression durch den EF-1 α -Promotor wird genutzt, um die Unterdrückung des CMV-Promotors in Säugetierzellen zu umgehen [23].

Die Reporter mCherry oder die Puromycin-Resistenz werden gleichzeitig mit dem Cas9-Protein exprimiert, wodurch die Expression des Cas9-Enzyms überprüft werden kann. Durch Nachweis der mCherry Fluoreszenz oder durch Zugabe von Puromycin kann die Cas9-Expression nachgewiesen bzw. auf Puromycin resistente Zellen selektiert werden. Damit nach der Cas9 Translation der Puromycin oder mCherry Reporter getrennt translatiert werden kann, liegt zwischen beiden Genen eine P2A-Sequenz. Diese kodiert für 18-22 Aminosäuren langes Peptid und löst während der Translation das ribosomale *Skipping* aus. Dies führt dazu, dass bei der Translation eine Peptidbindung ausgelassen wird. Nach der Cas9 Translation wird das *Skipping* eingeleitet und das Reporterprotein separat translatiert [6,24]. Weiterhin befindet sich am C-terminalen-Ende der Caspase9 ein Kernlokalisierungssequenz (NLS), welches als Markierung dient und den Import in den Zellkern ermöglicht. Auf diese Weise kann Cas9 mit der gebundenen sgRNA in den Zellkern gelangen [25]. Auf allen Vektoren wird unter dem AmpR-Promotor die Ampicillin Resistenz exprimiert, wodurch Bakterien nach einer Transformation selektiv wachsen können. Auf diese Weise kann die Plasmid-DNA selektiv in Bakterienkulturen produziert und anschließend für die Klonierung der Zielsequenzen aufgereinigt werden.

1.4. Auswahl von sgRNA-Zielsequenzen zur Anwendung in GBM

Ein Ziel der Genotypisierungsstrategien ist die Identifizierung von mutierten Genen in GBM-Tumorzellen, die bei der positiven Selektion eine Rolle spielen. Parallele Mutationen sind DNA-Nukleotid-Substitutionen, die am gleichen Genort in Tumorzellen patientenübergreifend nachgewiesen wurden. Solche parallelen Mutationen treten beim

niedriggradigen Gliom für IDH1 auf, wie bereits beschrieben, aber auch bei anderen Genen für Proteine wie EGFR (Epi-dermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) [26,27], TP53 (humanes Tumorprotein 53) [26], PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog) [28]. Darüber hinaus kann jede Mutation, wie stille Mutationen oder Mutationen außerhalb von Genen, zur Identifizierung von parallelen Mutationen verwendet werden. Solche Mutationen sind möglicherweise für die Veränderung des zellulären Phänotyps nicht relevant, können aber zusätzlich als Ziele zur Hemmung oder Abtötung von Tumorzellen verwendet werden. Da diese Mutationen GBM-Tumorzellen von normalen Hirnzellen unterscheiden, könnte die CRISPR-Cas9 sgRNA, die speziell für eine dieser Mutationen entwickelt wurde, diese Tumorzellen inaktivieren. Häufig spielen die parallelen Mutationen eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung, welches sie zu einem optimalen Ziel für eine Gentherapie machen. Durch die Sequenzierung von tumorspezifisch mutierten Genen nach einer Biopsie kann gezielt ein Pseudotyp mit passender sgRNA eingesetzt werden.

Weiterhin können Gene in Tumorzellen aufgrund von Mutationen inaktiviert sein. Führt eine solche Mutation, wie bei IDH1, zur Abhängigkeit von einem Enzym, so kann eine Inaktivierung durch CRISPR die Synthese vollständig hemmen. Toledo et al. (2015) hat mit einer genomweiten Sequenzierung eine Abhängigkeit von GBM-Zellen von den Genen PKMYT1 und WEE1 beobachtet [29]. Aus diesen Resultaten kann geschlossen werden, dass eine Inhibition eines der Enzyme Auswirkungen auf die Vitalität der GSC hat, aber keinen Effekt auf die gesunden Zellen hat. Zudem können Mutationen auch Enzymfunktionen steigern und das Tumorwachstum beschleunigen oder das Zellüberleben steigern. Eine Studie von Rusu et al. (2019) ergab, dass ein erhöhter Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase-1 (GPD1) Spiegel mit der gesteigerten Wachstumsgeschwindigkeit der GBM-Zellen zusammenhängt. Eine Verringerung des GPD1-Spiegels durch Inhibition hat zur Reduktion des Tumorwachstum in Mäusen geführt [30].

In vielen Krebsarten wurden zudem Mutationen des Promoters der Reversen Transkriptase der Telomerase (TERT) festgestellt. Die Mutationen führen zu einer höheren Aktivität, wodurch es zu einer gesteigerten Expression des TERT-Gens kommt. Die reverse Transkription ermöglicht den Tumorzellen eine unbegrenzte Zellteilung, da die Telomerasen stets erneuert werden. Da in gesunden Zellen das Gen meist nicht oder nur geringfügig exprimiert wird, bietet der Gen-*Knockout* von TERT einen züversichtlichen Ansatzpunkt die Zellproliferation der GSC-Zellen zu minimieren [31,32].

1.5. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollen Zielsequenzen für sgRNAs ausgesucht werden, die das Wachstum von Glioblastom Grad IV Tumorzellen inhibieren. Dazu sollen Sequenz-Datenbanken und die Literatur nach potenziellen Tumor-spezifischen Genmutationen durchsucht werden. Zusätzlich sollen eigene Zielsequenzen entworfen werden, die z.B. parallelen Mutationen entsprechen. Die ausgewählten Sequenzen sollen als synthetische Oligonukleotide in zwei verschiedene lentivirale Vektoren kloniert werden.

Dazu stehen zwei Plasmide, LentiCRISPRv2-mcherry und LentiCRISPRv2-puro zur Verfügung. Die Klonierung erfolgt in die BsmBI-Schnittstelle, welche zwischen beiden Vektoren kompatibel ist. Zusätzlich soll eine vereinfachte Klonierungsmethode etabliert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material und Ausrüstung

2.1.1. Geräte

Name	Beschreibung	Hersteller
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraceus
	Centrifuge 5810 R, Rotor FA-45-6-30	Eppendorf
	Avanti Centrifuge J-26XP	Beckman Coulter
Elektrophorese Kammer	Horiton 58	Life Technologies
Fluoreszenz Mikroskop	EVOS FL Auto	Life Technologies
Mikroskop	Diavert	Leitz
Inkubator	CB 150	Binder
	INE 500	Memmert
	Schüttelinkubator 3031	GFL
Pipetten	Research plus (verschiedene Größen)	Eppendorf
	Pipetman (verschiedene Größen)	Gilson
Skalpell	Metallklinge	B. Braun
Sterilwerkbank	Sterilgard III Advance	Baker Company
Thermocycler	Tprofessional Thermocycler	Biometra
	Mastercycler Gradient	Eppendorf
Thermomixer	Thermomixer comfort, 1,5 mL Tubes	Eppendorf
DNA-Messgerät	NanoDrop	Thermo Scientific
Vortexer	VF2	IKA Labortechnik

2.1.2. Verbrauchsmittel

Name	Beschreibung	Hersteller
Pipetten Spitzen	Biosphere Filter Spitzen (versch. Größen)	Sarstedt
Serologische Pipetten	Costar Stripette (verschiedene Größen)	Corning
Laborflaschen	Verschiedene Größen	Schott Duran
Reaktionsgefäße	Verschraubbare Reaktionsgefäße und Safe Seal Reaktionsgefäße (verschiedene Größen)	Sarstedt
	Verschraubbare Mikroreaktionsgefäße 1,5 mL	Sarstedt

Zentrifugenröhrchen	50 mL, 120x7 mm, PP	
	15 mL, 114x28 mm, PP	Sarstedt
Petrischalen	92x16 mm mit Nacken 82.1473	Sarstedt
Küvetten	1 mL, OS, QS	Helma

2.1.3. Chemikalien

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Ethanol 99.8%	Roth
Ethidiumbromid 10 mg/mL	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
LB Agar	Roth
LE Agarose	Biozym
TRIS	Roth
Essigsäure	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Trypton	Roth
Hefeextrakt	AppliChem
Kaliumacetat	Roth
Rubidiumchlorid	Sigma Aldrich
Magnesiumchlorid	Roth
Calciumchlorid	Roth
Glycerin	Roth
Na-MOPS	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth

2.1.4. Reagenzien

<u>Name</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Hersteller</u>
Antibiotika	Ampicillin Natrium Salz	Roth
Puffer	Cutsmart Puffer	NEB
	10x T4 Ligase Puffer	NEB
	5x Phusion HF Reaktionspuffer	NEB

DNA Marker	GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific
Farbstoff	Loading Dye Purple 6X	NEB
Nukleotide	dNTP	NEB
Enzyme	Trypsin/EDTA	Pan Biotech
	Phusion HF DNA-Polymerase	NEB
	BsmBI.v2	NEB
	T4 Ligase	NEB

2.1.5. Zellen

Name	Organismus	Herkunft
DH5 α	<i>E. coli</i>	BNITM

2.1.6. Plasmide

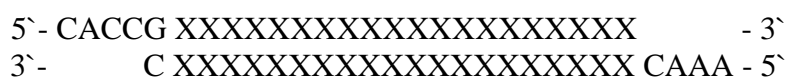
Name	Beschreibung	Hersteller
LentiCRISPRv2-mCherry	Lentiviral basierter Vektor, Cas9 Funktion, mCherry Reporter, #99154	Addgene
LentiCRISPRv2-puro	Lentiviral basierter Vektor, Cas9 Funktion, puro-Resistenz Reporter, #98290	Addgene

2.1.7. Reagenzien-Kits

Name	Hersteller
NucleoBond Xtra Plasmid DNA Purification	Machery-Nagel
NucleoSpin Plasmid	Machery-Nagel
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen

2.2. Oligonukleotide für die Klonierung mit BsmBI-Überhängen

Die Oligonukleotide wurden nach dem Protokoll des Zhang-Lab erstellt (Anhang 7.3). Für eine Ligation wurden zwei Oligonukleotide mit folgenden überstehenden 5'- und 3'-Enden konstruiert:



Durch die beiden unterschiedlichen Überhänge erfolgte eine orientierte Insertion der Oligonukleotide in die lentiviralen Vektoren. Die Oligonukleotide wurden bei Metabion

mit einer Konzentration von 100 μM (entsalzt) bestellt. Nach der Ankunft wurden die Oligonukleotide bei -20 Grad gelagert.

2.3. Herstellung kompetenter DH5 α - Bakterien

In einem Reagenzglas wurden 3 mL YT-Medium vorgelegt und mit einer Einzelkolonie von *E. coli* DH5 α angeimpft. Das Reagenzglas wurde über Nacht unter Rotation (37 °C, Memmert Inkubator INE 500) inkubiert. In einem 1000 mL Erlenmeyerkolben wurden 100 mL YT-Medium und 2 mL der Übernachtskultur zusammengegeben. Die Kultur wurde in einem Laborschüttler (37 °C, 180 rpm, Inkubator GFL, 3031) inkubiert, bis die optische Dichte (OD_{600}) zwischen 0,3 und 0,4 lag. Das Zellwachstum wurde gestoppt, indem der Erlenmeyerkolben auf Eis gestellt und dann gedreht wurde. Je Erlenmeyerkolben wurden 100 mL des TFB I – Puffers und 5 mL des TFB II – Puffers benötigt und vorab auf Eis gestellt. Von der gekühlten Kultur wurde je 50 mL in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 4500 rpm und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert (Eppendorf, Zentrifuge 5810 R, Rotor FA-45-6-30). Es war wichtig, dass die Zentrifuge vor der Benutzung auf 4 °C gekühlt war, damit die Bakterienkultur sich nicht wieder erwärmte. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in je 50 mL TFB I–Puffers suspendiert. Anschließend wurden die Zentrifugenröhrchen für 15 Minuten auf Eis inkubiert und erneut bei 4500 rpm und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert (Eppendorf, Zentrifuge 5810 R, Rotor FA-45-6-30). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in je 2,5 mL des TFB II–Puffers gelöst. Die so hergestellten kompetenten Bakterien wurden zu je 100 μL in PCR Reaktionsgefäße bei minus 70 °C eingefroren und konnten anschließend für die Transformation verwendet werden.

1L YT-Medium	8 g	Trypton
	5 g	Natriumchlorid
	5 g	Hefeextrakt

TFB I - Puffer	30 mM	Kaliumacetat
	100 mM	Rubidiumchlorid
	50 mM	Manganchlorid
	10 mM	Calciumchlorid
	15 %	Glycerin

Nach Zugabe der Reagenzien wurde der pH-Wert mit Natronlauge auf 5,8 eingestellt und der Puffer sterilfiltriert.

TFB II - Puffer	10 mM	Na-MOPS
	10 mM	Rubidiumchlorid
	75 mM	Calciumchlorid
	15 %	Glycerin

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 6,8 eingestellt und der Puffer sterilfiltriert.

2.4. Transformation von Bakterien

Bei der Transformation soll durch einen Hitzeschock Plasmid DNA in *E. coli* DH5 α Zellen gelangen. Dazu wurden 100 μ L der gefrorenen kompetenten Zellen (-70 °C) und 1 μ g der Plasmid DNA in einem PCR-Reaktionsgefäß zusammengegeben und 10 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde das PCR-Reaktionsgefäß für 3 Minuten im Thermocycler (Eppendorf, Mastercycler Gradient, 42 °C) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien wieder für 10 Minuten auf Eis gestellt. In einem 1,5 mL Reaktionsgefäß wurde 1 mL YT-Medium vorgelegt und nach der Inkubation auf Eis wurden die kompetenten Bakterien dem YT-Medium zugegeben. Die Kultur wurde bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Zum Ausplattieren wurden 100 μ L der Kultur auf eine YT-Amp-Agarplatte pipettiert und mit einem Glasstab ausgestrichen. Die restliche Kultur wurde bei 8000 rpm für 20 sec zentrifugiert (Heraeus, Biofuge pico) und der Überstand bis auf einen kleinen Rest, ca. 100 μ L, verworfen. Das Pellet wurde im restlichen Überstand suspendiert und auf eine neue YT-Amp-Agarplatte ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert (Mettler, GFL 3031). Dieses Verfahren wurde für die Lenti-Vektoren und klonierte Vektoren verwendet.

YT-Medium	8 g	Trypton
	5 g	Natriumchlorid
	5 g	Hefeextrakt
	1000 mL	ddH ₂ O
YT-Amp-Agar	8 g	Trypton
	5 g	Natriumchlorid
	5 g	Hefeextrakt
	16 g	Agar
	1000 mL	ddH ₂ O
	6 mL	Ampicillin 60mg/ml

Der YT-Agar wurde ohne Ampicillin autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das Ampicillin bei ca. 45 °C hinzugegeben und der Agar in die Petrischalen gegossen. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, um sie auf Kontaminationen zu prüfen.

2.5. CRISPR one-step cycle ligation

Bei dem *one-step cycle* Ligations-Verfahren werden das Plasmid, die Oligonukleotide, das Restriktionsenzym BsmBI und die T4-Ligase gleichzeitig eingesetzt. Das Verfahren zur Klonierung der Zielsequenzen wurde nach der Anleitung des Golden Gate Protokolls (vgl. Anhang 7.2) durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde dazu in einem PCR-Röhrchen angesetzt und durchlief im Thermocycler festgelegte Temperaturen in voreingestellten Zeitintervallen (Mastercycler Gradient, Eppendorf). In ersten Schritt erfolgte

der Restriktionsverdau durch *BsmBI* bei 42 °C. Im zweiten Schritt ligiert die T4-Ligase bei 16 °C die Oligonukleotide an die *Sticky*-Enden des *BsmBI* geschnittenen Plasmids. Nach Abschluss der Zyklen wurde der Reaktionsansatz für 20 Minuten bei 80 °C inkubiert, um die Enzyme zu inaktivieren. Anschließend wurde die Temperatur bei 15 °C gehalten, bis die Probe dem Thermocycler entnommen wurde. Die Ligation wurde mit DH5 α -Zellen transformiert.

Reaktionsansatz	1 μ L	LentiCRISPR.v2-mCherry (0,5 μ g/ μ L)
	3 μ L	10x T4 Ligase Puffer
	10 μ L	Oligonukleotide 1 μ M (rev + for)
	1 μ L	<i>BsmBI</i> (NEB) 10U/ μ l
	1 μ L	T4-Ligase (NEB) 5U/ μ l
	15 μ L	ddH ₂ O

Thermocycler Protokoll	Schritt 1: 42 °C, 3 min
	Schritt 2: 16 °C, 3 min
	60 Zyklen von Schritt 1 und 2
	Schritt 3: 80 °C, 20 min
	Schritt 4: 15 °C, ∞

2.6. PCR Scan

Um den Vektor nach der One-step-ligation auf die inserierte Zielsequenz zu überprüfen wurden fünf Kolonien aus der Transformation gewählt. Die Einzelkolonie wurde in einem PCR Reaktionsgefäß in 20 μ L ddH₂O gelöst und mit der Pipette ein Punkt mit ca. 1 μ l der Bakteriensuspension auf eine neue Ampicillin-Platte gegeben. Für die PCR wurde ein Primer 250 bp vor der Ligationsstelle des Targets ausgewählt und als *forward* Oligonukleotid bestellt. Als zweiter PCR-Primer wurde das *reverse* Oligonukleotid der jeweiligen Zielsequenz verwendet. Der Reaktionsansatz wurde in einem PCR-Röhrchen angesetzt und durchlief im Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf) festgelegte Temperaturen in voreingestellten Zeitintervallen. In Schritt 1 erfolgte das Denaturieren der DNA und somit die Trennung der Doppelhelix. In Schritt 2 lagern sich die Primer an den DNA-Einzelstrang an. In Schritt 3 erfolgte die Elongation der Primer durch die Taq-Polymerase. Die Wiederholung der Schritte ermöglichte das Anreichern des etwa 250 bp großen Fragments. Anschließend wurde die Temperatur bei 15 °C gehalten, bis die Probe dem Thermocycler entnommen wurde. Die Proben wurden mittels der Gel-Elektrophorese überprüft. Von positiven Proben konnten anschließend aus der markierten Ampicillin-Platte jeweils zwei Kolonie entnommen und in einer Plasmid-Extraktion das Plasmid für die Sequenzierung angereichert werden.

forward Oligonukleotid 5` - CGGATCGGCACTGCGTGCGCC - 3`

Reaktionsansatz	32,5 µL	ddH ₂ O
	10 µL	5x Phusion HF Reaktionspuffer
	2,5 µL	<i>forward</i> Oligo 10µM
	2,5 µL	<i>reverse</i> Oligo10 µM
	0,5 µL	Phusion HF DNA Polymerase 2U/µl
	1 µL	dNTP

Thermocycler Protokoll	35 Zyklen von Schritt 1 bis 3
	Schritt 1: 98 °C, 30 sec
	Schritt 2: 55 °C, 30 sec
	Schritt 3: 72 °C, 1 min
	Schritt 4: 15 °C, halten

2.7. Agarose Gel Elektrophorese

Der Nachweis von DNA und deren Größe erfolgte mit der Gel-Elektrophorese in einem 0,9 % Agarosegel. Dazu wurde die Agarose eingewogen und in TAE Puffer in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. In die Elektrophorese Kammer wurde auf das Trennbett (7 cm x 7cm) 1 µL Ethidiumbromid pipettiert. Anschließend wurde die Agarose hineingegossen und mit dem Ethidiumbromid verrührt. Zuletzt konnten ein oder zwei Kämme (8 Taschen, Breite 1 mm) in die vorgesehenen Plätze eingesetzt werden. Nach dem Erstarren der Agarose konnten die Kämme und die Begrenzungen zum Gießen vorsichtig entfernt werden und TAE-Puffer bis knapp über das Agarosegel in die Kammer (Horiton 58, Life Technologies) gefüllt werden. Zur Kontrolle wurde ein DNA-Marker (Gene Ruler 1 kb DNA ladder, Thermo Scientific) verwendet. Die Proben wurden mit jeweils 4 µL *Loading Dye* (Purple (6X), NEB) versehen und mit ddH₂O auf insgesamt 15 µL aufgefüllt. Die Separation erfolgte bei 87 V und 100 mA (die Zeit wurde abhängig von der DNA-Größe gewählt, 40 Minuten für Plasmide und 25 Minuten für Fragmente). Die Auswertung des Gels erfolgte unter UV-Licht.

TAE Puffer	40 mM	TRIS
	20 mM	Essigsäure 99% (Eisessig)
	2 mM	EDTA

2.8. Mini-Plasmid Extraktion

In einem Reagenzglas wurde 4 mL dYT-Amp-Medium vorgelegt und eine transformierte Kolonie mit einem Glasstab zugegeben. Das Reagenzglas wurde mit einer Alukappe verschlossen und im Inkubator über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bei 11.000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach dem *Protocol-at-a-glance* (Rev.09), *NucleoSpin* Plasmid Protokoll. Die Aufreinigung konnte durch Messung am NanoDrop Photometer und durch eine Gel-Elektrophorese überprüft werden.

dYT-Amp-Medium	16 g	Trypton
	5 g	Natriumchlorid
	10 g	Hefeextrakt
	5 mL	Ampicillin (60mg/mL)
	1000 mL	ddH ₂ O

2.9. Maxi-Plasmid Extraktion

In einem 1000 mL Erlenmeyerkolben wurden 250 mL dYT-Medium mit Ampicillin vorgelegt und eine Kolonie *E. coli* DH5 α Zellen mit einem Glasstab zugegeben. Die Kultur wurde in einem Laborschüttler (37 °C, 180 rpm, Inkubator GFL, 3031, Memmert) über Nacht inkubiert. Die Zellsuspension wurde in eine Flasche überführt und bei 10.000 g für fünf Sekunden zentrifugiert (Avanti J-26XP, Beckman Coulter). Das Bakterienpellet wurde in 8 mL Resuspensionspuffer (mit RNase) gelöst und anschließend mit 8 mL Lysis-Puffer versetzt. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde 8 mL Neutralisationspuffer zugegeben und vorsichtig gemischt, bis die blaue Suspension farblos wurde. Das Lysat wurde in ein 50 mL Falcon überführt und bei 10.000 g für 15 Minuten zentrifugiert (5810 R, Rotor FA-45-6-30, Eppendorf). Während der Zentrifugation wurde der Papierfilter mit 12 mL Equilibrierungspuffer befeuchtet. Der Überstand wurde auf den Papierfilter gegeben und das Pellet verworfen. Der Papierfilter wurde anschließend mit 5 mL Equilibrierungspuffer gewaschen und ebenfalls verworfen. Die Säule wurde anschließend mit 8 mL Waschpuffer gewaschen. In einem 15 mL Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) wurden 3,5 mL Isopropanol vorgelegt. Die DNA wurde mit 5 mL Elutionspuffer eluiert und in den Isopropanol-Röhrchen aufgefangen. Die DNA-Lösung wurde bei 15.000 g für 30 Minuten zentrifugiert (5810 R, Rotor FA-45-6-30, Eppendorf). Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das DNA-Pellet in 500 μ L ddH₂O gelöst und anschließend in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Das Zentrifugenröhrchen wurde erneut mit 200 μ L ddH₂O gewaschen und die DNA-haltigen Lösungen vereinigt. Die Plasmid-DNA wurde in einem weiteren Schritt Ethanol gefällt und aufkonzentriert.

2.10. DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurden 20 µL Plasmid aus der Mini-DNA-Präparation mit einer Konzentration von 80 ng/µL Plasmid angesetzt. Zur Verdünnung der Proben wurde ddH₂O verwendet. Die Sequenzanalyse wurde von LGC-Genomics (Berlin) mit dem hU6-F-Primer durchgeführt. Die Ergebnisse konnten nach zwei Werktagen online eingesehen werden (vgl. Anhang 8.4.). Vektoren mit erfolgreicher DNA-Sequenzierung wurden mittels einer Plasmid-Extraktion (Methode 2.9) für weitere Experimente angereichert.

2.11. Ethanol Fällung

Die DNA aus der Plasmid-Extraktion wurde mit dieser Methode weiter aufgereinigt und konzentriert. Dazu wurde die gesamte DNA-Lösung auf Eis gekühlt und mit 50 µL Natriumacetat versetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß bis 1,5 mL mit Ethanol aufgefüllt. Die Lösung wurde für 15 Minuten auf Eis inkubiert und bei 15.000 g für 15 Minuten zentrifugiert (5810 R, Rotor FA-45-6-30, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Plasmid-Pellet bei 42 °C mit offenem Deckel im Reaktionsgefäß getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 150 µL ddH₂O gelöst, dabei wurde mit einem Vortex das Reaktionsgefäß geschüttelt. Zum Nachweis der DNA wurde das Verfahren der Gel-Elektrophorese verwendet.

2.12. Messung und Konzentrierung der DNA

Konnte in der Gelelektrophorese Plasmid-DNA nachgewiesen werden, wurde die DNA zusätzlich im NanoDrop Photometer vermessen. Durch Zugabe von ddH₂O wurde die Plasmid-Konzentration (C_{dsDNA}) auf 1 µg/µL eingestellt.

$$C_{dsDNA} = \frac{A}{0.02 (\mu\text{g/mL})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}} = A \times 50 \mu\text{g/mL (or ng/\mu L)}$$

3. Ergebnisse

3.1. Aus der Literatur entworfene sgRNA-Zielsequenzen

3.1.1. sgRNA-Zielsequenzen gegen tumorfördernde Gene

Die Tumorentstehung resultiert aus einer Folge von zufälligen Mutationen auf dem Genom. Oft sind davon dieselben Gene betroffen, welches den Tumorzellen z.B. Immortalität, und eine schnellere Proliferation verleihen. Für eine Inaktivierung mit der CRISPR-Cas9-Genschere eignen sich Gene, die durch Mutationen überexprimiert werden. Die erhöhte Genexpression kann oft mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht werden. Eine Senkung der Genexpression oder die vollständige Inhibition kann für eine Verlangsamung der Proliferation entscheidend sein. In dieser Arbeit wurden Zielsequenzen für das GPD1- und TERT-Gen aus der Literatur übernommen (Tabelle 1 und Tabelle 2) [33–35] und in die BsmBI-Schnittstelle der beiden lentiviralen Vektoren kloniert (Abb. 4).

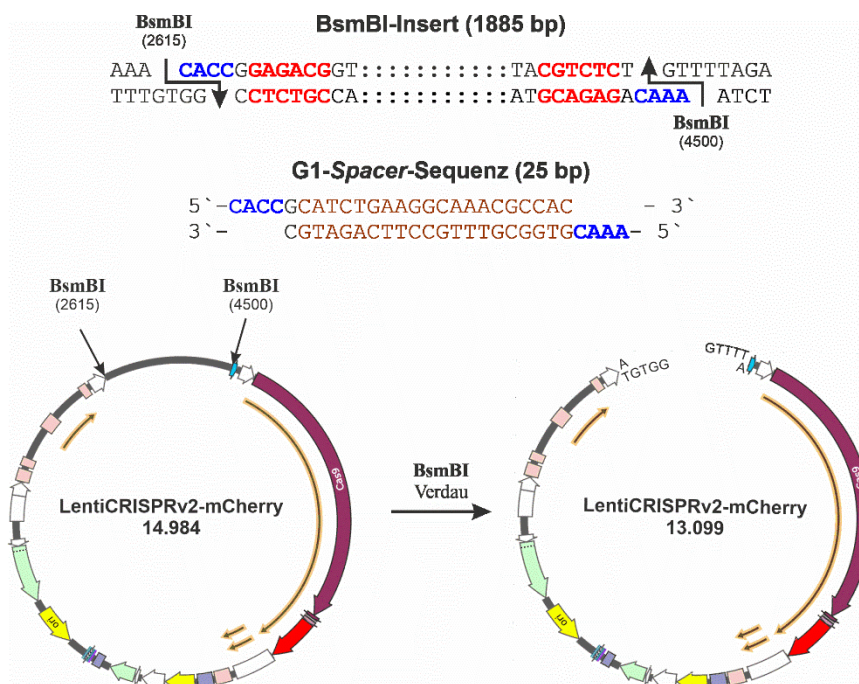


Abb. 4: BsmBI-Klonierung der Zielsequenzen in die lentiviralen Vektoren.

Durch Schneiden mit BsmBI wird ein 1860bp großes DNA-Fragment ausgeschnitten. Dadurch werden zwei verschiedene Überhänge erzeugt und die beiden BsmBI-Erkennungssequenzen (fett, rot) aus dem Vektor entfernt. Anhand der beiden unterschiedlichen Überhänge wird die Zielsequenz in der richtigen Orientierung in den Vektor legiert. Der fertige sgRNA-Vektor besitzt keine BsmBI-Schnittstelle und ist daher BsmBI resistent. Die Kombination aus BsmBI und T4-Ligase ermöglicht daher eine Klonierung mit Hilfe der One-Step-Ligation (Methode 2.5).

3.1.1.1. Das Enzym Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase 1

Die Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase 1 (GPD1) spielt eine entscheidende Rolle im Kohlenstoff- und Lipidstoffwechsel. GPD1 wandelt Dihydroxyacetonphosphat um und reduziert Nikotin-Adenin-Dinukleotid in NAD^+ . Das zytosolische Protein und die mitochondriale Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase bilden ein Glycerin Phosphat-Shuttle, der den Transfer von Äquivalenten in die Mitochondrien erleichtert [36,37]. In Zellen des Glioblastom Multiform wird GPD1 verstärkt exprimiert. Die erhöhte Expression des Enzyms konnte mit einer schlechten Prognose bei GBM Patienten in Verbindung gebracht werden. Wurde das Gen jedoch gezielt in den Zellen reguliert und inhibiert, wurde in kultivierten GBM Zellen ein Verlust Ausbildung von Rezidiven beobachtet [30]. Da besonders bei GSC das Wiederauftreten des Tumors einer Heilung entgegenwirkt, eignet sich die Inaktivierung des GPD1-Gens. Für die Inaktivierung von GPD1 mit CRISPR-Cas9 stehen Zielsequenzen zur Verfügung [34] (Tabelle 1A). Es wurden drei Zielsequenzen ausgewählt und als Oligonukleotide in die BsmBI-Schnittstelle der beiden lentiviralen Vektoren LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRISPRv2-puro kloniert (Tabelle 1B).

Tabelle 1: Zielsequenzen für GPD1 spezifische sgRNAs

A

Gen	Bez.	Lit.	Ort	sgRNA	PAM
GPD1	G1	[34]	Exon 3 48785700-48785720	CATCTGAAGGCAAACGCCAC	TGG
	G3	[34]	Exon 2 48784627-48784647	CTCAGCCATCGCCAAGATCG	TGG
	G5	[34]	Exon 3 48785675-48785695	CAAGATCTGTGACCAGCTCA	AGG

B

GPD1

Bezeichnung	Sequenzen der Oligonukleotide	
G1	Forward	5`- CACCG CAT CTG AAG GCA AAC GCC AC - 3`
	Reverse	3`- C GTA GAC TTC CGT TTG CGG TG CAAA - 5`
G2	Forward	5`- CACCG CTC AGC CAT CGC CAA GAT CG - 3`
	Reverse	3`- C GAG TCG GTA GCG GTT CTA GC CAAA - 5`
G3	Forward	5`- CACCG CAA GAT CTG TGA CCA GCT CA - 3`
	Reverse	3`- C GTT CTA GAC GCT GGT CGA GT CAAA - 5`

3.1.1.2. Das Enzym Telomerase Reverse Transkriptase

Die Struktur und Integrität der Telomere sind für die Stabilität des Genoms essenziell. Für die Aufrechterhaltung der Telomere ist Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) zuständig. In einzelligen Organismen ist die Telomerase Aktivität hoch, wodurch sich der Organismus unendlich teilen kann. In mehrzelligen Organismen ist die Telomerase Aktivität stark unterdrückt, ausgenommen sind dabei die Zellen der Keimbahn, profilierende Gewebe und hämatopoetische Gewebe. Durch Mutationen, besonders im Promotorbereich von TERT, kann es zur Hochregulierung der Aktivität kommen, was zur Profilerationsfähigkeit von Tumorzellen führt [31,38–40]. Da das Senken dieser Aktivität auch die Profileration der Krebszellen inhibiert, bietet sich dieses Gen besonders gut als inhibitorisches Ziel an (Tabelle 2A) [35]. Für TERT wurde eine Zielsequenz als BsmBI-Oligonukleotid in die LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRISPRv2-puro Vektoren kloniert (Tabelle 2B).

Tabelle 2: Zielsequenzen für die TERT spezifische sgRNA

A

Gen	Bez.	Lit.	Ort	sgRNA	PAM
TERT	TT1	[35]	Exon 4 1311741-1311760	AGATGTTGGTGCACACCGTC	TGG

B

TERT

Bezeichnung	Sequenzen der Oligonukleotide	
TT1	Forward	5'- CACCG CAT CTG AAG GCA AAC GCC AC - 3`
	Reverse	3`- C GTA GAC TTC CGT TTG CGG TG CAAA - 5`

3.1.2. sgRNA-Zielsequenzen für Second-Pathway Gene

Viele lebensnotwendige Stoffwechselprodukte werden in Zellen auf zwei verschiedenen Wegen hergestellt (*second pathway*). Wenn es zur Inhibition oder Inaktivierung eines der dafür notwendigen Gene kommt, kann die Zelle weiterhin über den zweiten Weg das Produkt synthetisieren. Aufgrund der hohen Mutationsrate in Tumorzellen kann es zu Inaktivierungen eines dieser Wege kommen, wodurch die Tumorzelle von der Aktivität des zweiten Enzyms abhängig wird. In Glioblastomen wurde nachgewiesen, dass PKMYT1 oder WEE1 inaktiv sein können und daher das Ausschalten des zweiten Faktors die Inhibition der PKMYT1/WEE1 Funktion bewirkt. Das CRISPR-Cas9-System kann in GBM einen Gen-*Knockout* hervorrufen, welcher durch Wegfall der PKMYT1 und WEE1 Aktivität zur Senkung der Zellproliferation führen kann [41]. In niedriggradigen Gliomen ist zudem das IDH1 Enzym inaktiv, welches zu einer Abhängigkeit von NAMPT führt. Da bereits an Therapien geforscht wird, die NAMPT inaktivieren, wäre es von Vorteil, mit dem CRISPR-Cas9-System IDH1 zu inaktivieren und auf diese Weise die Anwendung der NAMPT-Therapie auch bei Gliomen vom Grad IV zu ermöglichen [4].

3.1.2.1. Die Membran assoziierte Tyrosin/Threonin Protein Kinase 1 und WEE1

Die Membran assoziierte Tyrosin/Threonin Protein Kinase 1 (PKMYT1) ist eine Cdc2-Kinase und zählt ebenso wie WEE1 zur WEE-Familie. Beide Enzyme gelten als Mitose hemmende Inhibitoren des Menschen. PKMYT1 und WEE1 phosphorylieren Tyr 15 und Tyr 14 an der ATP Bindungsstelle von Cdk und hemmen somit dessen Funktion. Die Phosphorylierung ist von Bedeutung zu Beginn der Mitose, da es zu einer Aktivierung des M-Cdks kommt. Auf diese Weise wird die Zellgröße und Proliferation reguliert. Werden DNA-Schäden erkannt, bleibt Cdk inaktiv und die Mitose wird gestoppt. Auf diese Weise können schädliche Mutationen während der Zellproliferation verhindert werden, was der Bildung von Tumorzellen vorbeugt. Die biologische Rolle von PKMYT1 und WEE1 in Krebszellen ist nicht vollständig geklärt, anders als vermutet zeigen Ergebnisse aber, dass beide Proteine als Onkogene in Krebszellen wirken. Es wird vermutet, dass aufgrund der Überexpression die DNA-Stabilität über solche Enzyme erhalten bleibt. Zum anderen entfallen aufgrund der TP53 Inaktivierung Regulierungen in der Mitose, welches auf eine Abhängigkeit von der WEE1 Familie deuten lässt. Die Hochregulierung der Gene lässt darauf schließen, dass bei der Tumorbildung, ein bestimmtes Maß an Stabilität erhalten bleiben muss, um das Überleben der Krebszellen zu sichern.

Eine Genomweite Sequenzierung von Toledo et al. ergab, dass sich PKMYT1 und WEE1 in GSC wie synthetische Letalitätsfaktoren verhalten [29]. In gesunden Zellen müssen beide Gene inaktiv sein, damit ein letaler Effekt bei den Zellen zu beobachten ist. In GSC konnte jedoch bereits nach der Inaktivierung eines der Gene ein Verlust der Stabilität und das Sterben der Krebszellen beobachtet werden. Demnach wäre zu erwarten, dass eine spezifische Zielsequenz für PKMYT1 oder WEE1 (Tabelle 3A) sich bei Tumorzellen letal auswirken würde [29,42]. Für beide Faktoren wurden fünf Zielsequenzen ausgewählt und in die lentiviralen Vektoren kloniert (Tabelle 3B).

Tabelle 3: Zielsequenzen für PKMYT1 und WEE1 spezifische sgRNAs

A

Gen	Bez.	Lit.	Ort	sgRNA	PAM
PKMYT1	P1	[43]	Exon 7 2966923-2966943	GGGAGAATCCAGGTTCTGCG	TGG
	P2	[44]	Exon 6 2965436-2965456	CGAAGTCACCCAGCTTGCAG	CGG
WEE1	W1	[45]	Exon 2 9554061-9554080	CCATGAAGAGAGAACTACC C	CGG
	W2	[44]	Exon 9 9564678-9564698	TCAGACAGGGTAGATTACCT	CGG
	W3	[44]	Exon 9 9564664-9564684	TCAATGGCATGAAATCAGAC	AGG

B

PKMYT1

Bezeichnung	Sequenzen der Oligonukleotide	
P1	Forward	5`CACCG GG GAG AAT CCA GGT TCT GCG - 3`
	Reverse	3`- C CC CTC TTA GGT CCA AGA CGC CAAA - 5`
P2	Forward	5`CACCG CGA AGT CAC CCA GCT TGC AG - 3`
	Reverse	3`- C GCT TCA GTG GGT CGA ACG TC CAAA - 5`

WEE1

Bezeichnung	Sequenzen der Oligonukleotide	
W1	Forward	5`CACCG CC ATG AAG AGA GAA CTA CCC - 3`
	Reverse	3` C GG TAC TTC TCT CTT GAT GGG CAAA - 5`
W2	Forward	5`CACCG TCA GAC AGG GTA GAT TAC CT - 3`
	Reverse	3` C AGT CTG TCC CAT CTA ATG GA CAAA - 5`
W3	Forward	5`CACCG TCA ATG GCA TGA AAT CAG AC - 3`
	Reverse	3` C AGT TAC CGT ACT TTA GTC TG CAAA - 5`

3.1.2.2. Das Enzym Isocitrat-Dehydrogenase 1

Die Isocitrat Dehydrogenase 1 (IDH1) ist ein Enzym, das die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat unter Bildung von Alpha-Ketoglutarat und CO₂ katalysiert. Dieser Prozess erfolgt in zwei Schritten, im Zwischenschritt wird Isocitrat vorerst zu Oxalosuccinat umgesetzt. Im Menschen liegen drei Isoformen des IDH vor, wobei IDH3 diese Schritte im Citratzyklus unter Umwandlung von NAD⁺ zu NADH katalysiert. IDH1 und IDH2 katalysieren dieselbe Reaktion, aber außerhalb des Citratzyklus unter Umsetzung von NADP⁺ zu NADPH. Sie sind sowohl im Mitochondrium als auch im Peroxisom vorhanden. Da das IDH in Gliomen Grad I bis III mutiert ist, bleibt es in diesen Tumorzellen inaktiv. Dies sorgt für eine Abhängigkeit vom Enzym NAMPT, da nur noch dieses Enzym NADP⁺ umsetzen kann. In der Arbeit von Shankar et al. (2018) wurde dieses Enzym gehemmt, welches nachweislich zur Verringerung der Zellproliferation führte [4]. Wenn in GBM Grad IV Tumoren das IDH selektiv durch den Pseudotypen mit CRISPR-Cas9 inaktiviert werden könnte, wäre diese NAMPT-Therapie auch bei Grad IV Tumoren anwendbar. Für IDH1 wurden zwei Zielsequenzen ausgewählt (Tabelle 4A) [46] und in beide lentiviralen Vektoren als synthetische Oligonukleotide kloniert (Tabelle 4B).

Tabelle 4: Zielsequenzen für IDH1 spezifische sgRNAs

A

Gen	Bez.	Lit.	Ort	sgRNA	PAM
IDH1	I1	[46]	Exon 7 208821351-208821370	GCATGACGACCTATGATGAT	AGG
	I2	[46]	Exon 7 208821437-208821457	GCCACCCAGAATATTTTCGTA	TGG

B

IDH1

Bezeichnung	Sequenzen der Oligonukleotide	
I1	Forward	5`CACCG GCA TGA CGA CCT ATG ATG AT - 3`
	Reverse	3` C CGT ACT GCT GGA TAC TAC TA CAAA - 5`
I2	Forward	5`CACCG CGG TGG GTC TTA TAA AGC AT - 3`
	Reverse	3` C GCC ACC CAG AAT ATT TCG TA CAAA - 5`

3.1.3. sgRNA-Zielsequenzen spezifisch für m⁶A modifizierende Proteine

Epitranskriptomische Modifikationen versehen mRNA-Transkripte mit zusätzlichen Informationen, die über die der Basensequenz hinausgehen. Sie führen zu einer Ladungsänderung, veränderten Sekundärstrukturen, neuen Strukturen für Protein-RNA Interaktionen und beeinflussen so den mRNA-Metabolismus [47]. M⁶-Methyladenosin (m⁶A) ist die am häufigsten vorkommende Eukaryoten-mRNA-Modifikation, die prinzipiell von drei unterschiedlichen Regulatoren ausgeführt wird. Diese Regulatoren werden als *Writer*, *Eraser* und *Reader* bezeichnet und spielen eine entscheidende Rolle für den mRNA-Metabolismus. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der epigenetisch wirkenden *Writer*, *Eraser* und *Reader* Einfluss auf die Tumor-Eigenschaften der GSCs haben und somit deren Inaktivierung zur Inhibition der GSCs beitragen könnte. Die Deletion von ALKBH5 in GSCs reduzierte deren Selbsterneuerung und Proliferation und beeinträchtigte ihre Fähigkeit, einen Tumor zu bilden [48].

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass METTL3 modifizierte, m⁶A-mRNA in GSCs im Vergleich zu normalen Zellen deutlich häufiger vorkommt. Durch Inaktivierung von METTL3 in GSCs wurde eine signifikante Verringerung der Selbsterneuerung und der Expression von GSC-spezifischen Markern festgestellt [49].

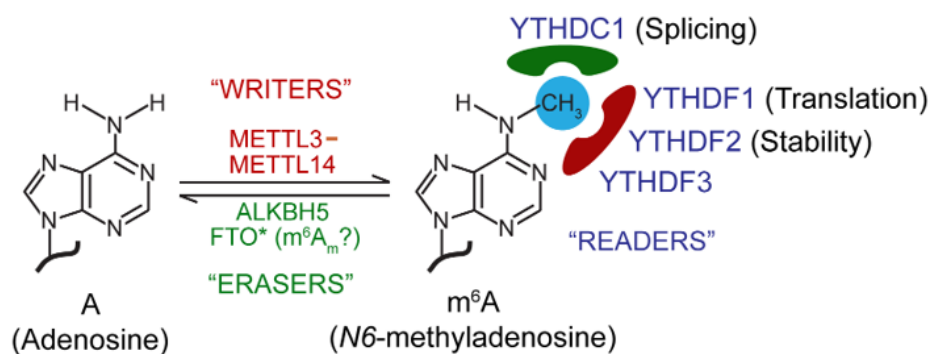


Abb. 5: Epigenetische Regulatoren für die m⁶A-Modifikation von RNA

METTL3 bis METTL14 sind *Writer*, sie modifizieren RNA durch Einführung einer Methylgruppe am Adenosin (m⁶A). Dies steigert die Translation der mRNA. Das Lesen der Methylierung erfolgt durch *Reader*, wobei diese unterschiedlichen Einflüsse auf die Translation haben. Während YTHDF2 einen Repressor der Translation aktiviert, steigern YTHDF1 und YTHDF3 die Translationsraten. Zur Regulation des m⁶A-Methylierungsmusters löscht bzw. demethyliert der *Eraser* (ALKBH5) die Methylierung am Adenosin.

Die m⁶A-Methylierung wird durch einen RNA-Methyltransferase-Komplex katalysiert, der als epigenetischer *Writer* bezeichnet wird. Die Methylierung findet während der Transkription an der Base Adenosin auf der prä-mRNA statt und beeinträchtigt die Stabilität der Basenpaarung, welches zu einer globalen Konformationsänderung der RNA führt (Abb. 5). Die Komponenten des RNA-Methyltransferase-Komplex sind die Methyltransferasen-like (METTL) 1-14. In dieser Arbeit wurden die zwei Transferasen METTL3 und METTL14 ausgesucht. METTL3 ist die katalytische Komponente des Komplexes und METTL14 dient inaktiv als allosterischer Aktivator der enzymatischen Aktivität und trägt zur Bindung an der RNA bei. Die m⁶A-Methylierungen des MTC reguliert Prozesse, wie die zirkadiane Uhr, die Differenzierung embryonaler und hämatopoetischer Stammzellen, die kortikale Neurogenese, die Reaktion auf DNA-Schäden, die Differenzierung von T-Zellen und die primäre miRNA-Verarbeitung [47].

Das Enzym AlkB-Homolog-5-RNA-Demethylase (ALKBH5) wird durch das ALKBH5-Gen kodiert. Bei dem Enzym handelt es sich um eine Dioxygenase, die m⁶A-Methylierungen am Adenosin auf mRNAs demethyliert und als *Eraser* der m⁶A-Modifikation fungiert (Abb. 4). Dadurch behebt sie Methylierungen der *Writer* (METTL3 und METTL14) und reguliert den Transport der mRNAs und die Translationsrate [47].

Die regulatorische Rolle von m⁶A ähnelt der auf dem Chromatin und kann ebenso wie diese von Enzymen gelesen werden. Neben der Umstrukturierung der mRNA können *Reader* an die m⁶A-Modifikation binden (Abb. 5). Eine der charakteristischen *Reader*-Proteinfamilien ist die YT-Homolog-Domainhaltige Proteinfamilie (YTHDF). Durch die Ausbildung von RNA-Protein-Komplexen können sie das Splicing, die Lokalisation und die Stabilität der RNA regulieren. Ihre YTH Bindungsdomäne erkennt dabei m⁶A-Methylierungen und interagiert nach der Bindung mit den Translationsfaktoren. Drei der Domänen sollen in dieser Arbeit als sgRNA-Target verwendet werden. Die YTHDF2 rekrutiert den CCR4-NOT-Deadenylase-Komplex, um die gebundene mRNA zu destabilisieren und abzubauen. Die Bindungen der YTHDF1 und YTHDF3 sollen die Translationseffizienz der mRNA erhöhen, dies ist aber noch nicht vollkommen nachgewiesen [47].

Für die genannten Gene wurde jeweils eine Zielsequenz aus Cui et al. (2017) entnommen (Tabelle 5A). Die Zielsequenzen wurden als BsmBI-Oligonukleotide in die lentiviralen Vektoren LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRISPRv2-puro kloniert (Tabelle 5B).

Tabelle 5: sgRNA-Zielsequenzen für m⁶A modifizierende Proteine

A

Gen	Bez.	Literatur	Ort	sgRNA	PAM
METTL3	M1	Cui et al. (2017) [50]	Exon 11 21049181-21049200	GGACACGTGGA GCTCTATCC	AGG
METTL14	M2	Cui et al. (2017) [50]	Exon 1 119826164-119826184	GCCGTA ACTTC TGCCGCTCC	CGG
YTHDF1	Y1	Cui et al. (2017) [50]	Exon 2 61305545-61305565	AATGGACGGCG GGTAATAGC	TGG
YTHDF2	Y2	Cui et al. (2017) [50]	Exon 5 289415401-28941560	GATGGAGGGAC TGTAAGTA ACT	GGG
YTHDF3	Y3	Cui et al. (2017) [50]	Exon 4 64262668-64262687	GCTAAGCGAAT ATGCCGTAAT	TGG
ALKBH5	A1	Cui et al. (2017) [50]	Exon 1 18028480-18028499	GCCTCATAGTC GCTGCGCTCG	GGG

B

Writer

Bezeichnung	Sequenzen der Oligonukleotide	
M1	Forward	5`CACCG GGA CAC GTG GAG CTC TAT CC - 3`
	Reverse	3` C CCT GTG CAC CTC GAG ATA GG CAAA - 5`
M2	Forward	5`CACCG GCC GTA ACT TCT GCC GCT CC - 3`
	Reverse	3` C CGG CAT TGA AGA CGG CGA GG CAAA - 5`

Eraser

Bezeichnung	Sequenzen der Oligonukleotide	
A1	Forward	5`CACCG GCC TCA TAG TCG CTG CGC TCG - 3`
	Reverse	3` C CGG AGT ATC AGC GAC GCG AGC CAAA - 5`

Reader

Bezeichnung	Sequenzen der Oligonukleotide	
Y1	Forward	5`CACCG AAT GGA CGG CGG GTA ATA GC - 3`
	Reverse	3` C TTA CCT GCC GCC CAT TAT CG CAAA - 5`
Y2	Forward	5`CACCG GAT GGA GGG ACT GTA GTA ACT - 3`
	Reverse	3` C CTA CCT CCC TGA CAT CAT TGA CAAA - 5`
Y3	Forward	5`CACCG GCT AAG CGA ATA TGC CGT AAT - 3`
	Reverse	3` C CGA TTC GCT TAT ACG GCA TTA CAAA - 5`

3.2. In dieser Arbeit entworfene sgRNA-Zielsequenzen

3.2.1. Das Enzym Telomerase Reverse Transkriptase

Für TERT wurde eine zweite Zielsequenz (siehe 4.1.2) spezifisch aufgrund einer identifizierten parallelen Mutation des TERT Promotors entworfen. Generell treten Mutationen des TERT-Promotors bei 83 % der GBM-Patienten auf und führen zu einer erhöhten Transkription des TERT-Enzyms. In Abb. 6 sind drei Punktmutationen des TERT-Promotors in Rot dargestellt. Die Mutationen erzeugen ein CCGGAA/T-Bindungsmotiv, an welches Ets/TCF-Transkriptionsfaktoren binden können [51,52]. Die Bindung an die ETs/TCF-sites aktiviert den Promotor, weshalb das Gen in Tumorzellen vermehrt transkribiert wird.

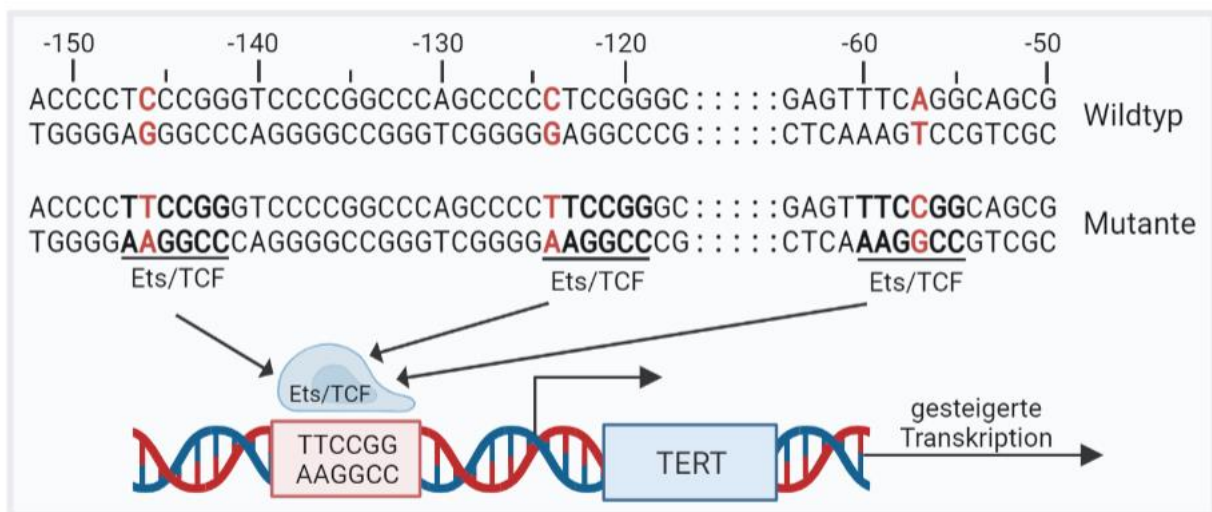


Abb. 6: Mutationen auf dem TERT Promotor steigern Transkriptionsrate

Schematische Darstellung eines Teils des TERT-Promotors, welcher von somatischen Mutationen an den Positionen 124 und 146 vor dem Startcodon betroffen ist. Es wird ein CCGGAA/T-Bindungsmotiv erzeugt für Ets/TCF-Transkriptionsfaktoren, welches zu einer erhöhten TERT-Expression führt. Es handelt sich dabei um eine parallele Mutation, die bei einer Studie mit 188 Patienten, in 54 % von diesen nachgewiesen wurde [32,51].

Die neue, in dieser Arbeit erstellte Zielsequenz für TERT wurde für die Mutation C>T 124 Basen vor dem Startcodon generiert (Abb. 7). Diese Mutation wurde gewählt, da sich vier Basen entfernt in 3`-Richtung eine PAM-Sequenz befindet, die von Cas9 erkannt wird. Da der komplementäre Strang an der Stelle des Bindungsmotivs stets ein doppeltes G aufweist könnten auch die anderen Mutationen als Zielsequenz gewählt werden.

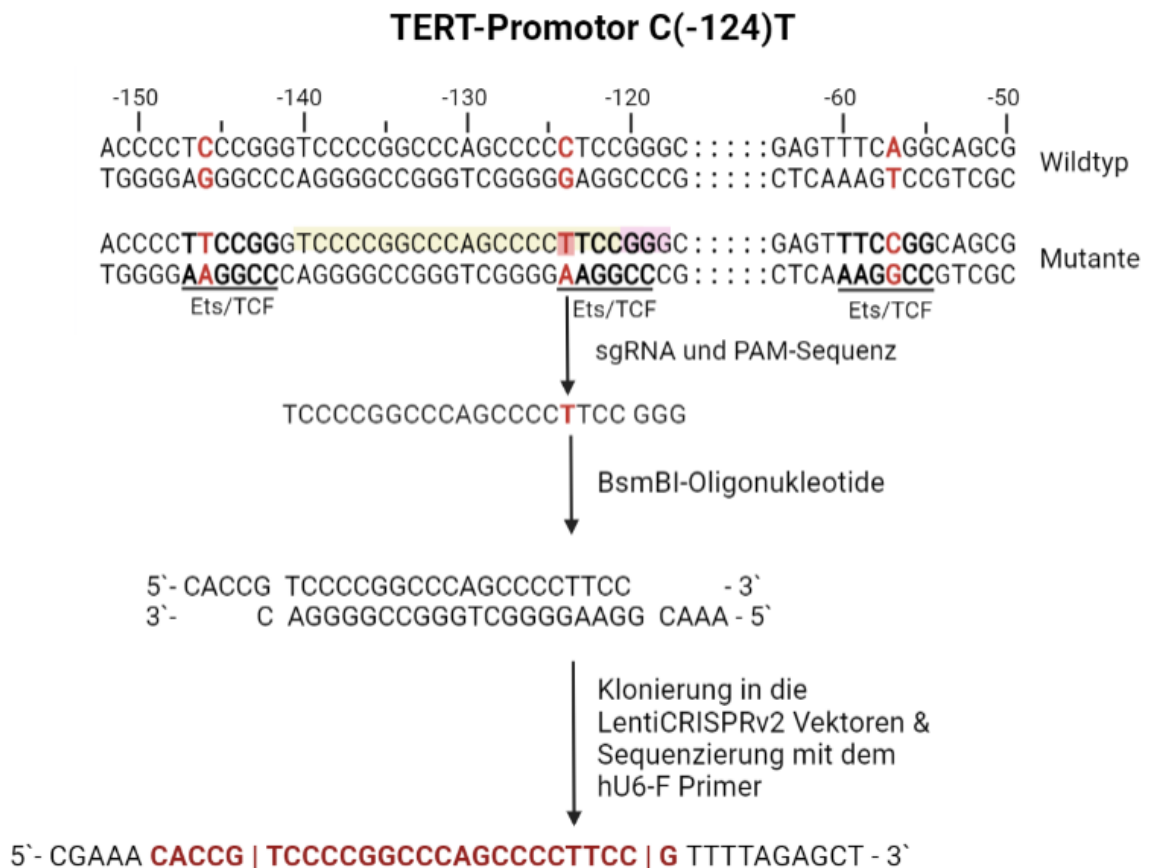


Abb. 7: TT2- Zielsequenz für den TERT-Promotor
 Die parallele Mutation des TERT Promotors wurde aus Abbildung 12 entnommen. Die Mutation führt zum Einbau der Base T anstelle des C, wodurch ein CCGGAA/T-Bindungsmotiv für Ets/TCF-Transkriptionsfaktoren erzeugt wird. In 3'-Richtung wurde nach einer PAM-Sequenz gesucht und in 5'-Richtung von dieser 20 Basen, einschließlich der Mutation, als Zielsequenz gewählt. Diese wurde als Oligonukleotide bestellt und in die LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRSIPRv2-puro Vektoren kloniert. Die Klonierung erfolgte mit einer One-Step-Ligation, wobei der Vektor mit BsmBI verdaut wurde und das Oligonukleotid in die entstehenden Restriktionsenden ligiert wurden. Der Vektor wurde anschließend in DH5α-Zellen transformiert.

3.2.2. sgRNA-Zielsequenzen gegen GBM spezifische parallele Mutationen

Parallele Mutationen sind Punktmutationen, die patientenübergreifend in mehreren Sequenzierungen am selben Genort auftreten. Solche Mutationen betreffen häufig dieselben Gene und resultieren oftmals in einem Wechsel der Aminosäure [53]. Da diese Mutationen oftmals auch tumorinitiierend sind, bieten sie ein Möglichkeit, um die genomische DNA der GBM-Zellen selektiv mit der CRISPR-Cas9-Genschere zu schneiden [26]. Die parallelen

Mutationen können aus Sequenzierungen entnommen werden. Im cBioPortal sind Sequenzierungsergebnisse von verschiedenen Veröffentlichungen in Grafiken und Tabellen zusammengefasst [54]. Die Sequenzdaten des cBioPortals können nach Mutationen und Genen selektiert werden, wodurch eine Liste an Mutationen erhalten wurde, die dann auf parallele Mutationen untersucht wurde. Zudem werden in der Datenbank (cBioPortal) die häufigsten parallelen Mutationen in den zugehörigen Veröffentlichungen benannt und deren Häufigkeit beschrieben. Die Mutationen werden als Veränderung der Aminosäure dargestellt, wodurch das entsprechende Triplet auf dem Genom ermittelt werden muss. Dies wurde durch die Verwendung des *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC) möglich. Über das cBioPortal können die einzelnen Mutationen und deren Eigenschaften eingesehen werden [54]. Neben dem Aminosäurewechsel wird in der COSMIC-Datenbank der genomische Ort der Mutation genannt und zudem die Aminosäuresequenz neben der Gensequenz dargestellt. Dadurch können die Mutationen identifiziert werden, um eine entsprechende Zielsequenz zu bestimmen. Dabei kann die tumorspezifische Mutation sowohl in der Zielsequenz, aber auch in der PAM-Sequenz liegen. Es können auch tumorspezifische Mutationen vorhanden sein, die neue PAM-Sequenzen erzeugen. Liegt eine Basenmutation von A, C, T zu G vor, wobei schon ein benachbartes G vorhanden ist, so kann diese Änderung eine neue PAM-Sequenz erzeugen. Als sgRNA-Targets wurden Mutationen auf den EGFR, PTEN und TP53 Genen ausgewählt, da diese zu einer der häufigsten parallelen Mutationen des Glioblastom Multiform zählen.

3.2.2.1. Der Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors

Der Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) ist ein Transmembranprotein, das durch Bindung spezifischer Liganden, den epidermalen Wachstumsfaktoren und transformierten Wachstumsfaktoren, aktiviert wird. Die Bindung eines Liganden führt zur Dimerisierung des Rezeptors, die wiederum die intrazelluläre Protein-Tyrosin-Kinase-Aktivität stimuliert. Nachfolgende Signaltransduktionskaskaden führen zur DNA-Synthese, Zellproliferation, Zellmigration und Adhäsion. Mutationen auf dem Gen können den Rezeptor dauerhaft ohne Liganden Bindung aktivieren und sind daher ein häufiger Grund für eine Tumorbildung [55,56]. Der EGFR-Rezeptor ist in 26-50 Prozent der mutiert [26,57,58]. Die bekanntesten Mutationen sind Leu858Arg, Ala289Val und Gly598Val und eine Deletion der Exons 2-7 [57,59,60]. Diese Mutationen verschlechtern die Inhibitor-Bindung an EGFR oder aktivieren das Enzym, was zu einer verstärkten Zellproliferation führt [26]. Als tumorinitiierendes Gen ist EGFR ein beliebtes Target für chemische Inhibitoren. Aufgrund der hohen Mutationsrate des Gens und der Heterogenität in den Patienten ist die Wirkung der Hemmstoffe jedoch begrenzt und es werden nur in wenigen Fällen positive Auswirkungen der entsprechenden Chemotherapie beobachtet [61].

In den Abbildung 8-10 ist die Vorgehensweise für die Erstellung von drei Zielsequenzen und deren Klonierung in den lentiviralen Vektor gezeigt. Da die Mutation Leu858Arg zu einem Basenwechsel von T nach G führt, kommt es zum Entstehen einer PAM-Sequenz. Darauf basierend wurde eine Zielsequenz in 5'-Richtung von der neuen Pam-Sequenz gewählt (Abb. 8). Aufgrund der hohen Spezifität des Cas9-Enzyms gegenüber der PAM-Sequenz weist diese Zielsequenz eine besonders hohe Spezifität zum Schneiden auf. Die parallelen Mutationen Gly598Val (Abb. 9) und Gly719Asp (Abb. 10) wurden in die neu entworfenen Zielsequenzen integriert.

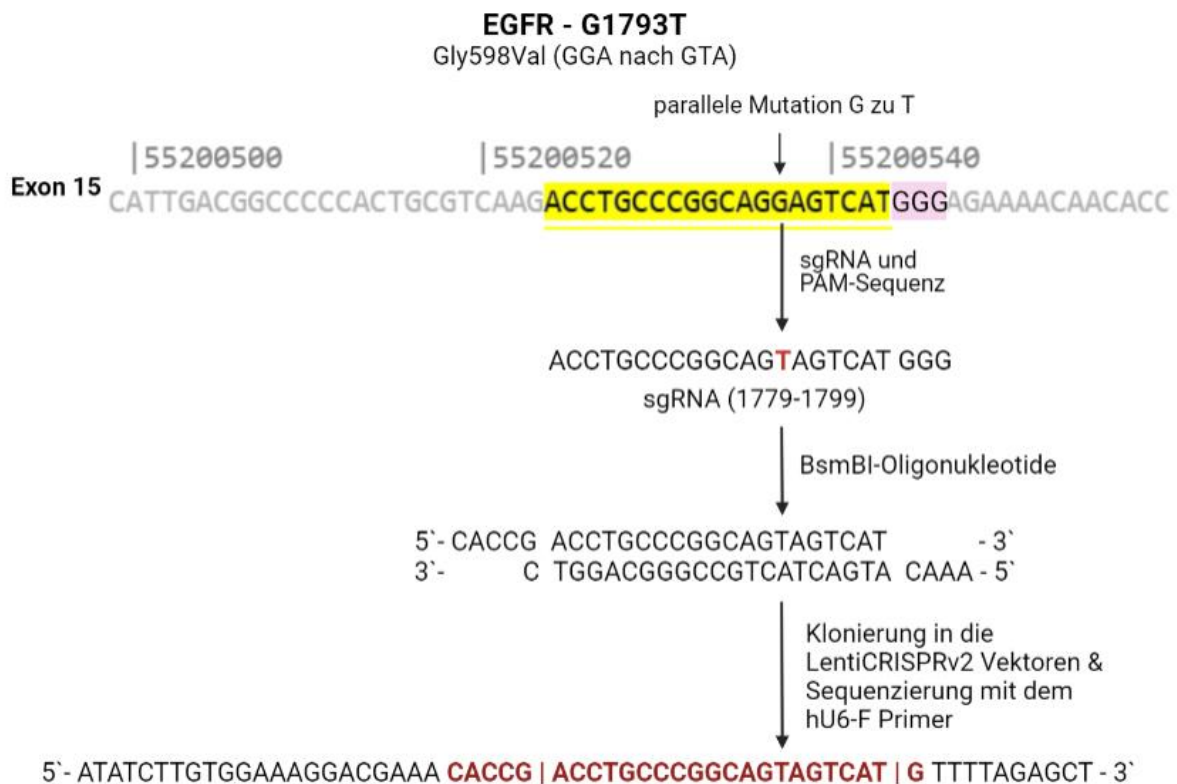


Abb. 9: sgRNA-Zielsequenz für die G1793T-Mutation des EGFR-Gens

Die parallele Mutation wurde auf der Genomsequenz aufgesucht [62]. Die Mutation führt zum Einbau der Base T anstelle des G, welches zum Aminosäuren Wechsel von Glycerin zu Valin führt. In 3`-Richtung wurde nach einer PAM-Sequenz gesucht und in 5`-Richtung von dieser 20 Basen, einschließlich der Mutation, als Zielsequenz gewählt. Diese wurde als Oligonukleotide bestellt und in die LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRSIPRv2-puro Vektoren kloniert. Die Klonierung erfolgte mit einer One-Step-Ligation, wobei der Vektor mit BsmBI verdaut und das Oligonukleotid in die entstehenden Restriktionsenden ligiert wurde. Der Vektor wurde anschließend in DH5α-Zellen transformiert, in diesen vermehrt produziert und aufgereinigt. Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem hU6-F-Primer.

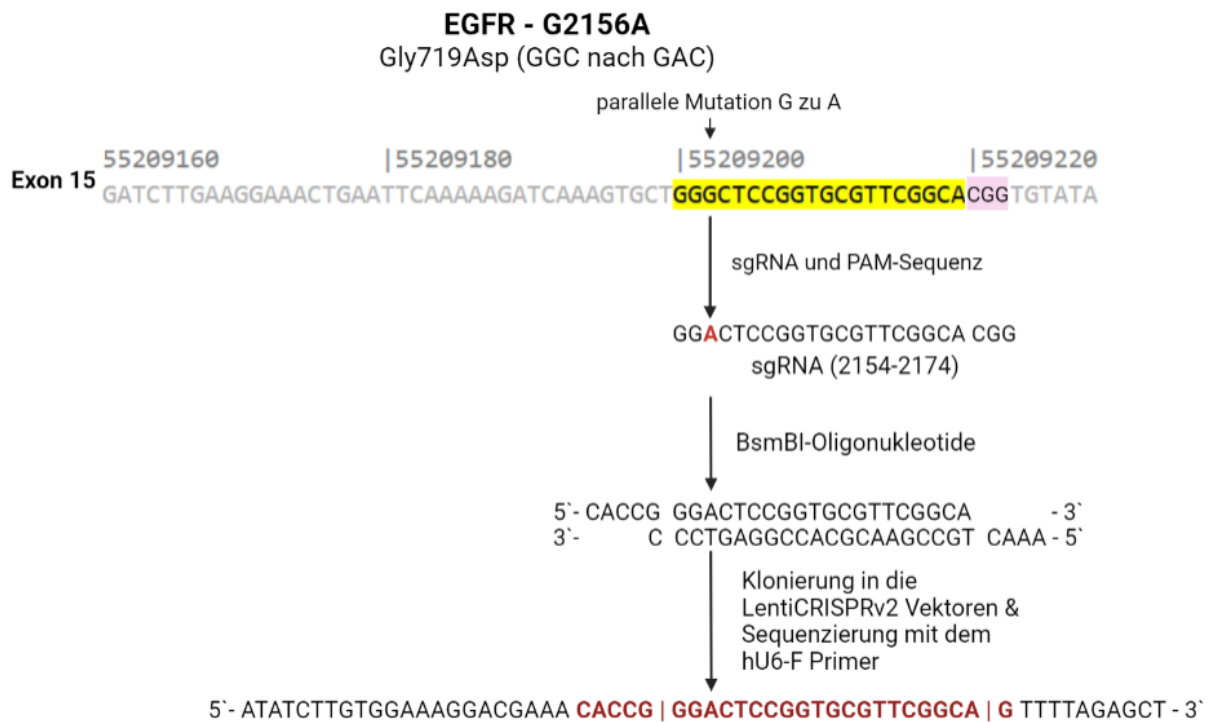


Abb. 10: sgRNA-Zielsequenz für die G2156A-Mutation des EGFR-Gens

Die parallele Mutation wurde auf der Genomsequenz aufgesucht [62]. Die Mutation führt zum Einbau der Base G anstelle des A, welches zum Aminosäuren Wechsel von Glycerin zu Asparagin führt. In 3`-Richtung wurde nach einer PAM-Sequenz gesucht und in 5`-Richtung von dieser 20 Basen, einschließlich der Mutation, als Zielsequenz gewählt. Diese wurde als Oligonukleotide bestellt und in die LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRSIPRv2-puro Vektoren kloniert. Die Klonierung erfolgte mit einer One-Step-Ligation, wobei der Vektor mit BsmBI verdaut und das Oligonukleotid in die entstehenden Restriktionsenden ligiert wurde. Der Vektor wurde anschließend in DH5 α -Zellen transformiert, in diesen vermehrt produziert und aufgereinigt. Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem hU6-F-Primer.

3.2.2.2. Die Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat-3-Phosphatase

Dieses Enzym wird auch Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN) genannt. Es enthält eine Tensin-ähnliche Domäne sowie eine katalytische Domäne, die der der Protein-Tyrosin-Phosphatasen ähnelt. Im Unterschied zu den meisten Protein-Tyrosin-Phosphatasen dephosphoryliert PTEN bevorzugt Phosphoinositidsubstrate. Es reduziert den intrazellulären Gehalt an Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat und fungiert als Tumorsuppressor, indem es den Akt/PKB-Signalweg negativ reguliert [63]. Mutationen auf dem PTEN-Gen sind häufig an der Entwicklung von Krebs beteiligt, da sie die Phosphatase-Aktivität senken oder die Funktionalität des Enzyms vollständig stören [28,56]. In 33-44 % von GBM-Fällen ist das PTEN-Gen mutiert [54,64]. Da viele Mutationen jedoch zu Deletionen mit unterschiedlichen Übergängen führen, bieten sich nur wenige und seltene parallele Mutationen als sgRNA-Traget für das CRISPR-Cas9-System an [64].

Für PTEN wurde eine Zielsequenz für die parallele Mutation Cys136Arg mit anliegender PAM-Sequenz in 3'-Richtung entworfen. Die Zielsequenz wurde als Oligonukleotid in die BsmBI-Schnittstellen der lentiviralen Vektoren kloniert (Abb. 11).

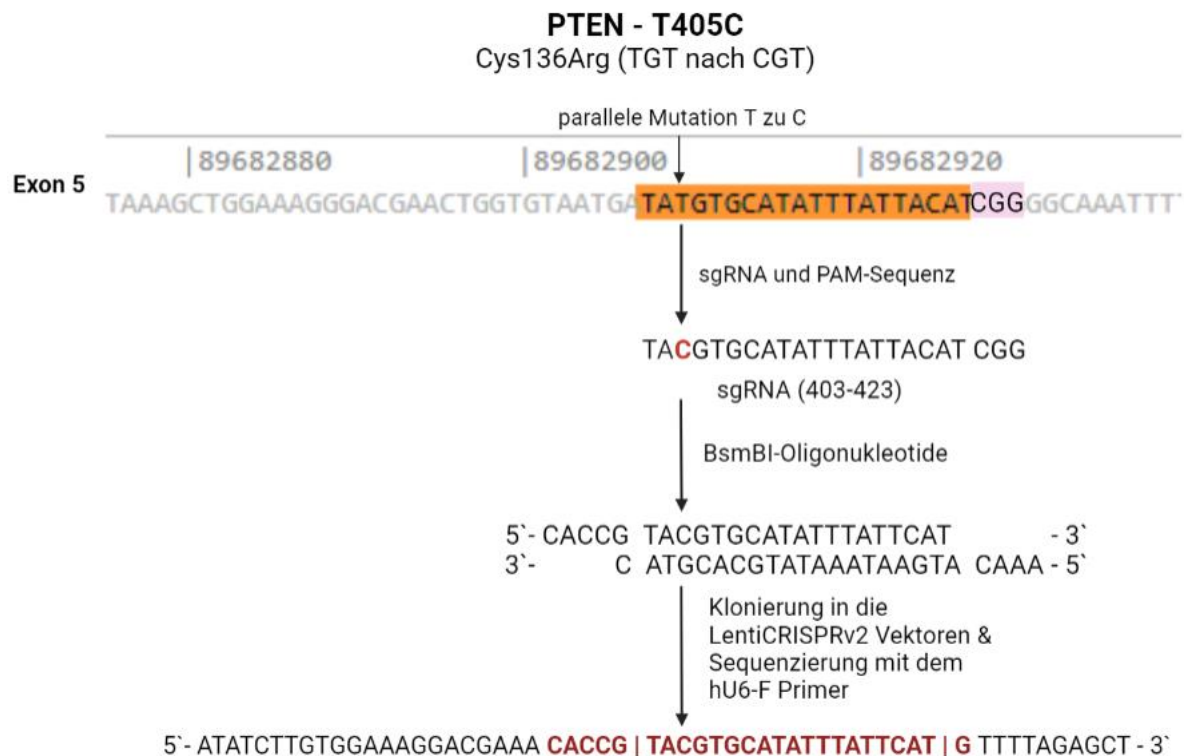


Abb. 11: sgRNA-Zielsequenz für die T405C-Mutation des PTEN-Gens

Die parallele Mutation wurde auf der Genomsequenz aufgesucht [65]. Die Mutation führt zum Einbau der Base T anstelle des C, welches zum Aminosäuren Wechsel von Cystein zu Arginin führt. In 3'-Richtung wurde nach einer PAM-Sequenz gesucht und in 5'-Richtung von dieser 20 Basen, einschließlich der Mutation, als Zielsequenz gewählt. Diese wurde als Oligonukleotide bestellt und in die LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRISPRv2-puro Vektoren kloniert. Die Klonierung erfolgte mit einer One-Step-Ligation, wobei der Vektor mit BsmBI verdaut und das Oligonukleotid in die entstehenden Restriktionsenden ligiert wurde. Der Vektor wurde anschließend in DH5 α -Zellen transformiert, in diesen vermehrt produziert und aufgereinigt.

3.2.2.3. Das Tumor Protein 53

Das Tumorprotein 53 (TP53), auch als Tumorsuppressor p53 bekannt, ist eine Isoform eines Proteins, das von homologen Genen kodiert wird. Dabei handelt es sich nicht um ein Protein, sondern eine Vielfalt von 15 Protein-Isoformen. TP53 gilt als Wächter des Genoms, da es Mutationen auf dem Genom verhindert und somit die Stabilität erhält. Die Protein-Isoformen binden an der DNA und regulieren auf unterschiedliche Weise die Genexpression, um Mutationsraten zu senken. Seine entscheidende Rolle als Tumorsuppressor ist besonders daran zu erkennen, dass bei menschlichen Krebsarten TP53 mit über 50 Prozent das am häufigsten mutierte Gen ist [52,66–69]. Es wurden zwei Zielsequenzen für die parallelen Mutationen Arg282Gln (Abb. 12) und Arg282Trp (Abb. 13) als BsmBI-Oligonukleotide in die lentiviralen Vektoren kloniert.

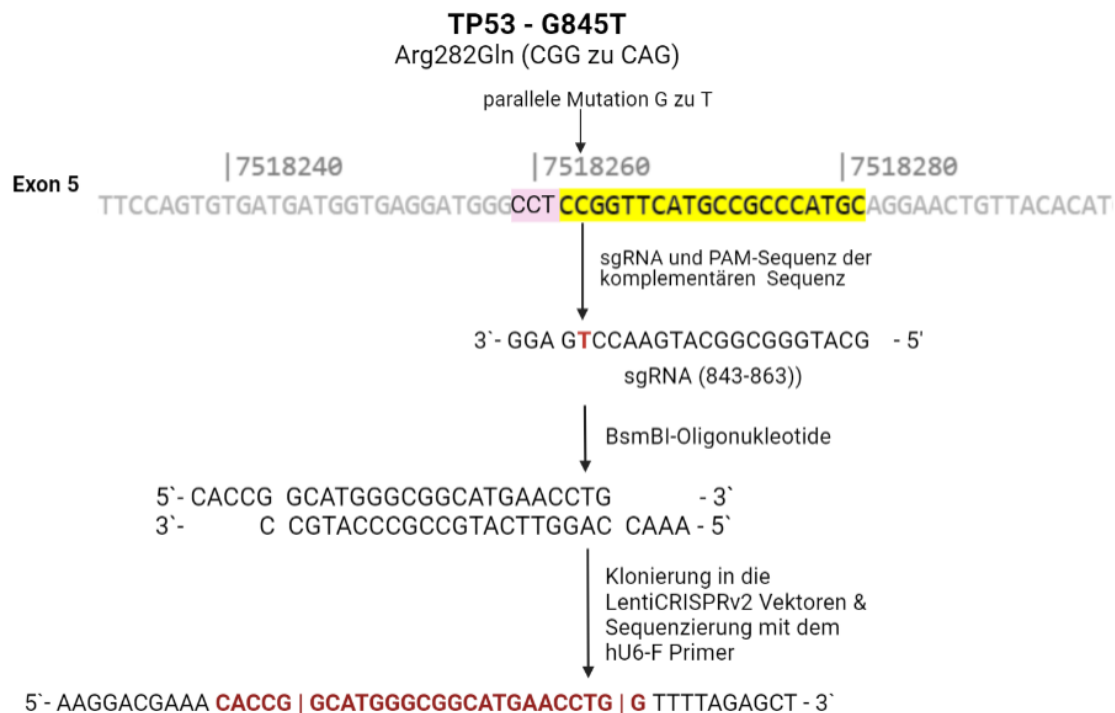


Abb. 12: sgRNA-Zielsequenz für die G845T-Mutation des TP53-Gens

Die parallele Mutation wurde auf der Genomsequenz aufgesucht [70]. Die Mutation führt zum Einbau der Base A anstelle des G, welches zum Aminosäuren Wechsel von Arginin zu Glutamin führt. Da die Mutation auf dem *Lagging-Strand* liegt, wurde die komplementäre Sequenz vom Genom abgelesen. In 3'-Richtung wurde nach einer PAM-Sequenz gesucht und in 5'-Richtung von dieser 20 Basen, einschließlich der Mutation, als Zielsequenz gewählt. Diese wurde als Oligonukleotide bestellt und in die LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRSIPRv2-puro Vektoren kloniert. Die Klonierung erfolgte mit einer One-Step-Ligation, wobei der Vektor mit BsmBI verdaut und das Oligonukleotid in die entstehenden Restriktionseenden ligiert wurde. Der Vektor wurde anschließend in DH5 α -Zellen transformiert, in diesen vermehrt produziert und aufgereinigt.

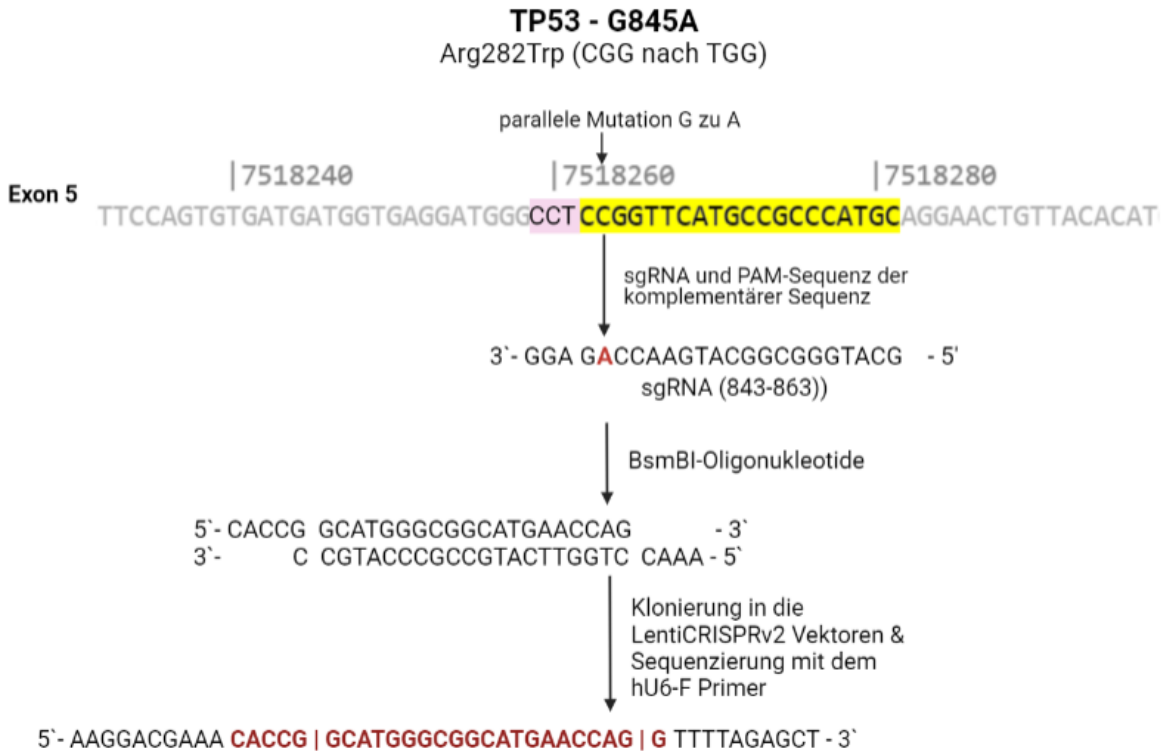


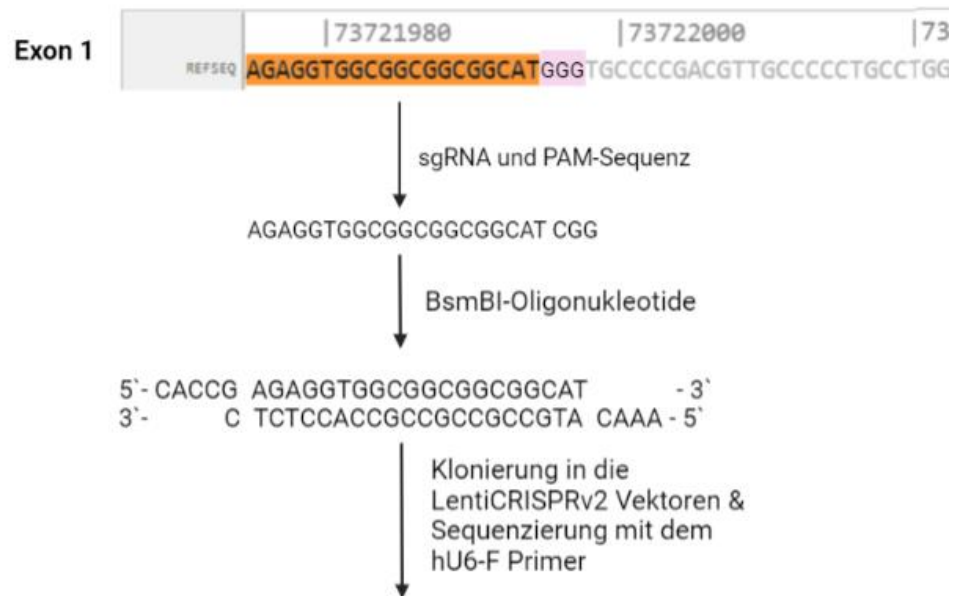
Abb. 13: sgRNA-Zielsequenz für die G845A-Mutation des TP53-Gens

Die parallele Mutation wurde auf der Genomsequenz aufgesucht [70]. Die Mutation führt zum Einbau der Base T anstelle des G, welches zum Aminosäuren Wechsel von Arginin zu Tryptophan führt. Da die Mutation auf dem *Lagging-Strand* liegt, wurde die komplementäre Sequenz vom Genom abgelesen. In 3`-Richtung wurde nach einer PAM-Sequenz gesucht und in 5`-Richtung von dieser 20 Basen, einschließlich der Mutation, als Zielsequenz gewählt. Diese wurde als Oligonukleotide bestellt und in die LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRSIPRv2-puro Vektoren kloniert. Die Klonierung erfolgte mit einer One-Step-Ligation, wobei der Vektor mit BsmBI verdaut und das Oligonukleotid in die entstehenden Restriktionsenden ligiert wurde. Der Vektor wurde anschließend in DH5 α -Zellen transformiert, in diesen vermehrt produziert und aufgereinigt.

3.2.2.4. Das Protein Survivin

Survivin gehört zur Familie der IAP-Proteine und wird durch die Bacuvirale-IAP-Wiederholung-5 (BIRC5) Gen kodiert. Die molekularen Mechanismen der Survivin-Regulierung sind noch nicht vollständig aufgeklärt, es wird aber vermutet, dass Survivin mit der Funktion des TP53-Proteins interagiert. Survivin wird mit der Hemmung der Apoptose und der Regulierung des Zellzyklus in Verbindung gebracht. Bei Untersuchungen der Survivin-Aktivität wurde festgestellt, dass Survivin in den meisten Zellen nur in der G2-M-Phase exprimiert wird. Eine erhöhter Survivin Spiegel wird oft in Tumorzellen beobachtet und konnte ebenfalls mit einer Chemotherapie-Resistenz in Verbindung gebracht werden. Die inhibierende Wirkung auf den Zelltod und der Zusammenhang mit TP53 deutet darauf hin, dass Survivin eine entscheidende Rolle für die Zellproliferation von Tumorzellen spielt. Durch Inaktivierung des BIRC5 Gens kann die Inhibition der Apoptose und Regulierungen in Zellprozessen aufgehoben werden und das Tumorwachstum reguliert werden [71–73].

Es wurden drei Zielsequenzen aus Exon 1 selbst ausgewählt. Diese wurden als Oligonukleotide in die BsmBI-Schnittstellen der LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRISPRv2-puro Vektoren kloniert (Abb. 14 und Abb. 15).



5'- ATATCTTGTGGAAAGGACGAAA CACCG | AGAGGTGGCGGCGGCGGCAT | G TTTTAGAGCT - 3'

Abb. 14: B1-Zielsequenz des BIRC5-Gens

Eine PAM-Sequenz wurde auf dem Exon 1 des BIRC5 Gens gefunden [74]. In 5'-Richtung von der PAM-Sequenz wurden 20 Basen als Zielsequenz gewählt. Diese wurde als Oligonukleotide bestellt und in die LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRISPRv2-puro Vektoren kloniert. Die Klonierung erfolgte mit einer One-Step-Ligation, wobei der Vektor mit BsmBI verdaut und das Oligonukleotid in die entstehenden Restriktionsenden ligiert wurde. Der Vektor wurde anschließend in DH5 α -Zellen transformiert, in diesen vermehrt produziert und aufgereinigt.

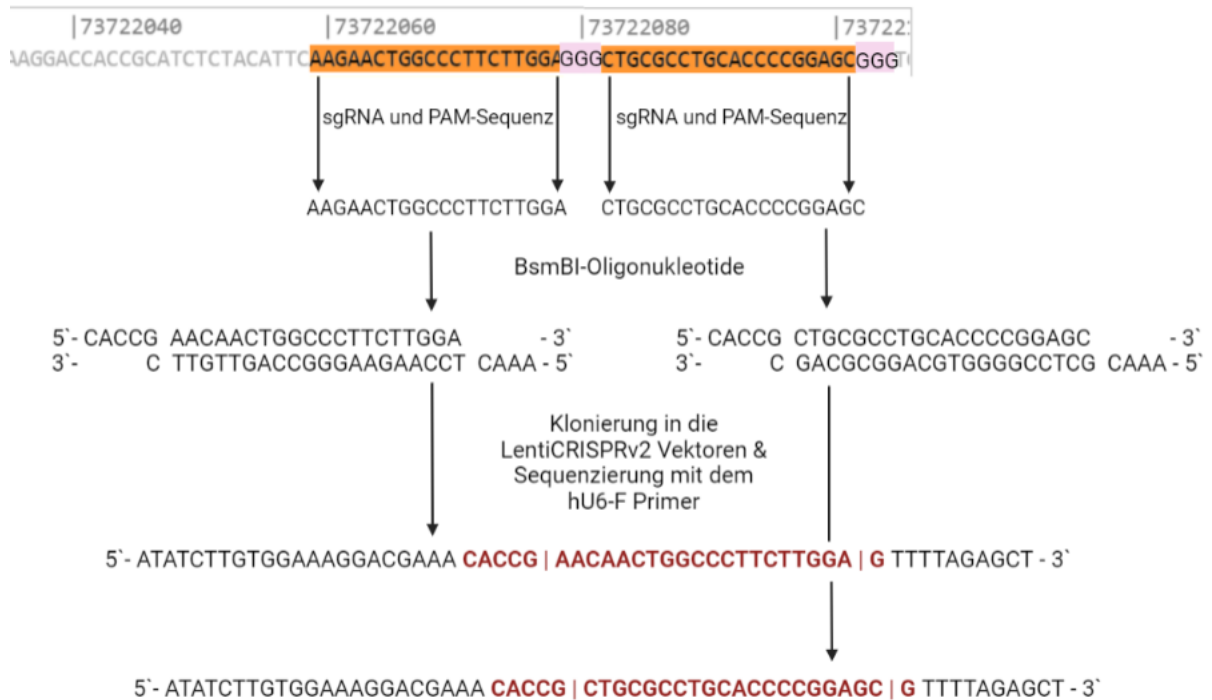


Abb. 15: B2- und B3-Zielsequenzen des BIRC5-Gens

Eine PAM-Sequenz wurde auf dem Exon 1 des BIRC5 Gens gefunden [74]. In 5`-Richtung von der PAM-Sequenz wurden 20 Basen als Zielsequenz gewählt. Diese wurde als Oligonukleotide bestellt und in die LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRSIPRv2-puro Vektoren kloniert. Die Klonierung erfolgte mit einer One-Step-Ligation, wobei der Vektor mit BsmBI verdaut und das Oligonukleotid in die entstehenden Restriktionsenden ligiert wurde. Der Vektor wurde anschließend in DH5α-Zellen transformiert, in diesen vermehrt produziert und aufgereinigt.

3.3. Klonierung der sgRNA-Zielsequenzen

Die sgRNAs wurden als Oligonukleotide mit der One-Step-Ligation in die LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRUSPRv2-puro kloniert. Die BsmBI-Schnittstelle ist bei beiden Vektoren identisch, sodass die Oligonukleotide für beide Vektoren für die Klonierung verwendet werden konnten. In Abbildung 16A sind die beiden Vektoren vor und nach der Klonierung mit der W3-Zielsequenz (WEE1) im Gel dargestellt. Nach der One-Step-Ligation, mit 60 Schneide/Ligations-Zyklen (Abb. 16B), wurde die Plasmid-DNA in DH5 α -Zellen transformiert. Die Bakterien wurden auf Ampicillin-Agar-Platten inkubiert. Aus den Kolonien wurden zwei Einzelkolonien ausgewählt und im PCR-Scan auf die inserierte Zielsequenz untersucht.

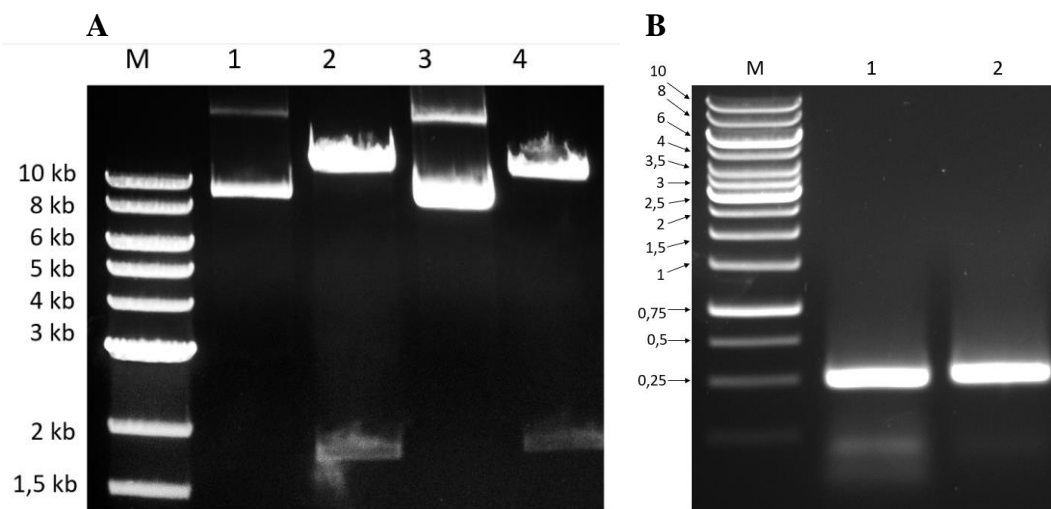


Abb. 16: Klonierung der sgRNA-Zielsequenzen

A, Die LentiCRISPRv2-mCherry (A1) und LentiSRISPRv2-puro (A3) Vektoren wurden in der One-Step-Ligation mit BsmBI geschnitten und die Oligonukleotide mit T4-Ligase inseriert (A2 und A4). Durch den BsmBI-Verdau wird ein Fragment von 1885 bp ausgeschnitten. Das 1885 bp-Fragment ist in Bahn A2 und A4 schwach zu erkennen.

- M 1 kb DNA-Marker NEB
- 1 LentiCRISPRv2-mCherry (14.984 bp)
- 2 LentiCRISPRv2-mCherry One-Step-Ligation mit W3 (13.124 bp)
- 3 LentiCRISPRv2-puro (14.877 bp)
- 4 LentiCRISPRv2-puro One-Step-Ligation mit W3 (13.017 bp)

B, Für die Identifikation positiver Klone wurde ein PCR-Scan durchgeführt. Dazu wurde ein Forward Primer 250 bp vor der Ligationsstelle und der Reverse Primer der Zielsequenz verwendet. Positive Kandidaten zeigen ein 250 bp großes DNA-Fragment (B1) und (B2).

- M 1 kb DNA-Marker NEB
- 1 PCR-Scan des CRISPRv2-mCherry Vektors mit dem P1 (253 bp)
- 2 PCR-Scan des CRISPRv2-mCherry Vektors mit dem W1 (253 bp)

Der PCR-Scan auf die W3-Zielsequenz ist beispielhaft in Abbildung 16B gezeigt. Die entsprechende Agarplatte wurde im Kühlschrank aufbewahrt, um Kolonien für die DNA-Extraktionen nach dem PCR-Scan zu entnehmen. Die Ausbeute, der im PCR-Scan untersuchten Kolonien bezog sich auf 100 Prozent. Konnte die Zielsequenz im Vektor nachgewiesen werden, wurde eine Kolonie entnommen und nach dem Protokoll der Mini-DNA-Extraktion dessen DNA aufgereinigt (vgl. Abbildung 16B). Zur Überprüfung der korrekten Ligation wurde die DNA sequenziert (Anhang 7.4 und Abb. 17). Die Sequenzierungen zeigten ebenfalls für alle Zielsequenzen den korrekten Einbau der Oligonukleotide in den Vektor. Es wurden jeweils zwei Klone des positivem PCR-Scans sequenziert. Dabei ergab sich eine Ausbeute an richtigen Sequenzen von 100 %. Nach den Sequenzierungen wurde mit der DNA der Sequenzierungen eine Transformation durchgeführt und im Kühlschrank aufbewahrt. Nach der Transformation wurde jeweils eine Kolonie für eine große DNA-Extraktion verwendet und die DNA-Konzentration auf 1µg/µl eingestellt. Die so aufgereinigte Plasmid-DNA kann anschließend für die Transfektion verwendet werden.

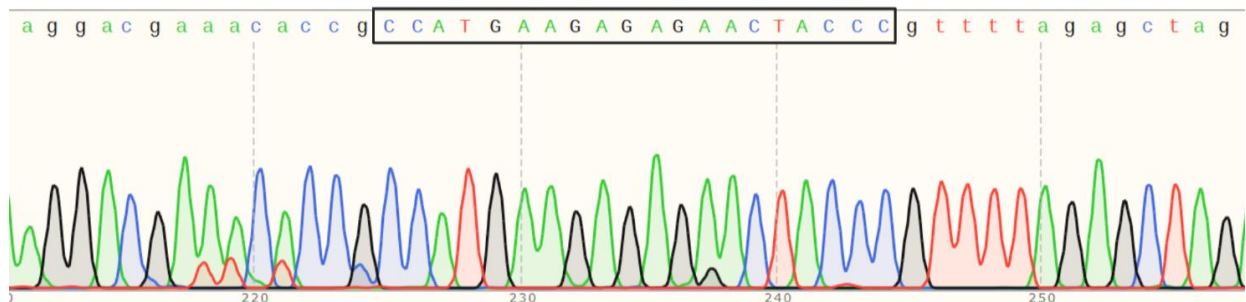


Abb. 17: Sequenzierungsergebnis LentiCRISPRv2-mCherry mit der W1-Zielsequenz
Die Sequenzierung des pLCmc-W1 Klon wurde mit dem hU6-F-Primer durchgeführt (Anhang 7.4). Umrandet ist die W1-Zielsequenz.

Die in dieser Arbeit klonierten und sequenzierten lentiviralen Vektoren sind zusammenfassend in Tabelle 6 dargestellt. Es wurden alle Zielsequenzen jeweils in den LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRISPRv2-puro Vektor kloniert. Die Bezeichnung der Vektoren setzt sich aus dem Kürzel für das lentivirale CRISPR-Cas9-Plasmid (pLC), dem Reportergen mCherry (mc) und dem Resistenzgen für Puromycin (pu) und der Kurzbezeichnung der Zielsequenz zusammen.

Tabelle 6: Zusammenfassung der hergestellten Vektoren und sgRNA-Zielsequenzen

Gen	LentiCRISPRv2-mCherry	LentiCRISPRv2-puro	Zielsequenz
ALKBH5	plCmc-A1	plCpu-A1	GCCTCATAGTCGCTGCGCTCG
BIRC5	plCmc-B1	plCpu-B1	AGAGGTGGCGGCGGGCAT
	plCmc-B2	plCpu-B2	AAGAACTGGCCCTTCTTGGA
	plCmc-B3	plCpu-B3	CTGCGCCTGCACCCCGGAGC
EGFR	plCmc-E1	plCpu-E1	TCAAGATCACAGATTTTGGG
	plCmc-E2	plCpu-E2	ACCTGCCCAGGAGTAGTCAT
	plCmc-E3	plCpu-E3	GGACTCCGGTGC GTTCGGCA
GPD1	plCmc-G1	plCpu-G1	CATCTGAAGGCAAACGCCAC
	plCmc-G3	plCpu-G3	CTCAGCCATCGCCAAGATCG
	plCmc-G5	plCpu-G5	CAAGATCTGTGACCAGCTCA
IDH1	plCmc-I1	plCpu-I1	GCATGACGACCTATGATGAT
	plCmc-I2	plCpu-I2	GCCACCCAGAATATTTTCGTA
METTL3	plCmc-M1	plCpu-M1	GGACACGTGGAGCTCTATCC
METTL14	plCmc-M2	plCpu-M2	GCCGTAACCTTCTGCCCTCC
PKMYT1	plCmc-P1	plCpu-P1	GGGAGAATCCAGGTTCTGCG
	plCmc-P2	plCpu-P2	CGAAGTCACCCAGCTTGACAG
PTEN	plCmc-PT1	plCpu-PT1	TACGTGCATATTTATTACAT
TERT	plCmc-TT1	plCpu-TT1	AGATGTTGGTGCACACCGTC
	plCmc-TT2	plCpu-TT2	TCCCCGGCCAGCCCCCTTCC
TP53	plCmc-T1	plCpu-T1	GCATGGGCGGCATGAACCAG
	plCmc-T2	plCpu-T2	TGGGAGAGACTGGCGCACAG
WEE1	plCmc-W1	plCpu-W1	CCATGAAGAGAGAACTACCC
	plCmc-W2	plCpu-W2	TCAGACAGGGTAGATTACCT
	plCmc-W3	plCpu-W3	TCAATGGCATGAAATCAGAC
YTHDF1	plCmc-Y1	plCpu-Y1	AATGGACGGCGGGTAATAGC
YTHDF2	plCmc-Y2	plCpu-Y2	GATGGAGGGACTGTAGTAACT
YTHDF3	plCmc-Y3	plCpu-Y3	GCTAAGCGAATATGCCGTAAT

4. Diskussion

Das CRISPR-System, ein adaptives Immunsystem in Bakterien und Archaeen, nutzt eine RNA-Erkennungssequenz und Cas-Proteine zur Abwehr eindringender Viren und Plasmide. In *Streptococcus pyogenes* wurde ein CRISPR-Cas9-System charakterisiert, das eine Endonuklease Cas9, eine CRISPR-RNA (crRNA) und eine transgierende RNA (tracrRNA) umfasst. Die Fusion beider RNAs wird als sgRNA bezeichnet. Die sgRNA kann so modifiziert werden, dass Cas9 ortsspezifische DNA-Doppelstrangbrüche verursacht [75]. Mit einer einfachen Klonierung kann die gewünschte 20 Basen lange Zielsequenz für die ortsspezifische DNA-Erkennung in die sgRNA eingefügt werden. CRISPR-Cas9 als Methode der Geninaktivierung zeigt, dass Gene hocheffizient unter Vermeidung von *Off-Target-Effects* geschnitten werden und dadurch die entsprechenden Genprodukte gezielt ausgeschaltet werden. Basierend auf diesen Grundlagen zeigt sich eine wichtige Anwendungsmöglichkeit in der Tumorforschung [76]. Da die Tumorentstehung durch eine Vielzahl von Mutationen und Genregulationen begleitet ist, können entscheidende Sequenzunterschiede zu gesunden Zellen auf genetischer Ebene identifiziert und dadurch passende Zielsequenzen gefunden werden. Dabei kann der Gen-*Knockout* Auswirkungen auf die Tumorbildung haben [77,78] oder im besten Fall zur Instabilität der Zelle und Einleitung der Apoptose führen[41,50].

Für die Klonierung von Zielsequenzen in die sgRNA auf LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRISPRv2-puro Vektoren wurden Sequenzen aus der Literatur verglichen und GBM-spezifische Zielsequenzen ausgewählt. Die Kombination von Lentiviralen Vektoren mit eingebautem CRISPR-Cas9-System hat sich als eine praktische und flexible Methode herausgestellt, Gene in Zellen gezielt zu inaktivieren [41,79]. Mehrere Studien zeigen die erfolgreiche Inaktivierung von Genen wie zum Beispiel dem CCR5-Rezeptor in menschlichen Zellen. Der CCR5-Rezeptor ist ein Korezeptor des HIV-1 und ist essenziell für die Infektion CD4-positiver T-Zellen. Der Funktionsverlust des CCR5-Rezeptors resultierte in einer Resistenz gegen eine HIV-Infektion [80,81]. Diese Methode funktioniert allerdings bisher nur *in vitro* außerhalb des Patienten.

Für die Anwendung in der Tumorforschung ist eine Methode von Glow et al. (2021) beschrieben, die ein *CRISPR-to-kill* (C2K)-System zum Abtöten von humanen Zelllinien entwickelt haben. Die Anwendung basiert auf einer Zielsequenz für hoch repetitive *Short-Interspaced*-Sequenzen, die mehr als 15.000 mal in menschlichen Zelllinien vorkommt. Das Ziel ist das Induzieren einer maximalen Anzahl an Doppelstrangbrüchen, um den programmierten Zelltod einzuleiten. Obwohl die Wirkung in menschlichen Zellen sehr hoch ist, konnte nachgewiesen werden, dass dieselbe sgRNA nahezu keine Wirkung in murinen

Ziellinien hat [79]. Aufgrund dieses Unterschieds kann das vorgestellte C2K-System mit humanen Tumoren in Mausmodellen überprüft werden.

Für die Infektion mit dem C2K-System und auch in anderen Infektionsstudien wurde der VSV-G-Pseudotyp verwendet, da dieser einen breiten Tropismus aufweist [79]. Diese Methode kann jedoch nicht für die Anwendung im Menschen genutzt werden, da der VSV-G-Pseudotyp unter Verwendung des C2K-Systems und anderen unspezifischen CRISPR-Cas9-Systemen *in vivo* auch gesunde Zellen infizieren würde. Dieses Problem zeigt sich auch bei Zielsequenzen, die in dieser Arbeit übernommen oder entworfen wurden. Demnach ist die Anwendung dieser und weiterer CRISPR-Cas9-Therapien abhängig von der Entwicklung eines spezifischen Vektors, der nur die Tumorzellen infiziert.

Ein solcher Vektor, der spezifisch für neuronale Zelle ist, kann auf einem Zikavirus- oder einem Pseudotypen mit den Zika-Hüllproteinen prM und E basieren. Die Spezifität des Zikavirus für GSC resultiert aus einer Hochregulierung des Integrin- $\alpha\beta 5$ -Rezeptormoleküls [82]. Eine *in vitro* Überprüfung der onkolytischen Aktivität des Zikavirus gegen Glioblastome zeigte Verluste in der Selbsterneuerung und Zellproliferation der GSC. Zudem konnte in Mausmodellen eine Verlangsamung der Tumorbildung verzeichnet und nur schwache Nebenwirkungen beobachtet werden [82]. Für die Überprüfung eines ZIKA-Pseudotyps wurde von Kretschmer et al. (2018) ein Z1-LENTI*Luc*-Pseudotyp hergestellt, der über das Hüllprotein des Zikavirus eine Spezifität für GSC aufweist. Die Infektion mit Zika-Pseudotypen wurde mit Hilfe eines Luciferase-Reporters in U87 und 86Hg39 GBM-Zelllinien nachgewiesen [18].

Der Pseudotyp wurde über das drei-Plasmid-System mit einem Lenti*Luc*-Plasmid hergestellt [18]. Das Drei-Plasmid-System ermöglicht die Verwendung verschiedener Lenti-Plasmide, die vom z.B. Zhang-Lab zur Verfügung gestellt werden. Die LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRISPRv2-puro Plasmide weisen neben einem Reporter ein vollständiges CRISPR-Cas9-System auf, in welches die gewünschte Zielsequenz in die sgRNA über einen BsmBI-Verdau integriert werden kann. Zudem ermöglichen die beiden Reporter mCherry und die Puromycin-Resistenz eine effektivere und exaktere Infektionsauswertung im Gegensatz zu einer Luciferase-Messung. Da der Reporter über denselben Promotor wie die Cas9-Endonuklease exprimiert wird, ermöglicht die Fluoreszenzmikroskopie Auswertungen von Einzelinfektionen. Über den Puromycin-Reporter können zudem transfizierte und infizierte Zellen selektiv kultiviert werden und die Wirkung der individuellen Zielsequenzen unter Beobachtung des Zellwachstums überprüft werden. Aufgrund der Vorteile beider Vektoren wurden die in dieser Arbeit gewählten Zielsequenzen in beide Plasmide kloniert.

Die Klonierung erfolgte mit der One-Step-Ligation, da die BsmBI-Erkennungssequenzen mit dem *Insert* herausgeschnitten wurden und nach Ligation der Oligonukleotide keine BsmBI-Schnittstelle mehr vorhanden sind. Die Methode des *Golden-Gate-Protocol* wurde zur Vermeidung von Zielsequenz-negativen Klonen verändert, indem die Anzahl der Zyklen und Oligonukleotid-Konzentration erhöht wurde. Diese Variation erwies sich als höchst effizient, da aus allen Klonierungen kein negativer Klon nachgewiesen werden konnte, bzw. alle untersuchten Klone die gewünschten Sequenzen zeigten. Die Verwendung von getrenntem Restriktionsverdau und Ligation erwies sich vor der Bearbeitung der Bachelorarbeit als wesentlich ineffizienter und bot zudem keinen erkennbaren zeitlichen Vorteil.

Die Wahl der Zielsequenzen basierte auf bestehenden Sequenzdaten und es wurden Zielsequenzen zur Inaktivierung von Genen und zur Erkennung von Tumormutationen in dieser Arbeit integriert. Zur Inaktivierung von Stoffwechselwegen wurden Zielsequenzen für die Gene GPD1 und BIRC5 aus der Literatur übernommen, da deren erhöhte Expression mit einer schlechten Prognose des Glioblastoms in Verbindung gebracht werden kann [30,71]. Aufgrund der allgemeinen Spezifität gegen alle Zellen benötigen diese *Gen-Knockouts* für eine *in vivo* Anwendung einen tumorspezifischen Vektor. Über dieselbe Spezifität könnte auch das IDH1-Gen inaktiviert werden, um eine Anschlusstherapie wie die aus Shankar et al. (2018) zur Inhibition des *Second-Pathway* zu ermöglichen.

Da die bisherigen Fortschritte in der ZIKA-Pseudotypisierung noch keine zuverlässige und effektive Therapie zulassen, wurden in dieser Arbeit auch CRISPR-Cas9-Zielsequenzen entwickelt, die ohne spezifischen Vektor anwendbar wären. Auf genomischer Ebene bieten parallele Mutationen eine Möglichkeit Zielsequenzen zu entwerfen, die in gesunden Zellen an keine Zielsequenz binden. Parallele Mutationen konnten in vielen hoch mutierten Genen des Glioblastoms nachgewiesen werden [26,53]. In einer großen Vielfalt von Mutationen kommt es dabei zu Mutationen, die patientenunabhängig in bis zu 55 Prozent der Patienten auftreten [26,55,64,76,83]. Ziel vieler Therapieansätze sind dabei oft die Tumorfaktoren EGFR, PTEN und TP53. Die in dieser Arbeit erzeugten Zielsequenzen wurden für die parallelen Mutationen mit der höchsten Nachweisrate in GBM-Patienten gewählt. Die Integration einer Mutation macht die Zielsequenz spezifisch, stellt aber die Bedingung, dass die Mutation im Patienten auftreten muss. Trotz der eingebauten Punktmutationen kann es zu *Off-Target-Effects* kommen, da die Caspase falsch bindet oder eine weitere Zielsequenz im Genom vorliegt. Daher wurden alle Zielsequenzen mit Hilfe des *Nucleoblast*-Programms von NCBI auf *Off-Target*-Sequenzen gescannt. Zudem wurde für das Gen EGFR eine Zielsequenz

entworfen, die nur in Tumorzellen erkannt wird, da eine parallele Mutation zur Entstehung einer PAM-Sequenz führt. Auf diese Weise weist die Zielsequenz die höchste Spezifität für die Zielstelle auf. Zur Anwendung von Zielsequenzen mit eingebauten parallelen Mutationen müsste der Tumor des Patienten nach einer Biopsie mit einer Sequenzierung oder einem PCR-Scan auf vorhandene Mutationen überprüft werden, um die richtige Zielsequenz bzw. den entsprechenden Pseudotyp einsetzen zu können.

Zu den stark mutierten Orten des Genoms zählt auch der TERT-Promotor, welcher in 85 % aller GBM-Patienten mutiert ist. Die Mutation resultiert in einer dauerhaften Aktivierung des Promotors und führt zur ständigen Erneuerung der Telomere [51,52,57]. Eine *in vivo* Studie in Mausmodellen zeigt, dass der Gen-*Knockout* von TERT in GBM-Zellen zur Instabilität der DNA und die Tumorbildung senkt [84]. Da das TERT-Gen in gesunden Zellen inaktiviert ist, wird vermutet, dass eine unspezifische Inaktivierung dieses Gens ohne nachweisbare Nebenwirkungen verwendet werden kann [85]. Um diese Vermutung zu umgehen, wurde in dieser Arbeit zudem eine Zielsequenz mit einer GBM-Mutation des TERT-Promotors entworfen, die wie die parallelen Mutationen für Tumorzellen spezifisch ist.

Weiterhin wurden Zielsequenzen zur Inaktivierung von *Second-Pathway*-Genen aus der Literatur übernommen. Diese Methode bietet ebenfalls eine Anwendung ohne spezifischen Vektor, da die gesunden Zellen trotz unspezifischer Inaktivierung unbeeinträchtigt bleiben. In einer Studie zur genomweiten Sequenzierung von Glioblastomen wurde diese Theorie für die Enzyme WEE1 und PKMYT1 gezeigt [41]. Für beide Gene wurden Zielsequenzen entworfen, die auch zu einer Genaktivierung in gesunden Zellen führt, jedoch nur in GSC letale Auswirkungen haben.

Ein neues Ziel in der CRSIPR-Cas9-Therapie ist die Inaktivierung von m⁶A-Regulatoren. In unabhängigen Studien wurden die Einflüsse der Inaktivierungen von *Writer*, *Eraser* und *Reader* untersucht. Die aus dem Gen-*Knockout* resultierenden Veränderungen der epigenetischen Strukturen von mRNAs führten zum Zusammenbruch des Stoffwechsels in den Tumorzellen [49,50]. Obwohl die Funktion der Regulatoren bis heute nicht vollständig geklärt ist, konnte gezeigt werden, dass deren Rolle bei der Erkennung und Verarbeitung von mRNAs essentiell ist [86]. Daher wurden in dieser Arbeit für die wichtigsten Regulatoren jeweils eine Zielsequenz aus der Literatur [50] übernommen. Da diese ebenfalls Tumorspezifisch schneiden wird ein hoch spezifischer Vektor benötigt.

Die Zielsequenzen sollen im Anschluss an diese Arbeit auf ihre Wirkung in GBM-Zelllinien und Patientenproben überprüft werden. *In vitro* können dafür VSV-G-Pseudotypen verwendet werden, um möglichst viele Tumorzellen gleichzeitig zu infizieren. Zur Erzeugung

von GSC-spezifischen ZIKV/HIV-Pseudotyp-Partikeln, die auf Gene in Zelllinien und frisch isolierten GBM Grad IV-Tumorzellen abzielen, wird die Methodik, die in Kretschmer et al. (2018) beschrieben ist, verwendet. Für die Infektion sollen die Patientenproben weiter charakterisiert werden und zudem eine Antikörper-Färbung des Integrin-Rezeptors erfolgen.

Die Weiterentwicklung zur Steigerung der Effizienz des Zika-HIV Pseudotypen ist ein wichtiges Ziel für weitere Arbeiten. Zum anderen ist die Methode zur Anzucht der Tumorzellen geeignet, eine Zell-Bibliothek aufzubauen und die Zellen für DNA-Sequenzierungen zu verwenden. Damit könnten bisher nicht bekannte Sequenzunterschiede von Tumor- und gesunden Zellen identifiziert werden.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden sgRNAs für das CRISPR/Cas9-System hergestellt, die spezifisch Tumorzellen des Glioblastom Multiform inaktivieren sollen. Dafür wurden anhand einer Literaturrecherche Target- bzw. Zielsequenzen für die sgRNAs des CRISPR-Cas9-Systems ausgewählt und zusätzlich wurden neue Zielsequenzen mit Hilfe von vorhandenen Sequenzdatenbanken erstellt.

Es wurden 27 Zielsequenzen aus wissenschaftlichen Arbeiten (17) entnommen oder selbst generiert (10). Die Zielsequenzen wurden als Oligonukleotide synthetisiert und mit der One-Step-Ligation Methode in die beiden LentiCRISPRv2-mCherry und LentiCRISPRv2-puro Vektoren kloniert. Die Klonierungsmethode wurde zu Beginn der Arbeit anhand des *Golden Gate Protocols* optimiert. Von jeder Zielsequenz-Klonierung wurden jeweils zwei Kandidaten ausgewählt und sequenziert. Insgesamt wurden 108 DNA-Sequenzierungen durchgeführt. Die Ausbeute an Klonen mit der gewünschten richtigen Zielsequenz betrug 100 %. Damit erwies sich die optimierte BsmBI-Klonierungsmethode als eine geeignete Vorgehensweise zur Herstellung von CRISPR-Cas9-Vektoren mit GBM spezifischen sgRNAs.

Aus der Literatur wurden für 11 Gene sgRNAs übernommen, kloniert und mit Hilfe von Sequenzierungen auf ihre Richtigkeit überprüft. Es wurden für die Gene GPD1 (3), TERT (1), PKMYT1 (2), WEE1 (3) und für IDH1 (2) Zielsequenzen ausgewählt. Für die epigenetischen Regulatoren wurden für METTL3, METTL14, ALKBH5, YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 jeweils eine Zielsequenz ausgesucht.

Für die TERT-Promotorregion wurde basierend auf tumorspezifischen Punktmutationen eine Zielsequenz entworfen. Zudem wurden für die Gene EGFR (2), für PTEN (1) und für TP53 (2) Zielsequenzen mit darin enthaltenen parallelen Mutationen des GBM erstellt. Weiterhin wurden für Survivin drei Zielsequenzen generiert.

Zudem wurde für EGFR eine Zielsequenz vor einer PAM-Sequenz, die durch eine parallele Mutation entsteht, entworfen. Das Fehlen der PAM-Sequenz in gesunden Zellen macht diese Zielsequenz hoch selektiv für die GBM-Tumorzellen.

Die Plasmide wurden mit einer Konzentration von 1µg/µl für zukünftige Transfektionen und Pseudotyp-Experimente aufgereinigt.

6. Literaturverzeichnis

1. Cloughesy, T.F.; Cavenee, W.K.; Mischel, P.S. Glioblastoma: From Molecular Pathology to Targeted Treatment. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130324> **2014**, *9*, 1–25, doi:10.1146/ANNUREV-PATHOL-011110-130324.
2. Witthayanuwat, S.; Pesee, M.; Supaadirek, C.; Supakalin, N.; Thamronganantasakul, K.; Krusun, S. Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2018**, *19*, 2613, doi:10.22034/APJCP.2018.19.9.2613.
3. Wang, R.; Chadalavada, K.; Wilshire, J.; Kowalik, U.; Hovinga, K.E.; Geber, A.; Fligelman, B.; Leversha, M.; Brennan, C.; Tabar, V. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nat.* **2010**, *468*, 829–833, doi:10.1038/nature09624.
4. Shankar, G.M.; Kirtane, A.R.; Miller, J.J.; Mazdiyasni, H.; Rogner, J.; Tai, T.; Williams, E.A.; Higuchi, F.; Juratli, T.A.; Tateishi, K.; et al. Genotype-targeted local therapy of glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, E8388–E8394, doi:10.1073/PNAS.1805751115/-/DCSUPPLEMENTAL.
5. Doudna, J.A.; Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (80-.)*. **2014**, *346*, doi:10.1126/SCIENCE.1258096.
6. Ishibashi, A.; Saga, K.; Hisatomi, Y.; Li, Y.; Kaneda, Y.; Nimura, K. A simple method using CRISPR-Cas9 to knock-out genes in murine cancerous cell lines. *Sci. Reports* **2020**, *10*, 1–10, doi:10.1038/s41598-020-79303-0.
7. Choi, B.D.; Yu, X.; Castano, A.P.; Darr, H.; Henderson, D.B.; Bouffard, A.A.; Larson, R.C.; Scarfò, I.; Bailey, S.R.; Gerhard, G.M.; et al. CRISPR-Cas9 disruption of PD-1 enhances activity of universal EGFRvIII CAR T cells in a preclinical model of human glioblastoma. *J. Immunother. cancer* **2019**, *7*, doi:10.1186/S40425-019-0806-7.
8. Zhang, D.; Zhang, Z.; Unver, T.; Zhang, B. CRISPR/Cas: A powerful tool for gene function study and crop improvement. *J. Adv. Res.* **2021**, *29*, 207–221, doi:10.1016/J.JARE.2020.10.003.
9. Park, D.M.; Rich, J.N. Biology of glioma cancer stem cells. *Mol. Cells* **2009**, *28*, 7–12, doi:10.1007/S10059-009-0111-2.
10. Denysenko, T.; Gennero, L.; Roos, M.A.; Melcarne, A.; Juenemann, C.; Faccani, G.; Morra, I.; Cavallo, G.; Reguzzi, S.; Pescarmona, G.; et al. Glioblastoma cancer stem cells: heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies. *Cell Biochem. Funct.* **2010**, *28*, 343–351, doi:10.1002/CBF.1666.
11. Patel, A.P.; Tirosh, I.; Trombetta, J.J.; Shalek, A.K.; Gillespie, S.M.; Wakimoto, H.; Cahill, D.P.; Nahed, B. V.; Curry, W.T.; Martuza, R.L.; et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* **2014**, *344*, 1396–1401, doi:10.1126/SCIENCE.1254257.
12. Gilg, A.G.; Tye, S.L.; Tolliver, L.B.; Wheeler, W.G.; Visconti, R.P.; Duncan, J.D.; Kostova, F. V.; Bolds, L.N.; Toole, B.P.; Maria, B.L. Targeting hyaluronan interactions in malignant gliomas and their drug-resistant multipotent progenitors. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1804–1813, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1228.
13. Dey, M.; Ulasov, I. V.; Tyler, M.A.; Sonabend, A.M.; Lesniak, M.S. Cancer stem cells:

- the final frontier for glioma virotherapy. *Stem cell Rev. reports* **2011**, *7*, 119–129, doi:10.1007/S12015-010-9132-7.
14. Polivka, J.; Holubec, L.; Kubikova, T.; Priban, V.; Hes, O.; Pivovarcikova, K.; Treskova, I. Advances in Experimental Targeted Therapy and Immunotherapy for Patients with Glioblastoma Multiforme. *Anticancer Res.* **2017**, *37*, 21–33, doi:10.21873/ANTICANRES.11285.
 15. A targeted approach to treating glioma | MIT News | Massachusetts Institute of Technology Available online: <https://news.mit.edu/2018/targeted-approach-treating-glioma-0806> (accessed on Sep 18, 2021).
 16. Manghwar, H.; Lindsey, K.; Zhang, X.; Jin, S. CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. *Trends Plant Sci.* **2019**, *24*, 1102–1125, doi:10.1016/J.TPLANTS.2019.09.006.
 17. Westra, E.R.; Buckling, A.; Fineran, P.C. CRISPR–Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* *2014 125* **2014**, *12*, 317–326, doi:10.1038/nrmicro3241.
 18. Kretschmer, M.; Kadlubowska, P.; Hoffmann, D.; Schwalbe, B.; Auerswald, H.; Schreiber, M. Zikavirus pr ME Envelope Pseudotyped Human Immunodeficiency Virus Type-1 as a Novel Tool for Glioblastoma-Directed Virotherapy. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, doi:10.3390/CANCERS12041000.
 19. Addgene: LentiCRISPRv2-mCherry Available online: <https://www.addgene.org/99154/> (accessed on Aug 31, 2021).
 20. Addgene: lentiCRISPRv2 puro Available online: <https://www.addgene.org/98290/> (accessed on Sep 2, 2021).
 21. poly(A)-Schwanz - Lexikon der Biologie Available online: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/poly-a-schwanz/52800> (accessed on Dec 16, 2021).
 22. Richetta, C.; Thierry, S.; Thierry, E.; Lesbats, P.; Lapailierie, D.; Munir, S.; Subra, F.; Leh, H.; Deprez, E.; Parissi, V.; et al. Two-long terminal repeat (LTR) DNA circles are a substrate for HIV-1 integrase. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 8286–8295, doi:10.1074/JBC.RA118.006755.
 23. Wang, X.; Xu, Z.; Tian, Z.; Zhang, X.; Xu, D.; Li, Q.; Zhang, J.; Wang, T. The EF-1 α promoter maintains high-level transgene expression from episomal vectors in transfected CHO-K1 cells. *J. Cell. Mol. Med.* **2017**, *21*, 3044, doi:10.1111/JCMM.13216.
 24. Daniels, R.W.; Rossano, A.J.; Macleod, G.T.; Ganetzky, B. Expression of Multiple Transgenes from a Single Construct Using Viral 2A Peptides in Drosophila. *PLoS One* **2014**, *9*, 100637, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0100637.
 25. Boulikas, T. Putative nuclear localization signals (NLS) in protein transcription factors. *J. Cell. Biochem.* **1994**, *55*, 32–58, doi:10.1002/jcb.240550106.
 26. Saleem, H.; Kulsoom Abdul, U.; Küçükosmanoglu, A.; Houweling, M.; Cornelissen, F.M.G.; Heiland, D.H.; Hegi, M.E.; Kouwenhoven, M.C.M.; Bailey, D.; Würdinger, T.; et al. The TICKing clock of EGFR therapy resistance in glioblastoma: Target Independence or target Compensation. *Drug Resist. Updat.* **2019**, *43*, 29–37,

doi:10.1016/J.DRUP.2019.04.002.

27. Lassman, A.B.; Aldape, K.D.; Ansell, P.J.; Bain, E.; Curran, W.J.; Eoli, M.; French, P.J.; Kinoshita, M.; Looman, J.; Mehta, M.; et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification rates observed in screening patients for randomized trials in glioblastoma. *J. Neurooncol.* **2019**, *144*, 205–210, doi:10.1007/S11060-019-03222-Y.
28. Choi, S.W.; Lee, Y.; Shin, K.; Koo, H.; Kim, D.; Sa, J.K.; Cho, H.J.; Shin, H. mi; Lee, S.J.; Kim, H.; et al. Mutation-specific non-canonical pathway of PTEN as a distinct therapeutic target for glioblastoma. *Cell Death Dis.* *2021 124* **2021**, *12*, 1–15, doi:10.1038/s41419-021-03657-0.
29. Toledo, C.M.; Ding, Y.; Hoellerbauer, P.; Davis, R.J.; Basom, R.; Girard, E.J.; Lee, E.; Corrin, P.; Hart, T.; Bolouri, H.; et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 Screens Reveal Loss of Redundancy between PKMYT1 and WEE1 in Glioblastoma Stem-like Cells. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 2425–2439, doi:10.1016/J.CELREP.2015.11.021.
30. Rusu, P.; Shao, C.; Neuerburg, A.; Acikgöz, A.A.; Wu, Y.; Zou, P.; Phapale, P.; Shankar, T.S.; Döring, K.; Dettling, S.; et al. GPD1 Specifically Marks Dormant Glioma Stem Cells with a Distinct Metabolic Profile. *Cell Stem Cell* **2019**, *25*, 241-257.e8, doi:10.1016/J.STEM.2019.06.004.
31. Autexier, C.; Lue, N.F. The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 493–517, doi:10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.75.103004.142412.
32. Killela, P.J.; Reitman, Z.J.; Jiao, Y.; Bettegowda, C.; Agrawal, N.; Diaz, L.A.; Friedman, A.H.; Friedman, H.; Gallia, G.L.; Giovanella, B.C.; et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 6021–6026, doi:10.1073/PNAS.1303607110/-/DCSUPPLEMENTAL.
33. Sanjana, N.E.; Shalem, O.; Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* *2014 118* **2014**, *11*, 783–784, doi:10.1038/nmeth.3047.
34. GPD1 CRISPR guide RNA - GenScript Available online: <https://www.genscript.com/gRNA-detail/2819/GPD1-CRISPR-guide-RNA.html> (accessed on Nov 27, 2021).
35. TERT CRISPR guide RNA - GenScript Available online: <https://www.genscript.com/gRNA-detail/7015/TERT-CRISPR-guide-RNA.html> (accessed on Dec 28, 2021).
36. Mráček, T.; Drahot, Z.; Houštěk, J. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2013**, *1827*, 401–410, doi:10.1016/J.BBABIO.2012.11.014.
37. Yeh, J.I.; Chinte, U.; Du, S. Structure of glycerol-3-phosphate dehydrogenase, an essential monotopic membrane enzyme involved in respiration and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 3280–3285, doi:10.1073/PNAS.0712331105.
38. Hernandez-Sanchez, W.; Xu, M.; Taylor, D.J. Telomere Maintenance and Genome Stability. *Genome Stab. From Virus to Hum. Appl.* **2016**, 353–371, doi:10.1016/B978-0-12-803309-8.00021-5.

39. Ludwig, K.; Muthukrishnan, S.D.; Alvarado, A.G.; Kornblum, H.I. Overview of glioblastoma biological hallmarks and molecular pathology. *Glioblastoma Resist. to Chemother. Mol. Mech. Innov. Reversal Strateg.* **2021**, 1–15, doi:10.1016/B978-0-12-821567-8.00020-8.
40. Chen, J.J.L.; Podlevsky, J.D. Telomeres and Telomerase. *Encycl. Cell Biol.* **2016**, *1*, 418–425, doi:10.1016/B978-0-12-394447-4.10042-2.
41. Toledo, C.M.; Ding, Y.; Hoellerbauer, P.; Davis, R.J.; Basom, R.; Girard, E.J.; Lee, E.; Corrin, P.; Hart, T.; Bolouri, H.; et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 Screens Reveal Loss of Redundancy between PKMYT1 and WEE1 in Glioblastoma Stem-like Cells. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 2425–2439, doi:10.1016/J.CELREP.2015.11.021.
42. Ghelli Luserna Di Rorà, A.; Cerchione, C.; Martinelli, G.; Simonetti, G. A WEE1 family business: regulation of mitosis, cancer progression, and therapeutic target. *J. Hematol. Oncol.* **2020**, *131* **2020**, *13*, 1–17, doi:10.1186/S13045-020-00959-2.
43. Addgene: PKMYT1 gRNA (BRDN0001148430) Available online: <https://www.addgene.org/77279/> (accessed on Nov 27, 2021).
44. GUIDES | Graphical User Interface for DNA Editing Screens Available online: <http://guides.sanjanalab.org/#/designer/13cace4b-5eeb-46f9-bede-ee87da820fa1> (accessed on Nov 27, 2021).
45. Addgene: WEE1 gRNA (BRDN0001148564) Available online: <https://www.addgene.org/77369/> (accessed on Nov 27, 2021).
46. IDH1 CRISPR guide RNA - GenScript Available online: <https://www.genscript.com/gRNA-detail/3417/IDH1-CRISPR-guide-RNA.html> (accessed on Dec 28, 2021).
47. Galardi, S.; Michienzi, A.; Ciafrè, S.A. Insights into the Regulatory Role of m6A Epitranscriptome in Glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/IJMS21082816.
48. Zhang, S.; Zhao, B.S.; Zhou, A.; Lin, K.; Zheng, S.; Lu, Z.; Chen, Y.; Sulman, E.P.; Xie, K.; Böglér, O.; et al. m6A Demethylase ALKBH5 Maintains Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells by Sustaining FOXM1 Expression and Cell Proliferation Program. *Cancer Cell* **2017**, *31*, 591-606.e6, doi:10.1016/J.CCELL.2017.02.013/ATTACHMENT/79E1F47A-321D-4884-BD29-F417952CA22A/MMC5.XLS.
49. Visvanathan, A.; Patil, V.; Arora, A.; Hegde, A.S.; Arivazhagan, A.; Santosh, V.; Somasundaram, K. Essential role of METTL3-mediated m6A modification in glioma stem-like cells maintenance and radioresistance. *Oncogene* **2018**, *374* **2017**, *37*, 522–533, doi:10.1038/onc.2017.351.
50. Cui, Q.; Shi, H.; Ye, P.; Li, L.; Qu, Q.; Sun, G.; Sun, G.; Lu, Z.; Huang, Y.; Yang, C.G.; et al. m6A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 2622–2634, doi:10.1016/J.CELREP.2017.02.059.
51. Heidenreich, B.; Rachakonda, P.S.; Hemminki, K.; Kumar, R. TERT promoter mutations in cancer development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2014**, *24*, 30–37, doi:10.1016/J.GDE.2013.11.005.

52. Nonoguchi, N.; Ohta, T.; Oh, J.E.; Kim, Y.H.; Kleihues, P.; Ohgaki, H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* **2013**, *126*, 931–937, doi:10.1007/S00401-013-1163-0/TABLES/2.
53. Bailey, S.F.; Blanquart, F.; Bataillon, T.; Kassen, R. What drives parallel evolution? *BioEssays* **2017**, *39*, 1–9, doi:10.1002/BIES.201600176.
54. cBioPortal for Cancer Genomics Available online: <https://www.cbioportal.org/> (accessed on Nov 30, 2021).
55. Jorissen, R.N.; Walker, F.; Pouliot, N.; Garrett, T.P.J.; Ward, C.W.; Burgess, A.W. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res.* **2003**, *284*, 31–53, doi:10.1016/S0014-4827(02)00098-8.
56. Messaoudi, K.; Clavreul, A.; Lagarce, F. Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 899–905, doi:10.1016/J.DRUDIS.2015.02.011.
57. Brennan, C.W.; Verhaak, R.G.W.; McKenna, A.; Campos, B.; Nounshmehr, H.; Salama, S.R.; Zheng, S.; Chakravarty, D.; Sanborn, J.Z.; Berman, S.H.; et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **2013**, *155*, 462, doi:10.1016/J.CELL.2013.09.034.
58. Yoshimoto, K.; Dang, J.; Zhu, S.; Nathanson, D.; Huang, T.; Dumont, R.; Seligson, D.B.; Yong, W.H.; Xiong, Z.; Rao, N.; et al. Development of a Real-time RT-PCR Assay for Detecting EGFRvIII in Glioblastoma Samples. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 488–493, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1966.
59. Lee, J.C.; Vivanco, I.; Beroukhi, R.; Huang, J.H.Y.; Feng, W.L.; DeBiasi, R.M.; Yoshimoto, K.; King, J.C.; Nghiemphu, P.; Yuza, Y.; et al. Epidermal Growth Factor Receptor Activation in Glioblastoma through Novel Missense Mutations in the Extracellular Domain. *PLoS Med.* **2006**, *3*, 2264–2273, doi:10.1371/JOURNAL.PMED.0030485.
60. Hoogstrate, Y.; Vallentgoed, W.; Kros, J.M.; de Heer, I.; de Wit, M.; Eoli, M.; Sepulveda, J.M.; Walenkamp, A.M.E.; Frenel, J.-S.; Franceschi, E.; et al. EGFR mutations are associated with response to deparatux-m in combination with temozolomide and result in a receptor that is hypersensitive to ligand. *Neuro-Oncology Adv.* **2020**, *2*, 1–15, doi:10.1093/NOAJNL/VDZ051.
61. Chang, M.T.; Asthana, S.; Gao, S.P.; Lee, B.H.; Chapman, J.S.; Kandoth, C.; Gao, J.J.; Socci, N.D.; Solit, D.B.; Olshen, A.B.; et al. Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *34*, 155–163, doi:10.1038/nbt.3391.
62. HEK293 Genome EGFR Sequence Available online: http://hek293genome.org/v2/index.php?query=EGFR&view=exon&query_location=chr7%3A55054218-55242525&cell_lines%5B%5D=6&tsId=NM_005228.
63. Hopkins, B.D.; Hodakoski, C.; Barrows, D.; Mense, S.M.; Parsons, R.E. PTEN function, the long and the short of it. *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 183, doi:10.1016/J.TIBS.2014.02.006.
64. Wang, S.I.; Puc, J.; Li, J.; Bruce, J.N.; Cairns, P.; Sidransky, D.; Parsons, R. Somatic Mutations of PTEN in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Res.* **1997**, *57*.

65. HEK293 Genome PTEN Sequence Available online:
http://hek293genome.org/v2/index.php?query=PTEN&view=genome&query_location=chr10%3A89613174-89718512&cell_lines%5B%5D=6&tsId=NM_000314.
66. Aubrey, B.J.; Strasser, A.; Kelly, G.L. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, doi:10.1101/CSHPERSPECT.A026062.
67. TP53 Gene - Somatic Mutations in Cancer Available online:
https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?all_data=&coords=AA%3AAA&dr=&gd=&id=348585&ln=TP53&res_type=AA&seqlen=394&export=html&start=284&end=undefined (accessed on Dec 29, 2021).
68. Olivier, M.; Hollstein, M.; Hainaut, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a001008, doi:10.1101/cshperspect.a001008.
69. Newcomb, E.W.; Madonia, W.J.; Pisharody, S.; Lang, F.F.; Koslow, M.; Miller, D.C. A Correlative Study of p53 Protein Alteration and p53 Gene Mutation in Glioblastoma Multiforme. *Brain Pathol.* **1993**, *3*, 229–235, doi:10.1111/J.1750-3639.1993.TB00749.X.
70. HEK293 Genome TP53 Sequence Available online:
http://hek293genome.org/v2/index.php?query=TP53&view=genome&query_location=chr17%3A7512444-7531593&cell_lines%5B%5D=6&tsId=NM_001126113.
71. Tong, X.; Yang, P.; Wang, K.; Liu, Y.; Liu, X.; Shan, X.; Huang, R.; Zhang, K.; Wang, J. Survivin is a prognostic indicator in glioblastoma and may be a target of microRNA-218. *Oncol. Lett.* **2019**, *18*, 359–367, doi:10.3892/OL.2019.10335.
72. Lin, T.Y.; Chan, H.H.; Chen, S.H.; Sarvagalla, S.; Chen, P.S.; Coumar, M.S.; Cheng, S.M.; Chang, Y.C.; Lin, C.H.; Leung, E.; et al. BIRC5/Survivin is a novel ATG12-ATG5 conjugate interactor and an autophagy-induced DNA damage suppressor in human cancer and mouse embryonic fibroblast cells. *Autophagy* **2020**, *16*, 1296–1313, doi:10.1080/15548627.2019.1671643.
73. Conde, M.; Michen, S.; Wiedemuth, R.; Klink, B.; Schröck, E.; Schackert, G.; Temme, A. Chromosomal instability induced by increased BIRC5/Survivin levels affects tumorigenicity of glioma cells. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 1–17, doi:10.1186/S12885-017-3932-Y/FIGURES/8.
74. HEK293 Genome BIRC5 Sequence Available online:
http://hek293genome.org/v2/index.php?query=BIRC5&view=exon&query_location=chr7%3A55054218-55242525&cell_lines%5B%5D=6&tsId=NM_005228.
75. Marchfelder, A.; Maier, L.K.; Heidrich, N.; Pul, Ü. CRISPR-Cas. *Biol. unserer Zeit* **2013**, *43*, 158–165, doi:10.1002/BIUZ.201310506.
76. Bressan, R.B.; Dewari, P.S.; Kalantzaki, M.; Gangoso, E.; Matjusaitis, M.; Garcia-Diaz, C.; Blin, C.; Grant, V.; Bulstrode, H.; Gogolok, S.; et al. Efficient CRISPR/Cas9-assisted gene targeting enables rapid and precise genetic manipulation of mammalian neural stem cells. *Development* **2017**, *144*, 635–648, doi:10.1242/DEV.140855.
77. Rusu, P.; Shao, C.; Neuerburg, A.; Acikgöz, A.A.; Wu, Y.; Zou, P.; Phapale, P.; Shankar, T.S.; Döring, K.; Dettling, S.; et al. GPD1 Specifically Marks Dormant Glioma Stem Cells with a Distinct Metabolic Profile. *Cell Stem Cell* **2019**, *25*, 241-

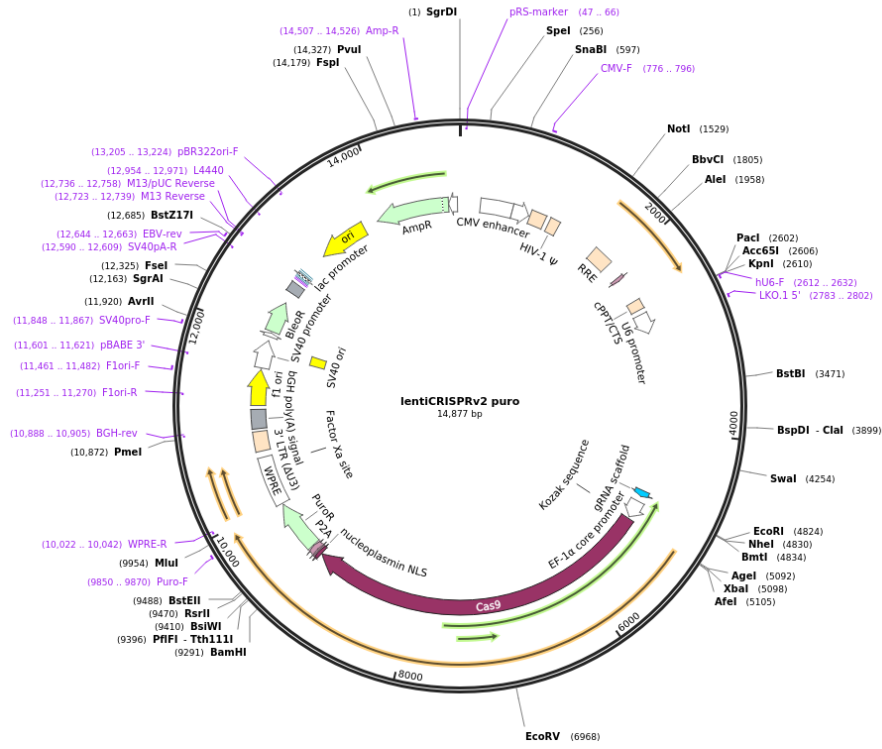
257.e8, doi:10.1016/j.stem.2019.06.004.

78. MacLeod, G.; Bozek, D.A.; Rajakulendran, N.; Monteiro, V.; Ahmadi, M.; Steinhart, Z.; Kushida, M.M.; Yu, H.; Coutinho, F.J.; Cavalli, F.M.G.; et al. Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screens Expose Genetic Vulnerabilities and Mechanisms of Temozolomide Sensitivity in Glioblastoma Stem Cells. *Cell Rep.* **2019**, *27*, 971-986.e9, doi:10.1016/J.CELREP.2019.03.047.
79. Głów, D.; Maire, C.L.; Schwarze, L.I.; Lamszus, K.; Fehse, B.; Przewrocka, J. CRISPR-to-Kill (C2K)—Employing the Bacterial Immune System to Kill Cancer Cells. *Cancers 2021, Vol. 13, Page 6306* **2021**, *13*, 6306, doi:10.3390/CANCERS13246306.
80. Ye, L.; Wang, J.; Beyer, A.I.; Teque, F.; Cradick, T.J.; Qi, Z.; Chang, J.C.; Bao, G.; Muench, M.O.; Yu, J.; et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection., doi:10.1073/pnas.1407473111.
81. Kang, H.J.; Minder, P.; Park, M.A.; Mesquitta, W.T.; Torbett, B.E.; Slukvin, I.I. CCR5 Disruption in Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9 Provides Selective Resistance of Immune Cells to CCR5-tropic HIV-1 Virus. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2015**, *4*, e268, doi:10.1038/MTNA.2015.42.
82. Zhu, Z.; Gorman, M.J.; McKenzie, L.D.; Chai, J.N.; Hubert, C.G.; Prager, B.C.; Fernandez, E.; Richner, J.M.; Zhang, R.; Shan, C.; et al. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 2843–2857, doi:10.1084/JEM.20171093.
83. Muscat, A.M.; Wong, N.C.; Drummond, K.J.; Algar, E.M.; Khasraw, M.; Verhaak, R.; Field, K.; Rosenthal, M.A.; Ashley, D.M. The evolutionary pattern of mutations in glioblastoma reveals therapy-mediated selection. *Oncotarget* **2018**, *9*, 7844, doi:10.18632/ONCOTARGET.23541.
84. Amen, A.M.; Fellmann, C.; Soczek, K.M.; Ren, S.M.; Lew, R.J.; Knott, G.J.; Park, J.E.; McKinney, A.M.; Mancini, A.; Doudna, J.A.; et al. Cancer-specific loss of TERT activation sensitizes glioblastoma to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2021**, *118*, doi:10.1073/PNAS.2008772118/-/DCSUPPLEMENTAL.
85. Yuan, X.; Larsson, C.; Xu, D. Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players. *Oncogene 2019 3834* **2019**, *38*, 6172–6183, doi:10.1038/s41388-019-0872-9.
86. Jiang, X.; Liu, B.; Nie, Z.; Duan, L.; Xiong, Q.; Jin, Z.; Yang, C.; Chen, Y. The role of m6A modification in the biological functions and diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *61* **2021**, *6*, 1–16, doi:10.1038/s41392-020-00450-x.

7. Anhang

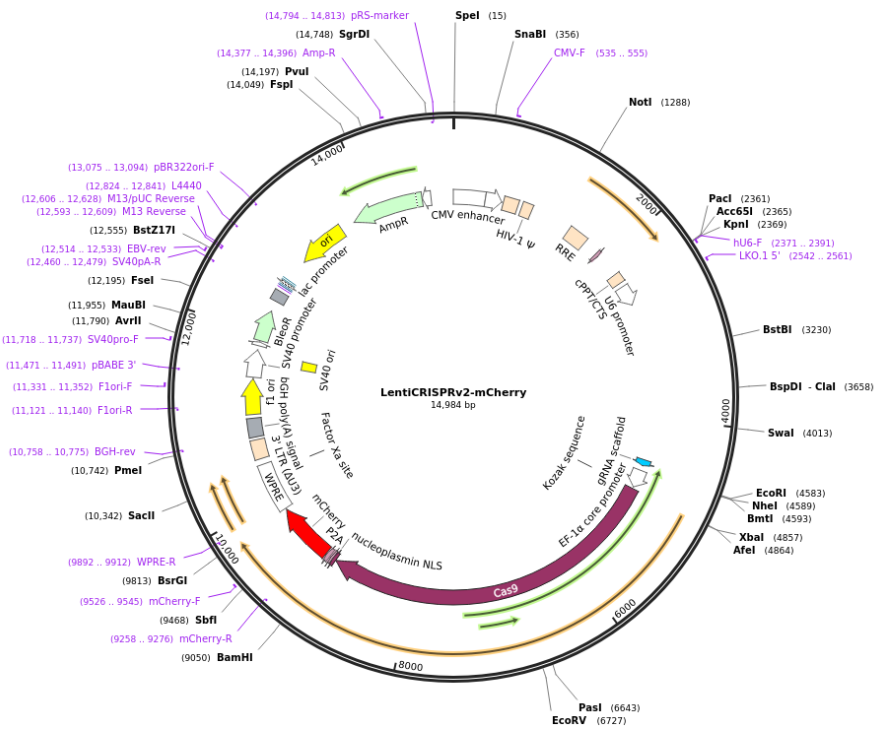
7.1. Lentivirale Vektoren

Created with SnapGene®



LentiCRISPRv2-puro [20]

Created with SnapGene®



LentiCRISPRv2-mCherry [19]

7.2. One-Step-Ligation

<https://barricklab.org/twiki/bin/view/Lab/ProtocolsBTKMakeANewPartPlasmid>

Part Plasmid Assembly

Once you have designed your part and either amplified with PCR or ordered the desired gBlock (as described [here](#)) you can proceed to the assembly step of the part plasmid itself. The example reaction below shows pYTK001 used as the entry vector for the reaction; however, this can be substituted for any other entry vector with requisite BsmBI cut sites. Once built, part plasmids can be assembled into transcriptional units.

Assembly reaction

Total volume will be 20 μ L; You will need 10 fmol of entry vector and 20 fmol of your DNA insert(s).

- 10 fmol pYTK-001 plasmid = **17.7ng** [try to keep volume to 1-2 μ L]
- 20 fmol of insert DNA = $650 \times \text{insert length} \times 20 \times 10^{-6} = \mathbf{X \text{ ng}}$ [try to keep volume to less than 10 μ L]
- 2 μ L of 10 \times T4 DNA ligase buffer (Promega)
- 1 μ L of BsmBI
- 1 μ L of T4 DNA ligase
- x μ L water up to 20 μ L total.

Mix samples well by pipetting, then run the reaction on the thermocycler under the following conditions:

Step	Temperature	Time
1	42°C	1.5 min
2	16°C	3 min
Cycles 1-2:	Repeat 25x	
3	50°C	5 min
4	80°C	10 min

- Transform 2 μ L assembly reaction and plate on LB + Cam

7.4. pICmc-E1 – Sequenzierung mit hU6-F-Primer bei LGCGenomics

GGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAA
TACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAA
AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATAT
CTTGTGGAAAGGACGAAACACCG **TCAAGATCACAGATTTTGGG** GTTTTAGAGCTAGAA
ATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTG
CTTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCA
GTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTG
ATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTTCGTGTACTGGCT
CCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGT
TCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGAT
CACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCA
CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGC
CACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTGCTA
TCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACT
GGAAGAGTCCTTCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACAGAGCGGCACCCCATCTTCGGCA
ACATCGTGGAAACAAGGTGGCCTACCACGAAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAAGAA
GAAACTGGTGGACAGCACCGACCAGGCCAACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCC
ACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATTCGA

8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Hamburg, 26.01.2022

Name (Unterschrift)

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Bachelorarbeit bedanken.

Zuerst gebührt mein Dank Dr. Michael Schreiber, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem spannenden Thema mitzuwirken und meine Arbeit als Zweitbetreuer begutachtet hat. Darüber hinaus möchte ich mich für die aufmerksame und engagierte Unterstützung bei der Erarbeitung meines Themas bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinem Erstgutachter Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker bedanken, der mir als Ansprechpartner eine problemlose Planung und Durchführung meiner Arbeit ermöglichte.

Ich danke Kerstin Krausz, Sebastian Beier und Xinran Zhang, die mit anregenden Gesprächen und ihrer Hilfsbereitschaft ein angenehmes und produktives Arbeitsumfeld geschaffen haben. Weiterhin bedanke ich mich bei Pia Rausche und Kristin Kania für das Korrekturlesen meiner Bachelorarbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich während meines Studiums unterstützt hat.