

Aus dem Institut für Neuropathologie und Prionforschung
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Jochen Herms

Herunterregulation des Mikro-RNA-Clusters auf Chromosom 19
(C19MC) in Tumorzellen eines embryonalen Tumors mit
mehrschichtigen Rosetten (ETMR) *in vitro*

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anna Theresa Bayer

aus Nürnberg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. med. Ulrich Schüller
Mitberichterstatterinnen:	PD Dr. Angela Abicht Prof. Dr. Irene Schmid
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. med. Julia Neumann
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	17.10.2019

Eidesstattliche Versicherung

Bayer, Anna Theresa

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Herunterregulation des Mikro-RNA-Clusters auf Chromosom 19 (C19MC) in Tumorzellen eines embryonalen Tumors mit mehrschichtigen Rosetten (ETMR) *in vitro*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 24.10.2019

Ort, Datum

Anna Theresa Bayer

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie pädiatrischer Krebserkrankungen und Hirntumore.....	1
1.2 Klassifikation der Hirntumore	2
1.2.1 Klassifikation der embryonalen Hirntumore	2
1.3 Therapie, Prognose und Folgeschäden pädiatrischer Hirntumore	4
1.4 Embryonale Tumoren mit mehrschichtigen Rosetten.....	5
1.4.1 Epidemiologie.....	5
1.4.2 Histologie	6
1.4.3 Genexpression.....	8
1.4.3.1 LIN28A	8
1.4.3.2 <i>Sonic-Hedgehog</i> - und WNT-Signalweg	8
1.4.3.3 19q13.41 Cluster und C19MC-mikro-RNA-Cluster.....	8
2 Themenstellung	10
3 Material und Methoden	11
3.1 Das CRISPR/Cas9 System	11
3.2 Das CRISPR <i>interference</i> System	13
3.3 Plasmide	15
3.3.1 dCas9-Plasmid	15
3.3.2 gRNA-Plasmid.....	16
3.4 Virusproduktion	19
3.4.1 Theoretische Grundlagen	19
3.4.2 Praktische Durchführung.....	22
3.5 BT183-Zelllinie	22
3.6 Zellkultur von BT183-Zellen	23
3.7 Transfektion von BT183-Zellen	23
3.8 Transduktion von BT183-Zellen	23
3.9 Zellkultur von HEK293T-Zellen.....	24
3.10 Fluoreszenz-Mikroskopie	24

3.11 Durchflusszytometrie	26
3.12 MTT-Zellproliferations-Assay	29
3.13 Statistische Auswertung	29
4 Ergebnisse	30
4.1 Versuchsdesign: Herunterregulation des C19MC-Clusters durch das CRISPRi System	30
4.2 Transduktion der BT183-Zellen.....	32
4.3 FACS der transduzierten BT183-Zellen.....	33
4.4 MTT-Assay zum Vergleich der Zellproliferation	35
5 Diskussion der Ergebnisse	36
6 Ausblick	37
7 Zusammenfassung.....	38
8 Lebenslauf.....	39
9 Danksagung.....	40
10 Literaturverzeichnis.....	41

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Relative Häufigkeitsverteilung maligner Erkrankungen in einem pädiatrischen Patientenkollektiv. Quelle: an das Deutsche Kinderkrebsregister gemeldete Erkrankungsfälle nach Diagnose-Hauptgruppen, basierend auf insgesamt 14791 unter 18-jährigen Patienten im Zeitraum von 2009-2015. Adaption nach Kaatsch et al. (1)	1
Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung der Tumor-Entitäten innerhalb der ZNS-Tumore. Quelle: Jahresbericht des Deutschen Kinderkrebsregisters 2016	2
Abbildung 3: Einteilung der ZNS-Tumore, adaptiert nach der WHO Klassifikation von 2016.....	4
Abbildung 4: Mikroskopische Aufnahmen von ETMR-Gewebe aus Veröffentlichungen von Korshunov et al., Neumann et al. und Nobusawa et al. (7, 28, 29)	7
Abbildung 5: Darstellung des Chromosoms 19 mit dem 19q13.41-Lokus	9
Abbildung 6: Vermutete Tumorphogenese der ETMR-Tumoren	10
Abbildung 7: Funktionsprinzip des CRISPR interference Systems. Adaption nach Qi et al. (69)	14
Abbildung 8: Vektorkarte des dCas9-T2A-GFP Plasmids.	15
Abbildung 9: Gelelektrophorese eines Restriktionsverdau des dCas9-Plasmids mit dem Restriktionsenzym SpeI.....	16
Abbildung 10: Lineare Anordnung der miRNAs des C19MC-Clusters im 19q13.41-Lokus des Chromosoms 19. Adaption nach Li et al. (22)	17
Abbildung 11: Vektorkarte des gRNA-miR-mCherry Plasmids	18
Abbildung 12: Gelelektrophorese eines Restriktionsverdau des gRNA-Plasmids mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NsiI.....	19
Abbildung 13: Prinzip der Kotransfektion bei der Virusproduktion.....	21
Abbildung 14: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops	25
Abbildung 15: Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie.....	27
Abbildung 16: Entstehung von Vorwärtstreulicht (Forward Scatter = FSC) und Seitwärtstreulicht (Side Scatter = SCC) durch Beugung des Laserlichtes.....	27
Abbildung 17: Funktionsprinzip des Droplet Zell-Sortens mit FACS	28
Abbildung 18: Sphäre der Zelllinie BT183	30

Abbildung 19: Wirkprinzip der Herunterregulation des C19MC-Clusters durch das CRISPR <i>interference</i> System	31
Abbildung 20: Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit	32
Abbildung 21: Fluoreszenz von transduzierten BT183-Zellen	33
Abbildung 22: FACS-Daten der mit dem dCas9- und gRNA-Plasmid co-transduzierten BT183-Zellen	34
Abbildung 23: Darstellung der Proliferationsrate transduzierter BT183-Zellen	35

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Transfektionsmix für die Transfektion von Hek293T-Zellen mit der Ca ²⁺ -Phosphat-Methode	22
--	----

Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AmpR	Ampicillin-Resistenz
antagomiR	miRNA Antagonist
Array-CGH	<i>Array-based Comparative Genomic Hybridization</i>
AT/RT	Atypischer Teratoider/Rhabdoider Tumor
BleoR	Bleomycin-Resistenz
bp	Basenpaar
C19MC	microRNA Cluster auf Chromosom 19
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CaCl ₂	Calciumchlorid-Ionen
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRISPRa	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats activation</i>

CRISPRi	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats interference</i>
crRNA	CRISPR RNA
dCas9	<i>dead Cas9</i>
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)</i>
DNMT	De novo-Methyltransferase
DPBS	<i>Dulbecco's Buffered Salt Solution</i>
E. coli	Escherichia coli
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EIAV	<i>Equine Infectious Anemia Virus</i>
ETANTR	<i>Embryonal Tumor with Abundant Neuropil and True Rosettes</i>
ETMR	Embryonaler Tumor mit mehrschichtigen Rosetten
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
FIV	<i>Feline Immunodeficiency Virus</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Erdbeschleunigung
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
gRNA	<i>guide RNA</i>
HDR	<i>Homology-Directed Repair</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
iFBS	<i>heat-inactivated Fetal Bovine Serum</i>
Indel	Insertion und Deletion
kb	Kilobasen
lac	<i>lactose</i>

loxP site	<i>locus of X(cross)-over in P1 site</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
miR	mikroRNA
miRNA	mikroRNA
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
nm	Nanometer
NOS	<i>Not Otherwise Specified</i>
ori	<i>origin of replication</i>
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNET	Primitiv Neuroektodermaler Tumor
precrRNA	<i>precursor CRISPR RNA</i>
PuroR	Puromycin-Resistenz
qPCR	<i>real-time quantitative PCR</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	<i>RNA interference</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
S. pyogenes	Streptococcus pyogenes
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
SV	<i>Simian Virus</i>
Tab.	Tabelle

TALEN	<i>Transcription Activator-Like Effector Nuclease</i>
tracrRNA	<i>trans-encoded RNA</i>
TTY	<i>tweety</i>
UBC	Ubiquitin C
USA	<i>United States of America</i>
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>
VSV-G	Glykoprotein G des <i>Vesicular Stomatitis Virus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Ψ	Psi

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie pädiatrischer Krebserkrankungen und Hirntumore

Gehirntumore und andere Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS) sind mit knapp 24 % nach Leukämien die am häufigsten bei Kindern vorkommende maligne Erkrankung (s. Abb. 1) (1).

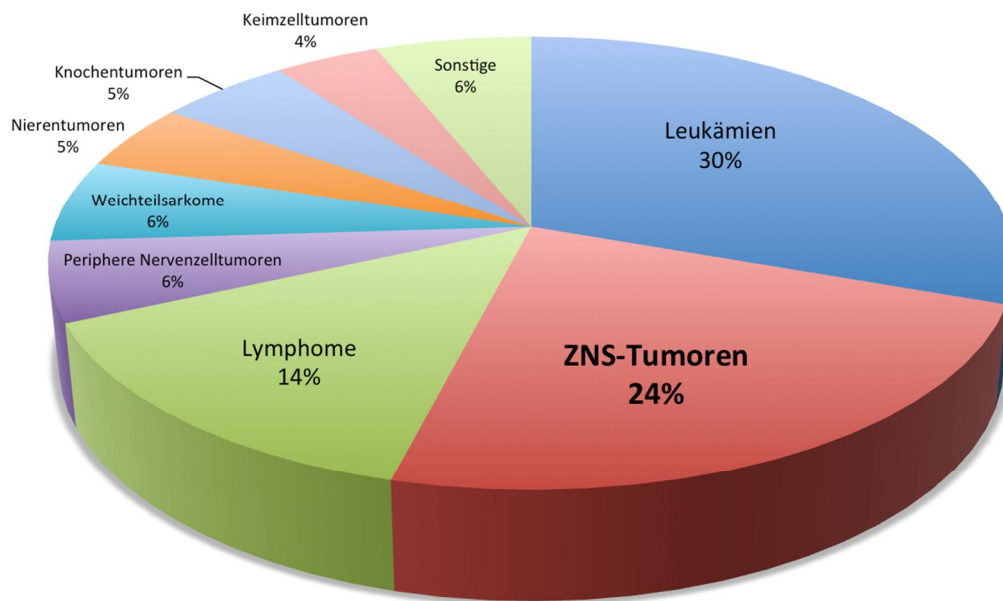


Abbildung 1: Relative Häufigkeitsverteilung maligner Erkrankungen in einem pädiatrischen Patientenkollektiv. Quelle: an das Deutsche Kinderkrebsregister gemeldete Erkrankungsfälle nach Diagnose-Hauptgruppen, basierend auf insgesamt 14791 unter 18-jährigen Patienten im Zeitraum von 2009-2015. Adaption nach Kaatsch et al. (1).

In Deutschland treten pro Jahr 1800 neu diagnostizierte Krebserkrankungen bei unter 15-Jährigen auf. Hochgerechnet auf die Gesamtbevölkerung dieser Altersgruppe, ergibt sich eine Inzidenz von 16,6 pro 100.000 Kinder. Die Wahrscheinlichkeit für ein neugeborenes Kind, vor dem 15. Geburtstag eine Krebserkrankung zu erleiden, liegt bei 0,2 % bzw. 1 pro 410 Neugeborenen (1, 2). Die Inzidenz für pädiatrische Krebserkrankungen ist vor dem 5. Geburtstag doppelt so hoch wie in der Altersgruppe der 5- bis 14-Jährigen. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 5 Jahren und 10 Monaten. Jungen erkranken 1,2-mal häufiger als Mädchen. Insgesamt sind maligne Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache bei Kindern.

Eine Besonderheit pädiatrischer Tumorerkrankungen ist, dass im Gegensatz zu Erwachsenen äußerst selten Karzinome auftreten. Den Großteil stellen stattdessen Tumore embryonalen Ursprungs dar (Neuroblastom, Retinoblastom, Nephroblastom, Medulloblastom, embryonales Rhabdomyosarkom oder Keimzelltumoren) (2).

In Bezug auf die ZNS-Tumore ist 1 von 1700 Kindern unter 15 Jahren betroffen. Das mediane Alter bei Diagnose beträgt 7 Jahre. Dabei sind Jungen circa um den Faktor 1,2 häufiger betroffen als Mädchen (1).

Embryonale Hirntumore zählen dabei neben Astrozytomen und Ependymomen zu den häufigen zentralnervösen Tumoren (insgesamt 4,4 % der Tumoren des Kindesalters, s. Abb. 2). Von dieser Gruppe von Tumoren sind vorwiegend Kleinkinder betroffen. Das mediane Alter bei Diagnose liegt bei 5 Jahren 3 Monaten. Jungen haben ein um den Faktor 1,6 höheres Risiko, an einem embryonalen ZNS-Tumor zu erkranken als Mädchen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 67 % und damit weit unter der von Astrozytomen und Ependymomen (jeweils 81 %). Nach 10 Jahren liegt die Überlebensrate bei 60 % (1).

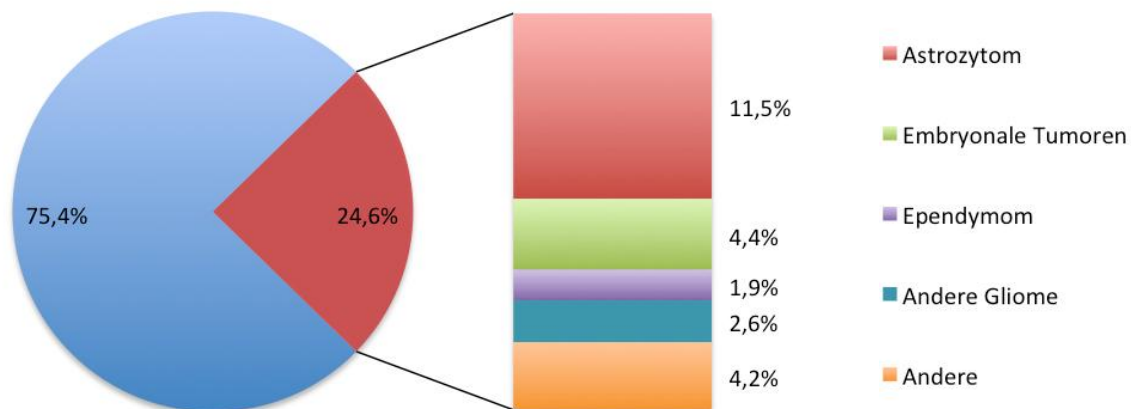


Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung der Tumor-Entitäten innerhalb der ZNS-Tumore. Quelle: Jahresbericht des Deutschen Kinderkrebsregisters 2016.

1.2 Klassifikation der Hirntumore

Nach der aktuellen WHO-Klassifikation (WHO = *World Health Organization*) von 2016 werden die Hirntumore unter Berücksichtigung der Histologie und molekulargenetischer Parameter eingeteilt. Die Nomenklatur spiegelt dies ebenfalls wieder, da die Tumore einen histopathologischen Namen tragen, in welchem die genetischen Eigenschaften, mit einem Komma abgetrennt, nachgestellt werden. Beispiele hierfür sind „Embryonaler Tumor mit mehrschichtigen Rosetten, C19MC-alteriert“ oder „Medulloblastom, SHH-aktiviert und TP53-mutiert“ (3).

Die WHO-Klassifikation teilt die Hirntumore weiterhin in vier verschiedene Grade (Grad I bis Grad IV) ein. Von Grad I zu Grad IV nimmt die Differenzierung der Tumorzellen immer weiter ab und die Invasivität des Tumors zu. Während Grad I klassischerweise einen langsam wachsenden, nicht invasiven benignen Tumor bezeichnet, entspricht Grad IV einem schnell und invasiv wachsenden malignen Tumor. Das *Grading* ist für Therapie und Prognose von essenzieller Bedeutung. Alle embryonalen ZNS-Tumoren werden zum aggressivsten Grad IV gezählt und haben dementsprechend eine besonders schlechte Prognose (3).

1.2.1 Klassifikation der embryonalen Hirntumore

Die WHO-Klassifikation von 2007 gliederte die embryonalen ZNS-Tumore in drei Untergruppen. Dies waren Medulloblastome, ZNS-PNETs (PNET = Primitiv Neuroektodermaler Tumor) und atypische teratoide/rhabdoide Tumore (AT/RT). ZNS-PNETs wurden nach histologischen

Gesichtspunkten weiter untergliedert in ZNS-Neuroblastome, ZNS-Ganglioneuroblastome, Medulloepitheliome und Ependymblastome (4). Im Jahre 2000 wurde mit dem Rosettenbildenden ETANTR (= *Embryonal Tumor with Abundant Neuropil and True Rosettes*) eine weitere Entität innerhalb der ZNS-PNETs vorgeschlagen (5, 6). 2014 postulierten Korshunov et al., dass ETANTR, Ependymblastome und Medulloepitheliome eine klinisch-pathologische Einheit bilden. Diese Hypothese wurde durch die Ergebnisse gestützt, dass alle Proben in der Histologie mehrschichtige Rosetten ausbildeten, sowie 93% der Proben eine Amplifikation des 19q13.41 Locus aufwiesen (7, 8). Die Autoren befürworteten den Vorschlag von Paulus und Kleihues (2010), dieser Entität den Namen ETMR (= Embryonaler Tumor mit mehrschichtigen Rosetten) zu geben (9). ETMRs weisen insgesamt spezifische Genexpressions- und Methylierungsprofile auf (10-12). Diese ermöglichen eine Abgrenzung zu anderen Entitäten, die eine ähnliche Histologie zeigen (13, 14). Entsprechend findet sich ETMRs nun als eigene Entität in der aktuellen WHO-Klassifikation von 2016. Sie werden über eine Amplifikation des 19q13.41 Locus auf Chromosom 19 definiert (3, 8). Neueste Erkenntnisse zeigen, dass sich PNETs in zahlreiche weitere molekulare Subgruppen unterteilen lassen (15). Die Bezeichnung PNET findet sich dementsprechend nicht mehr in der aktuellen WHO-Klassifikation der ZNS-Tumore. Stattdessen wurde als Sammelbegriff für Tumore, die sich nicht eindeutig einer bestimmten Entität zuordnen lassen, der Begriff „Embryonaler ZNS-Tumor, NOS“ (= *Not Otherwise Specified*) etabliert (3). Aktuell werden embryonale ZNS-Tumore nach der WHO-Klassifikation von 2016 in folgende Entitäten eingeteilt: „Medulloblastom, genetisch oder histologisch definiert oder NOS“, „Embryonaler Tumor mit mehrschichtigen Rosetten, C19MC-alteriert oder NOS“, „Medulloepitheliom“, „ZNS-Neuroblastom“, „ZNS-Ganglioneuroblastom“, „Embryonaler ZNS-Tumor, NOS“, „Atypischer teratoider/rhabdoider Tumor“ und „Embryonaler ZNS-Tumor mit rhabdoiden Eigenschaften“ (s. Abb. 3) (3). Medulloblastome haben dabei mit Abstand die höchste Inzidenz (71 %) unter den embryonalen ZNS-Tumoren (1) und stellen außerdem den insgesamt am häufigsten vorkommenden malignen ZNS-Tumor bei Kindern dar. Medulloblastome sind in der Fossa posterior/Cerebellum lokalisiert und zeigen eine Tendenz zur Metastasierung (16).

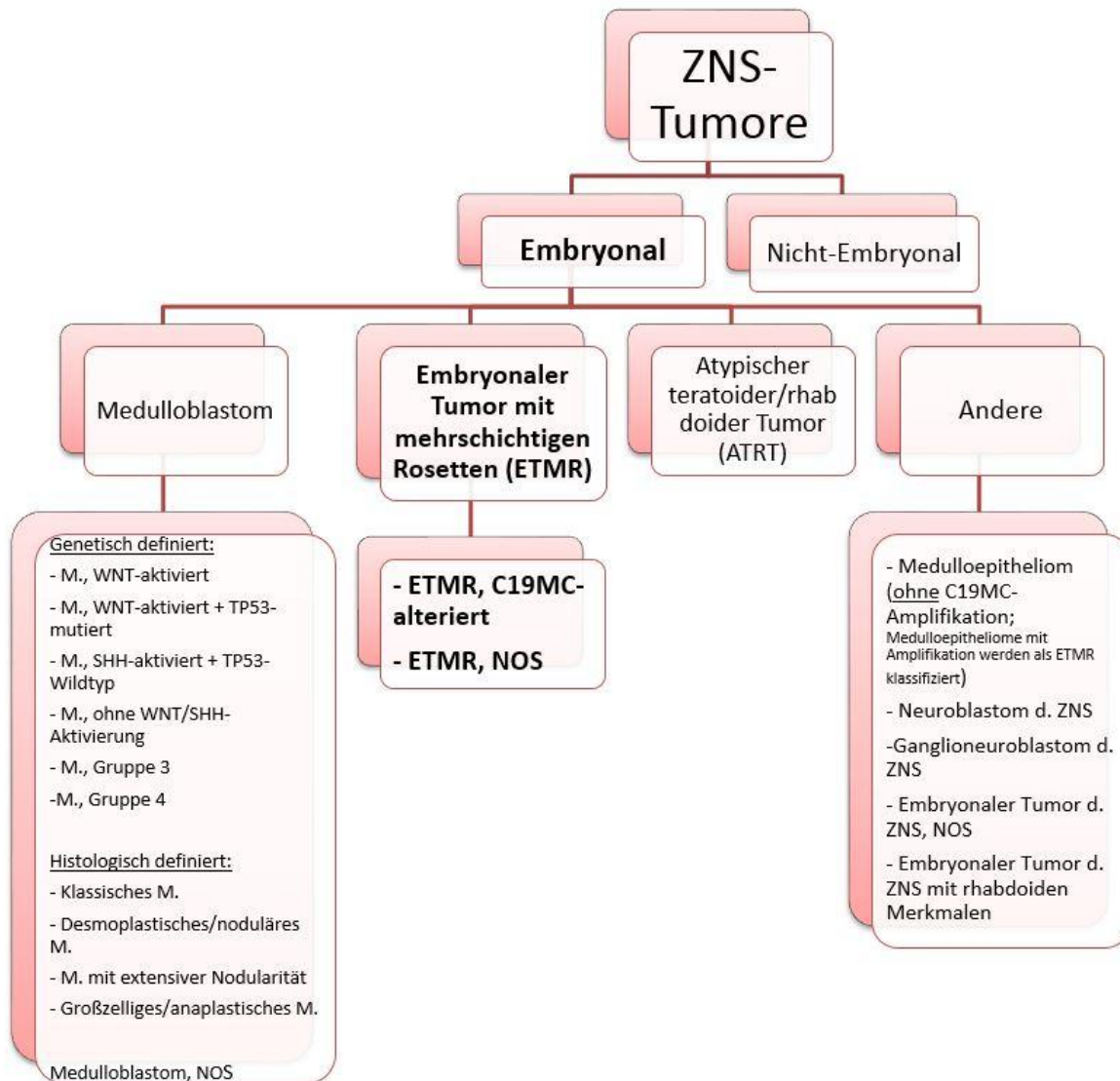


Abbildung 3: Einteilung der ZNS-Tumore, adaptiert nach der WHO-Klassifikation von 2016. Die Gruppe der embryonalen ZNS-Tumore wird weiter untergliedert in drei Kategorien: Medulloblastom, Embryonaler Tumor mit mehrschichtigen Rosetten (ETMR) und Andere. Neben der Histologie spielt besonders die Molekulargenetik eine wichtige Rolle und wird bei vielen Entitäts-Bezeichnungen angegeben (z.B. WNT-aktiviert, C19MC-alteriert). Die Bezeichnung NOS (= *Not Otherwise Specified*) dient als Sammelbegriff für Tumoren, die sich nicht eindeutig zuordnen lassen. Hier liegen entweder nicht ausreichend Informationen vor, falls eine genetische Analyse nicht möglich war, oder der Tumor zeigt nicht die spezifischen molekulargenetischen Veränderungen der Verdachtsdiagnose. Die ehemalige Gruppe der ZNS-PNETs fällt in diese Kategorie, ebenso wie Tumore, die histologische Eigenschaften eines ETMR zeigen, jedoch keine C19MC-Amplifikation aufweisen.

1.3 Therapie, Prognose und Folgeschäden pädiatrischer Hirntumore

In der Therapie der pädiatrischen ZNS-Tumore konnte in den letzten Jahren eine Zunahme der Überlebensrate erreicht werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland liegt kumulativ für alle ZNS-Tumor-Entitäten bei 78 % (1), in den USA bei 73 % (17). Bei embryonalen Hirntumoren zeigt sich im Vergleich eine deutlich niedrigere 5-Jahres-Überlebensrate von 67 % (1).

Die aktuellen Therapie-Protokolle für embryonale Tumore bestehen aus chirurgischer Exzision des Tumors gefolgt von Chemotherapie. Letztere ist je nach Alter des Patienten oft eine

Hochdosis-Variante inklusive Rescue-Stammzell-Transplantation und fokaler oder kraniospinaler Radiotherapie. Die konventionelle Chemotherapie besteht häufig aus einer Kombination von mehreren Zytostatika, darunter Cyclophosphamid, Methotrexat, Vincristin, Carboplatin und Etoposid (18). Trotz dieser radikalen multimodalen Therapie ist die Prognose mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 12 Monaten nach Diagnosestellung sehr ungünstig. Zwar wird initial oft ein Ansprechen auf die Therapie beobachtet, es kommt jedoch frühzeitig zu Rezidiven, was das schlechte Gesamtüberleben erklärt (18-22).

Zusätzlich zu akuten Nebenwirkungen wie Haarausfall, Übelkeit und Erbrechen, sowie Gewichtsverlust, leiden über die Hälfte der Patienten an Langzeitschäden durch die aggressive Therapie. Schon fünf Jahre nach Diagnosestellung und Therapie haben 82 % mindestens einen gesundheitlichen Folgeschaden. Hierzu zählen Kognitionsdefizite (Aufmerksamkeit, Arbeitsgedächtnis, Verarbeitungsgeschwindigkeit), Endokrinopathien (Wachstumshormon-Defizit und Hypothyreose), neurologische und sensorische Störungen, zerebro-kardiovaskuläre Komplikationen, sowie Sekundärmalignome. Für Sekundärmalignome sind Chemotherapie (Leukämien) und Radiotherapie (solide Tumoren) die wichtigsten Risikofaktoren. Auch psychosoziale Folgen sind ein wesentlicher Aspekt (17, 23). So entwickeln Überlebende eines ZNS-Tumors mit höherer Wahrscheinlichkeit eine Depression als Kontrollpersonen ohne Tumor-Erkrankung. Außerdem haben sie mit geringerer Wahrscheinlichkeit einen Universitätsabschluss, eine feste Anstellung und einen Ehepartner. Insgesamt stechen Überlebende eines ZNS-Tumors aus der Gesamtheit aller Überlebenden von pädiatrischen malignen Erkrankungen hervor, da sie die höchste Rate an therapiebedingten chronischen Gesundheits-Schäden haben und sowohl ihre gesundheitsbezogene als auch ihre allgemeine Lebensqualität subjektiv schlechter bewerten. Risikofaktoren für das Auftreten von Langzeitschäden sind die Tumor-Lokalisation, hohe Dosen an Chemotherapeutika und Radiotherapie (additiv), sowie junges Alter bei der Therapie. In absteigender Häufigkeit sind die Todesursachen von ZNS-Tumor-Überlebenden Rezidive, Sekundärmalignome und kardiovaskuläre Erkrankungen. Mehr als zehn Jahre nach der Therapie des Primärtumors sind Sekundärmalignome die häufigste Todesursache (17).

1.4 Embryonale Tumoren mit mehrschichtigen Rosetten

1.4.1 Epidemiologie

ETMRs kommen insgesamt sehr selten vor. Zu ihrer Prävalenz gibt es jedoch keine verlässlichen Zahlen. Seit 2000 sind nur einige wenige Fälle in der Literatur beschrieben worden (24). Besonders häufig sind Kinder unter zwei Jahren betroffen. Der Tumor ist meist supratentoriell lokalisiert und mit den Ventrikeln assoziiert, wobei häufig Zeichen einer intrakraniellen Druckerhöhung auftreten (7, 10, 18, 19, 24-26). Korshunov et al. (7) untersuchten 97 ETMR-Tumorproben (histopathologische Diagnose ETANTR, Ependymoblastom oder Medulloepitheliom) und fanden folgende klinischen Charakteristika. Das mediane Alter bei Diagnosestellung lag bei 2,3 Jahren. Jungen erkrankten mit der Ratio 1,1:1 etwas häufiger als Mädchen. 70 % der Tumoren waren supratentoriell lokalisiert, die Hälfte davon frontoparietal. 80 % der Tumore zeigten bei Diagnosestellung ein M0-Grading ohne Fernmetastasen. Das mediane progressionsfreie Überleben nach bestmöglicher Therapie betrug acht Monate und 84 % der Tumorpatienten verstarben innerhalb von drei Jahren nach Diagnosestellung. Das mediane Gesamtüberleben betrug 12,3 Monate.

1.4.2 Histologie

Histologisch imponieren bei ETMRs mehrreihig rosettenförmig um ein Lumen angeordnete mitotisch aktive Tumorzellen. Diese Rosetten unterscheiden sich in Form und Größe (7, 9). Tumore, die solche Rosetten zeigen, wurden in der Vergangenheit als Ependymblastome diagnostiziert. Deshalb trägt dieses histologische Muster auch den Namen „ependymblastische Rosetten“. Die konzentrischen Ringe aus primitiven Tumorzellen sind um ein zentrales Lumen angeordnet. Die Zellen des äußersten Ringes vermischen sich mit den die Rosette umgebenden undifferenzierten neuroektodermalen Zellen. Es gibt keine abgrenzende äußere Membran (siehe Abb. 4: A, B, C, D, F; Rosetten mit Pfeil markiert). ETMRs zeigen weiterhin wie Medulloepitheliome papilläre, tubuläre und/oder trabekuläre Muster mit einer nach außen abgrenzenden Membran, die an das embryonale Neuralrohr erinnern (siehe Abb. 4: G). Außerdem zeigen ETMRs wie ETANTRs dichte klein-blau- und rundzellige Zellverbände und unterschiedlich große Inseln aus Neuropil, ependymblastische Rosetten und vereinzelt unreife Neuronen (7, 27) (siehe Abb. 4: E, F). ETMRs weisen in der Histologie also Anteile mit undifferenzierten, klein-blau- und rundzelligen Tumorzellen, Areale mit mehrreihigen ependymblastischen Rosetten, sowie zum Teil eine papilläre oder tubuläre Architektur und einen Neuropilhintergrund auf.

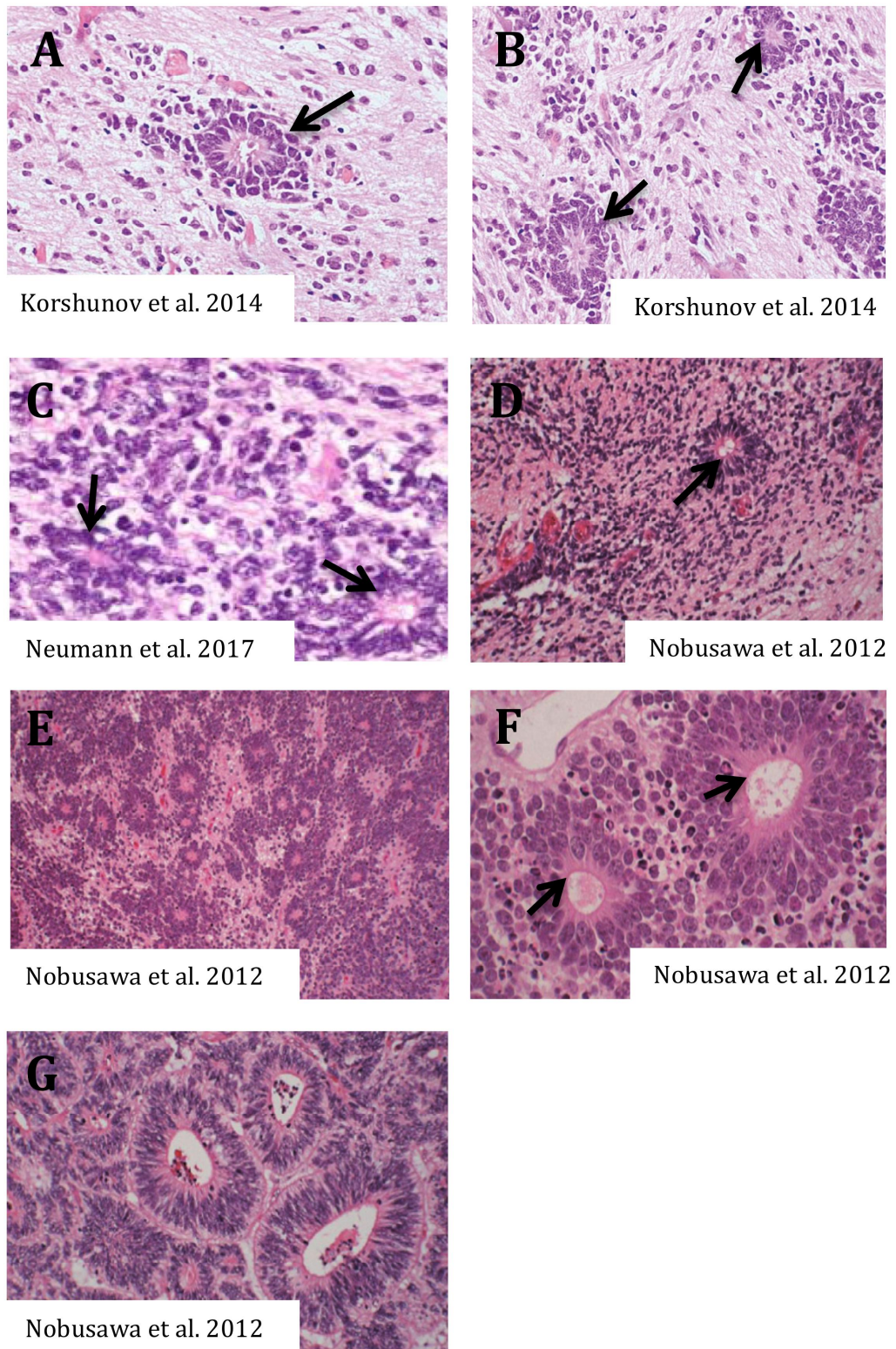


Abbildung 4: Mikroskopische Aufnahmen von ETMR-Gewebe aus Veröffentlichungen von Korshunov et al., Neumann et al. und Nobusawa et al. (7, 28, 29). Die typischen, namensgebenden Rosetten aus mehrschichtig um ein Lumen angeordneten mitotisch aktiven Tumorzellen sind mit Pfeilen markiert. Panel G zeigt an ein Neuralrohr erinnernde Strukturen.

1.4.3 Genexpression

1.4.3.1 LIN28A

Ein hochspezifisches immunhistochemisches Merkmal der ETMR ist die LIN28A-Positivität (7, 12, 19, 30). LIN28A und sein Homolog LIN28B werden vor allem in Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert. Die von diesem Gen kodierten Proteine binden *small* RNA und hemmen die mikroRNAs (=miRNA, miR) der let-7-Familie (31, 32). Da die let-7-miRNAs eine Tumor-Suppressor-Funktion besitzen, führt deren Hemmung zu einer erhöhten Onkogenität (33). Diese erfolgt durch die verstärkte Expression der Onkogene RAS, MYC, und HMGA2 (34). Von allen Veränderungen der tumor-suppressiven miRNAs lässt sich bei malignen Erkrankungen am häufigsten eine reduzierte let-7-Expression finden. Diese ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (34). LIN28A kommt physiologisch in der frühen Embryonalentwicklung vor, wird danach jedoch herunterreguliert. Eine erhöhte Aktivität über die Entwicklungsphase hinaus konnte mit Gehirntumoren (35, 36), sowie zahlreichen weiteren Tumorerkrankungen assoziiert werden (37). Dazu zählen beispielsweise das Kolon- und Ösophagus-Karzinom, sowie Brustkrebs (38-41). Da LIN28B auch in anderen Hirntumoren vorkommt, hat sich LIN28A als spezifischer Marker für ETMRs durchgesetzt (30).

1.4.3.2 *Sonic-Hedgehog*- und WNT-Signalweg

Weiterhin zeigen ETMRs auf Genexpressionsebene eine pathologische Aktivierung des *Sonic-Hedgehog*- (SHH) und WNT-Signalweges (19, 28). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass LIN28A einerseits in der Lage ist, WNT- und SHH-Signalwege hochzuregulieren, während andererseits eine direkte Aktivierung dieser beiden Signalwege in einem Mausmodell ausreicht, um die Entstehung von embryonalen Großhirntumoren zu initiieren. Diese Hirntumoren der Maus ähneln dabei histologisch, immunhistochemisch und bezüglich ihrer globalen Genexpressionsprofile humanen ETMRs (28).

1.4.3.3 19q13.41 Cluster und C19MC-mikro-RNA-Cluster

Definierend für die Entität der ETMR ist wie oben beschrieben die Amplifikation des 19q13.41 Clusters, welche per FISH-Analyse (= Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung) nachgewiesen werden kann. Dieser auf Chromosom 19 lokalisierte Abschnitt enthält die mikro-RNA-Cluster C19MC und miR-371–373 (8, 22, 42).

Mikro-RNAs sind circa 22 Basenpaare lange, nicht kodierende RNAs, die eine wichtige Rolle in der post-transkriptionellen Genregulation spielen (34). Sie beeinflussen Proliferation, Differenzierung und Apoptose, indem sie ihre Zielgene durch Bindung an die 3'-Region der mRNA (= *messenger* RNA) regulieren. Eine miRNA kann dabei Hunderte von Zielgenen regulieren. Aktuell sind ungefähr 2660 humane miRNAs bekannt (43). Sie spielen eine wichtige Rolle beim Entstehungsprozess maligner Erkrankungen (44, 45). Aktuelle Forschungsergebnisse legen nahe, dass miRNAs sowohl Tumor-Suppressor-Gene, als auch Onkogene sein können. Diese Annahme wird von der Tatsache gestützt, dass circa 50 % aller miRNAs auf „*fragile sites*“ genannten Genomabschnitten lokalisiert sind, welche mit malignen Erkrankungen assoziiert sind (46, 47). Einige miRNAs konnten schon bestimmten Erkrankungen zugeordnet werden. Zum Beispiel sind miR-15 und miR-16 bei Chronisch Lymphatischer Leukämie herunterreguliert (48), während bei Glioblastomen und Brustkrebs miR-21 überexprimiert wird (46).

Beide mikro-RNA-Cluster des 19q13.41 Locus sind in humanen embryonalen Stammzellen hochreguliert. Das C19MC-Cluster kommt nur bei Primaten vor. Mit circa 100 kb ist es das größte miRNA-Cluster des menschlichen Genoms und enthält 46 mi-RNAs (49). MiRNAs des C19MC-Clusters werden insbesondere während des dritten Schwangerschafts-Trimesters exprimiert (50). Für miRNAs des C19MC-Clusters wurde außerdem gezeigt, dass diese das Zellwachstum fördern und die Differenzierung humaner neuraler Stammzellen inhibieren.

Die Amplifikation des 19q13.41 Locus findet sich bei nahezu allen ETMR-Tumoren, nicht aber bei anderen Hirntumor-Entitäten, und scheint somit hochspezifisch für ETMRs zu sein (7, 8).

Kleinman et al. (11) konnten 2014 zeigen, dass in ETMRs zudem ein Fusionskonstrukt vorliegt, welches das C19MC-Cluster betrifft. Hierbei ist das C19MC-Cluster mit dem endogenen TTYH1-Gen fusioniert. Der Breakpoint der Fusion liegt zwischen 5,5 und 16 kb *upstream* des C19MC-Clusters. Die Fusion und die Amplifikation des C19MC-Clusters führen zusammen zu einer Überexpression der auf dem C19MC-Cluster kodierten miRNAs. Die Expressionslevel dieser miRNAs sind 150- bis 1000-fach erhöht. Außerdem liegt die De-Novo-Methyltransferase DNMT3B stark überexprimiert vor, was als mögliche Ursache für die Tumorgenese vorgeschlagen wurde. Aufgrund von epigenetischer Modifikation durch DNMT3B könnte es zur Re-Aktivierung eines Programmes kommen, das physiologisch nur in der frühen Entwicklung des Gehirns aktiv ist (11). Weiterhin korreliert das Expressionslevel der miRNAs mit der Expression des TTYH1-Gens, weshalb der TTYH1-Promoter als gemeinsamer Promoter diskutiert wird (11).

TTYH1 liegt normalerweise *downstream* des C19MC-Clusters auf dem gleichen Chromosom. Das TTY (= *tweety*) Gen wurde erstmals in *Drosophila melanogaster* beschrieben (51). Beim Menschen gibt es drei homologe Gene. Dies sind TTYH1, TTYH2 und TTYH3, deren Genprodukte als transmembrane Chlorid-Kanäle fungieren (52, 53). TTYH1 wird vor allem in embryonalen Stammzellen und neuronalem Gewebe exprimiert, wobei die genaue Rolle noch nicht geklärt ist (11, 54). Eine erhöhte TTYH1-Expression findet sich beispielsweise in Gliomen (55) und bei Epilepsie (56, 57).

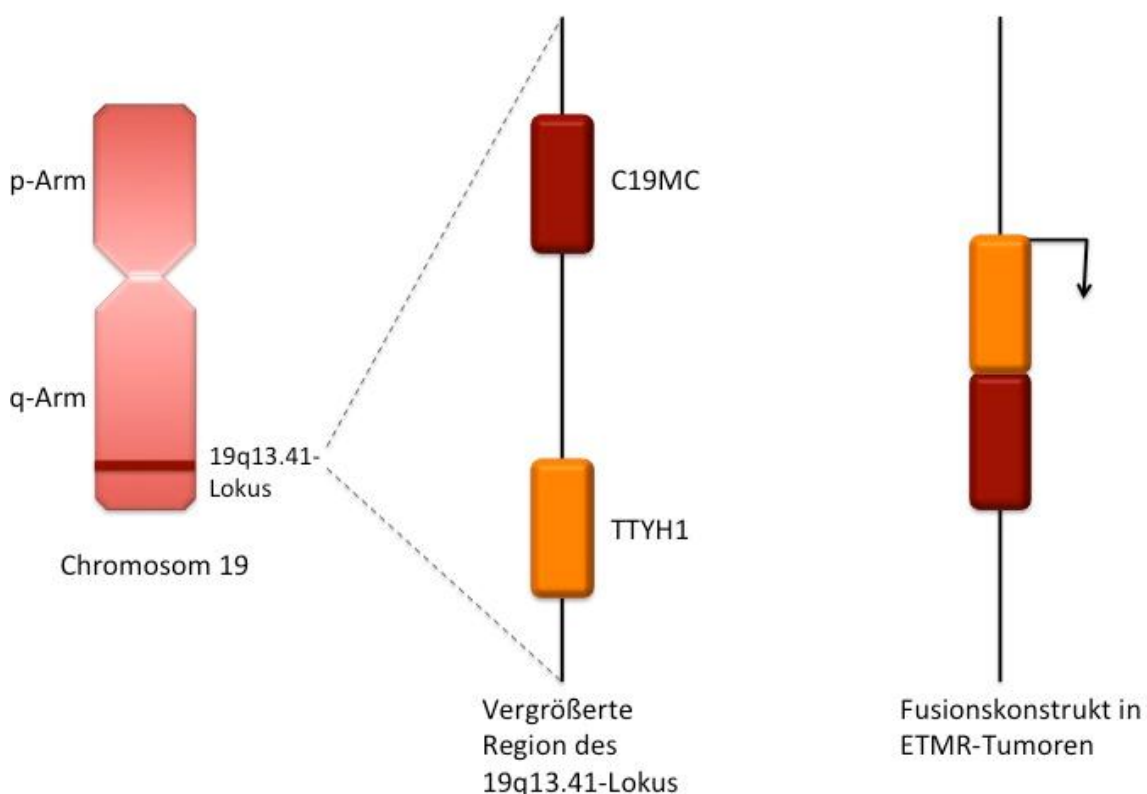


Abbildung 5: Darstellung des Chromosoms 19 mit dem 19q13.41-Lokus. Die Vergrößerung des 19q13.41-Lokus zeigt die normale Gen-Anordnung (links), sowie das in ETMR-Tumoren vorliegende pathologische Fusionskonstrukt aus TTYH1 und C19MC (rechts).

2 Themenstellung

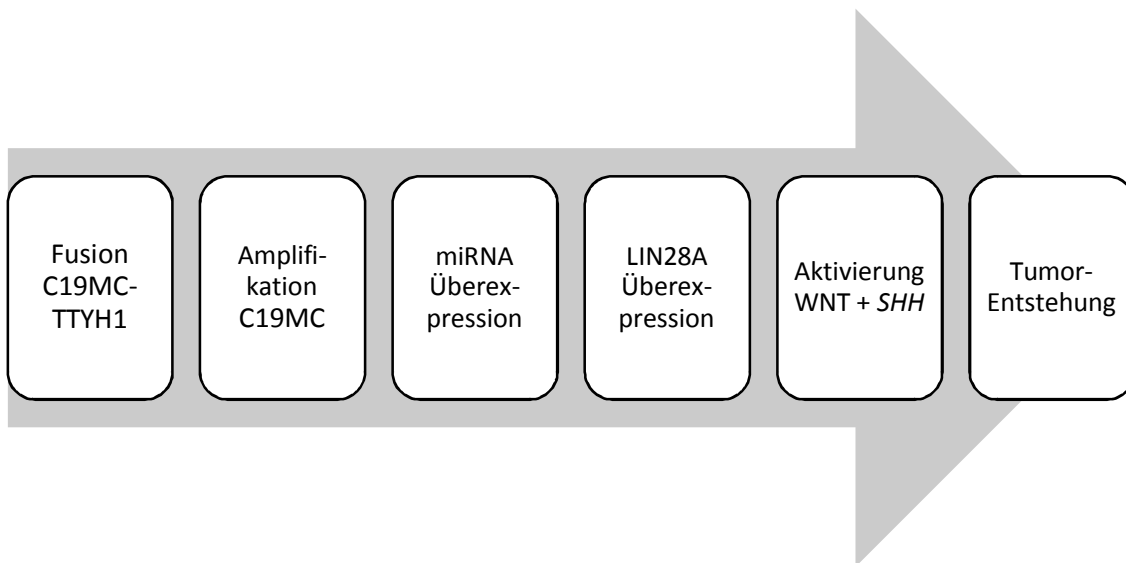


Abbildung 6: Vermutete Tumorphathogenese der ETMR-Tumoren.

In ETMR-Tumoren konnte ein Fusionskonstrukt aus dem C19MC-Cluster und dem TTYH1-Gen nachgewiesen werden. Außerdem liegt eine starke Amplifikation des C19MC-Clusters sowie eine Überexpression der auf dem Cluster kodierten miRNAs vor (11). Ein Zusammenhang zwischen diesen beiden pathologischen Veränderungen erscheint wahrscheinlich. Des Weiteren liegt LIN28A überexprimiert vor (19). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass LIN28A *in vitro* SHH- und WNT-Signalgene hochregulieren kann. Eine direkte Aktivierung der SHH- und WNT-Signalwege reicht dabei im Mausmodell aus, um ETMR-ähnliche Großhirntumore zu initiieren. Die Hypothese ist, dass das C19MC-Fusionskonstrukt die Überexpression der C19MC-miRNAs bedingt, was zu einer Hochregulation von LIN28A und damit zur Tumorentstehung führt. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob das Fusionskonstrukt die zugrundeliegende Ursache für die Tumorentstehung ist. Hierfür soll in einer humanen ETMR-Zelllinie mit Hilfe der CRISPR (= *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) *interference* Methode das C19MC-Cluster herunterreguliert und die Zellproliferation untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Das CRISPR/Cas9 System

Das Akronym CRISPR steht für *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (58). Zusammen mit der Endonuklease Cas (= *CRISPR associated protein*) ermöglicht dieses System die sequenzspezifische Genom-Modifikation *in vitro* und *in vivo*. Das CRISPR/Cas-System hat sich innerhalb weniger Jahre von einer Nischentechnologie zu einer weit verbreiteten Methode entwickelt und zu einem enormen Fortschritt in der Biotechnologie geführt (59).

Vor der Entdeckung des CRISPR/Cas-Systems wurden zur Genom-Modifikation Zink-Finger-Nukleasen (60-62), TALENs (= *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) (63, 64) oder die RNA *interference* Methode (RNAi) (65, 66) verwendet. Die Bindung an die Zielsequenz erfolgt durch Protein-DNA-Wechselwirkung. Da diese Werkzeuge jedoch nur in bestimmten Organismen verwendet werden können (RNAi) (67) oder aufwendig und teuer in der Herstellung sind (TALENs) (68), haben sie an Bedeutung verloren (69).

Die Entdeckung des CRISPR/Cas-Systems nahm im Jahr 1987 ihren Anfang, als in *E. coli* Bakterien fünf je 29 Nukleotide lange sich wiederholende identische DNA-Sequenzen beschrieben wurden. Diese werden als *repeats* bezeichnet (70, 71). In den folgenden Jahren konnten *repeats* in weiteren Prokaryonten und Archaea nachgewiesen werden (72-74). Außerdem wurden die Cas-Gene in unmittelbarer Nähe zu den *repeat*-Sequenzen entdeckt (58). Diese Gene kodieren eine Reihe von unterschiedlichen Proteinen, darunter Nukleasen, Helikasen und Polymerasen (75).

2002 wurde der Begriff CRISPR geprägt, der den Aufbau des Lokus mit *repeats* und dazwischen liegenden variablen *spacer*-Sequenzen genauer beschreibt (58). 2007 konnte die Funktion als adaptives Immunsystem bestätigt werden (76), die aufgrund der Komplementarität von *spacer*-Sequenzen zu DNA-Sequenzen aus Viren und Plasmiden (sog. *protospacer*) schon länger vermutet worden war (77, 78). Prokaryonten und Archaea schützen sich vor dem Eindringen von Fremdmaterial, indem sie fremde Sequenzen als *spacer* in ihre CRISPR-Loki integrieren und diese dadurch bei einem erneuten Kontakt erkennen und unschädlich machen können (79). Das System ist dynamisch und kann durch Integration oder Deletion von *spacern* adaptiert werden (80, 81). Neben der Funktion als Immunsystem ist das CRISPR/Cas-System nach neuesten Erkenntnissen auch an der DNA-Reparatur (82), Genregulation (83, 84) und Genom-Evolution (85) beteiligt (79). Es ist in 90 % der Archaea und 40 % der Bakterien vorhanden (86-88).

Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche weitere CRISPR/Cas-Systeme entdeckt (75) und es erfolgte eine Klassifikation in Klasse 1 und 2 mit Untertypen (89). Typ II der Klasse 2 hat sich weitgehend in der wissenschaftlichen Forschung durchgesetzt, da nur ein Cas-Protein (Cas9) benötigt wird und nur an einer einzigen Stelle ein Doppelstrangbruch erfolgt (90).

2012 wurde das CRISPR/Cas-System aus *Streptococcus pyogenes* (91) und *Streptococcus thermophilus* (92) erstmals *in vitro* verwendet und als Werkzeug für gezielte Genom-Modifikation vorgeschlagen (93). Im Rahmen dieser Experimente konnte auch der molekularbiologische Funktionsmechanismus des CRISPR/Cas-Systems genauer verstanden werden. Dieser besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt, der Adaption, erfolgt die Integration einer kurzen Sequenz der eindringenden DNA in den proximalen Bereich des CRISPR Lokus (*spacer*). Danach erfolgt die Expression, also die Transkription der *repeat-spacer*-Sequenz. Hierbei entsteht zuerst die Vorläufer-/precursor CRISPR-RNA (= pre-crRNA). Diese wird durch Interaktion mit trans-*encoded* RNA (= tracrRNA) und Aktivierung der Ribonuklease III zu reifer CRISPR-RNA (= crRNA) umgewandelt (94). Die crRNA bindet per Watson-Crick-Basenpaarung an den *protospacer* und

bildet mit der Endonuklease Cas9 einen Komplex. Dieser CRISPR/Cas9-Komplex führt zum *silencing* der fremden Sequenz, indem Cas9 einen Doppelstrangbruch im Bereich des *protospacers* nahe der sog. PAM-Sequenz (= *Protospacer Adjacent Motif*) verursacht (95). Dies stellt den letzten Schritt, die Interferenz, dar (91). Sowohl die Bindung des CRISPR/Cas9-Komplexes an die DNA, als auch das Schneiden der DNA sind abhängig von der PAM-Sequenz (91, 92, 96). Diese besteht bei *Streptococcus pyogenes* aus der Basenfolge 5'-NGG und schließt direkt an das 3'-Ende der Zielsequenz an. Die PAM-Sequenz scheint dem Bakterium die Unterscheidung zwischen Fremd und Eigen zu ermöglichen (97-99). Jinek et al. konnten zeigen, dass Cas9 mit einem tracrRNA-crRNA-Konstrukt, der sog. *guide* RNA (=gRNA) bestehend aus 20 Basenpaaren, programmiert werden kann und somit Doppelstrangbrüche an einer gewünschten Stelle im Genom induziert werden können. Hierfür enthält Cas9 zwei Nuklease-Domänen, HNH und RuvC-*like*, die jeweils einen DNA-Strang schneiden (91). Doppelstrangbrüche werden entweder durch *Non-Homologous End Joining* (NHEJ) oder *Homology-Directed Repair* (HDR) repariert (100-103). Während bei der fehlerfreien HDR der homologe DNA-Strang des Schwesterchromatids als Vorlage für den neu synthetisierten DNA-Strang dient, werden bei NHEJ die prozessierten Enden der DNA miteinander ligiert. Letzterer Mechanismus ist fehleranfälliger und es entstehen häufig Insertionen oder Deletionen (Indels) (104). Bei der Genom-Modifikation mit dem CRISPR/Cas9-System wird ein Donor-Plasmid in die Zelle eingebracht. Dieses enthält das gewünschte *insert*, das beidseits von zum Zielort homologen Sequenzen flankiert wird und durch die DNA-Reparaturmechanismen in das Genom integriert wird. Hierbei wird eine hohe Rate an HDR angestrebt, da dieser Mechanismus die präzise Integration ausschließlich des *inserts* ermöglicht (105). Aktuelle Studien legen nahe, dass NHEJ zur schnellen und gezielten Inaktivierung bestimmter Gene dienen könnte (106, 107).

2013 vermeldeten drei unabhängige Forschungslabore erfolgreiche Genom-Modifikation bei Pro- (108) und Eukaryonten (109, 110). Noch im selben Jahr gelang die Anwendung des CRISPR-Cas9-Systems *in vivo* an Mausembryonen und embryonalen Stammzellen (111, 112). Dies machte die Generierung von transgenen Mauslinien so einfach und zeitsparend wie nie zuvor. Auch die kostenlose Bereitstellung aller Bestandteile des CRISPR/Cas9-Systems über die Plasmid-Datenbank „*Addgene*“ trug zur schnellen Verbreitung in Wissenschaftskreisen und der Vielzahl an Forschungsprojekten bei (113-115).

Zusammengefasst bietet das CRISPR/Cas-System einige Vorteile. Verglichen mit anderen Werkzeugen zur Genom-Modifikation zeigt es eine hohe Effizienz. Außerdem ermöglicht es die sequenzspezifische Wahl des Zielortes. Dieser kann durch Anpassung der gRNA-Sequenz schnell und einfach geändert werden. Es ist möglich, mehrere unterschiedliche gRNAs einzusetzen und somit gleichzeitig multiple Gene zu modifizieren (108-110). Die Herstellung der Komponenten ist darüber hinaus deutlich günstiger.

Das größte Problem des CRISPR/Cas-Systems sind *off-target* Effekte (116). Diese entstehen, weil die Cas9-Nuklease auch einen DNA-Bruch verursachen kann, wenn bis zu fünf Fehlpaarungen (*mismatches*) zwischen gRNA und Zielsequenz vorliegen (117). Außerdem werden von *Streptococcus pyogenes*-Cas9 teilweise auch NAG-PAM-Sequenzen erkannt (108). Es scheint aktuell am erfolversprechendsten die Cas9-Nuklease zu modifizieren (118, 119). Hierbei sind besonders die Cas9-Nickasen zu erwähnen. Cas9-Nickasen haben eine Punktmutation in einer der zwei Nuklease-Domänen (NHN oder RuvC-*like*), welche dadurch inaktiviert wird (91, 92, 96). Dies hat zur Folge, dass anstelle eines Doppelstrangbruchs ein Einzelstrangbruch induziert wird. Um den benötigten Doppelstrangbruch zu erhalten, werden zwei gRNAs verwendet, von denen eine den *template* und die andere den *non-template* Strang zum Ziel hat (120, 121). Da durch die Verwendung von zwei gRNAs die Länge der Erkennungssequenz auf 40 Basenpaare verdoppelt wird, kommt es zu weniger *off-target* Effekten. Außerdem werden durch Nickasen induzierte Einzelstrangbrüche eher durch die präzise HDR repariert (109).

Eine weitere Einschränkung basiert auf der zwingenden Voraussetzung einer PAM-Sequenz zur Zielort-Erkennung. Die von *Streptococcus pyogenes*-Cas9 benötigte NGG-PAM-Sequenz findet sich im menschlichen Genom beispielsweise circa alle acht Basenpaare (109). Als möglicher Lösungsansatz kommt die Verwendung von Cas9-Varianten, die kürzere PAM-Sequenzen erkennen können, (122) oder die Modifikation der mit der PAM-Sequenz interagierenden Aminosäuren des Cas9-Proteins in Frage (116). Außerdem variiert die Effizienz der vom CRISPR/Cas9-System hervorgerufenen Doppelstrangbrüche deutlich und ist stark von der *protospacer*-Sequenz und der verwendeten gRNA abhängig (116, 123).

Das Potential der CRISPR/Cas-Methode ist noch nicht voll ausgeschöpft und aktuell laufen zahlreiche Forschungen zu neuen Anwendungsmöglichkeiten, wie zum Beispiel als Therapieansatz für genetische Erkrankungen (124-127).

3.2 Das CRISPR *interference* System

CRISPR *interference* (CRISPRi) ist eine Abwandlung des in *Streptococcus pyogenes* vorkommenden Systems, das zur sequenzspezifischen Genregulation eingesetzt wird (69, 128). Hierbei wird die Nuklease-Aktivität des Cas9 Proteins inaktiviert, weshalb es die Bezeichnung *dead Cas9* (dCas9) trägt. Dies wird durch zwei Punktmutationen in der NHN- (H840A) und RuvC-*like*-Domäne (D10A) erreicht (91).

Ebenso wie beim CRISPR/Cas9-System wird neben dem dCas9 eine den Zielort angegebende gRNA benötigt. Diese enthält auch die NGG-PAM-Sequenz. Die gRNA besteht aus 20-25 zur Zielsequenz komplementären Basenpaaren, der dCas9-bindenden RNA-Struktur (*dCas9-handle-hairpin*, 42 Basenpaare) und einem *terminator* (40 Basenpaare). Der aus dCas9 und gRNA gebildete Komplex bindet den DNA-Strang und fungiert als „Blockade“. Die Effizienz dieser ist bei Bindung des *non-template* DNA-Strangs besser als bei Bindung des *template* DNA-Strangs. Die RNA-Polymerase kann diese Struktur nicht überwinden und daher den dahinter liegenden DNA-Abschnitt nicht transkribieren. Bindet der Komplex an die Promotor-Region, so wird die Initiation der Transkription unterbunden. Bindet der Komplex an ein Exon oder Intron innerhalb des Zielgens, so wird die Transkriptions-Elongation gehemmt.

Somit kann die Expression eines gewünschten Gens abgeschwächt oder komplett gehemmt werden. Hierbei erfolgt im Gegensatz zum CRISPR/Cas9-System keine Veränderung der DNA-Sequenz. Die Regulation ist hochspezifisch, reversibel und zeigt schon nach ein bis zwei Wochen Wirkung. Außerdem kann auch hier durch den Einsatz mehrerer gRNAs eine gleichzeitige Modifikation multipler Gene erfolgen und somit eine höhere Effizienz erreicht werden (69, 128).

Qi et al. konnten in Bakterien zeigen, dass mit dem CRISPRi System eine Repression der Transkription um den Faktor 1000 erreicht werden kann (69). Die Effizienz der Repression ist invers korreliert mit der Entfernung der Zielsequenz vom Transkriptions-Start. Aus diesem Grund sollten mehrere gRNAs in der Nähe des Promotors gewählt werden (69). Um die Effizienz weiter zu steigern, kann dCas9 mit einer KRAB-Domäne fusioniert werden. Mit einer idealen gRNA kann so eine Repressions-Rate von 90-99% erreicht werden (129). Auch an humanen Zellen konnte die Methode bereits erfolgreich angewendet werden (69, 130).

Das CRISPRi System kann abgewandelt auch zur Genaktivierung eingesetzt werden. Hierfür wird dCas9 mit einer VP64-Aktivator-Domäne fusioniert und als CRISPR *activation* (CRISPRa) bezeichnet (129, 131-133).

Off-target Effekte sind beim CRISPR *interference* System weitaus seltener zu beobachten als bei der konventionellen Variante, da weniger Fehlpaarungen toleriert werden (69, 134).

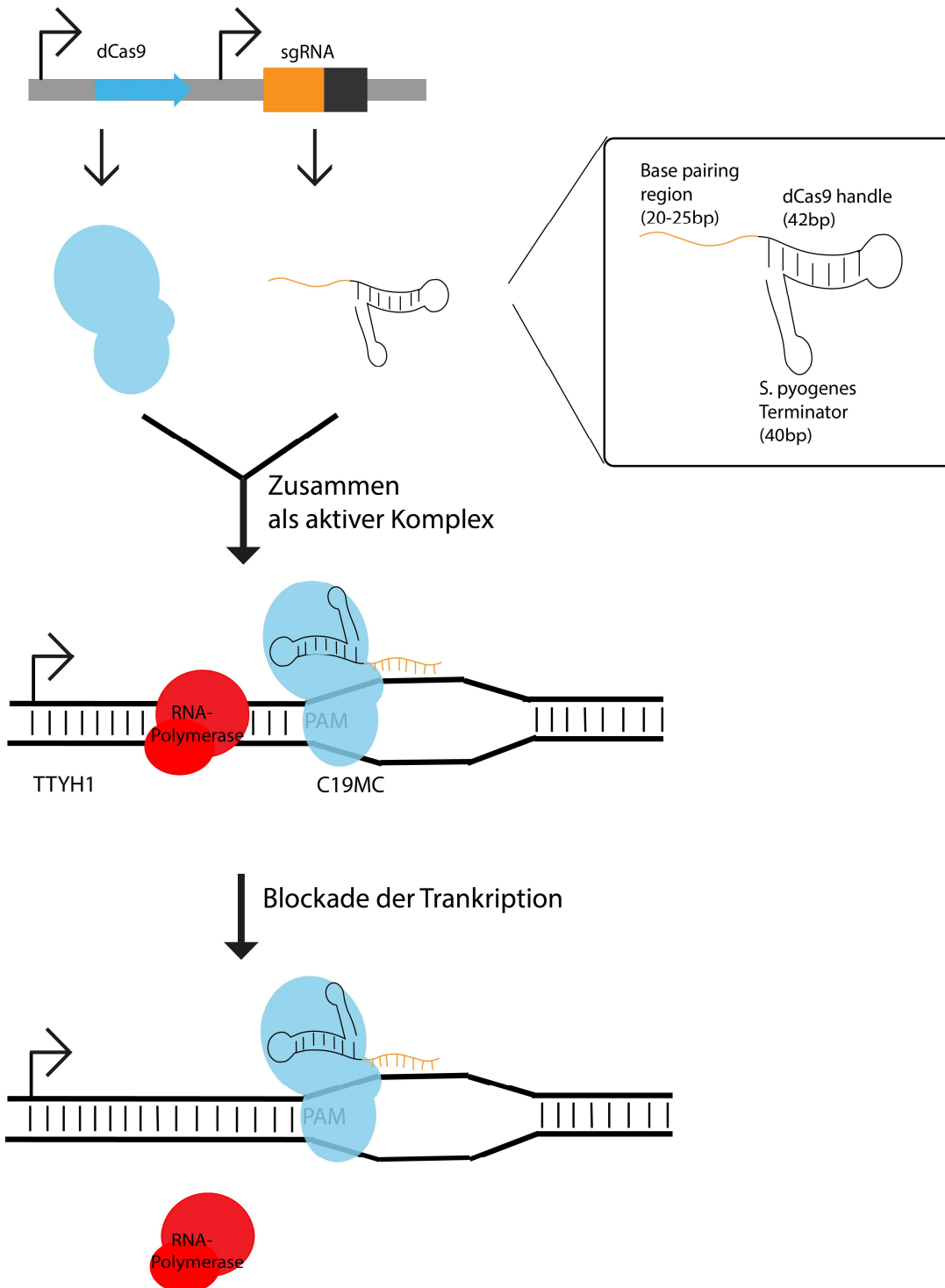


Abbildung 7: Funktionsprinzip des CRISPR *interference* Systems. Das Nuklease-defiziente *dead-Cas9* und die gRNA bilden einen Komplex, der sich an die durch die gRNA vorgegebene Zielsequenz des DNA-Stranges anlagert. Dadurch wird die RNA-Polymerase an der Transkription des hinter dem Komplex liegenden DNA-Abschnittes gehindert und somit die Genexpression reprimiert. Adaption nach Qi et al. (69).

In dieser Arbeit soll mit dem CRISPRi System in ETMR-Zellen das C19MC-Cluster und folglich die Expression der darauf kodierten miRNAs herunterreguliert werden. Hierfür wurden ein über „Addgene“ erhältliches dCas9- und ein in der Arbeitsgruppe designtes gRNA-Plasmid verwendet. Diese wurden als lentivirale Vektoren durch Transduktion in die ETMR-Zellen eingebracht. Der aktive Komplex aus beiden Plasmiden bindet an die DNA und blockiert die Transkription des *downstream* liegenden C19MC-Clusters. Da das CRISPRi System eine hohe Spezifität aufweist, kann davon ausgegangen werden, dass die nach der Transduktion beobachteten Veränderungen der Zellproliferation direkte Folge der Herunterregulation des C19MC-Clusters sind.

3.3 Plasmide

Diese Arbeit baut auf der Vorarbeit von Marc Weißhaar auf, die am gleichen Institut durchgeführt wurde (135). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verwendeten Plasmide etabliert oder designt und kloniert.

3.3.1 dCas9-Plasmid

Der *pLV hUbc-dCas9-T2A-GFP* Vektor wurde von Charles Gersbach über „Addgene“ (#53191) bereitgestellt. Dieser enthält die Nuklease-defiziente Variante von Cas9, dCas9, und GFP (= *Green Fluorescent Protein*) als Reportergen. Wie bereits beschrieben, weist dCas9 zwei Punktmutationen in der NHN- (H840A) und RuvC-*like*-Domäne (D10A) auf, wodurch die Nuklease-Aktivität aufgehoben wird. Die Fähigkeit, mit gRNAs zu interagieren und an DNA zu binden, bleibt jedoch unbeeinflusst (91).

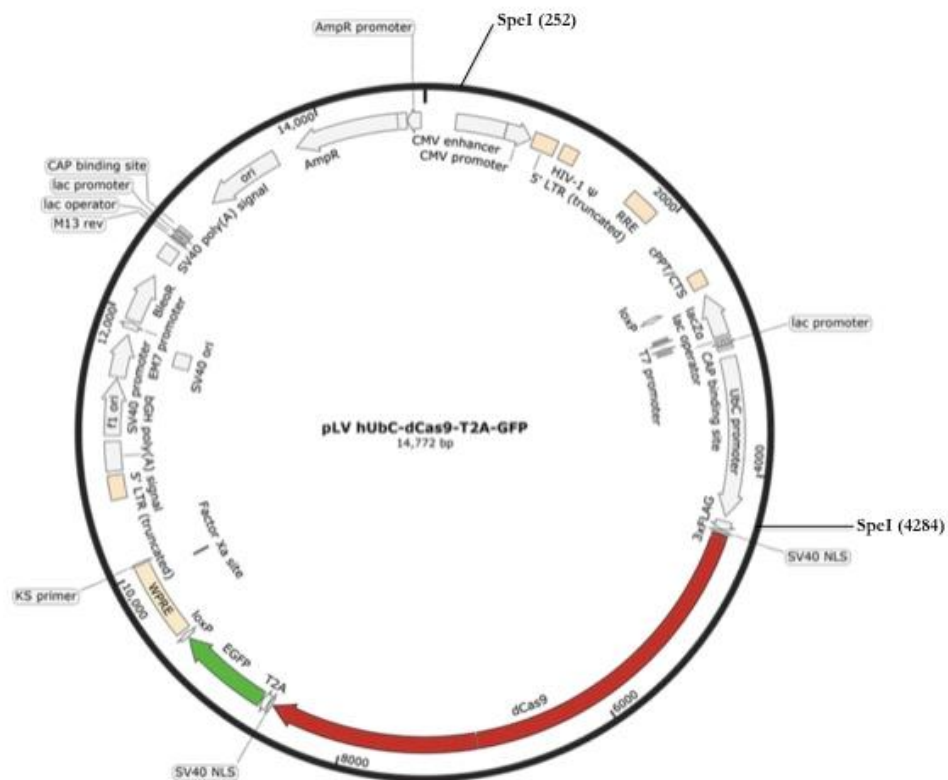


Abbildung 8: Vektorkarte des *dCas9-T2A-GFP* Plasmids. Das 14.772 Basenpaare große Plasmid enthält folgende Komponenten: das *insert dead* Cas9 (dCas9, rot), den *reporter Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP, grün), die eukaryotischen Promotoren *Simian Virus* 40 (SV40), Cytomegalievirus (CMV) und Ubiquitin C (UBC), die prokaryotischen Promotoren EM7, lac (Lactose), T7, AmpR (Ampicillin-Resistenz), die Resistenzen gegen die Antibiotika Bleomycin (BleoR) und Ampicillin (AmpR), mehrere *origins of replication (ori)*, eine *loxP site (locus of X(cross)-over in P1)*, sowie T2A (2A Peptid aus dem *Thossea asigna* Virus Kapsidprotein).

Vor der Verwendung des Plasmides wurde mit einem Restriktionsverdau sichergestellt, dass es sich um das korrekte Plasmid handelte. Hierfür wurde das Restriktionsenzym SpeI verwendet. Aufgrund der bekannten Schnittstellen von SpeI im Plasmid konnte die Größe der zwei im Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente mit einer Gelelektrophorese überprüft werden (s. Abb. 9).

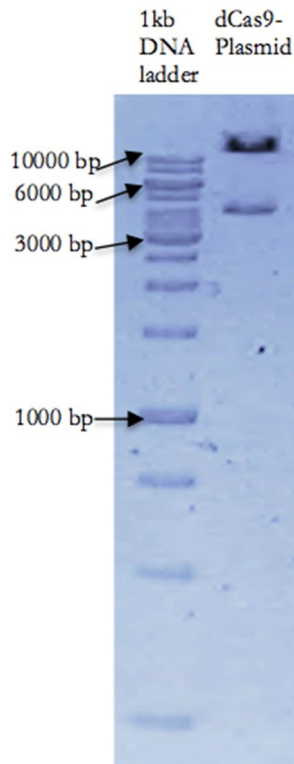


Abbildung 9: Gelelektrophorese eines Restriktionsverdaus des dCas9-Plasmids mit dem Restriktionsenzym SpeI. Erwartete Banden bei 4032 bp und 10740 bp; 1%iges Agarosegel.

3.3.2 gRNA-Plasmid

Für die Klonierung des *gRNA-miR-mCherry* Vektors wurden mit Hilfe des „*Optimized CRISPR Design Tools*“ (Zhang Lab, Massachusetts Institute of Technology) (136) drei geeignete miRNAs als Zielsequenzen gewählt, die sich möglichst nah am Beginn des C19MC-Clusters befinden sollten (s. Abb. 10). Außerdem sollten sie auf dem *non-template* Strang liegen, da Zielsequenzen, die auf diesem DNA-Strang kodiert sind, eine deutlich bessere Effizienz zeigen als Sequenzen, die auf dem *template* Strang liegen (69). Bei den nach diesen Kriterien ausgewählten Zielsequenzen handelt es sich um miR515-1, miR520a und miR512-2, die in ETMRs stark überexprimiert werden (11). Die zu diesen miRNAs komplementären gRNAs werden von dCas9 gebunden und geben somit den Zielort vor. Da miR515-1 und miR512-2 als Duplikate im C19MC-Cluster vorliegen, ergeben sich insgesamt fünf Bindungsstellen für dCas9. Die Transkription des C19MC-Clusters wird somit gleich am Anfang gestoppt und es kommt zur Herunterregulation aller folgenden miRNAs. Dies führt zu einer effektiven Repression des C19MC-Clusters.

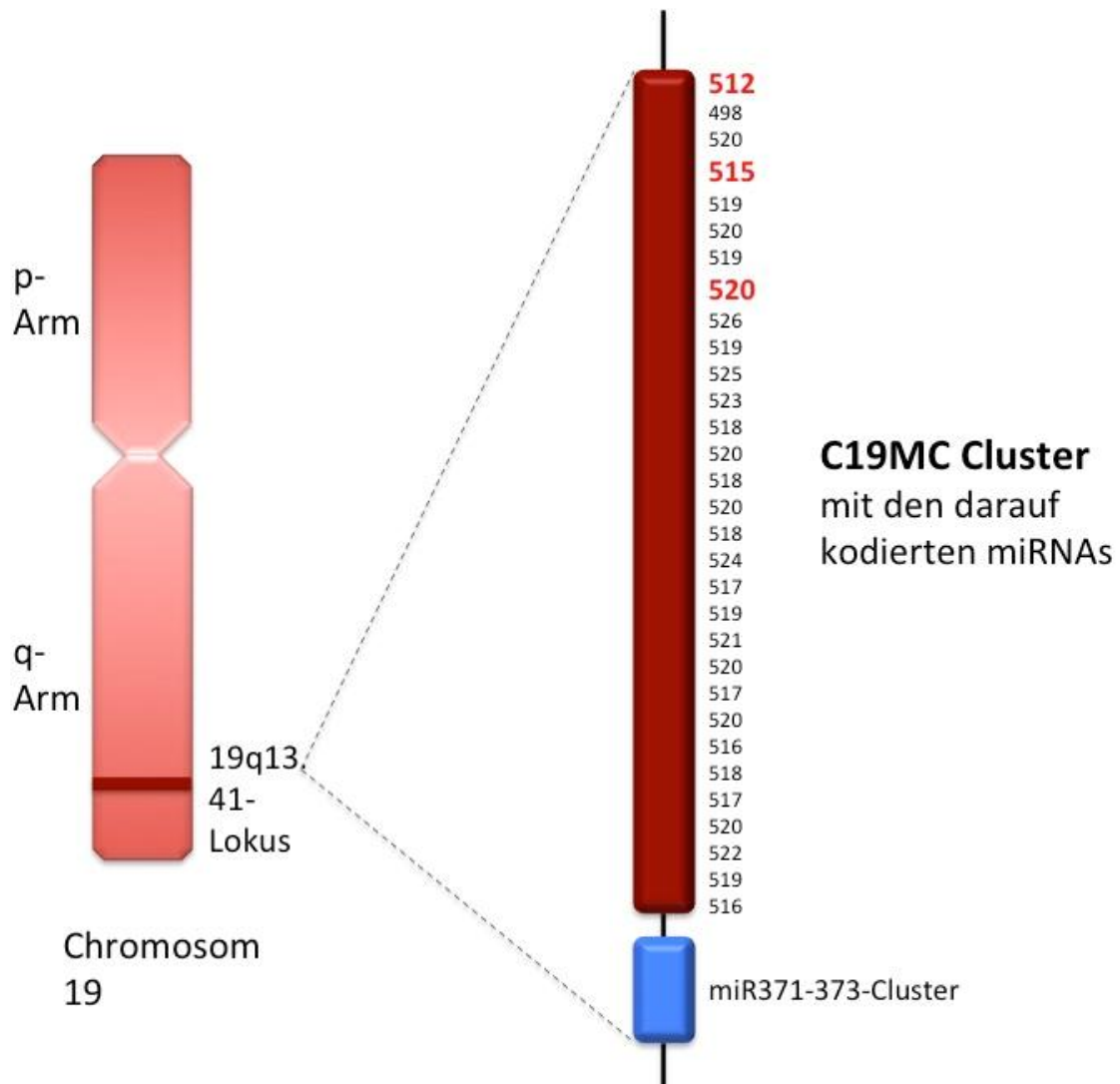


Abb. 10: Lineare Anordnung der miRNAs des C19MC-Clusters im 19q13.41-Lokus des Chromosoms 19. Für das gRNA-Plasmid wurden die drei rot markierten miRNAs verwendet. Adaption nach Li et al. (22).

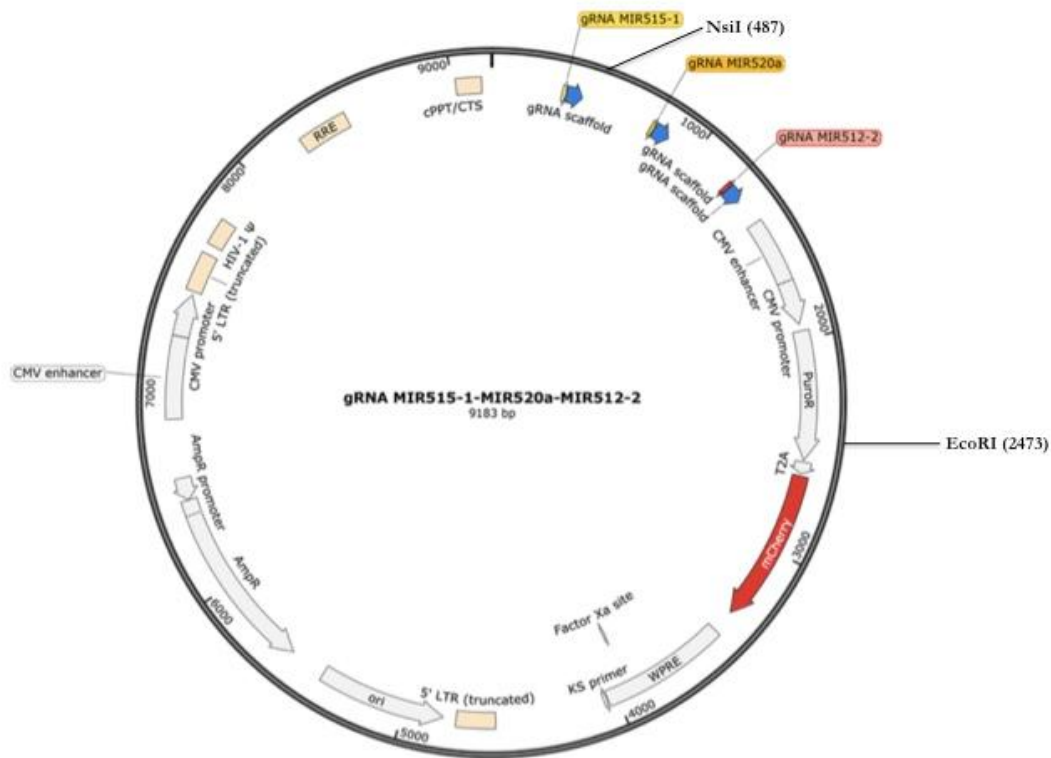


Abbildung 11: Vektorkarte des *gRNA-miR-mCherry* Plasmids. Das 9.183 Basenpaare große Plasmid enthält folgende Komponenten: die *inserts* gRNA MIR515-1, gRNA MIR520a, gRNA MIR512-2 (orange), den *reporter* mCherry (rot), den eukaryotischen Promotor Cytomegalievirus (CMV) in zweifacher Ausführung, den prokaryotischen Promoter AmpR (Ampicillin-Resistenz), die Resistenzen gegen die Antibiotika Ampicillin (AmpR) und Puromycin (PuroR), einen *origin of replication* (*ori*), sowie T2A (2A Peptid aus dem *Thosea asigna* Virus Kapsidprotein).

Vor der Verwendung des Plasmides wurde mit einem Restriktionsverdau sichergestellt, dass es sich um das korrekte Plasmid handelte. Hierfür wurden die Restriktionsenzyme EcoRI und NsiI verwendet. Aufgrund der bekannten Schnittstellen von EcoRI und NsiI im Plasmid konnte die Größe der zwei im Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente mit einer Gelelektrophorese überprüft werden (s. Abb. 11).

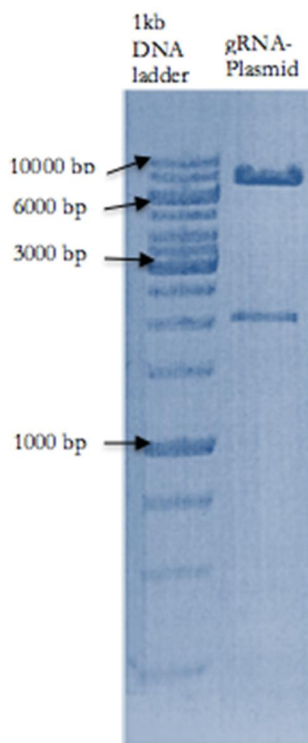


Abbildung 12: Gelelektrophorese eines Restriktionsverdaus des gRNA-Plasmids mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NsiI. Erwartete Banden bei 1986 bp und 7197 bp; 1%iges Agarosegel.

3.4 Virusproduktion

3.4.1 Theoretische Grundlagen

Für die Versuche wurden Lentiviren verwendet, welche eine Untergruppe der Retroviren darstellen. Beispiele für Lentiviren sind HIV (= *Human Immunodeficiency Virus*) -1 und -2, SIV (= *Simian Immunodeficiency Virus*), FIV (= *Feline Immunodeficiency Virus*) und EIAV (= *Equine Infectious Anemia Virus*). Lentivirale Vektoren können sowohl mitotische als auch nicht-mitotische Zellen effizient und stabil transduzieren. Außerdem sind sie in der Lage, große Plasmide als Transfervektor aufzunehmen, was bei den hier vorliegenden Größen von 14.772 bp und 9.183 bp eine essentielle Voraussetzung war (137-141).

Die Herstellung der lentiviralen Vektoren beruht auf der Kotransfektion einer sog. Verpackungszelllinie (*packaging cell line*) mit drei Plasmiden. Meist werden HEK293T-Zellen (= *Human Embryonic Kidney Zellen*) als Verpackungszellen verwendet. Es werden gleichzeitig drei Plasmide in die Verpackungszellen eingebracht. Dies sind das Verpackungsplasmid, das *envelope* Plasmid und der Transfervektor. Das Verpackungsplasmid enthält drei Gene, die für virale Proteine kodieren. „Gag“ für Matrix und Kapsid, „Pro“ für die Protease und „Pol“ für Reverse Transkriptase und Integrase. Das Verpackungssignal, die Ψ (Psi-) Sequenz, ist jedoch inaktiviert. Das *envelope* Plasmid enthält die Gene für die Virushülle, wie z.B. das Hüllprotein VSV-G (=Glykoprotein G des *Vesicular Stomatitis Virus*). Die Tatsache, dass die lentiviralen Vektoren nicht ihre eigenen, sondern artfremde Hüllproteine exprimieren, nennt sich Pseudotypisierung und bestimmt den Tropismus des Virus. Da VSV ein sehr breites Spektrum an potentiellen Wirtszellen hat, wird sein Glykoprotein besonders oft eingesetzt (142, 143). Der Transfervektor enthält exogene DNA oder RNA, einen Promotor, eine aktive Ψ (Psi-) Sequenz, sowie meist ein

Reporter gen. Da das Verpackungssignal hier aktiv ist, wird die DNA oder RNA in den Virus geschleust und von Kapsid und Hülle umschlossen.

Nach der Kotretransfektion mit der Ca^{2+} -Phosphat-Methode entstehen durch Rekombination in den Verpackungszellen Viruspartikel, die anstatt der viralen Proteine die exogene DNA oder RNA enthalten (s. Abb. 12).

Wird der lentivirale Vektor durch Transduktion in eine Zelle eingebracht, so wandelt die Reverse Transkriptase die einzelsträngige Virus-RNA/-DNA in doppelsträngige RNA/DNA um, die dann stabil in das Genom der Zelle integriert wird. Die Zelle ist „infiziert“ und gibt die virale Sequenz bei jeder Teilung an die Tochterzellen weiter.

Eine Besonderheit der lentiviralen Vektoren ist, dass sie sich selbst inaktivieren. Dies wird erreicht durch die Deletion der U3-Region und weiterer für die Transkription wichtiger Bereiche am 3' LTR (= *Long Terminal Repeat*) des Transfervektors. So wird die gewünschte Sequenz zwar integriert, die normalerweise darauffolgende Virusreplikation jedoch unterbunden.

Für die Virusproduktion dienten das *dCas9-T2A-GFP*-Plasmid und das *gRNA-miR-mCherry*-Plasmid als Transfervektoren. Außerdem wurden das Verpackungsplasmid psPAX2 und das *envelope* Plasmid pMD2.G verwendet. Letztere wurden freundlicherweise von Charles Gersbach (Duke Universität, North Carolina, USA) zur Verfügung gestellt.

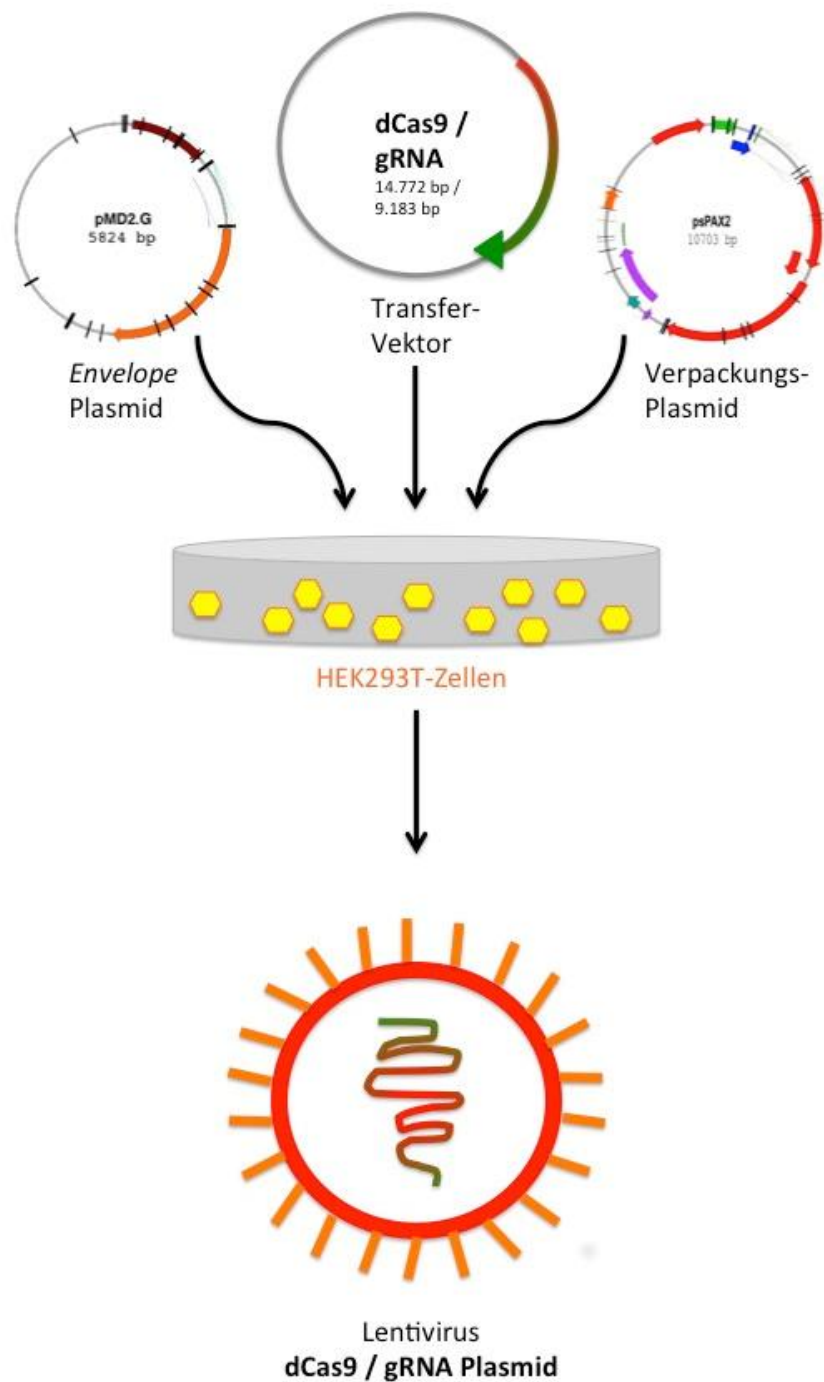


Abbildung 13: Prinzip der Kotransfektion bei der Virusproduktion. HEK293T-Zellen wurden mit dem *envelope*- und Verpackungs-Plasmid kotransfiziert. Für die Herstellung von zwei verschiedenen Lentivirus-Linien wurde entweder das *dCas9-T2A-GFP*-Plasmid oder das *gRNA-miR-mCherry*-Plasmid als Transfervektor verwendet.

3.4.2 Praktische Durchführung

HEK293T-Zellen wurden am Vortag in einer 15 cm²-Schale ausgesät, wodurch die Zellen am Tag der Virusproduktion zu circa 50 Prozent konfluent waren. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Nährmedium gegen Medium ohne Serum und Antibiotika ausgetauscht. Der Transfektionsmix wurde aus 20 µg Transfervektor, 15 µg psPAX2 und 9 µg pMD2.G, sowie CaCl₂ und DEPC-Wasser hergestellt (s. Tab. 1). Dieser Mix wurde unter leichtem Vortexen tropfenweise zu 1 ml 2 × HBS-Pufferlösung pipettiert. Der Transfektionsmix wurde anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Komponenten	Transfektionsmix
Transfervektor	20 µg
psPAX2	15 µg
pMD2.G	9 µg
CaCl ₂ (2,5 M)	100 µl
DEPC-Wasser	Auf 1 ml
2 × HBS	1 ml

Tabelle 1: Zusammensetzung des Transfektionsmix für die Transfektion von Hek293T-Zellen mit der Ca²⁺-Phosphat-Methode.

Für die Transfektion wurde der Transfektionsmix tropfenweise auf die Zellen pipettiert. 4 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Wechsel auf normales Nährmedium. Dieses wurde nach 24 Stunden durch neues ersetzt. Die Virusernte erfolgte 48 und 72 Stunden nach der Transfektion.

Der geerntete Virus wurde filtriert (45 µm Filter) und anschließend durch Ultrazentrifugation bei 22.000 rpm (= *revolutions per minute*) für 2 Stunden bei 4 °C um den Faktor 100 konzentriert, um die Transduktions-Effizienz zu steigern.

3.5 BT183-Zelllinie

Die erste ETMR-Zelllinie wurde unter dem Namen BT183 im Jahre 2013 in einer Zusammenarbeit des „The Hospital for Sick Children“ der Universität von Toronto und des „Department of Pathology and Laboratory Medicine“ der Universität von Calgary etabliert (36). Hierfür wurden ETMR-Tumorzellen eines 2-jährigen Patienten verwendet. Der Tumor zeigte auf genetischer Ebene eine C19MC-Amplifikation und war in der hinteren Schädelgrube/Fossa cranii posterior lokalisiert.

Aus Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Tumorproben sowie aus frisch eingefrorenen Tumorproben wurde DNA und RNA extrahiert.

Die frisch eingefrorenen Tumorproben wurden vorsichtig manuell und durch eine Filter-Passage vereinzelt. Die Tumorzellen wurden daraufhin in Zellkultur genommen. Das Kulturmedium bestand aus serumfreien *human neural stem cell proliferation* Medium sowie den *supplements* Heparin, EGF (= *E*pidermal *G*rowth *F*actor), FGF (= *F*ibroblast *G*rowth *F*actor) und rekombinanten humanen SHH (= *S*onic *H*edgehog). Die Zugabe frischer *supplements* erfolgte alle drei bis vier Tage. Nach

zweiwöchiger Kultur bildeten sich Tumor-Neurosphären aus. Diese zeigten keine Adhärenz. Wenn die Sphären einen Durchmesser von 100 – 200 µm erreicht hatten, wurden die Zellen gesplittet. Es erfolgten circa zehn Passagen.

Anschließend wurden 100.000 vereinzelte Tumorzellen in einem Volumen von 3 µl gelöst und stereotaktisch in das Striatum von *CB-17NOD-SCID*-Mäusen eingebracht. Nach acht Wochen wurden die Mäuse euthanasiert und die Gehirne untersucht. Es zeigte sich, dass die kultivierten Tumorzellen *in vivo* Tumoren auslösen können. Bei der histologischen Untersuchung zeigten die Xenograft-Tumoren eine große Ähnlichkeit zum Primärtumor. Sowohl FISH (= Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung) als auch Array-CGH (= *Array-based Comparative Genomic Hybridization*) zeigten übereinstimmend eine Amplifikation des 19q13.41 Lokus. In der Immunhistochemie zeigte sich ebenfalls eine Übereinstimmung mit einer hohen Expression von Nestin und LIN28, einer Positivität für *Ini1* und einer schwachen Expression von GFAP und *Olig2*. Auch auf der miRNA-Ebene (*Nanostring miRNA profiling*, *Taqman quantitative RT-PCR*) zeigten der Primärtumor, die Xenograft-Tumore sowie die Zelllinie eine Überexpression der auf dem C19MC-Cluster kodierten miRNAs. Somit repräsentiert die BT183-Zelllinie ETMR-Tumoren auf histologischem und genetischem Niveau, und ist folglich für die weitere Erforschung dieser Tumorentität *in vitro* und *in vivo* geeignet (28, 36).

3.6 Zellkultur von BT183-Zellen

Die Suspensionszelllinie BT183 wurde in *Neurocult NS-A Basal Medium* mit den Zusätzen *NS-A Proliferation Supplement* und Penicillin/Streptomycin (1%) kultiviert. Die Zusätze wurden dem Medium einmalig beim Öffnen der Flasche zugegeben. Außerdem wurden die Wachstumsfaktoren humanes EGF und FGF, beide in der Konzentration 100 mg/ml, im Verhältnis 1:5000 zum gesamten Medium, sowie Heparin im Verhältnis 1:1000 zum neuen Medium dazugegeben. Die Zugabe von neuem Medium, sowie EGF und FGF erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die Zellen wurden alle sieben Tage gesplittet. Bei den hier vorgestellten Versuchen wurde mit der Laborpassage BT183-Xeno2 gearbeitet.

3.7 Transfektion von BT183-Zellen

Im ursprünglichen Versuchsdesign war vorgesehen die Plasmide durch Transfektion in die BT183-Zellen einzubringen. Hierfür wurden in einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe chemische (Ca^{2+} -Phosphat), physikalische (Elektroporation (Nucleofector 2b)) und lipid-basierte Methoden (*Lipofectamine 2000 Transfection Reagent*, *Lipofectamine 3000 Transfection Reagent*, *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent*, *ViaFect Transfection Reagent*, *Effectene Transfection Reagent*, *PolyFect Transfection Reagent*, *TransIT-Neural Dynamic Delivery System*, *TransIT-X2 Dynamic Delivery System*) ausprobiert. Allerdings war die Transfektion mit keiner der oben genannten Methoden erfolgreich, weshalb die Methode der Transduktion mit lentiviralen Transfervektoren für die stabile Integration von dCas9 und gRNA in das Genom der BT183-Zellen gewählt wurde (135).

3.8 Transduktion von BT183-Zellen

Die Transduktion wurde mit der Spinfection-Methode durchgeführt. Hierfür wurden 400.000 BT183-Zellen, gelöst in 350 µl *Neurocult NS-A Basal Medium*, in ein 24-Well gegeben und je 75 µl

des ultrazentrifugierten dCas9- und gRNA-Virus dazu pipettiert. Die 24-Well-Platte wurde im Anschluss für 90 Minuten bei 800 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurden die Zellen aus dem Well in ein 1,5 ml Zentrifugen-Tube überführt. Dieses wurde für 5 Minuten bei 300 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das dabei entstandene Zellpellet wurde in neuem Medium resuspendiert und die Zellen in Kultur genommen. Hierbei erwies es sich als essentiell, die transduzierten Zellen langsam zu expandieren und die Menge des Nährmediums in kleinen Schritten zu erhöhen. Nach der Spinfection wurden 600 µl Medium und nach den oben genannten Verhältnissen adaptierte Wachstumsfaktoren in das Well gegeben. Am darauf folgenden Tag erfolgte die Zugabe von 1 ml Medium. Am nächsten Tag wurde die Suspension in ein 6-Well überführt und 2 ml Medium sowie Wachstumsfaktoren zugegeben. Nach zwei weiteren Tagen, bei Verfärbung des Mediums bereits früher, wurde der Well-Inhalt in eine T25-Flasche überführt, die auf insgesamt 10 ml mit Medium aufgefüllt wurde. Die Zellvermehrung wurde im Verlauf unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und es erfolgte eine regelmäßige Zugabe von Medium und Wachstumsfaktoren nach den oben beschriebenen Kulturvorschriften für BT183-Zellen.

3.9 Zellkultur von HEK293T-Zellen

Die für die Virusproduktion benötigten HEK (= *Human Embryonic Kidney*)-293T Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit Glutamin (1%), iFBS (= *heat-inactivated Fetal Bovine Serum*) (10 %) und Penicillin/Streptomycin (1 %) kultiviert. Die Zusätze wurden dem Medium einmalig beim Öffnen der Flasche zugegeben. Abhängig von der Zellvermehrung erfolgten Mediumwechsel und Splitten. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und der Puffer DPBS (= *Dulbecco's Buffered Salt Solution*) auf die Zellen gegeben. Dieser wurde ohne Einwirkzeit wieder abgesaugt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Trypsin mit einer Einwirkzeit von 5 Minuten. Danach wurden 5 ml Medium in die Flasche gegeben und der Inhalt der Flasche in ein Falcon überführt. Dieses wurde für 5 Minuten bei 300 g und 24 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert und wieder in Kultur genommen.

3.10 Fluoreszenz-Mikroskopie

Fluoreszenz-Mikroskopie ist eine ideale Methode für die Betrachtung der Zellphysiologie. Fluoreszenz beruht auf der Absorption von Lichtteilchen (Photonen) durch einen Indikator (Exzitation). Einige Nanosekunden später wird ein Anteil dieser Photonen wieder abgegeben (Emission), was als Fluoreszenz sichtbar ist. Das emittierte Fluoreszenzlicht ist langwelliger als das absorbierte Licht. Dieses Phänomen wird als *Stokes Shift* bezeichnet. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgt auf der Wellenlänge der maximalen Emission des Indikators (144). Diese liegt für GFP bei 508 nm, für mCherry bei 607 nm (145). Werden mehrere Indikatoren gleichzeitig verwendet, kann eine saubere Differenzierung der Fluoreszenz-Signale durch die Verwendung von spezifischen Filtern erreicht werden. Diese lassen nur die gewünschte Emissions-Wellenlänge durch und werden deshalb als Farbkkanäle bezeichnet (144).

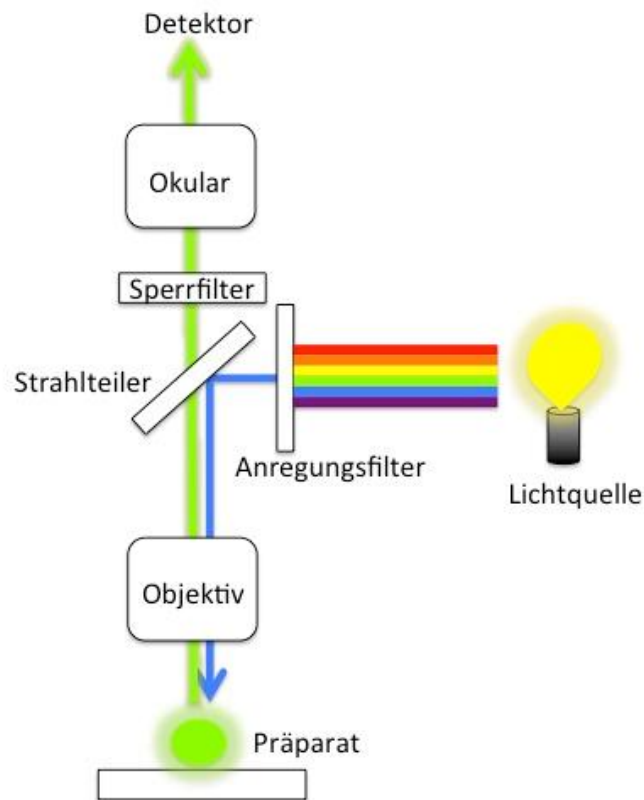


Abb. 14: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.

Einige Tage nach der Transduktion wurden die BT183-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop IX50 von Olympus betrachtet. Dieses verfügt über mehrere Farbkanäle. Da beide Viren ein Reportergen (Fluoreszenz-Indikatoren GFP oder mCherry) enthalten, emittieren die Zellen bei Anregung durch Laserlicht entweder grünes Licht, wenn sie den dCas9-Virus eingebaut haben oder rotes Licht bei Einbau des gRNA-Virus. Wurden beide Viren in das zelluläre Genom integriert, so sind beide Emissionen im jeweiligen Kanal sichtbar. Es wurden Foto-Aufnahmen in beiden Kanälen sowie im Durchlicht angefertigt. Die Auswertung dieser Aufnahmen erfolgte mit dem Programm „ImageJ“.

3.11 Durchflusszytometrie

Um die Zellen mit eingebautem Virusplasmid herauszufiltern, wurde die Methode der Durchflusszytometrie bzw. *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS) gewählt.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Bestimmung der Größe und Granularität von Zellen. Außerdem können mit Fluoreszenz-Antikörpern markierte Zellen und Zellen, die ein Fluoreszenz-Reporter gen enthalten, detektiert werden. Das System beruht auf der Streuung des Lichtes, wenn fließende Zellen einen Laserstrahl passieren. Dabei müssen die Zellen so in einer Reihe fließen, dass immer nur eine einzige Zelle gleichzeitig den Laser passiert. Dafür wird die Probe (hochkonzentrierte Zellsuspension) in einen Flüssigkeitsstrom aus Hüllflüssigkeit (*sheath fluid*) injiziert. Hierfür muss die Probenflüssigkeit einen höheren Druck als die Hüllflüssigkeit haben. Bei dieser „*stream in stream*“-Methode entsteht eine laminäre Strömung. Das bedeutet, dass die beiden Flüssigkeiten in separaten Schichten strömen und sich nicht miteinander vermischen. Die Flussgeschwindigkeit des Hüllstroms ist deutlich höher als die der Probe, weshalb die Zellen der Probe nacheinander vom Hüllstrom „mitgerissen“ werden. Durch diese hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen vereinzelt und zu einem feinen Strahl fokussiert. Sie gelangen dann in eine Mikrokanalküvette, die meist aus Quarz besteht. In der Küvette passieren die Zellen perlschnurartig aufgereiht einzeln die (Durchfluss-)Messzelle (*flow cell*). In der Messzelle trifft Laserlicht einer definierten Wellenlänge auf die Zelle. Das einfallende Licht wird von der Zelle gebeugt, es entsteht Streulicht. Hat die Zelle Fluoreszenz-Eigenschaften, emittiert sie Licht. Ein Detektor (*Photomultiplier*) misst quantitativ die Lichtstreuung sowie die Fluoreszenz jeder Zelle. Die Menge des gestreuten Lichtes ist abhängig von Größe und Granularität der Zelle. Hierbei unterscheidet man zwei Arten der Lichtstreuung, das Vorwärtstreulicht (*Forward Scatter* = FSC) und das Seitwärtstreulicht (*Side Scatter* = SSC). FSC entsteht durch die Beugung des Lichts an der Zelloberfläche und misst unter anderem die Zellgröße. SSC wird in einem 90°-Winkel zum FSC gemessen und entspricht der Beugung an Zellorganellen, Vesikeln und dem Zellkern. Der SSC misst also die Granularität bzw. Komplexität der Zellen. Folglich haben Granulozyten und Monozyten einen höheren SSC-Wert als Lymphozyten. Um das Licht zum richtigen Detektor zu dirigieren, wirken zahlreiche Filter, Spiegel, Linsen und Strahlenteiler zusammen (146). Der Detektor konvertiert die optischen in elektrische Signale. Diese werden zur Auswertung an einen Computer gesendet.

Mit modernen Durchflusszytometrie-Geräten können innerhalb von einer Sekunde bis zu 70.000 Zellen analysiert werden (70.000 *Events* pro Sekunde), was repräsentative Aussagen über die Zellprobe ermöglicht. Die Durchflussrate und damit die Zahl der *Events* pro Sekunde wird durch den Druck der Probenflüssigkeit bestimmt. Wird der Druck erhöht, so erhöht sich die Durchflussrate.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie können grafisch in einem *Dot Plot* dargestellt werden. Dieser besteht aus einem Koordinatensystem mit x- und y-Achse, in dem die Zellen je nach für die jeweiligen Achsen gewählten Eigenschaften als Punkte aufgetragen werden. Jeder Punkt entspricht einer Zelle. Durch diese Darstellung sind Zellpopulationen, die die gleichen Eigenschaften haben, als Cluster erkennbar.

In den *Dot Plots* dieser Arbeit (s. Abb. 21, Panel A und B) wurden zwei verschiedene Einstellungen gewählt. Zuerst wurde auf der x-Achse FSC und auf der y-Achse SSC eingestellt (Panel A). Mit dieser linearen Skala konnten die Zellen bestimmt werden, die genauer analysiert werden sollten. Hierfür wurden auf der x-Achse mCherry und auf der y-Achse GFP als logarithmische biexponentielle Skala gewählt (Panel B).

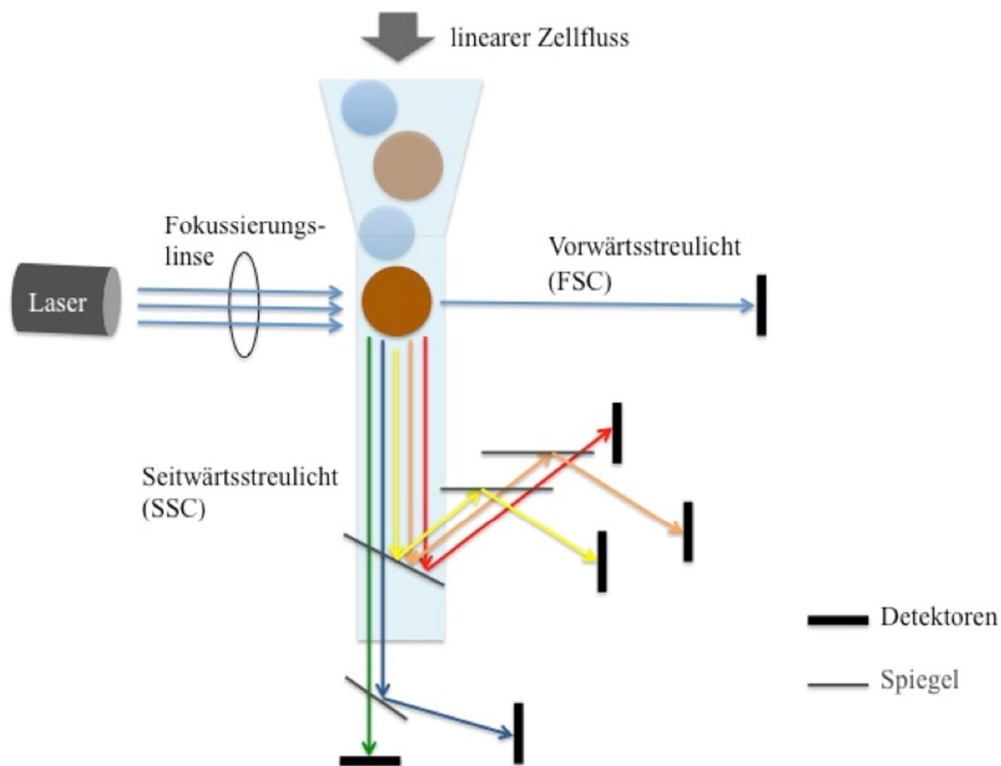


Abbildung 15: Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie. Die linear fließenden Zellen passieren nacheinander einzeln einen Laserstrahl, dessen Licht von der Zelle in Abhängigkeit von ihren Eigenschaften gebeugt wird. Gegebenenfalls kommt es zusätzlich zur Emission von Fluoreszenz-Licht. Die Lichtstreuung wird in Vorwärtstreulicht (*Forward Scatter* = FSC) und Seitwärtstreulicht (*Side Scatter* = SCC) unterteilt. Diese erlauben Aussagen über Zellgröße (FSC) und Granularität (SCC).

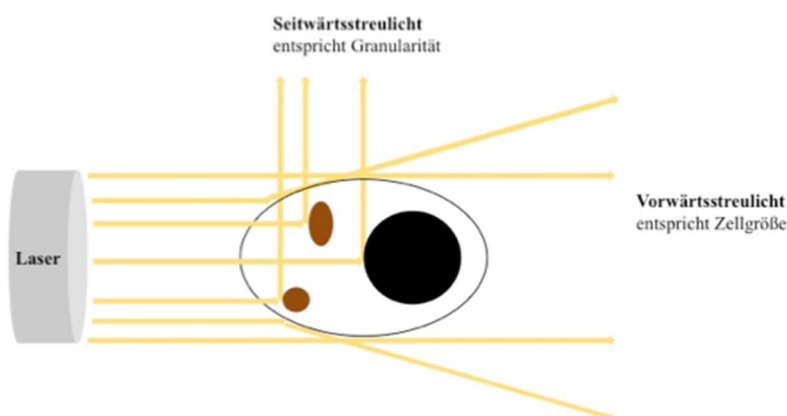


Abbildung 16: Entstehung von Vorwärtstreulicht (*Forward Scatter* = FSC) und Seitwärtstreulicht (*Side Scatter* = SCC) durch Beugung des Laserlichtes.

Obwohl die Bezeichnung Durchflusszytometrie und FACS oft synonym verwendet wird, bezeichnet der Begriff FACS streng genommen die Sortierung von Zellen nach gewünschten Eigenschaften, also das Herausfiltern einer Zellpopulation mit der gleichen Eigenschaft aus der durchflusszytometrisch analysierten Probe. Hierbei können verschiedene Eigenschaften gewählt werden, wie zum Beispiel Größe, Granularität oder die Emission von Fluoreszenzsignalen bestimmter Wellenlängen. Viele moderne Durchflusszytometer verfügen über diese Funktion, meist werden jedoch spezielle FACS-Sorter verwendet. In dieser Arbeit wurde das Prinzip des *Droplet Sorting* verwendet. Hierbei wird der Zell-Strahl an einem definierten Punkt, der sich nach

der Messzelle und damit dem Passieren des Lasers befindet, so in Tröpfchen (= *Droplets*) aufgeteilt, dass jeder Tropfen exakt eine Zelle enthält. Dieser Punkt heißt Abrisspunkt. Durch Messung der Zeit vom Passieren des Lasers bis zum Passieren des Abrisspunktes kann berechnet werden, ob die Zelle die gewünschte Eigenschaft besitzt. Wenn dies der Fall ist, wird die Zelle am Abrisspunkt elektrisch geladen, von einem gegensätzlich geladenen elektromagnetischen Feld abgelenkt und in einem FACS-Röhrchen gesammelt.

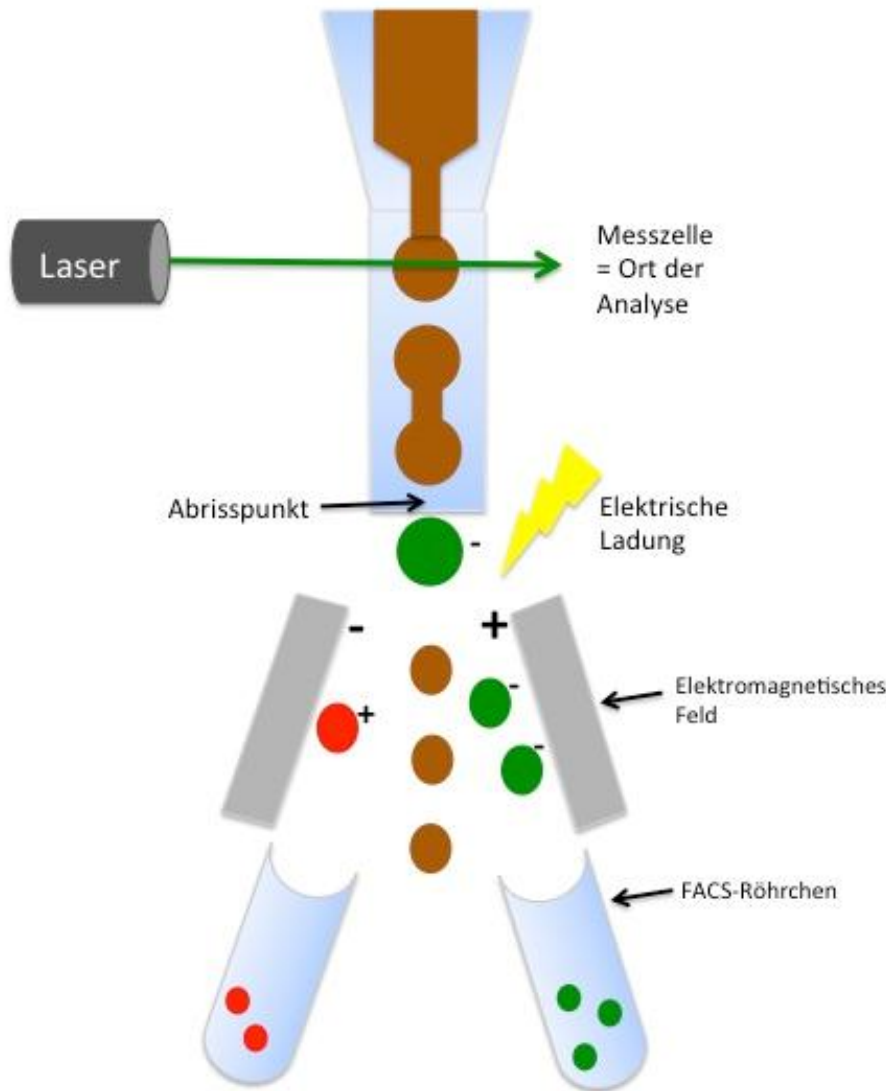


Abbildung 17: Funktionsprinzip des *Droplet* Zell-Sortens mit FACS. An einem definierten Punkt nach Passieren des Lasers (Abrisspunkt) werden die Zellen so vereinzelt, dass jeder Tropfen genau eine Zelle enthält. Je nach ihren Eigenschaften brauchen Zellen unterschiedlich lange für diese Passage. Es wird die Zeit für die gewünschten Zelleigenschaften berechnet. Zellen, die diese Zeit benötigen, werden elektrisch geladen und durch ein elektromagnetisches Feld abgelenkt.

Die Messungen wurden in dieser Arbeit mit dem Zellsorter *FACS Aria Cell Sorter* von *BD Biosciences* durchgeführt. Hierbei werden die Zellen nach ihrer Fluoreszenz-Färbung in unterschiedliche Gefäße sortiert. Da nur BT183-Zellen mit eingebautem Virusplasmid Fluoreszenzlicht emittieren, können sie von normalen Zellen differenziert werden. Es wurden doppelt transduzierte Zellen (GFP und mCherry), sowie nur mit dCas9-transduzierte Zellen (GFP) gesortet.

Als Einstellungen für die Detektor-Empfindlichkeit (*voltage*) wurden die folgenden verwendet: FSC 130, SSC 255, GFP 525, mCherry 620. Der FSC Schwellenwert (*threshold*) war 5000.

3.12 MTT-Zellproliferations-Assay

Das MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid) Assay basiert auf der Umwandlung von MTT in Formazan Kristalle durch lebende Zellen. MTT in der Form des Tetrazolium Salzes ist wasserlöslich und positiv geladen. Deshalb kann es die Zellmembran passieren und gelangt in die Zellen. Intrazellulär wird MTT sowohl durch die mitochondriale Dehydrogenase, als auch durch die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH aus dem endoplasmatischen Retikulum zu Formazan reduziert. Diese Umwandlungsreaktion spiegelt also die mitochondriale Aktivität, sowie die Glykolyserate der Zellen wieder. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass im Gegensatz zur initialen Annahme die pyridinhaltigen Reduktionsäquivalente die wichtigere Rolle spielen (147). Da die oben genannte Reduktion bei den meisten Zelltypen mit der Anzahl der lebenden Zellen korreliert, ist der MTT-Assay ein Maß für die Zellviabilität bzw. Zellproliferation.

Bei der Reduktion von MTT zu Formazan erfolgt ein mit bloßem Auge sichtbarer Farbumschlag von hellgelb nach blau-violett. Formazan ist nicht wasserlöslich, weshalb es vor der Auswertung durch Zugabe von Säure oder Tensiden in Lösung gebracht werden muss (*Solubilization*). Danach kann der Farbumschlag mithilfe eines Spektrophotometers quantifiziert werden. Die Absorption ist direkt proportional zur Zahl der lebenden Zellen (148-150).

Um die Proliferation der BT183-Zellen zu quantifizieren wurden drei MTT-Assays mit dem *Cell Proliferation Kit I* von Roche durchgeführt. Hierfür wurden je 10.000 Zellen mit 100 µl Nährmedium, Wachstumsfaktoren und Heparin in ein 96-Well gegeben. Nach Zugabe von 10 µl MTT *labeling reagent* wurde die Platte für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl *solubilization solution* dazu gegeben und die Platte über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dieses Protokoll wurde einmal direkt im Anschluss an das Aussäen der Zellen und einmal 42,5 Stunden später durchgeführt. Die photometrische Bestimmung der Zellproliferation erfolgte durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge zwischen 550 und 650 nm mit dem Programm „*Optima Control*“. Dieser Versuch vergleicht die Proliferationsraten von doppelt transduzierten Zellen und damit herunterreguliertem C19MC-Cluster mit Kontrollzellen, die nur mit dem dCas9-Virus transduziert wurden. Eine Negativkontrolle von nicht transduzierten BT183-Zellen wurde immer mitgeführt.

3.13 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden in dieser Arbeit als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (*Standard Error of the Mean = SEM*) angegeben. Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der *one sample t-test* verwendet. P-Werte (von *probability*, engl. für Wahrscheinlichkeit) $< 0,05$ wurden hierbei als signifikant gewertet. Die Datenanalyse und grafische Darstellung erfolgte mit dem Programm „*GraphPad PRISM 6.0*“.

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsdesign: Herunterregulation des C19MC-Clusters durch das CRISPRi System

Um Informationen über die Bedeutung des C19MC-Clusters, das in ETMR-Zellen als Fusionskonstrukt mit dem endogenen TTYH1-Promoter vorliegt und stark überexprimiert wird (11), zu gewinnen, soll dieses herunterreguliert werden. Dafür wird die humane ETMR-Zelllinie BT183 verwendet werden, die die TTYH1-C19MC Fusion trägt. BT183 bilden in Suspension Sphären aus (s. Abb. 18).

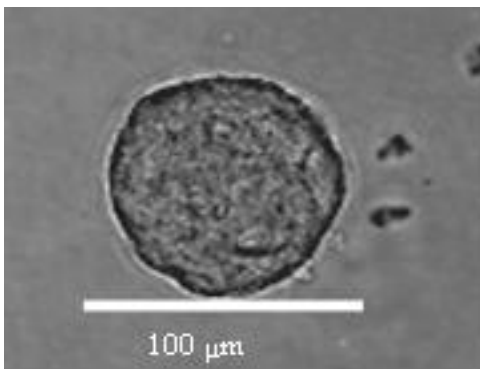


Abbildung 18: Sphäre der Zelllinie BT183.

Mithilfe des CRISPR *interference* (CRISPRi) Systems soll die Transkription des C19MC-Clusters und somit die Expression der darauf kodierten miRNAs herunterreguliert werden. Die erforderlichen Komponenten gRNA und dCas9 werden lentiviral eingebracht und mit Hilfe der Reportergene GFP und mCherry erfolgt eine Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen. An diesen sollen MTT-Zellproliferations-Assays durchgeführt werden. Hierbei soll herausgefunden werden, ob sich die Proliferationsrate der Zellen mit blockiertem und damit herunterreguliertem C19MC-Cluster von Kontrollzellen unterscheidet. Da die Überexpression des C19MC mit der Tumorphogenese von ETMR-Tumoren in Verbindung gebracht wurde, wird erwartet, dass die Zellproliferation abnimmt.

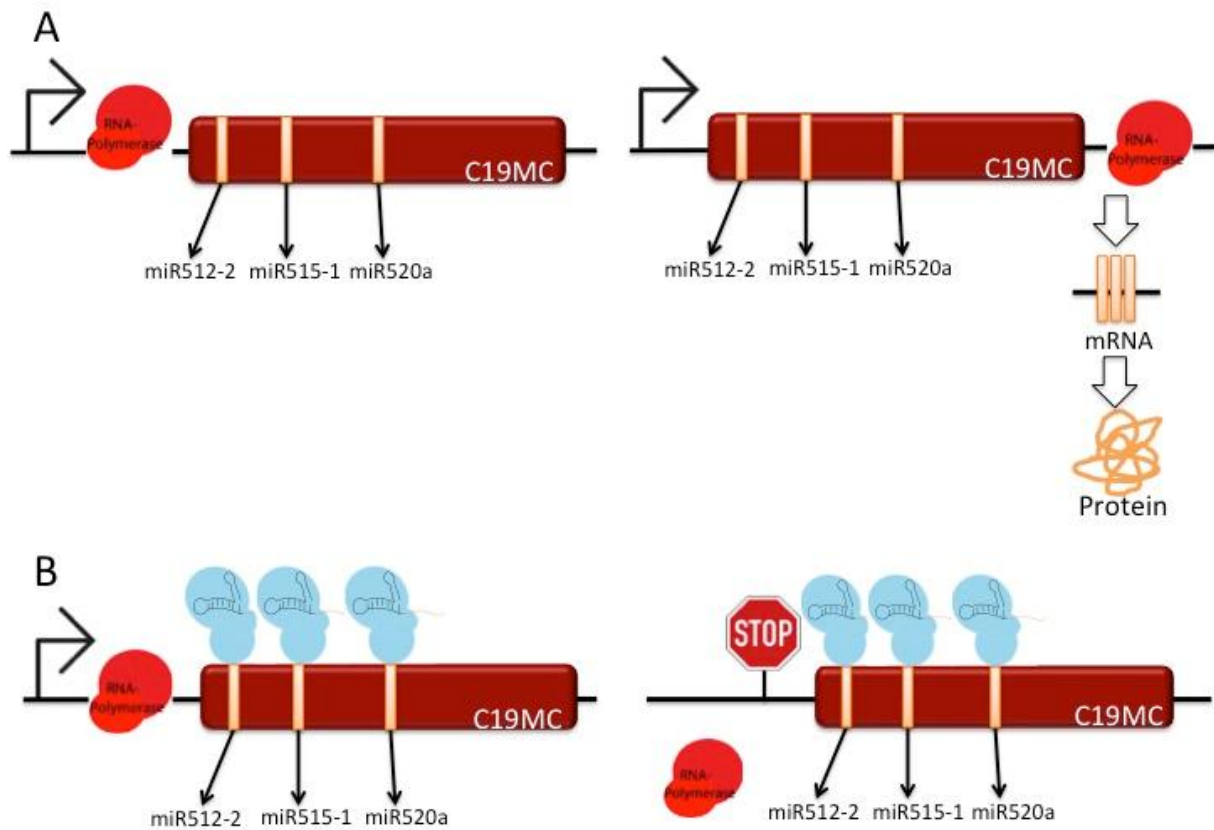


Abbildung 19: Wirkprinzip der Herunterregulation des C19MC-Clusters durch das CRISPR *interference* System. Teilausschnitt des C19MC-Clusters mit den am Anfang liegenden miRNAs. Diese dienen als Zielstruktur für den aktiven CRISPRi Komplex aus dCas9 und gRNA. Der Komplex fungiert als mechanische Blockade, die die Transkription des dahinter liegenden DNA-Abschnittes durch die RNA-Polymerase hemmt.

Panel A: Die RNA-Polymerase wandert entlang des DNA-Stranges und transkribiert das C19MC-Cluster und die darauf kodierten miRNAs. Aus der *messenger*RNA entstehen Proteine.

Panel B: Die RNA-Polymerase kann die Blockade des CRISPRi Komplexes nicht überwinden und löst sich vom DNA-Strang. Es findet keine Transkription des C19MC-Clusters statt.

4.2 Transduktion der BT183-Zellen mit dem dCas9- und gRNA-Plasmid

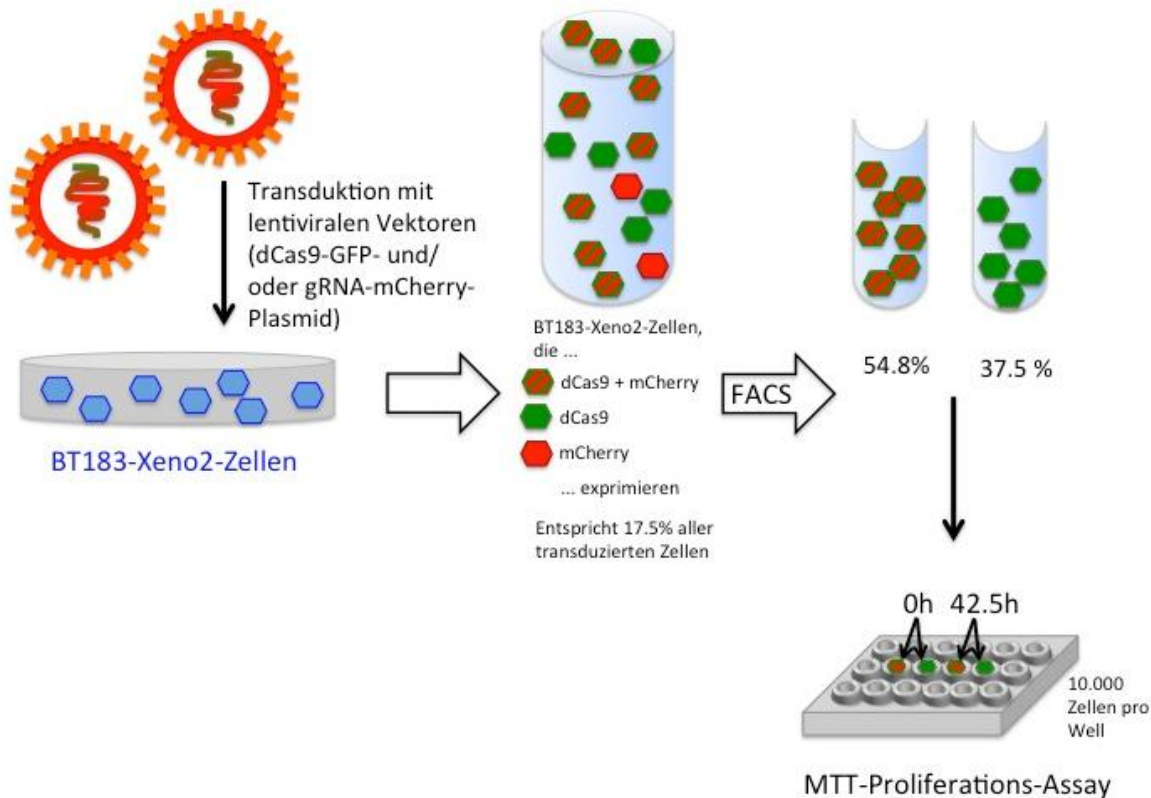


Abbildung 20: Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit. ETMR-Tumorzellen werden mit zwei lentiviralen Vektoren transduziert, die durch das CRISPR *interference* System zu einer Herunterregulation des C19MC-miRNA-Clusters führen sollen. Eine Kontrollgruppe wird nur mit einem Vektor transduziert, wodurch keine Herunterregulation erfolgt. Die transduzierten Zellen werden durch FACS *Sorting* nach dem Einbau von einem oder zwei Plasmiden selektiert. Mit den selektierten Zellen werden MTT-Proliferations-Assays durchgeführt, um die Proliferation der Zellen mit herunterreguliertem Cluster mit der Kontrollgruppe zu vergleichen.

Die kultivierten ETMR-Tumorzellen aus der BT183-Zelllinie wurden im ersten Schritt mit den hergestellten Virus-Plasmiden transduziert. Dabei wurden zwei Gruppen gebildet.

Die erste Gruppe wurde mit beiden Plasmiden, also dem *dCas9-T2A-GFP*-Vektor und dem *gRNA-miR-mCherry*-Vektor, co-transduziert. Durch das Vorhandensein der gRNA kann dCas9 an den Zielort binden und das C19MC-Cluster und damit die Expression der darauf kodierten miRNAs herunterregulieren.

Da die Plasmide Reportergene enthalten, können Zellen, die das Plasmid in ihr Genom integriert haben, unter dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden. Die Fluoreszenz wird einige Tage nach der Transduktion sichtbar. Das dCas9-Plasmid enthält GFP (= *Green Fluorescent Protein*) und fluoresziert deshalb auf der Emissionswellenlänge von 507 nm grün, während das gRNA-Plasmid mCherry enthält und somit auf der Emissionswellenlänge von 610 nm rot fluoresziert (151). Zellen, die wie gewünscht beide Plasmide in ihr Genom integriert haben, fluoreszieren im grünen und roten Kanal und zeigen eine Überlagerung beider Signale. Eine solche Sphäre ist in Abb. 20 im Panel D mit einem Pfeil gekennzeichnet zu sehen. Da die Aufnahme vor dem FACS zur Selektion der doppelt transduzierten Zellen erfolgte, sind in der oberen Reihe nicht nur doppelt positive Sphären zu sehen.

Die zweite Gruppe, die als Kontrolle dient, wurde nur mit dem *dCas9-T2A-GFP*-Vektor transduziert. Da hier keine Leitstruktur in Form der gRNA vorliegt, kann dCas9 nicht an den Zielort binden und es erfolgt keine Herunterregulation des C19MC-Clusters. Diese Sphären fluoreszieren nur im grünen Kanal und zeigen kein rotes mCherry-Signal.

Zusammengefasst zeigt Abb. 20, dass die Plasmide erfolgreich in das Zellgenom integriert werden konnten.

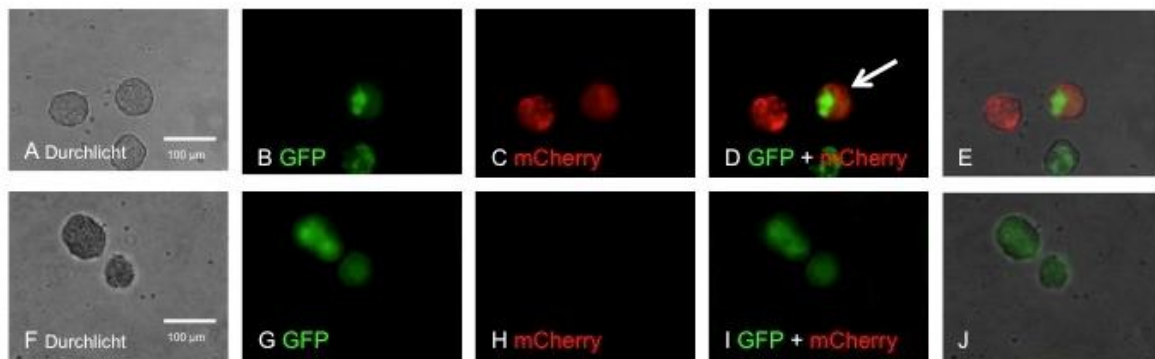


Abbildung 21: Fluoreszenz von transduzierten BT183-Zellen.

BT183-Zellen wurden mit dem *dCas9-T2A-GFP*-Vektor und dem *gRNA-miR-mCherry*-Vektor co-transduziert (obere Reihe) und als Kontrolle nur mit dem *dCas9-T2A-GFP*-Vektor transduziert (untere Reihe). Die Aufnahmen erfolgten zehn Tage nach der Transduktion. Die in Panel A angegebene Skala gilt für alle Panels.

A: mikroskopische Aufnahme der BT183-Sphären im Durchlicht-Mikroskop

B: GFP-Signal des *dCas9-T2A-GFP*-Vektors

C: mCherry-Signal des *gRNA-miR-mCherry*-Vektors

D: Überlagerung von GFP- und mCherry-Signal; die doppel positive Sphäre ist mit einem Pfeil markiert

E: Überlagerung der mikroskopischen Aufnahme (A) und der Überlagerung von GFP- und mCherry-Signal (D)

F: mikroskopische Aufnahme der BT183-Sphären im Durchlicht-Mikroskop

G: GFP-Signal des *dCas9-T2A-GFP*-Vektors

H: nicht vorhandenes mCherry-Signal des *gRNA-miR-mCherry*-Vektors

I: Überlagerung von GFP- und mCherry-Signal; da kein mCherry-Signal vorhanden ist, nur GFP-Signal sichtbar

J: Überlagerung der mikroskopischen Aufnahme (F) und der Überlagerung von GFP- und mCherry-Signal (I)

4.3 FACS der transduzierten BT183-Zellen

Um die Zellen zu selektieren, die je nach Gruppe ein oder beide Plasmide in ihr Genom integriert haben und somit mCherry (rote Fluoreszenz) und/oder GFP (grüne Fluoreszenz) exprimieren, erfolgte circa 14 Tage nach der Transduktion ein *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS). Hierbei hatten circa zehn Prozent aller transduzierten Zellen beide Plasmide integriert und konnten somit für den MTT-Proliferations-Assay verwendet werden. Bei den Kontrollzellen, die nur dCas9 exprimieren, lag die Erfolgsrate bei circa 20 %.

Die untenstehende Abb. 21 zeigt die detaillierten FACS-Ergebnisse. In Grafik A ist der *Forward Scatter* auf der x-Achse gegen den *Side Scatter* auf der y-Achse aufgetragen. Die grünen eingerahmten Punkte (P2) wurden selektiert (*Gating*) und wie in Grafik B dargestellt nach der Emission von Fluoreszenzlicht durch Expression von mCherry und/oder GFP gesortet. Die gewünschten Zellen, die sowohl mCherry als auch GFP exprimieren, finden sich im Feld Q2-2. Die ausschließlich GFP-exprimierenden Kontrollzellen finden sich in Feld Q1-2.

Grafik C schlüsselt alle analysierten Zellen (*Events*) genau auf. Es wurden knapp 16.000 Zellen analysiert. Davon konnten 10.000 (P1) aufgrund ihres *Scatter* Profils vom Sorten ausgeschlossen werden. Knapp 3.000 (P2) Zellen wurden nach ihrem Fluoreszenzlicht gesortiert. Hierbei wurden 153 Zellen mit mCherry- und GFP-Expression (P2: Q2-2) und knapp 1.100 Zellen mit GFP-Expression (P2: Q1-2) selektiert. Alle analysierten Zellen wurden in einem *Dot Plot* mit vier Quadranten aufgetragen. Die Eigenschaften der Zellpopulationen der jeweiligen Quadranten sind in Grafik D eingezeichnet. In der Auswertung wird die Anzahl an Zellen (*Events*) auch noch in % *Parent* und % *Total* angegeben. % *Parent* entspricht dabei der Zahl an *Events* dividiert durch die Gesamtzahl der P2-*Events*. % *Total* errechnet sich aus der Zahl an *Events* dividiert durch die Gesamtzahl aller *Events* (P1 und P2). % *Parent* entspricht also der Anzahl von Zellen mit bestimmten Fluoreszenz-Eigenschaften aus der Gruppe der nach FSC und SSC vorselektierten Zellen. % *Total* entspricht der Anzahl bezogen auf alle analysierten Zellen.

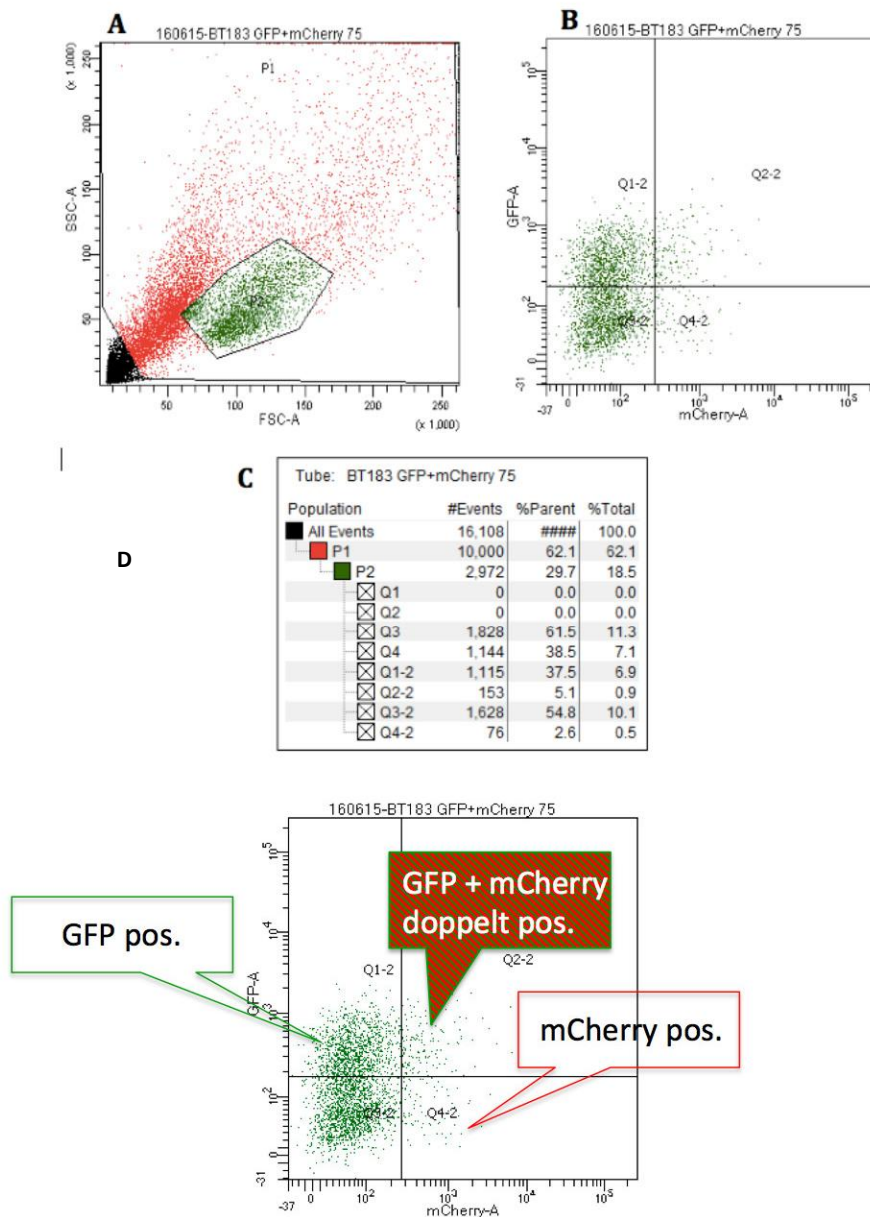


Abbildung 22: FACS-Daten der mit dem dCas9- und gRNA-Plasmid co-transduzierten BT183-Zellen.

A: *Forward Scatter* und *Side Scatter*

B: GFP- und mCherry-Expression

C: Einteilung der Gesamtzahl an gesortierten Zellen nach ihrer Fluoreszenz-Eigenschaft

D: Darstellung der Fluoreszenz-Eigenschaft nach Quadranten

4.4 MTT-Assay zum Vergleich der Zellproliferation

An durch FACS selektierten Zellen beider Gruppen wurden insgesamt drei MTT-Zellproliferations-Assays durchgeführt. Dieser Assay besteht jeweils aus zweimaliger Durchführung des im Methodenteil beschriebenen Protokolls mit Beginn direkt nach dem Aussäen der Zellen und 42,5 Stunden später. Die mit dem *dCas9-T2A-GFP*-Vektor transduzierten Zellen zeigen eine stärkere Proliferation als die mit dem *dCas9-T2A-GFP*-Vektor und dem *gRNA-miR-mCherry*-Vektor co-transduzierten Zellen. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant mit einem p-Wert von 0,0050 (Signifikanz ab Werten < 0,05). Dies bedeutet, dass die Nullhypothese verworfen werden kann, da diese bei solch einem niedrigen Wert nur mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit vorliegt. Es gibt also wie erwartet einen signifikanten Unterschied der Zellproliferation zwischen Zellen mit herunterreguliertem C19MC-Cluster und Kontrollzellen.

Zellproliferation

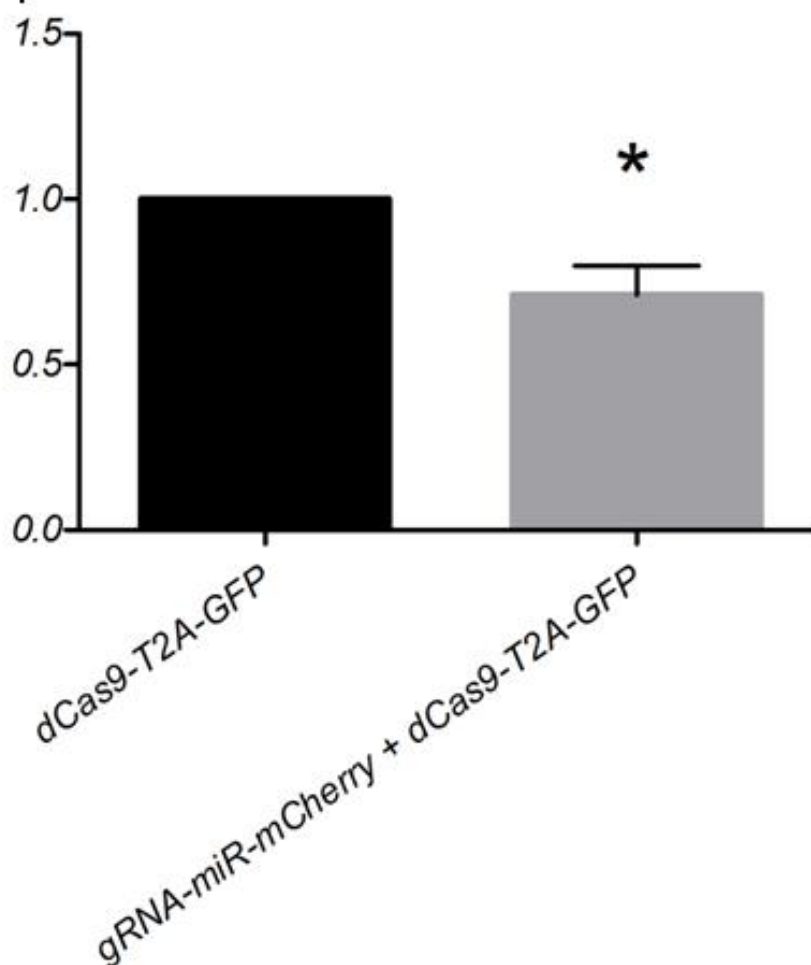


Abbildung 23: Darstellung der Proliferationsrate transduzierter BT183-Zellen. An BT183-Zellen, transduziert mit *dCas9-T2A-GFP*-Vektor (Kontrolle) und *dCas9-T2A-GFP*-Vektor + *gRNA-miR-mCherry*-Vektor (doppelt transduziert), wurden drei MTT-Assays zur Feststellung der Proliferationsrate durchgeführt.

p-Wert 0,0050

Die Werte sind auf die Kontrolle (*dCas9-T2A-GFP*-Vektor) normalisiert.

5 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch die Inhibierung des C19MC-Clusters durch das CRISPR *interference* System eine Herunterregulation der Zellproliferation von ETMR-Tumorzellen (BT183-Zelllinie) erreicht werden kann. Der Erfolg der Transduktion wurde durch Fluoreszenz-Signale bestätigt, die bei normalen BT183-Zellen nicht vorkommen und somit spezifisch den Einbau des viralen Vektors in das Genom nachweisen. Die Transduktionseffizienz lag zwischen circa zehn (*gRNA-miR-mCherry*) und vierzig Prozent (*dCas9-T2A-GFP*), was in Anbetracht der schwierigen Transduzierbarkeit der BT183-Zelllinie zufriedenstellend ist. Für weitere Experimente sollte diese jedoch noch erhöht werden, um eine bessere Aussagekraft der Ergebnisse zu erreichen.

Der MTT-Zellproliferations-Assay Versuch zeigte, dass die Zellen, bei denen es durch den Einbau beider Plasmide zu einer Herunterregulation des C19MC-Clusters kam, eine deutlich niedrigere Proliferationsrate aufwiesen als Kontrollzellen mit intaktem C19MC-Cluster. Dies unterstützt die Hypothese, dass das C19MC-Cluster und die darauf kodierten miRNAs maßgeblich am Entstehungsprozess von ETMR-Tumoren beteiligt sind. Hier stellt sich die Frage, ob mehr Zellen absterben oder die Zellen weniger proliferieren, denn eingeschränkt muss gesagt werden, dass der MTT-Assay die Zellviabilität mittels enzymatischem Durchsatz der Mitochondrien misst und nicht direkt zwischen Apoptose und Proliferation unterscheiden kann. Diese Frage muss in zukünftigen Versuchen geklärt werden, indem man die Zellen mit Proliferationsmarkern wie ki67 oder BrdU und mit Apoptosemarkern wie Caspase3 untersucht. Insgesamt stützen die Ergebnisse jedoch die Hypothese, dass das C19MC-Cluster für das Zellwachstum wichtig ist und eine Blockade die Proliferationsrate vermindert. Wie effektiv die Herunterregulierung der C19MC-miRNAs ist, muss jedoch noch mittels qPCR (= *real-time quantitative PCR*) gezeigt werden.

Es gibt zwei Punkte, die problematisch sind. Erstens kann das C19MC-Cluster nicht *in vivo* im Mausmodell untersucht werden, da das Cluster primatenspezifisch ist und somit nicht in der Maus vorkommt. Dies würde jedoch einen wichtigen Schritt zur Bestätigung der Ergebnisse dieser Arbeit darstellen. Zweitens gibt es zu einigen der miRNAs, die auf C19MC kodiert werden, bisher widersprüchliche Ergebnisse. Beispielsweise wurde miR 519-d in einigen Tumorarten mit einer onkogenen Wirkung assoziiert, während in anderen Tumorarten eine Tumor-suppressive Wirkung gezeigt wurde (152). Der Grund hierfür könnte sein, dass die miRNAs als funktionelle Einheit agieren. Wahrscheinlich müsste man deshalb mehrere miRNAs gleichzeitig therapeutisch hemmen. Ein anderer Ansatz wäre die weitere Aufklärung der *Targets* der miRNAs.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass durch Herunterregulation des C19MC-Clusters in BT183-Tumorzellen die Zellproliferation abnimmt. Dies spricht für eine Beteiligung des C19MC-Clusters und den darauf kodierten miRNAs an der Tumorphathogenese von ETMR-Tumoren.

6 Ausblick

Auf lange Sicht könnte das gezielte *Targeting* des gesamten C19MC-Clusters oder einzelner miRNAs einen Ansatz für medikamentöse Therapien darstellen, die das Tumorstadium verlangsamen oder im Idealfall komplett stoppen.

Die therapeutische Nutzung von miRNAs ist ein vielversprechender Ansatz, da bis zu ein Drittel des menschlichen Protein-kodierenden Genoms durch miRNAs moduliert werden kann (153). Obwohl die Wirkmechanismen zahlreicher miRNAs bereits aufgeklärt werden konnten, befindet sich die Forschung zur miRNA-Therapie im Moment noch im Anfangsstadium. Es müssen effiziente und sichere Vektoren gefunden werden, um die miRNA *in vivo* einzubringen. Hierbei stellt besonders die Penetration der miRNA-Vesikel in das Tumor-Gewebe aufgrund von inhomogener Perfusion und interstitieller Fibrose eine Herausforderung dar. Außerdem müssen die miRNAs eine ausreichend lange Halbwertszeit haben, um bis in das Tumorgewebe zu gelangen. Des Weiteren müssen die miRNAs spezifisch für Tumor-Zellen sein, was sich angesichts der multiplen Ansatzpunkte jeder einzelnen miRNA schwierig gestaltet.

Es gibt zwei Ansätze für die therapeutische Nutzung von miRNAs: miRNA *mimics*, die dysfunktionelle miRNAs ersetzen, und miRNA Antagonisten (antagomiRs), die onkogene miRNAs blockieren. Beide Ansätze haben zum Ziel die normale miRNA-Aktivität wiederherzustellen (154, 155). Auch die Kombination von miRNAs mit Chemotherapeutika ist aktuell Gegenstand der Forschung (156).

Bei Brustkrebs gelten besonders miR-21 und miR-34 als vielversprechende therapeutische Ansatzpunkte (155). Für Glioblastome könnte miR-21 ebenfalls einen geeigneten Ansatzpunkt darstellen (157, 158).

Aktuell werden bereits zwei klinische Studien durchgeführt, die miR122 zur Therapie von Hepatitis C (159) und miR34 zur Therapie von Hepatozellulärem Karzinom und Metastasen verschiedener Tumore (160) auf ihre Wirksamkeit hin untersucht.

7 Zusammenfassung

ETMR-Tumoren (ETMR = Embryonaler Tumor mit mehrschichtigen Rosetten) sind seltene hochmaligne Hirntumore, an denen besonders häufig Kinder unter zwei Jahren erkranken.

In ETMR-Tumoren konnte auf molekulargenetischer Ebene ein Fusionskonstrukt aus dem C19MC-Cluster und dem TTYH1-Gen nachgewiesen werden. Außerdem liegt eine starke Amplifikation des C19MC-Clusters sowie eine Überexpression der auf dem Cluster kodierten mikroRNAs vor (11).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das Fusionskonstrukt die zugrundeliegende Ursache für die Tumorentstehung ist. Hierfür wurde in einer humanen ETMR-Zelllinie mit Hilfe der CRISPR *interference* Methode das C19MC-Cluster herunterreguliert. Die hierfür erforderlichen Komponenten gRNA und dCas9 wurden lentiviral eingebracht und mit Hilfe der Reportergene GFP und mCherry selektiert. An den durchflusszytometrisch (FACS) gesorteten Zellen mit herunterreguliertem Cluster erfolgten MTT-Assays, um die Zellproliferation zu bestimmen.

Bei ca. zehn Prozent aller Zellen konnte eine erfolgreiche Herunterregulation des Clusters erreicht werden. 153 Zellen wurden selektiert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne herunterreguliertes Cluster zeigten die Zellen eine deutlich verminderte Proliferation. Dieser Unterschied war statistisch signifikant mit einem p-Wert von 0,0050.

Weitere Experimente zur Bestimmung der Effizienz der Herunterregulierung des Clusters und der Wirkweise der mikroRNAs sind erforderlich, bevor das gezielte *Targeting* des gesamten C19MC-Clusters oder einzelner miRNAs einen Ansatz für medikamentöse Therapien darstellen könnte.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anna Theresa Bayer
 Geburtsdatum: 26.09.1991
 Geburtsort: Nürnberg
 Nationalität: Deutsch

Schulische Ausbildung

1998 - 2002 Grundschole Cadolzburg
 2002 - 2011 Gymnasium Stein
 Abschluss: Abitur (Note: 1,3)

Universitäre Ausbildung

10/2011 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
 09/2013 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 3,0)
 6/2015 Annahme als Doktorandin in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Schüller am Institut für Neuropathologie und Prionforschung der LMU München
 08 – 10/2015 Famulatur „Neurochirurgie und Neurologie“ am *Royal Prince Alfred Hospital* der *University of Sydney*
 10/2015 - 02/2016 Forschungssemester (Modul 6)
 03/2016 Famulatur „Hämatologie und Onkologie“ am Universitätsklinikum Großhadern, München
 04/2017 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
 05/2017 – 05/2018 Praktisches Jahr
 „Innere Medizin“ am *Hôpital Saint-Antoine, UPMC Sorbonne Universités, Paris*
 „Chirurgie“ am Stadtspital Waid, Zürich
 „Pädiatrie“ am *Cincinnati Children's Hospital*, Ohio und am *Hôpital Centre Territorial Gaston-Bourret, Nouméa*
 06/2018 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)

Berufliche Ausbildung

Seit 10/2018 Assistenzärztin für Pädiatrie an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Kliniken St. Elisabeth in Neuburg an der Donau

9 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Ulrich Schüller für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sowie die Betreuung während der Durchführung der Dissertation bedanken. Außerdem danke ich meiner Betreuerin Julia Neumann für die fachliche Unterstützung und Betreuung.

Mein Dank gilt ebenfalls der gesamten Arbeitsgruppe, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Besonders hervorheben möchte ich Pia und Silvia ohne deren Hilfsbereitschaft ich einige Stunden mehr im Labor verbracht hätte und die bei Problemen immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Bei Marc Weißhaar möchte ich mich sehr herzlich dafür bedanken, dass er mich mit viel Geduld, Engagement und Begeisterung in das Thema eingearbeitet hat und bei Fragen immer zur Verfügung stand.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Fabian Klein, der mir beim FACSen eine große Hilfe war und mit einem essenziellen Hinweis zum Gelingen der Experimente beigetragen hat.

Zum Schluss möchte ich mich noch ganz herzlich bei meinen Eltern und Markus bedanken, die mich auf dem langen Weg durch das Studium begleitet, unterstützt und motiviert haben. Ein besonderer Dank geht noch an meinen Papa für die Formatierung.

10 Literaturverzeichnis

1. Kaatsch P, et al. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2016 (1980-2015). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz; 2016.
2. Robert Koch-Institut GdeKiDeV. Krebs in Deutschland 2011/2012. Berlin; 2015.
3. Louis DN, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*. 2016;131(6):803-20.
4. Louis DN, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*. 2007;114(2):97-109.
5. Ferri Níguez B, et al. Embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes (ETANTR): a new distinctive variety of pediatric PNET: a case-based update. *Child's Nervous System*. 2010;26(8):1003-8.
6. Eberhart CG, et al. Pediatric neuroblastic brain tumors containing abundant neuropil and true rosettes. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*. 2000;3(4):346-52.
7. Korshunov A, et al. Embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes (ETANTR), ependymoblastoma, and medulloepithelioma share molecular similarity and comprise a single clinicopathological entity. *Acta Neuropathol*. 2014;128(2):279-89.
8. Korshunov A, et al. Focal genomic amplification at 19q13.42 comprises a powerful diagnostic marker for embryonal tumors with ependymoblastic rosettes. *Acta Neuropathologica*. 2010;120(2):253-60.
9. Paulus W, et al. Genetic profiling of CNS tumors extends histological classification. *Acta Neuropathologica*. 2010;120(2):269-70.
10. Ceccom J, et al. Embryonal tumor with multilayered rosettes: diagnostic tools update and review of the literature. *Clin Neuropathol*. 2014;33(1):15-22.
11. Kleinman CL, et al. Fusion of TTYH1 with the C19MC microRNA cluster drives expression of a brain-specific DNMT3B isoform in the embryonal brain tumor ETMR. *Nat Genet*. 2014;46(1):39-44.
12. Spence T, et al. CNS-PNETs with C19MC amplification and/or LIN28 expression comprise a distinct histogenetic diagnostic and therapeutic entity. *Acta Neuropathol*. 2014;128(2):291-303.
13. Korshunov A, et al. Comparative integrated molecular analysis of intraocular medulloepitheliomas and central nervous system embryonal tumors with multilayered rosettes confirms that they are distinct nosologic entities. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 2015;35(6):538-44.
14. Ozolek JA, et al. Medulloepithelioma with peculiar clinical presentation, stem cell phenotype and aberrant DNA-methylation profile. *CNS oncology*. 2015;4(4):203-12.
15. Sturm D, et al. New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs. *Cell*. 2016;164(5):1060-72.
16. Gilbertson RJ. Medulloblastoma: signalling a change in treatment. *The Lancet Oncology*. 2004;5(4):209-18.
17. Roddy E, et al. Late Effects of Treatment of Pediatric Central Nervous System Tumors. *Journal of child neurology*. 2016;31(2):237-54.

18. Friedrich C, et al. Treatment of young children with CNS-primitive neuroectodermal tumors/pineoblastomas in the prospective multicenter trial HIT 2000 using different chemotherapy regimens and radiotherapy. *Neuro Oncol.* 2013;15(2):224-34.
19. Picard D, et al. Markers of survival and metastatic potential in childhood CNS primitive neuro-ectodermal brain tumours: an integrative genomic analysis. *The Lancet Oncology.* 2012;13(8):838-48.
20. Gerber NU, et al. Outcome of 11 children with ependymoblastoma treated within the prospective HIT-trials between 1991 and 2006. *Journal of Neuro-Oncology.* 2011;102(3):459-69.
21. Mozes P, et al. Evaluation of the good tumor response of embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes (ETANTR). *Journal of Neuro-Oncology.* 2016;126(1):99-105.
22. Li M, et al. Frequent amplification of a chr19q13.41 microRNA polycistron in aggressive primitive neuroectodermal brain tumors. *Cancer cell.* 2009;16(6):533-46.
23. Turner CD, et al. Late effects of therapy for pediatric brain tumor survivors. *Journal of child neurology.* 2009;24(11):1455-63.
24. Horwitz M, et al. Embryonal tumors with multilayered rosettes in children: the SFCE experience. *Childs Nerv Syst.* 2016;32(2):299-305.
25. Stanuszek A, et al. Multiple faces of children and juvenile meningiomas: a report of single-center experience and review of literature. *Clinical neurology and neurosurgery.* 2014;118:69-75.
26. Nowak J, et al. Systematic comparison of MRI findings in pediatric ependymoblastoma with ependymoma and CNS primitive neuroectodermal tumor not otherwise specified. *Neuro Oncol.* 2015;17(8):1157-65.
27. Wesseling P. Embryonal tumor with multilayered rosettes (ETMR): signed, sealed, delivered *Acta Neuropathologica.* 2014;128(2):305-8.
28. Neumann JE, et al. A mouse model for embryonal tumors with multilayered rosettes uncovers the therapeutic potential of Sonic-hedgehog inhibitors. *Nat Med.* 2017;23(10):1191-202.
29. Nobusawa S, et al. Analysis of chromosome 19q13.42 amplification in embryonal brain tumors with ependymoblastic multilayered rosettes. *Brain pathology (Zurich, Switzerland).* 2012;22(5):689-97.
30. Korshunov A, et al. LIN28A immunoreactivity is a potent diagnostic marker of embryonal tumor with multilayered rosettes (ETMR). *Acta Neuropathologica.* 2012;124(6):875-81.
31. Viswanathan SR, et al. Selective Blockade of MicroRNA Processing by Lin28. *Science.* 2008;320(5872):97.
32. Molenaar JJ, et al. LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nat Genet.* 2012;44(11):1199-206.
33. Zhou J, et al. LIN28/LIN28B: an emerging oncogenic driver in cancer stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2013;45(5):973-8.
34. Balzeau J, et al. The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. *Frontiers in Genetics.* 2017;8:31.
35. Qin R, et al. LIN28 is involved in glioma carcinogenesis and predicts outcomes of glioblastoma multiforme patients. *PLoS One.* 2014;9(1):e86446.
36. Spence T, et al. A novel C19MC amplified cell line links Lin28/let-7 to mTOR signaling in embryonal tumor with multilayered rosettes. *Neuro Oncol.* 2014;16(1):62-71.

37. Viswanathan SR, et al. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet.* 2009;41(7):843-8.
38. King C, et al. Lin28b promotes colon cancer progression and metastasis. *Cancer research.* 2011;71(12):4260-8.
39. Hamano R, et al. High expression of Lin28 is associated with tumour aggressiveness and poor prognosis of patients in oesophagus cancer. *British journal of cancer.* 2012;106(8):1415-23.
40. Xiong H, et al. Oncogenic mechanisms of Lin28 in breast cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Oncotarget.* 2017;8(15):25721-35.
41. Cai W-Y, et al. The Wnt- β -catenin pathway represses let-7 microRNA expression through transactivation of Lin28 to augment breast cancer stem cell expansion. *Journal of Cell Science.* 2013;126(13):2877.
42. Pfister S, et al. Novel genomic amplification targeting the microRNA cluster at 19q13.42 in a pediatric embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes. *Acta Neuropathol.* 2009;117(4):457-64.
43. Manchester Uo. miRBase: the microRNA database [17.06.2017]. Available from: <http://www.mirbase.org/cgi-bin/query.pl?terms=human>.
44. Peng Y, et al. The role of MicroRNAs in human cancer. 2016;1:15004.
45. Flor I, et al. The dark side of a success story: microRNAs of the C19MC cluster in human tumours. *The Journal of Pathology.* 2012;227(3):270-4.
46. Esquela-Kerscher A, et al. Oncomirs [mdash] microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(4):259-69.
47. Calin GA, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(9):2999-3004.
48. Calin GA, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15524-9.
49. Bentwich I, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet.* 2005;37(7):766-70.
50. Morales-Prieto DM, et al. Pregnancy-associated miRNA-clusters. *Journal of reproductive immunology.* 2013;97(1):51-61.
51. Campbell HD, et al. The *Drosophila melanogaster* flightless-I gene involved in gastrulation and muscle degeneration encodes gelsolin-like and leucine-rich repeat domains and is conserved in *Caenorhabditis elegans* and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(23):11386-90.
52. Campbell HD, et al. Human and mouse homologues of the *Drosophila melanogaster* tweety (tty) gene: a novel gene family encoding predicted transmembrane proteins. *Genomics.* 2000;68(1):89-92.
53. Suzuki M, et al. A novel human Cl(-) channel family related to *Drosophila* flightless locus. *The Journal of biological chemistry.* 2004;279(21):22461-8.
54. Stefaniuk M, et al. Expression of Ttyh1, a member of the Tweety family in neurons in vitro and in vivo and its potential role in brain pathology. *Journal of neurochemistry.* 2010;115(5):1183-94.

55. Matthews CA, et al. Expression and evolution of the mammalian brain gene *Ttyh1*. *Journal of neurochemistry*. 2007;100(3):693-707.
56. Lukasiuk K, et al. cDNA profiling of epileptogenesis in the rat brain. *The European journal of neuroscience*. 2003;17(2):271-9.
57. Stefaniuk M, et al. Cloning of expressed sequence tags (ESTs) representing putative epileptogenesis-related genes and the localization of their expression in the normal brain. *Neuroscience letters*. 2010;482(3):230-4.
58. Jansen R, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*. 2002;43(6):1565-75.
59. Mojica FJ, et al. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends Microbiol*. 2016;24(10):811-20.
60. Urnov FD, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*. 2005;435(7042):646-51.
61. Beerli RR, et al. Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nature biotechnology*. 2002;20(2):135-41.
62. Remy S, et al. Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. *Transgenic research*. 2010;19(3):363-71.
63. Zhang F, et al. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nature biotechnology*. 2011;29(2):149-53.
64. Sommer D, et al. TALEN-mediated genome engineering to generate targeted mice. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*. 2015;23(1):43-55.
65. Hannon GJ. RNA interference. *Nature*. 2002;418(6894):244-51.
66. Zamore PD, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 2000;101(1):25-33.
67. Kim D, et al. RNAi mechanisms and applications. *BioTechniques*. 2008;44(5):613-6.
68. Klug A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annual review of biochemistry*. 2010;79:213-31.
69. Qi Lei S, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*. 2013;152(5):1173-83.
70. Nakata A, et al. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of bacteriology*. 1989;171(6):3553-6.
71. Ishino Y, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*. 1987;169(12):5429-33.
72. Hermans PW, et al. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infection and immunity*. 1991;59(8):2695-705.
73. Mojica FJ, et al. Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified *PstI* sites. *Mol Microbiol*. 1993;9(3):613-21.
74. Mojica FJ, et al. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloflex mediterranei* and *Haloflex volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol*. 1995;17(1):85-93.

75. Haft DH, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS computational biology*. 2005;1(6):e60.
76. Barrangou R, et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*. 2007;315(5819):1709.
77. Mojica FJM, et al. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*. 2005;60(2):174-82.
78. Bolotin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005;151(8):2551-61.
79. Hille F, et al. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016;371(1707).
80. Horvath P, et al. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science*. 2010;327(5962):167.
81. Deveau H, et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology*. 2008;190(4):1390-400.
82. Babu M, et al. A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Mol Microbiol*. 2011;79(2):484-502.
83. Sampson TR, et al. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature*. 2013;497(7448):254-7.
84. Levy A, et al. CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. *Nature*. 2015;520(7548):505-10.
85. Vercoe RB, et al. Cytotoxic chromosomal targeting by CRISPR/Cas systems can reshape bacterial genomes and expel or remodel pathogenicity islands. *PLoS genetics*. 2013;9(4):e1003454.
86. Jansen R, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*. 2002;43(6):1565-75.
87. Sorek R, et al. CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature reviews Microbiology*. 2008;6(3):181-6.
88. van der Oost J, et al. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends in biochemical sciences*. 2009;34(8):401-7.
89. Makarova KS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Micro*. 2015;13(11):722-36.
90. van der Oost J, et al. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nature reviews Microbiology*. 2014;12(7):479-92.
91. Jinek M, et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012;337(6096):816.
92. Gasiunas G, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(39):E2579-E86.
93. Barrangou R. RNA-mediated programmable DNA cleavage. *Nature biotechnology*. 2012;30(9):836-8.
94. Deltcheva E, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011;471(7340):602-7.

95. Garneau JE, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010;468(7320):67-71.
96. Sapranaukas R, et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. 2011;39(21):9275-82.
97. Mojica FJM, et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009;155(3):733-40.
98. Marraffini LA, et al. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*. 2010;463(7280):568-71.
99. Sashital DG, et al. Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system. *Mol Cell*. 2012;46(5):606-15.
100. Kanaar R, et al. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends in cell biology*. 1998;8(12):483-9.
101. van Gent DC, et al. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature reviews Genetics*. 2001;2(3):196-206.
102. Lieber MR, et al. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(9):712-20.
103. Weterings E, et al. The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair*. 2004;3(11):1425-35.
104. Bibikova M, et al. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2002;161(3):1169-75.
105. Zhang J-P, et al. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome biology*. 2017;18(1):35.
106. Su T, et al. A CRISPR-Cas9 Assisted Non-Homologous End-Joining Strategy for One-step Engineering of Bacterial Genome. *Scientific reports*. 2016;6:37895.
107. Zhou Y, et al. Simultaneous generation of multi - gene knockouts in human cells. *Febs Letters*. 2016;590(23):4343-53.
108. Jiang W, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature biotechnology*. 2013;31(3):233-9.
109. Cong L, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-23.
110. Mali P, et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*. 2013;339(6121):823.
111. Yang H, et al. One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell*. 2013;154(6):1370-9.
112. Wang H, et al. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell*. 2013;153(4):910-8.
113. Joung JK, et al. Accelerating research through reagent repositories: the genome editing example. *Genome biology*. 2015;16:255.
114. Doudna JA, et al. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213).
115. Hsu PD, et al. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014;157(6):1262-78.

116. Zhang JH, et al. Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering. *Bioengineered*. 2016;7(3):166-74.
117. Fu Y, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature biotechnology*. 2013;31(9):822-6.
118. Slaymaker IM, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016;351(6268):84-8.
119. Kleinstiver BP, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. 2016;529(7587):490-5.
120. Mali P, et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature biotechnology*. 2013;31(9):833-8.
121. Ran FA, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013;154(6):1380-9.
122. Hirano H, et al. Structure and Engineering of *Francisella novicida* Cas9. *Cell*. 2016;164(5):950-61.
123. Liu X, et al. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. *Scientific reports*. 2016;6:19675.
124. Singh V, et al. Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology. *Gene*. 2017;599:1-18.
125. Men K, et al. CRISPR/Cas9-mediated correction of human genetic disease. *Science China Life sciences*. 2017.
126. Yin H, et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nature biotechnology*. 2016;34(3):328-33.
127. Singh V, et al. Recent Advances of CRISPR-Cas9 Genome Editing Technologies for Biological and Biomedical Investigations. *Journal of cellular biochemistry*. 2017.
128. Larson MH, et al. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat Protocols*. 2013;8(11):2180-96.
129. Gilbert Luke A, et al. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*. 2013;154(2):442-51.
130. Mandegar MA, et al. CRISPR Interference Efficiently Induces Specific and Reversible Gene Silencing in Human iPSCs. *Cell stem cell*. 2016;18(4):541-53.
131. Perez-Pinera P, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nature methods*. 2013;10(10):973-6.
132. Lin S, et al. In Vivo Transcriptional Activation Using CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics*. 2015;201(2):433.
133. Lowder LG, et al. A CRISPR/Cas9 Toolbox for Multiplexed Plant Genome Editing and Transcriptional Regulation. *Plant Physiology*. 2015;169(2):971.
134. Gilbert Luke A, et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*. 2014;159(3):647-61.
135. Weißhaar M. Funktionelle Evaluation des TTYH1-C19MC Fusionskonstrukts in embryonalen Tumoren mit mehrschichtigen Rosetten: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2016.
136. Zhang F, et al. Optimized CRISPR Design Massachusetts Institute of Technology: [03.11.2017]. Available from: <http://crispr.mit.edu>.

137. Naldini L, et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(21):11382-8.
138. Trono D. Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene therapy*. 2000;7(1):20-3.
139. Naldini L, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996;272(5259):263-7.
140. Yacoub Na, et al. Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts. *The Journal of Gene Medicine*. 2007;9(7):579-84.
141. Kumar M, et al. Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Human gene therapy*. 2001;12(15):1893-905.
142. Cronin J, et al. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Current gene therapy*. 2005;5(4):387-98.
143. Burns JC, et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(17):8033-7.
144. Sanderson MJ, et al. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor protocols*. 2014;2014(10):pdb.top071795.
145. Albertazzi L, et al. Quantitative FRET Analysis With the E0GFP-mCherry Fluorescent Protein Pair. *Photochemistry and Photobiology*. 2009;85(1):287-97.
146. Virgo PF, et al. Flow cytometry in clinical pathology. *Annals of clinical biochemistry*. 2012;49(Pt 1):17-28.
147. Berridge MV, et al. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. 11: Elsevier; 2005. p. 127-52.
148. van Meerloo J, et al. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: Cree IA, editor. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. p. 237-45.
149. Koyanagi M, et al. A comparative study of colorimetric cell proliferation assays in immune cells. *Cytotechnology*. 2016;68(4):1489-98.
150. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
151. Shaner NC, et al. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods*. 2005;2(12):905-9.
152. Xie L, et al. The function of miR-519d in cell migration, invasion, and proliferation suggests a role in early placentation. *Placenta*. 2016;48(Supplement C):34-7.
153. Lewis BP, et al. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.
154. Chen Y, et al. In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: Challenges and strategies. *Advanced drug delivery reviews*. 2015;81:128-41.
155. Kaboli PJ, et al. MicroRNA-based therapy and breast cancer: A comprehensive review of novel therapeutic strategies from diagnosis to treatment. *Pharmacological Research*. 2015;97(Supplement C):104-21.
156. Gandhi NS, et al. Nanocarrier mediated delivery of siRNA/miRNA in combination with chemotherapeutic agents for cancer therapy: Current progress and advances. *Journal of Controlled Release*. 2014;194(Supplement C):238-56.

157. Wang G, et al. Targeting strategies on miRNA-21 and PDCD4 for glioblastoma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2015;580(Supplement C):64-74.
158. Costa PM, et al. MiRNA-21 silencing mediated by tumor-targeted nanoparticles combined with sunitinib: A new multimodal gene therapy approach for glioblastoma. *Journal of Controlled Release*. 2015;207(Supplement C):31-9.
159. Janssen HL, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *The New England journal of medicine*. 2013;368(18):1685-94.
160. Bouchie A. First microRNA mimic enters clinic. *Nature biotechnology*. 2013;31(7):577.