

Aus der Klinik für Nephrologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Lars Christian Rump

**Gezielte Sequenzierung von *USP8* bei PatientInnen mit  
Morbus Cushing und  
Genome Editing in HAC15 Zellen mittels CRISPR/Cas9**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von  
Cora Ballmann  
2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin/Erstgutachter: Frau Prof. Dr. med. Ute Scholl

Zweitgutachterin/Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. med. Matthias Schott



„Ausdauer wird früher oder später belohnt, meistens aber später“

*Wilhelm Busch*

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht

Cora Ballmann, Anne Thiel, Hannah E. Korah, Anna-Carina Reis, Wolfgang Saeger, Stefanie Stepanow, Karl Köhrer, Guido Reifenberger, Christiane B. Knobbe-Thomsen, Ulrich J. Knappe, Ute I. Scholl (2018), *USP8* Mutations in Pituitary Cushing Adenomas – Targeted Analysis by Next-Generation Sequencing, *Journal of the Endocrine Society* 2018; 2(3): 266-278

Teile aus der genannten Arbeit<sup>1</sup> werden in der folgenden Darstellung in wörtlicher Übersetzung verwendet.

## Zusammenfassung

Teile dieser Arbeit wurden in der Arbeit Ballmann *et al.* 2018<sup>1</sup> veröffentlicht. In der folgenden Darstellung werden Teile aus der genannten Arbeit <sup>1</sup> in wörtlicher Übersetzung verwendet.

Eine häufige Ursache sekundären Bluthochdrucks stellen endokrine Krankheitsbilder dar. Dabei spielen somatische Mutationen in endokrinen Tumoren eine wichtige Rolle. Die vorliegende Doktorarbeit befasst sich mit *KCNJ5*- und *CACNA1D*-Mutationen als Ursache eines primärem Hyperaldosteronismus (PA), sowie mit *USP8*-Mutationen als Ursache eines Morbus Cushing.

Kürzlich wurden somatische *Gain-of-function*-Mutationen im *USP8*-Gen corticotroper Adenome als Ursache eines Morbus Cushing identifiziert. Eine molekulare Diagnostik könnte eine hilfreiche Ergänzung der Standarddiagnostik sein und zukünftig bestenfalls eine spezifische Therapie zur Konsequenz haben. Häufig, insbesondere bei kleineren Adenomen, liegt kein frisches Gewebe für eine solche Diagnostik vor, und oft kommt es zu einer Kontamination mit Normalgewebe. In dieser Arbeit testeten wir deshalb DNA aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem (FFPE) Gewebe von 42 Hypophysenadenomen von PatientInnen mit Morbus Cushing (27 weibliche und 15 männliche PatientInnen; mittleres Alter bei OP, 42,5 Jahre; mittlere Tumorgröße, 12,2 mm). Mittels Sanger Sequenzierung identifizierten wir vorher beschriebene somatische Mutationen in sechs (Mutationsfrequenz, 14,3 %) der Adenome. Mit Hilfe von gezieltem *Next-Generation Sequencing* (NGS) konnten bekannte, sowie bislang unbeschriebene Mutationen in drei weiteren Adenomen (zwei mit jeweils zwei Mutationen) mit Allelfrequenzen von bis zu lediglich 3 % identifiziert werden. Sieben von neun (Gesamtmutationsfrequenz, 21,4 %) mutierten Adenomen stammten von weiblichen Patientinnen (Mutationsfrequenz, 25,9 %) und zwei von männlichen Patienten (Mutationsfrequenz, 13,3 %). Die durchschnittliche Größe der Adenome mit *USP8*-Mutation betrug 11,4 mm, und das durchschnittliche Alter der zugehörigen PatientInnen lag bei 43,9 Jahren. Insgesamt lag unsere Mutationsfrequenz etwas unter den Frequenzen in zuvor publizierten Studien. Aktuellere Studien geben teils jedoch ähnliche Mutationsfrequenzen an. Zudem ermittelten wir keine Deletionen, welche in anderen Kohorten häufig beschrieben wurden. Wir konnten in dieser Arbeit erfolgreich DNA aus kleinen Mengen FFPE Gewebe isolieren und zeigen, dass NGS eine höhere Sensitivität für die Detektion von *USP8*-Mutationen aufweist als Sanger Sequenzierung. Die Ermittlung des *USP8*-Mutationsstatus mittels dieser Methode könnte zukünftig eine sinnvolle Ergänzung der histopathologischen Diagnostik darstellen.<sup>1</sup>

Mutationen im *CACNA1D*- und *KCNJ5*-Gen kommen in über der Hälfte aller Aldosteron produzierender Adenome (APA) vor. Die aktuelle Therapie der Wahl stellt eine operative Entfernung des Adenoms dar. Um den Pathomechanismus zu untersuchen und alternative therapeutische Optionen testen zu können, sind Zellmodelle von großer Bedeutung. In dieser Arbeit wurde mittels CRISPR/Cas9, einer neuen Methode, gezieltes *Genome Editing* durchgeführt. Ziel war es, ein Knockin der häufigsten *KCNJ5*-Mutation G151R und der *CACNA1D*-Mutation I770M in das Genom der Aldosteron produzierenden Zelllinie HAC15 zu erzielen. Nachdem das erfolgreiche Knockin zwei homozygoter I770M-Mutationen und die Erzeugung von 110 (90,9 %) Insertionen und/oder Deletionen (Indels) in der schnellwachsenden Testzelllinie HEK293 gelang, erfolgte die Transfektion von HAC15 Zellen und die Isolation von 164 Klonen. In 121 (73,8 %) der transfizierten HAC15 Zellklone konnte eine Indel identifiziert und somit erfolgreiches *Genome Editing* durchgeführt werden. Eine I770M oder G151R Mutationen konnte in keinem der HAC15 Zellklone identifiziert werden. Während es trotz unterschiedlichster Anpassungen des Versuchsaufbaus im Rahmen dieser Arbeit demnach nicht gelang, ein gezieltes Knockin durchzuführen, konnte dagegen die Erzeugung von Knockouts in HAC15 Zellen mittels CRISPR/Cas9 erfolgreich etabliert werden. 37 der Zellklone (davon 22, die mit einem *CACNA1D*-Konstrukt und 15, die mit einem *KCNJ5*-Konstrukt transfiziert wurden) wiesen eine homozygote Indel auf, welche zu einer Leserasterverschiebung mit Einbau eines vorzeitigen Stopp-Codons führte. Die erzeugten *KCNJ5*- bzw. *CACNA1D*-Knockoutzelllinien können für funktionelle Studien verwendet werden, die beispielsweise die Aldosteronproduktion untersuchen.

## Abstract

Endocrine diseases are a frequent cause of secondary hypertension. In this context, somatic mutations in endocrine adenomas play an important role. This doctoral thesis covers *KCNJ5* and *CACNA1D* mutations previously described in patients with primary aldosteronism (PA) as well as *USP8* mutations in patients with Cushing's disease.

Recently, somatic mutations in the *USP8* gene were identified in approximately one third of pituitary adenomas from patients with Cushing's disease. Molecular testing of *USP8* might complement the diagnosis of Cushing's disease in the future and potentially have therapeutic implications. However, tissue is sparse after transsphenoidal surgery and typically fixed for histopathology. Thus, fresh tissue is usually not available, especially when tumors are very small. What is more, contamination with normal tissue is frequent. We here tested DNA isolated from single formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections of 42 pituitary adenomas. All adenomas were from patients with Cushing's disease (27 female and 15 male; mean age at surgery, 42.5 years; mean tumor size, 12.2 mm). By Sanger sequencing, we identified previously described mutations in six of 42 adenomas (mutation frequency, 14.3 %). Performing targeted next-generation sequencing, we detected somatic mutations in three additional adenomas (overall mutation frequency, 21.4 %), with mutant allele frequencies as low as 3 %. Two of these adenomas carried two *USP8* mutations each. While most mutations had been previously published, one had not been described before. Seven out of nine *USP8* mutations occurred in adenomas from female patients (mutation frequency, 25.9 %) and two in male patients (mutation frequency, 13.3 %). The average size of mutated adenomas was 11.4 mm, while the mean age of the corresponding patients was 43.9 years. Compared to previous studies, our overall mutation frequency was lower, but some more recent studies showed similar overall mutations frequencies. Moreover, we did not identify deletions, which had been frequently observed in other cohorts. In summary, in this study, we successfully isolated DNA from single FFPE tissue sections of pituitary adenomas and demonstrated that targeted NGS has a higher sensitivity for identifying *USP8* mutations than Sanger sequencing. Molecular testing of *USP8* by targeted NGS might be a useful complement to histopathological diagnostics in future.<sup>1</sup>

Somatic mutations in the *KCNJ5* or *CACNA1D* gene occur in more than half of all aldosterone-producing adenomas (APAs). The current first line treatment of APAs is adrenalectomy, the resection of the affected adrenal gland. Cell models could be important to examine the underlying pathomechanism and to test novel therapeutic options. Here, we performed targeted genome editing using CRISPR/Cas9. The aim of this study was to introduce the most common *KCNJ5* mutation G151R and the *CACNA1D* mutation I770M into the genome of the aldosterone-producing human adrenocortical cancer cell line HAC15. After the successful knockin of two homozygous I770M mutations and the generation of 110 (90.9 %) indels in the test cell line HEK293, HAC15 cells were transfected, and 164 individual clones were obtained. In 121 (73.8 %) of the transfected HAC15 clones, an indel was identified, thus the residues had been successfully targeted. No clones with I770M or G151R mutations were identified despite various adjustments of the experimental setup. However, homozygous *KCNJ5* and *CACNA1D* knockouts in HAC15 cells using CRISPR/Cas9 were established. 37 clones (22 transfected with a *CACNA1D* construct, 15 transfected with a *KCNJ5* construct) showed a homozygous indel, which resulted in a frameshift mutation followed by a premature stop codon. The generated *KCNJ5* and *CACNA1D* knockout cell lines may be useful for future functional studies, for example on aldosterone production.

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AKT1	RAC-alpha Serin/Threonin-Proteinkinase
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
<i>ATP1A1</i>	<i>ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Transporting Subunit Alpha 1</i>
<i>ATP2B3</i>	<i>ATPase Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> Transporting 3</i>
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum
bp	<i>base pairs</i>
<i>BRAF</i>	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
<i>CABLES1</i>	<i>Cdk5 and ABL enzyme substrate 1</i>
<i>CACNA1D</i>	<i>Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 D</i>
Cas	CRISPR associated
CCS	<i>Cosmic Calf Serum</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent Kinase</i>
CHE	Schweiz
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
COSMIC	<i>catalog of somatic mutations in cancer</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeat</i>
CT	Computertomographie
CYP11B1	11-β-Hydroxylase
CYP11B2	Aldosteron-Synthase
D	Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNK	Dänemark
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EGF	<i>Epithelial Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epithelial Growth Factor Receptor</i>
FBS	Fetales Kälberserum
FFPE	<i>Formalin-fixed paraffin-embedded</i>
FIPA	<i>Familial isolated pituitary adenomas</i>
FH	Familiärer Hyperaldosteronismus
fwd	<i>forward</i>
IHC	Immunhistochemie



---

ggf.	gegebenenfalls
GSH	Glucocorticoid-supprimierbarer Hyperaldosteronismus
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Wasserstoff
HDR	<i>Homology-directed Repair</i>
HSP90	<i>heat shock protein 90</i>
HR	<i>Homologous recombination</i>
K <sup>+</sup>	Kalium
<i>KCNJ5</i>	<i>Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 5</i>
KOR	Korea
l	Liter
LUX	Luxemburg
m	männlich
M	Median
min	Minuten
MEN	Multiple endokrine Neoplasie
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MW	Mittelwert
MRT	Magenetresonanztomographie
Na <sup>+</sup>	Natrium
NHEJ	<i>Non-homologous End Joining</i>
NL	Niederlande
NNR	Nebennierenrinde
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NV	nicht verfügbar
OSAS	Obstruktives Schlafapnoesyndrom
PA	Primärer Hyperaldosteronismus
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motive</i>
<i>PASNA</i>	<i>Primary aldosteronism, seizures and neurological abnormalities</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
POMC	Proopiomelanocortin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rev	<i>reverse</i>
RGEN	<i>RNA-guided engineered nucleases</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RRID	<i>Resource Research Identifier</i>
s	Sekunden
s.	siehe
SD	Standardabweichung
sgRNA	<i>Single Guide RNA</i>
sNK	Selektive Nebennierenvenen-Katheterisierung

SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
ssODN	<i>Single-stranded oligonucleotides</i>
SSTR	<i>Single-stranded template repair</i>
SW	Spannweite
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TALEN	<i>Transcription activator-like effector nuclease</i>
UBPY	<i>Ubiquitin specific protease Y</i>
UK	<i>United Kingdom</i>
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
UN	unterhalb der Nachweisgrenze
US	<i>United States of America</i>
<i>USP48</i>	<i>Ubiquitin specific protease 48</i>
<i>USP8</i>	<i>Ubiquitin specific protease 8</i>
µl	Mikroliter
V.a.	Verdacht auf
vs.	versus
w	weiblich
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZFN	Zinkfinger-Nukleasen

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Arterielle Hypertonie	1
1.2	Primärer Hyperaldosteronismus	1
1.3	Morbus Cushing	4
1.4	Genetische Ursachen eines primären Hyperaldosteronismus	8
1.4.1	Somatische Mutationen als Ursache eines primären Hyperaldosteronismus	8
1.4.2	Somatische <i>KCNJ5</i> -Mutationen	9
1.4.3	Somatische <i>CACNA1D</i> -Mutationen	10
1.4.4	Keimbahnmutationen bei PatientInnen mit primären Hyperaldosteronismus	12
1.4.5	Keimbahnmutationen im <i>KCNJ5</i> -Gen	12
1.4.6	Keimbahnmutationen im <i>CACNA1D</i> -Gen	13
1.5	Genetische Ursachen eines Morbus Cushing	13
1.5.1	Somatische <i>USP8</i> -Mutationen	13
1.5.2	Somatische Mutationen im <i>USP48</i> - und <i>BRAF</i> -Gen	16
1.5.3	Keimbahnmutationen bei Morbus Cushing	16
1.6	Ziele der Arbeit	17
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>18</b>
2.1	Geräte	18
2.2	Verbrauchsmaterialien	18
2.3	Medien und Chemikalien für Molekularbiologische Versuche	19
2.4	Enzyme	19
2.5	Kits	20
2.6	Puffer	20
2.7	Bakterienstämme	20
2.8	Zelllinien	20
2.9	Medien und Chemikalien für die Zellkultur	21
2.10	Primer und Oligonukleotide	22
2.11	Plasmide	23
2.12	Antikörper	24
2.13	Software/Programme	25
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>26</b>
3.1	<i>USP8</i> -Mutationen in Hypophysenadenomen bei PatientInnen mit Morbus Cushing	26
3.1.1	PatientInnen und klinische Daten	26
3.1.2	Formelle Voraussetzungen	27
3.1.3	DNA Extraktion, Gelelektrophorese, Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sanger Sequenzierung	27
3.1.4	Gezieltes <i>Next-Generation Sequencing</i> und Datenanalyse	29
3.1.5	Immunhistochemie	30
3.1.6	Statistische Analyse	30
3.2	<i>Genome Editing</i> mittels CRISPR/Cas9 in HEK293 und HAC15 Zellen	30
3.2.1	Design der sgRNAs und <i>repair templates</i>	33
3.2.2	Klonierung, Transformation und DNA-Isolation	34
3.2.3	Zellkultivierung	37
3.2.4	Tauen, Passagieren und Wegfrieren von Zellen	37
3.2.5	Transfektion, Puromycinselektion, Picken und Splitten von Klonen	37
3.2.6	DNA Isolation, Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sanger Sequenzierung	40
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
4.1	<i>USP8</i> -Mutationen in Hypophysenadenomen bei PatientInnen mit Morbus Cushing	41

---

4.1.1	Charakterisierung der Patientenkohorte .....	41
4.1.2	Identifizierung von <i>USP8</i> -Mutationen in sechs von 42 Proben mittels Sanger Sequenzierung .....	45
4.1.3	Identifizierung dreier weiterer Mutationen mittels NGS .....	46
4.1.4	Ermittlung von insgesamt neun Mutationen in 42 corticotropen Hypophysenadenomen .....	48
4.1.5	Korrelation klinischer Daten mit dem <i>USP8</i> -Mutationsstatus .....	49
4.1.6	Keine Hochregulation der EGFR-Expression bei Tumoren mit <i>USP8</i> -Mutationen .....	50
4.2	<i>Genome Editing</i> mittels CRISPR/Cas9 in HEK293 und HAC15 Zellen .....	52
4.2.1	Identifizierung von zwei homozygoten I770M-Mutationen und 110 Indels in 121 HEK293 Zellklonen.....	52
4.2.2	Ergebnisse des erfolgreichen <i>Genome Editings</i> in HEK293 Zellen in Abhängigkeit vom verwendeten Konstrukt – Überlegenheit der Konstrukte <i>CACNA1D_1</i> und <i>KCNJ5_1</i> .....	60
4.2.3	Identifizierung von 121 Indels in 164 HAC15 Zellklonen.....	61
4.2.4	Ergebnisse des erfolgreichen <i>Genome Editings</i> in HAC15 Zellen in Abhängigkeit von der Transfektion, dem verwendeten Konstrukt und <i>repair template</i> .....	62
4.2.5	Homozygote Indels in HAC15 Zellen führen zu Knockouts im <i>CACNA1D</i> -Gen..	67
5	Diskussion .....	72
5.1	<i>USP8</i> -Mutationen in Hypophysenadenomen bei PatientInnen mit Morbus Cushing .....	72
5.1.1	Next Generation Sequencing von FFPE-Gewebeschnitten als mögliche Methode zur molekularbiologischen Diagnostik von Hypophysenadenomen ...	72
5.1.2	Mögliche Gründe für eine niedrige Mutationsfrequenz.....	72
5.1.3	Hinweise für das Auftreten unabhängiger Hits .....	74
5.1.4	Keine erhöhte EGFR-Expression in <i>USP8</i> -mutierten Adenomen .....	74
5.1.5	Limitationen der Studie und mögliche Inhalte zukünftiger Arbeiten .....	75
5.2	<i>Genome Editing</i> mittels CRISPR/Cas9 in HAC15 Zellen .....	76
5.2.1	Erzeugung von Knockout-Modellen in HAC15 Zellen mittels CRISPR/Cas9 .....	76
5.2.2	Geringe Effizienz von HDR in HAC15 Zellen .....	76
5.2.3	Effektivität unterschiedlicher sgRNAs .....	78
5.2.4	Einfluss verschiedener <i>repair templates</i> auf ein erfolgreiches Knockin .....	80
5.2.5	Mehrfaches Schneiden von Cas9 – unerwünschte Indels und <i>off target</i> Effekte .....	81
5.3	Schlussfolgerungen.....	83
6	Literatur- und Quellenverzeichnis .....	84

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Regulation der Aldosteron-Sekretion entsprechend Spät <i>et al.</i> <sup>5</sup> .....	2
Abb. 2:	Diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf (V.a.) PA in Anlehnung an Williams <i>et al.</i> <sup>7</sup> .....	4
Abb. 3:	Regulation der Cortisol-Ausschüttung über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse entsprechend Nussey <i>et al.</i> <sup>13</sup> .....	5
Abb. 4:	Diagnostisches Vorgehen bei V.a. Cushing Syndrom in Anlehnung an Lacroix <i>et al.</i> <sup>14</sup> .....	7
Abb. 5:	Modell der Aldosteron-Synthese in Anlehnung an Choi <i>et al.</i> <sup>17</sup> .....	8
Abb. 6:	Modell der Aldosteron-Synthese in Zellen mit <i>KCNJ5</i> -Mutation in Anlehnung an Choi <i>et al.</i> <sup>17</sup> .....	10
Abb. 7:	Modell der Aldosteron-Synthese in Zellen mit <i>CACNA1D</i> -Mutationen entsprechend Scholl <i>et al.</i> <sup>36</sup> .....	11
Abb. 8:	Plasmidkarte pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459).....	23
Abb. 9:	Wege des <i>Genome Editings</i> durch Reparatur von Doppelstrangbrüchen in Anlehnung an Ran <i>et al.</i> <sup>64</sup> .....	31
Abb. 10:	Versuchsaufbau in Anlehnung an das Protokoll von Ran <i>et al.</i> <sup>64</sup> .....	32
Abb. 11:	Geschlechter- und Altersverteilung der Kohorte, geschlechtsabhängige Altersverteilung.....	42
Abb. 12:	Maximaler durchschnittlicher Tumordurchmesser und Einteilung in Mikro- und Makroadenome der gesamten Kohorte, sowie in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	43
Abb. 13:	Chromatogramme der sechs Mutationen, die mittels Sanger Sequenzierung identifiziert wurden <sup>1</sup> .....	45
Abb. 14:	Allelfrequenzen mittels NGS identifizierter <i>USP8</i> -Varianten <sup>1</sup> .....	46
Abb. 15:	NGS <i>reads</i> der Tumore mit jeweils zwei Mutationen <sup>1</sup> .....	47
Abb. 16:	Mutationsfrequenz und Art der Mutationen .....	48
Abb. 17:	Geschlechterverteilung in Abhängigkeit vom Mutationsstatus <sup>1</sup> .....	49
Abb. 18:	Verteilung von Alter, Größe und Mikro-/Makroadenomen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus (In Anlehnung an <sup>1</sup> ).....	50
Abb. 19:	EGFR Immunhistochemie <sup>1</sup> .....	51
Abb. 20:	Anteil an WT, Indels und Punktmutationen (I770M/G151R), sowie Zygotie der Indels im Vergleich zwischen transfizierten HEK293 Zellen .....	52
Abb. 21:	Chromatogramme zweier homozygoter I770M Mutationen im <i>CACNA1D</i> -Gen .....	53
Abb. 22:	Chromatogramme fraglicher G151R Mutationen in HEK293 Zellklonen.....	54
Abb. 23:	Chromatogramme fraglicher I770M Mutationen in HEK293 Zellklonen (1).....	55
Abb. 24:	Chromatogramme fraglicher I770M Mutationen in HEK293 Zellklonen (3).....	56
Abb. 25:	Anteil an WT und Indels sowie Zygotie der Indels transfizierter HAC15 Zellen.....	61
Abb. 28:	Nukleotidsequenzen homozygoter Indels in HAC15 Zellen, die mit <i>CACNA1D</i> -Konstrukten transfiziert wurden .....	68
Abb. 29:	Sanger Sequenzierungen genetischer Varianten homozygoter Indels in Zellen, die mit <i>CACNA1D</i> -Konstrukten transfiziert wurden .....	69
Abb. 28:	Nukleotidsequenzen homozygoter Indels in HAC15 Zellen, die mit <i>KCNJ5</i> -Konstrukten transfiziert wurden .....	70
Abb. 30:	Nukleotidsequenzen und Chromatogramme homozygoter Indels in HAC15 Zellen, die mit einem <i>KCNJ5</i> -Konstrukt transfiziert wurden.....	70
Abb. 31:	Compound-Heterozygotie p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2 .....	71

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer zur Sanger Sequenzierung .....	22
Tabelle 2: Primer für das <i>Next-Generation Sequencing</i> .....	22
Tabelle 3: sgRNAs .....	22
Tabelle 4: Repair templates .....	23
Tabelle 5: Plasmide mit Klonierungsstrategie und <i>insert</i> .....	24
Tabelle 6: Antikörper .....	24
Tabelle 7: PCR Ansatz USP8_F und _R, 45 µl .....	28
Tabelle 8: Step-Down-Protokoll PCR USP8_F und _R .....	28
Tabelle 9: <i>Targets</i> für das Design der sgRNAs .....	33
Tabelle 10: Zielsequenzen der sgRNAs .....	33
Tabelle 11: Reaktion zur Vorbereitung der Oligonukleotide .....	35
Tabelle 12: Ligationsreaktion zur Klonierung .....	35
Tabelle 13: Plasmid-Safe-Reaktion .....	36
Tabelle 14: Transfektionen, verwendete Plasmide, templates und Transfektionsmethoden .....	38
Tabelle 15: PCR Ansatz für J5cDNA_F/R und I770M_F/R, 15 µl .....	40
Tabelle 16: Klinische Daten, Ergebnisse der Sequenzierungen und EGFR- Immunhistochemie der Patientenkohorte <sup>1</sup> .....	44
Tabelle 17: Identifizierte <i>USP8</i> -Varianten <sup>1</sup> .....	48
Tabelle 18: Sequenzierungsergebnisse aller HEK293 Zellklone im Detail (1) .....	57
Tabelle 19: Sequenzierungsergebnisse aller HEK293 Zellklone im Detail (2) .....	58
Tabelle 20: Sequenzierungsergebnisse aller HEK293 Zellklone im Detail (3) .....	59
Tabelle 21: Sequenzierungsergebnisse von HEK293 Zellklonen in Abhängigkeit von verwendetem Konstrukt und <i>repair template</i> .....	60
Tabelle 22: Übersicht der Transfektionen mit verwendeten Konstrukten und <i>repair</i> <i>templates</i> .....	61
Tabelle 23: Sequenzierungsergebnisse von HAC15 Zellklonen in Abhängigkeit von der Transfektion, dem verwendeten Konstrukt und <i>repair template</i> .....	62
Tabelle 24: Sequenzierungsergebnisse aller HAC15 Zellklone im Detail (1) .....	64
Tabelle 25: Sequenzierungsergebnisse aller HAC15 Zellklone im Detail (2) .....	65
Tabelle 26: Sequenzierungsergebnisse aller HAC15 Zellklone im Detail (3) .....	66
Tabelle 27: Sequenzierungsergebnisse aller HAC15 Zellklone im Detail (4) .....	67
Tabelle 28: Homozygote Indels transfizierter HAC15 Zellen .....	68

## 1 Einleitung

### 1.1 Arterielle Hypertonie

Ein systolischer Blutdruckwert von  $\geq 140$  mmHg und/oder ein diastolischer Blutdruckwert von  $\geq 90$  mmHg gelten als Bluthochdruck.<sup>2</sup>

Mit einer weltweiten Prävalenz von ca. 40 % bei Erwachsenen ist die arterielle Hypertonie eine sehr häufige Erkrankung<sup>3</sup>. Bluthochdruck führt zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko, sowie zu Hypertonie bedingten Organschäden vor allem von Blutgefäßen, Herz, Gehirn, Augen und Nieren<sup>2</sup>. Insbesondere bei Vorliegen eines erhöhten systolischen Blutdrucks steigt die Morbidität und Mortalität<sup>4</sup>. Ein systolischer Blutdruck von  $\geq 140$  mmHg ist schätzungsweise mit einer jährlichen Sterberate von ca. 100/100.000 assoziiert<sup>4</sup>. Ischämische Herzerkrankungen, sowie hämorrhagische und ischämische Schlaganfälle stellen dabei die Haupttodesursache dar<sup>4</sup>.

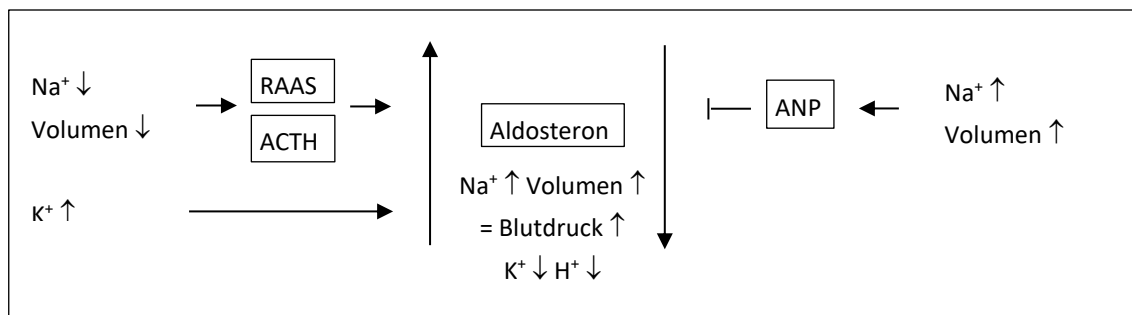
Ursachen eines Bluthochdrucks können vielfältig sein. Im Wesentlichen unterscheidet man zunächst zwischen zwei Formen, der primären, oder essentiellen arteriellen Hypertonie und dem sekundären Bluthochdruck. Wesentlich häufiger ist dabei die essentielle arterielle Hypertonie, welche multifaktoriell bedingt ist. Sekundärer Bluthochdruck macht etwa 5-15 % der Fälle aus und ist dadurch definiert, dass eine identifizierbare Ursache vorliegt. Dies ist therapeutisch von Relevanz, da unter Umständen eine spezifische Behandlung der Ursache möglich ist.<sup>2</sup>

Die häufigste Ursache sekundären Bluthochdrucks ist ein primärer Hyperaldosteronismus (5-15 %), gefolgt vom Vorkommen eines obstruktiven Schlafapnoesyndroms (OSAS) (5-10 %), sowie Erkrankungen des Nierenparenchyms (2-10 %) oder der Nierengefäße (1-10 %). Neben dem primären Hyperaldosteronismus können das Cushing Syndrom (<1 %), Phäochromozytome (<1 %), sowie Hyperparathyreoidismus (<1 %) und Erkrankungen der Schilddrüse (1-2 %) weitere endokrine Ursachen eines sekundären Bluthochdrucks sein. Auch anatomische (z.B. Aortenisthmusstenose), sowie medikamentöse oder toxische Ursachen sind möglich.<sup>2</sup>

### 1.2 Primärer Hyperaldosteronismus

Aldosteron ist ein Steroidhormon und wird von den Zellen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde (NNR) sezerniert. Es wirkt am Epithel des distalen Nephrons, wo es zu einer Natrium ( $\text{Na}^+$ )-Retention und einer Kalium ( $\text{K}^+$ )- und Wasserstoff ( $\text{H}^+$ )-Sekretion führt. Da zusammen mit dem  $\text{Na}^+$  Wasser rückresorbiert wird, wirkt Aldosteron Blutdruck steigernd.<sup>5</sup>

Die Aldosteron-Sekretion wird durch viele Faktoren reguliert. Unter physiologischen Bedingungen stellen  $\text{K}^+$ , Angiotensin II und adrenocorticotropes Hormon (ACTH) die wesentlichen stimulatorischen Faktoren und atriales natriuretisches Peptid (ANP) den wesentlichen inhibitorischen Faktor dar. In den allermeisten Fällen liegt einer Aldosteron-Sekretion ein aktiviertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und/oder ein erhöhter  $\text{K}^+$ -Plasmaspiegel zugrunde. Das RAAS beschreibt einen Signalweg, bei dem die Protease Renin Angiotensinogen zu Angiotensin I spaltet, welches anschließend vom Angiotensin-konvertierendem Enzym (ACE) zu Angiotensin II umgewandelt wird. Angiotensin II wirkt wiederum stimulierend auf die Aldosteron-Sekretion (s.o.). Im Falle eines schweren Natrium- und/oder Volumenmangels wirkt zusätzlich ACTH stimulierend auf die Aldosteron-Sekretion. Ein Natrium- und/oder Volumenüberschuss wirkt dagegen über eine Steigerung der ANP-Sekretion inhibitorisch auf die Aldosteron-Sekretion (Abb. 1).<sup>5</sup>



**Abb. 1: Regulation der Aldosteron-Sekretion entsprechend Spät *et al.*<sup>5</sup>**

Die Abbildung zeigt die Regulation der Aldosteron-Sekretion. Hyponatriämie und/oder Volumenmangel führen mittels RAAS-Aktivierung, sowie bei schwerem Mangel zusätzlich mittels ACTH, ebenso wie ein erhöhter  $\text{K}^+$ -Plasmaspiegel, zu einer vermehrten Aldosteron-Sekretion und somit zu einem Blutdruckanstieg. Eine Hypernatriämie und/oder ein Volumenüberschuss führen durch eine gesteigerte ANP-Sekretion zu einer Inhibition der Aldosteron-Sekretion und somit zu einer Senkung des Blutdrucks. Abkürzungen: ACTH, Adrenocorticotropes Hormon; ANP, Atriales natriuretisches Peptid;  $\text{H}^+$ , Wasserstoff;  $\text{K}^+$ , Kalium;  $\text{Na}^+$ , Natrium; RAAS, Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Als primären Hyperaldosteronismus (PA), oder auch als Conn-Syndrom, bezeichnet man eine zumindest teilweise autonome Überproduktion von Aldosteron<sup>6</sup>. Diese hat eine arterielle Hypertonie zur Folge<sup>6</sup>. Durch vermehrte Kalium-Sekretion kann zudem eine Hypokaliämie vorliegen. Dies ist jedoch nicht bei allen PatientInnen der Fall<sup>6</sup>. Typisch für das Krankheitsbild sind niedrige Renin- im Verhältnis zu hohen Aldosteron-Plasmaspiegeln<sup>7</sup>.

PA stellt die häufigste Ursache von endokrinem Bluthochdruck dar<sup>7</sup>. Dennoch ist nicht abschließend geklärt, wie viele PatientInnen mit arterieller Hypertonie tatsächlich an einem PA leiden<sup>8</sup>. Eine Studie aus dem Jahr 2017 zeigte eine Prävalenz von ca. 6 % in der Grundversorgung<sup>8</sup>. Dabei stieg die Prävalenz in Abhängigkeit vom Schweregrad der Hypertonie von ca. 4 % im Hypertonie-Stadium I (140-159 mmHg systolisch und/oder 90-99 mmHg diastolisch) auf ca. 12 % im Hypertonie-Stadium III ( $\geq 180$  mmHg systolisch und/oder  $\geq 110$  mmHg diastolisch)<sup>8</sup>. Rossi *et al.* ermittelten eine Prävalenz von ca. 11 % in spezialisierten Hypertonie-Zentren<sup>9</sup>.

PatientInnen mit PA haben ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen, unter anderem von Schlaganfällen und Vorhofflimmern<sup>10-12</sup>. Auch das Risiko für Organschäden an Herz und Nieren, sowie für das Erkranken an einem metabolischen Syndrom oder Diabetes, ist im Vergleich zu PatientInnen mit einer essentiellen Hypertonie erhöht<sup>8, 11</sup>.

Die zwei häufigsten Ursachen des PA sind das in der Regel unilaterale Vorkommen eines Aldosteron produzierenden Adenoms (APA) mit ca. 30-40 %, sowie eine bilaterale Hyperplasie der Nebennierenrinde, auch als idiopathischer Hyperaldosteronismus bezeichnet, mit ca. 60 %<sup>8, 9</sup>. Selten stellen eine unilaterale Hyperplasie, ein Nebennierenrindenzinom oder ein familiärer Hyperaldosteronismus (FH) die Ursache eines PA dar<sup>7</sup>.

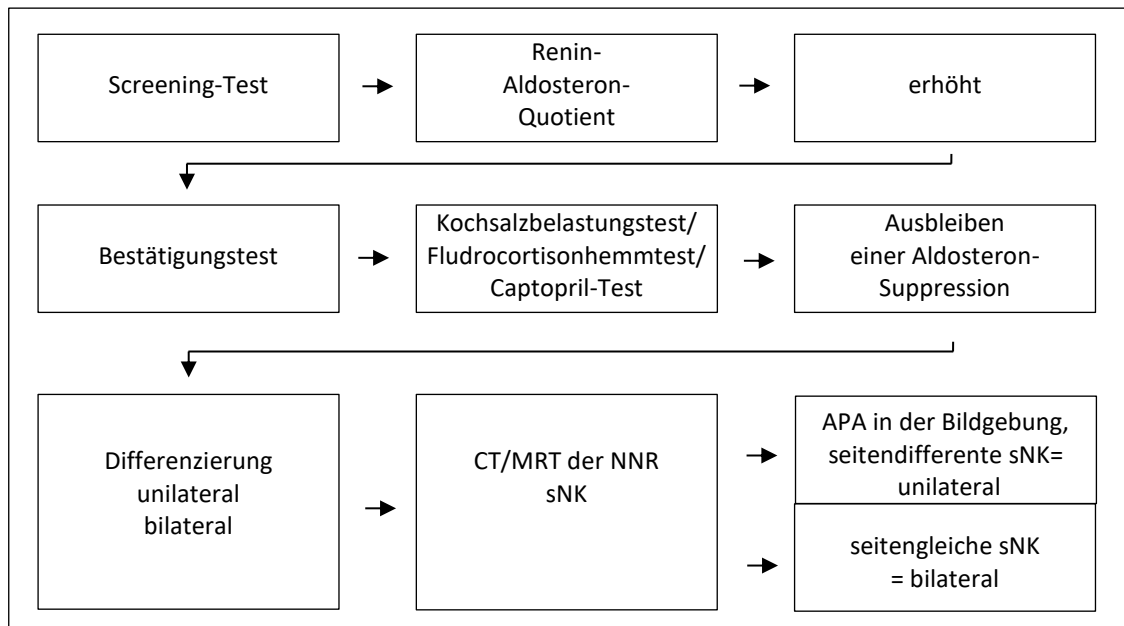
Insbesondere PatientInnen mit schwerer oder therapieresistenter Hypertonie, mit gleichzeitiger Hypokaliämie, sowie junge PatientInnen, oder solche mit positiver Familienanamnese für Hypertonie oder cerebrovaskuläre Ereignisse in jungen Jahren sollten auf einen PA getestet werden.<sup>6</sup> Das diagnostische Vorgehen bei Verdacht auf einen PA besteht aus drei Schritten: einem Screening-Test, einem Bestätigungstest und der Differenzierung in eine uni- oder bilaterale Ursache (Abb. 2).<sup>7</sup>

Für das Screening wird nach Absetzen aller Medikamente, die einen Einfluss auf das RAAS haben, der Aldosteron-Renin-Quotient bestimmt. Im Falle eines PA ist dieser erhöht (Abb. 2).<sup>7</sup>



Fällt der Test positiv aus, gibt es verschiedene Bestätigungstests. Dies sind der Kochsalzbelastungstest, der Fludrocortison-Suppressionstest oder der Captopril-Test. Allen gemein ist, dass eine exogene Substanz verabreicht wird, welche normalerweise zur Suppression des RAAS bzw. von Angiotensin II und somit von Aldosteron führt. Beim Kochsalzbelastungstest wird durch eine Volumenexpansion und Natriumbelastung das RAAS gehemmt. Fludrocortison, ein Aldosteronanalogon, führt mittels verminderter Renin-Sekretion zu einer Suppression von Angiotensin II bzw. Aldosteron. Captopril ist ein ACE-Hemmer und verhindert somit die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II. Beim Gesunden hat dies eine Aldosteron-Suppression zur Folge. Ist die Aldosteron-Sekretion jedoch unabhängig von den üblichen Regulationsmechanismen, wie beim Vorliegen eines PA, bleibt eine Suppression aus. In diesem Fall ist der Bestätigungstest positiv (Abb. 2).<sup>7</sup>

Um anschließend eine uni- oder bilaterale Ursache zu differenzieren, sollte zunächst eine Bildgebung der Nebennieren mittels CT oder MRT erfolgen. Dies bietet die Möglichkeit ein APA oder ein seltenes NNR-Karzinom zu identifizieren. Es besteht jedoch die Gefahr, dass ein kleines APA übersehen wird, oder dass das Vorliegen eines Nebennierenrinden-Inzidentaloms zu falsch positiven Ergebnissen führt. Der Goldstandard zur Unterscheidung zwischen einem APA und einer bilateralen Hyperplasie ist die Durchführung einer selektiven Nebennierenvenen-Katheterisierung (sNK). Dabei werden beide Nebennierenvenen katheterisiert, es findet eine Stimulation mit ACTH statt und der jeweilige Aldosteron/Cortisol-Quotient auf beiden Seiten wird bestimmt. Unterschiedliche Quotienten auf beiden Seiten weisen auch bei unauffälliger Bildgebung auf eine unilaterale Ursache hin (Abb. 2).<sup>6,7</sup>



**Abb. 2: Diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf (V.a.) PA in Anlehnung an Williams *et al.*<sup>7</sup>**

Die Abbildung zeigt das diagnostische Vorgehen bei V.a. einen PA. Zunächst wird als Screening der Renin-Aldosteron-Quotient bestimmt. Ist dieser erhöht, wird ein Bestätigungstest durchgeführt. Bleibt nach Durchführung eines Kochsalzbelastungstests/Fludrocortison-Suppressionstests/Captopril-Tests eine Aldosteron-Suppression aus, gilt der V.a. PA als bestätigt. In diesem Fall erfolgt eine Differenzierung in eine uni- oder bilaterale Ursache. Mittels CT/MRT der NNR kann gegebenenfalls (ggf.) ein APA als unilaterale Ursache nachgewiesen werden. Als Goldstandard erfolgt die Durchführung einer selektiven Nebennierenvenen-Katheterisierung (sNK) beider Seiten mit Bestimmung des Aldosteron/Cortisol-Quotienten. Ist eine Seitendifferenz festzustellen, geht man auch ohne einen positiven Befund in der Bildgebung von einer unilateralen Ursache, in der Regel einem APA, aus. Abkürzungen: APA, Aldosteron produzierendes Adenom; CT, Computertomographie; MRT, Magnetresonanztomographie; NNR, Nebennierenrinde; PA, primärer Hyperaldosteronismus; sNK, selektive Nebennierenvenen-Katheterisierung.

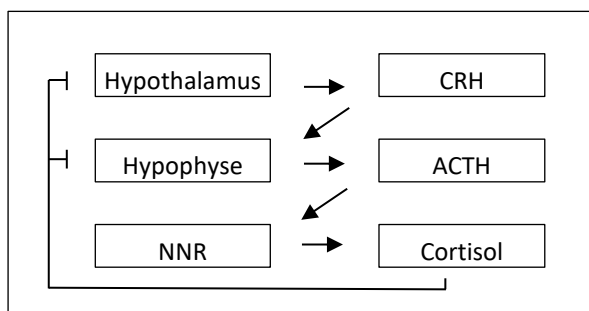
Therapeutisch gibt es im Wesentlichen zwei Möglichkeiten. Aldosteron produzierende Adenome und eine unilaterale Hyperplasie werden in der Regel operativ entfernt. Meist erfolgt eine laparoskopische oder retroperitoneoskopische Adrenalectomie. Eine bilaterale Hyperplasie der NNR wird üblicherweise medikamentös unter Verwendung von Aldosteronrezeptorantagonisten therapiert.<sup>7</sup>

### 1.3 Morbus Cushing

Cortisol zählt zu den Glucocorticoiden und wird in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde gebildet. Seine Wirkung ist sehr vielfältig. Es beeinflusst den Stoffwechsel, indem es in der Leber durch eine vermehrte Gluconeogenese anabol wirkt, während es im Muskel- und Fettgewebe durch Steigerung der Lipolyse und Proteolyse eine katabole Wirkung entfaltet. Insgesamt führt Cortisol zu einem Anstieg des Blutzuckerspiegels. Darüber hinaus wirkt es hemmend auf das Wachstum von Fibroblasten und interstitiellem Material, wie beispielsweise Kollagen, und führt zu einem Abbau der Knochensubstanz. Zudem beeinflusst Cortisol das kardiovaskuläre System, indem es beispielsweise die Wirkung von Katecholaminen und Angiotensin II auf Gefäße verstärkt. Durch Beeinflussung des ZNS kann Cortisol unter anderem zu Stimmungsveränderungen führen. Weiterhin hat es eine immunsuppressive Wirkung. Cortisol bindet außerdem den Aldosteron-Rezeptor in der Niere mit gleicher Affinität wie Aldosteron. In der Regel erfolgt jedoch ein

Abbau des Cortisols im Aldosteron-sensitiven Bereich der Niere mittels 11-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Ein Cortisol-Überschuss, der zu einer Überschreitung der Enzymkapazität führt, kann jedoch zu einer Aldosteron-ähnlichen Wirkung von Cortisol in der Niere und folglich zu einem Bluthochdruck führen.<sup>13</sup>

Reguliert wird die Cortisol-Ausschüttung über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse. Corticotropin-releasing Hormon (CRH) aus dem Hypothalamus stimuliert die Ausschüttung von ACTH aus der Hypophyse. ACTH, welches von Proopiomelanocortin (POMC) abgespalten wird, führt zu einer Freisetzung von Cortisol aus der Nebennierenrinde. Cortisol wiederum wirkt durch negative Rückkopplung hemmend auf die Ausschüttung von CRH und ACTH (Abb. 3).<sup>13</sup>



**Abb. 3: Regulation der Cortisol-Ausschüttung über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse entsprechend Nussey *et al.*<sup>13</sup>**

Eine Freisetzung von CRH aus dem Hypothalamus stimuliert die ACTH-Sekretion der Hypophyse. ACTH wiederum führt zu einer Cortisol-Freisetzung aus der Zona fasciculata der NNR. Cortisol wirkt über eine negative Rückkopplung hemmend auf die CRH- und ACTH-Freisetzung. Abkürzungen: ACTH, Adrenocorticotropes Hormon; CRH, Corticotropin-releasing Hormon; NNR, Nebennierenrinde

Morbus Cushing ist mit 60-70 % die häufigste Ursache eines endogenen Cushing Syndroms<sup>14</sup>. Als Cushing Syndrom (CS) wird ein Symptomkomplex zusammengefasst, der Folge einer chronisch erhöhten Cortisol-Exposition des Gewebes ist<sup>14, 15</sup>.

Mit einer Prävalenz von 39-79 pro Million ist das Cushing Syndrom eine seltene Erkrankung<sup>14</sup>. PatientInnen mit CS weisen eine erhöhte Mortalität auf, wobei kardiovaskuläre Komplikationen die häufigste Todesursache darstellen<sup>14</sup>. Durch adäquate Therapie und Normalisierung des Cortisol-Spiegels kann die Morbidität und Mortalität von PatientInnen mit Hypercortisolismus reduziert werden<sup>15</sup>.

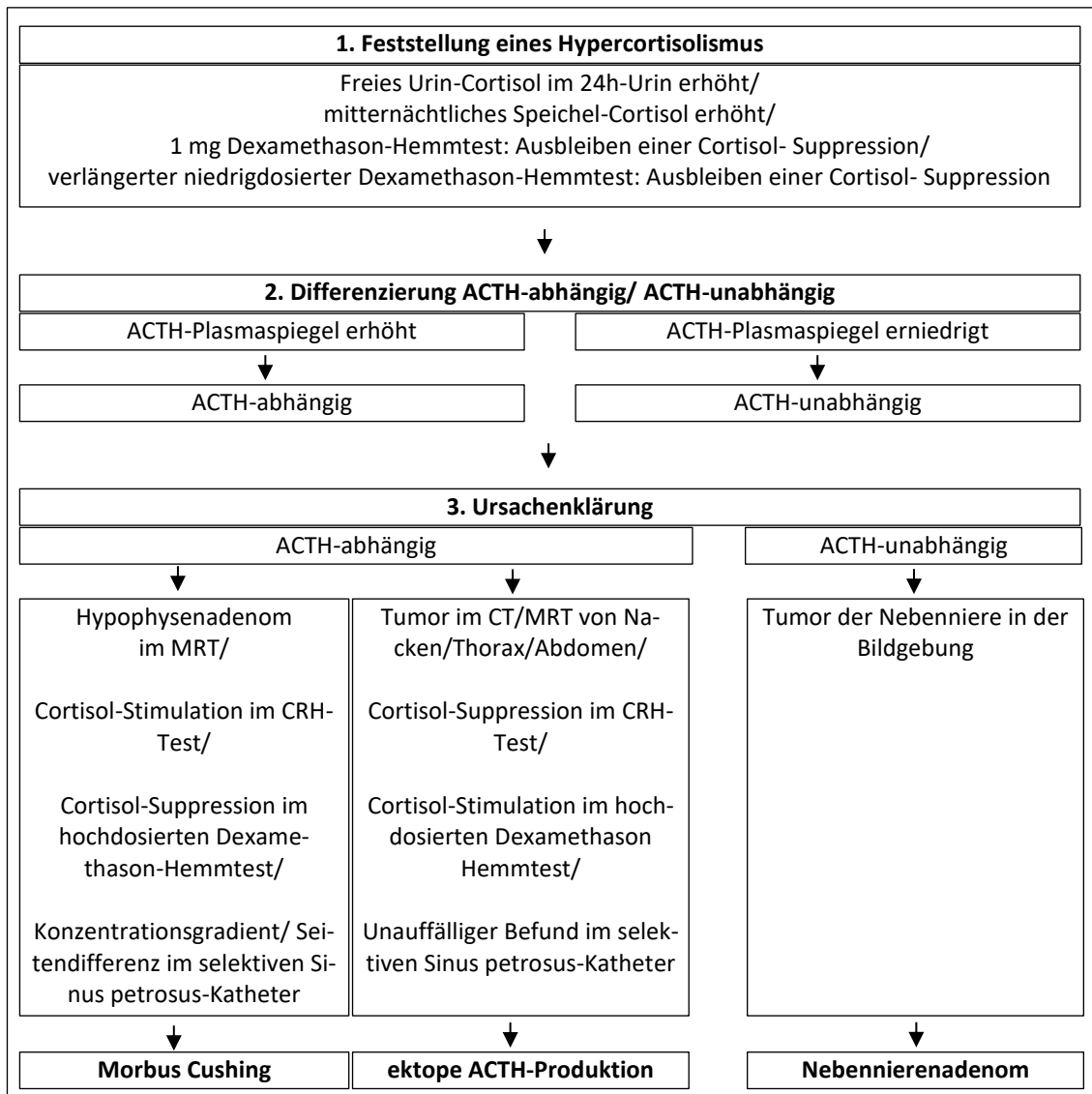
Die Symptome eines Hypercortisolismus sind entsprechend der Wirkung des Cortisols sehr vielfältig und können in ihrer Ausprägung variieren. Zu den typischen Symptomen zählen Merkmale des äußeren Erscheinungsbildes, wie Stammfettsucht, ein „Mondgesicht“, ein „Stiernacken“, proximaler Muskelschwund, Hirsutismus und Zeichen der Haut, wie Striae rubrae, Akne und/oder atrophische Haut. Darüber hinaus können PatientInnen mit einem Cushing Syndrom unter gonadaler Dysfunktion und unregelmäßiger Menstruation, Infertilität und/oder Impotenz leiden. Bei Kindern kann es zudem zu einer Wachstumsverzögerung und/oder einer Verzögerung des Eintritts in die Pubertät kommen. Ein chronisch erhöhter Cortisol-Spiegel kann außerdem zu Stimmungsveränderungen, Depression, Infekthäufungen und Diabetes mellitus führen. Bereits nach leichtem Trauma können PatientInnen Hämatome ausbilden. Auch Osteoporose und Frakturen ohne adäquates Trauma zählen zu den typischen Symptomen. Zudem stellt ein Cushing Syndrom eine mögliche Ursache für eine arterielle Hypertonie dar.<sup>14-16</sup>

Die häufigste Ursache eines Cushing Syndroms ist eine erhöhte exogene Cortisol-Zufuhr<sup>15</sup>. Endogener Hypercortisolismus wird in ACTH-abhängige (70-80 %) und ACTH-unabhängige (20-30 %) Formen unterteilt<sup>14</sup>. Dem am häufigsten vorkommenden Morbus Cushing liegt ein ACTH-produzierendes Adenom der Hypophyse zugrunde<sup>14</sup>. Zusammen mit ektopen ACTH-produzierenden Tumoren (5-10 %) und einigen sehr seltenen Ursachen, wie CRH-produzierenden Tumoren, zählt der Morbus Cushing zur Gruppe der ACTH-abhängigen Formen<sup>14</sup>. Die häufigste Ursache eines ACTH-unabhängigen, endogenen Cushing Syndroms sind unilaterale Adenome der Nebenniere (10-22 %) <sup>14</sup>. Sehr viel seltener kommen auch Nebennierenkarzinome (5-7 %), bilaterale Adenome (1-2 %) oder makronoduläre Hyperplasien der Nebenniere (<2 %) vor<sup>14</sup>.

Diagnostisch sollte zuerst eine exogene Cortisol-Zufuhr ausgeschlossen werden. Anschließend gibt es zur Feststellung eines Hypercortisolismus vier laborchemische Tests. Es kann die Bestimmung des freien Urin-Cortisols im 24-Stunden-Urin oder eines mitternächtlichen Speichel-Cortisols erfolgen. Alternativ oder zusätzlich ist die Durchführung eines 1 mg Dexamethason-Hemmtests über Nacht oder eines verlängerten niedrigdosierten Dexamethason-Hemmtest möglich, bei dem 2 mg Dexamethason pro Tag über 48h verabreicht werden. Beide Tests funktionieren nach dem gleichen Prinzip. Beim Gesunden kommt es nach Gabe von Dexamethason in unphysiologisch hoher Dosis zu einer Suppression der ACTH-Ausschüttung. Dies hat wiederum eine verminderte Cortisol-Ausschüttung und einen entsprechend erniedrigten Cortisol-Plasmaspiegel zur Folge. Bleibt eine ACTH- und damit Cortisol-Suppression nach Dexamethason-Gabe aus, spricht dies für das Vorliegen eines Hypercortisolismus und der Test ist positiv.<sup>15</sup>

Im nächsten Schritt erfolgt die Differenzierung zwischen ACTH-abhängigem und -unabhängigem Cushing Syndrom. Hierfür wird der Plasma-ACTH-Spiegel bestimmt. Ist er erniedrigt, spricht dies für eine ACTH-unabhängige Form. In diesem Fall sollte eine Bildgebung der Nebennieren erfolgen. Ist der ACTH-Spiegel erhöht, ist das Vorliegen eines ACTH-abhängigen Cushing Syndroms wahrscheinlich. Es gilt eine weitere Differenzierung zwischen einem zentralen Morbus Cushing und einer ektopen ACTH-Produktion vorzunehmen. Hierfür stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Ein MRT der Hypophyse kann einen Hinweis auf ein Hypophysenadenom geben. Ein negatives MRT schließt ein Hypophysenadenom jedoch nicht aus. Zudem können inzidentelle Läsionen zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Neben der Bildgebung stehen zwei nicht-invasive Tests zur Verfügung. Beim CRH-Test wird den PatientInnen CRH verabreicht und geprüft, ob es daraufhin zu einem Anstieg des ACTH- und Cortisol-Spiegels kommt. Der hochdosierte Dexamethason-Hemmtest funktioniert ähnlich wie der niedrigdosierte Dexamethason-Hemmtest (s.o.), lediglich die Dexamethason-Dosis ist höher. Es wird kontrolliert, ob eine Suppression von ACTH/Cortisol wie beim Gesunden erfolgt oder ob diese ausbleibt. Bei Vorliegen eines zentralen Morbus Cushing kommt es in der Regel zu einer ACTH/Cortisol-Stimulation durch CRH-Gabe und einer Cortisol-Suppression im Rahmen des hochdosierten Dexamethason-Hemmtests, da die meisten Adenome eine gewisse Sensibilität für die Regulationsmechanismen behalten. Ein gegenteiliges Ergebnis spricht für das Vorliegen einer ektopen ACTH-Produktion. In diesem Fall sollte eine Bildgebung in Form einer CT oder MRT von Nacken, Thorax, Abdomen und Becken erfolgen. Als sicherstes Diagnostikum zur Unterscheidung sollte insbesondere bei diskordanten Ergebnissen der nicht-invasiven Tests eine bilaterale Katheterisierung des Sinus petrosus inferior (selektiver Sinus petrosus Katheter) erfolgen. Mit Hilfe des Katheters wird der zentrale ACTH-Spiegel bestimmt. Ein ACTH-Konzentrationsgradient zwischen Peripherie und

Sinus petrosus inferior spricht für einen zentralen Morbus Cushing. Diese Methode hat eine hohe Sensitivität und Spezifität und ist deshalb der Goldstandard zur Unterscheidung zwischen hypophysärer oder ektope ACTH-Produktion. Abb. 4 zeigt das diagnostische Vorgehen.<sup>14</sup>



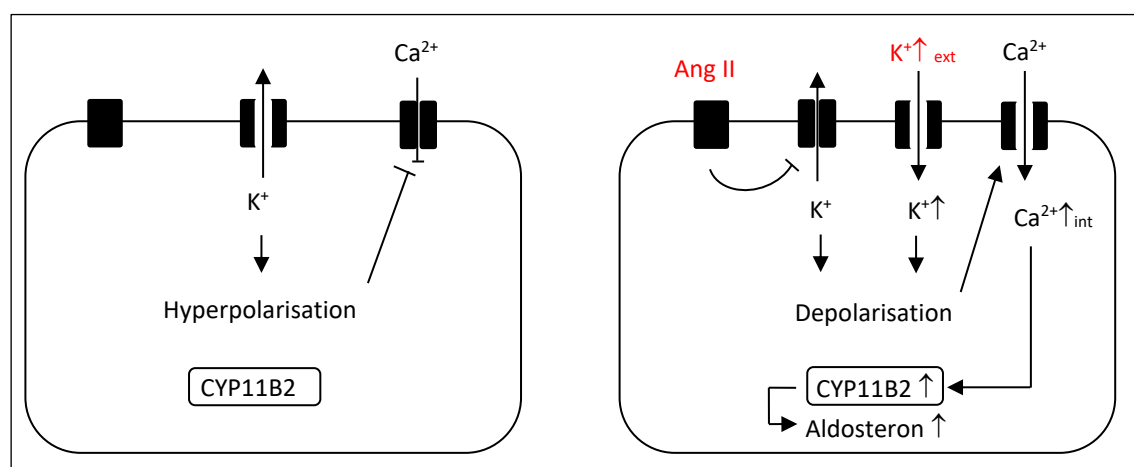
**Abb. 4: Diagnostisches Vorgehen bei V.a. Cushing Syndrom in Anlehnung an Lacroix et al.<sup>14</sup>**

Die Abbildung zeigt das diagnostische Vorgehen bei V.a. Cushing Syndrom. Um einen Hypercortisolismus laborchemisch nachzuweisen, können vier mögliche Tests durchgeführt werden. Ein Hypercortisolismus liegt vor bei erhöhtem freiem Cortisol im Urin, bei erhöhtem mitternächtlichem Speichel-Cortisol, sowie beim Ausbleiben einer Cortisol-Suppression nach Durchführung des 1 mg Dexamethason-Hemmtests oder des verlängerten niedrigdosiertem Dexamethason-Hemmtests. Wird ein Hypercortisolismus festgestellt, erfolgt anschließend die Differenzierung in ACTH-abhängig/ -unabhängig. Hierfür wird der ACTH-Plasmaspiegel bestimmt. Ist dieser erhöht, spricht dies für eine ACTH-abhängige Form des Cushing-Syndroms. Zur Differenzierung der Ursache in einen zentralen Morbus Cushing oder das Vorliegen einer ektope ACTH-Produktion erfolgen weitere Untersuchungen. Für das Vorliegen eines Morbus Cushing sprechen dabei die Darstellung eines Hypophysenadenoms im MRT, eine Cortisol-Stimulation nach Durchführung des CRH-Tests, sowie eine Cortisol-Suppression nach Durchführung des hochdosierten Dexamethason-Hemmtests und/oder eine Seitendifferenz oder ein Konzentrationsgradient zwischen zentralem und peripheren Cortisol-Spiegel bei Durchführung eines selektiven Sinus petrosus Katheters. Bei einer Cortisol-Suppression im CRH-Test bzw. einer Cortisol-Stimulation im hochdosiertem Dexamethason-Hemmtest, sollte eine Bildgebung von Nacken, Thorax, Abdomen und Becken erfolgen, um eine ektope ACTH-Produktion zu lokalisieren. Die häufigste Ursache eines ACTH-unabhängigen Cushing-Syndroms stellt ein Adenom der Nebenniere dar, welches mittels Bildgebung diagnostiziert werden kann. Abkürzungen: ACTH, Adrenocorticotropes Hormon

Die Therapie erfolgt in Abhängigkeit von der Ursache des Cushing-Syndroms. Im Falle eines Morbus Cushing ist die operative Entfernung des Hypophysenadenoms über einen transnasalen-transsphenoidalen Zugang die Therapie der Wahl.<sup>14</sup>

#### 1.4 Genetische Ursachen eines primären Hyperaldosteronismus

Verschiedene Ionenkanäle und -pumpen sind auf zellulärer Ebene an der Regulation der Aldosteron-Sekretion beteiligt. Durch eine Depolarisation der Zelle in der Zona glomerulosa der NNR kommt es zum Öffnen spannungsgesteuerter Calciumkanäle und zu einer gesteigerten intrazellulären Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Konzentration. Die beiden wichtigsten Stimuli dafür sind Angiotensin II und ein erhöhter extrazellulärer  $\text{K}^+$ -Spiegel. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg führt zu einer vermehrten Aldosteron-Synthese mittels der Aldosteron-Synthase (CYP11B2) und entsprechend zu einer erhöhten Aldosteron-Sekretion (Abb. 5).<sup>5</sup>



**Abb. 5: Modell der Aldosteron-Synthese in Anlehnung an Choi *et al.*<sup>17</sup>**

Die Abbildung zeigt links eine Glomerulosa-Zelle in der Abwesenheit von Stimuli. Geöffnete Kalium-Kanäle sorgen für einen Kalium-Ausstrom und ein stabiles hyperpolarisiertes Membranpotential. Rechts werden die Mechanismen in Anwesenheit der Stimuli Angiotensin II und/oder einer Hyperkaliämie gezeigt. Beide Stimuli führen zu einer Depolarisation der Zelle. Dies hat wiederum einen Calcium-Einstrom zur Folge, der zu einer Aktivierung der Aldosteron-Synthese führt. Abkürzungen: Ang II, Angiotensin II;  $\text{Ca}^{2+}$ , Calcium; CYP11B2, Aldosteron-Synthase; ext, extrazellulär; int., intrazellulär;  $\text{K}^+$ , Kalium

Verschiedene genetische Veränderungen greifen an unterschiedlichen Stellen in diese zellulären Mechanismen ein und führen zu einer vermehrten Aldosteron-Sekretion.<sup>18</sup>

Genetische Ursachen des primären Hyperaldosteronismus lassen sich in Keimbahnmutationen und somatische Mutationen unterteilen.<sup>19</sup>

##### 1.4.1 Somatische Mutationen als Ursache eines primären Hyperaldosteronismus

Aldosteron produzierende Adenome stellen mit 30-40 % die zweithäufigste Ursache eines primären Hyperaldosteronismus dar<sup>8,9</sup>. Die bislang größte Multicenter-Studie, die eine europäische Kohorte untersuchte, ergab, dass in ca. 54 % der Fälle eine somatische Mutation in einem der Gene *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1* oder *ATP2B3* vorhanden ist<sup>20</sup>. Weiterhin wurden in einigen APA somatische Mutationen in den Genen *CTNNB1* und *PRKACA* identifiziert, welche auch in Cortisol produzierenden Adenomen vorkommen<sup>21</sup>. Eine aktuelle Studie analysierte gezielt Tumo-

rareale, welche eine positive CYP11B2-Immunhistochemie verzeichneten und führte *Next Generation Sequencing* (NGS) durch, wobei ein Multigen-Panel sequenziert wurde, das die bekannten in APA mutierten Gene abdeckte<sup>22</sup>. Auf diese Weise wurde eine Prävalenz von ca. 88% der oben genannten Mutationen identifiziert. Die Autoren vermuteten daraufhin, dass die Prävalenz somatischer Mutationen in APA höher ist, als bislang angenommen, da vorherige Studien als Methode die Sanger Sequenzierung verwendeten und nicht immer die vollständigen Gene sequenziert wurden, was zu einer falsch niedrigen Prävalenz geführt haben könnte<sup>22</sup>. Vorherige Studien trafen die Auswahl des Gewebematerials zudem häufig anhand makroskopisch identifizierter Knötchen innerhalb der Adenome, anstelle anhand des Ergebnisses der CYP11B2-Immunhistochemie<sup>22</sup>. Eine Multicenter Studie, die die gleiche Methodik anwandte und die Prävalenz somatischer Mutationen in APA Schwarzer untersuchte, zeigte mit ca. 89% eine ähnlich hohe Prävalenz innerhalb dieser Kohorte<sup>23</sup>.

Mutationen in den Genen *ATP1A1* und *ATP2B3* kommen laut der oben genannten Multicenter-Studie in ca. 5,3 % bzw. 1,7 % der APA vor<sup>20</sup>. Auch die Prävalenz dieser Mutationen wurde jedoch bislang gegebenenfalls (ggf.) unterschätzt<sup>22</sup>. Nanba *et al.* identifizierten mittels neuer Methodik (s.o.) *ATP1A1*- und *ATP2B3*-Mutationen in 17 % bzw. 4 % der 75 sequenzierten APA<sup>22</sup>. Beide Gene kodieren für ATPasen und führen vermutlich über Depolarisation mittels Natriumeinstrom zu einem Calcium-Einstrom mittels spannungsabhängiger Calcium-Kanäle und folglich zu einer vermehrten Aldosteron-Sekretion (s.o.)<sup>18, 24, 25</sup>. *CTNNB1*-Mutationen wurden in ca. 4-5 % der APAs identifiziert<sup>26, 27</sup>. Das Gen kodiert für  $\beta$ -Catenin<sup>26, 27</sup>. Der genaue Pathomechanismus ist bislang ungeklärt<sup>26, 27</sup>. Dies gilt auch für Mutationen im *PRKACA*-Gen, welche bislang bei zwei PatientInnen mit APA identifiziert wurden<sup>28</sup>. *PRKACA* kodiert für die  $\alpha$ -Untereinheit der Protein Kinase A<sup>28</sup>. Kürzlich wurden zudem Mutationen in den Genen *CACNA1H* und *CLCN2* in einzelnen APA identifiziert<sup>29, 30</sup>. Beide Mutationen wurden zuvor nur bei Patienten mit einem familiärem Hyperaldosteronismus Typ II (*CLCN2*) bzw. IV (*CACNA1H*) festgestellt und werden an dieser Stelle (s.u.) näher erläutert<sup>29, 30</sup>.

Mutationen im *KCNJ5*-, *CACNA1D*-, *ATP1A1*- und *ATP2B3*-Gen konnten zudem in *aldosterone-producing cell clusters* (APCC) identifiziert werden<sup>31, 32</sup>. Diese stellen möglicherweise eine Vorstufe von APA dar, kommen jedoch auch in normalem Nebennierengewebe vor<sup>21</sup>. Es wird diskutiert, dass sie eine Rolle beim idiopathischen Hyperaldosteronismus spielen, welcher neben APA die häufigste Ursache eines PA darstellt<sup>32</sup>.

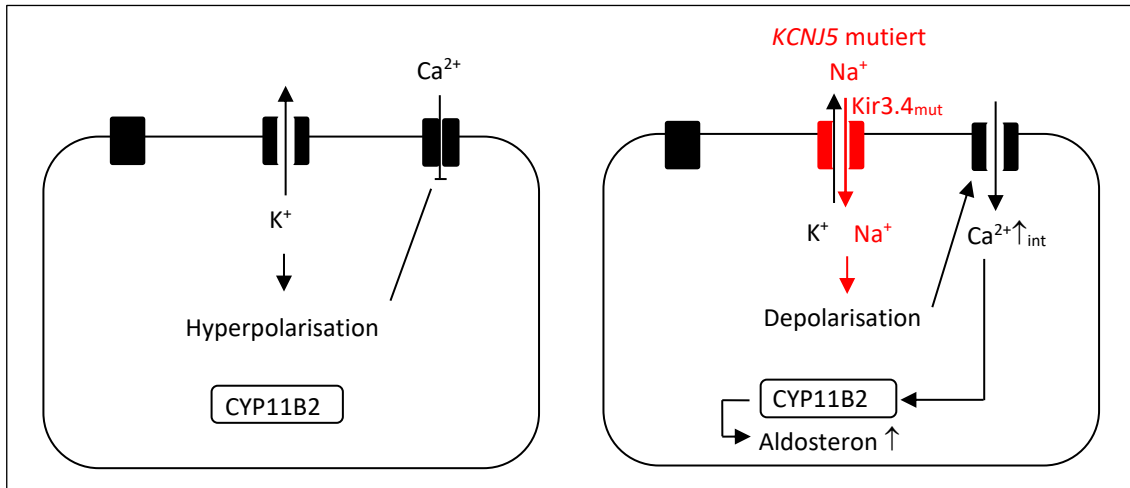
#### 1.4.2 Somatische *KCNJ5*-Mutationen

Mit einer Prävalenz von ca. 43 % sind somatische Mutationen im *KCNJ5*-Gen die mit Abstand häufigsten in APA vorkommenden Mutationen. Dabei ist die Prävalenz in Asien mit ca. 63% höher als in Europa, den USA und Australien (ca. 35 %).<sup>33</sup>

Eine Meta-Analyse aus dem Jahr 2015 zeigte, dass PatientInnen mit einer *KCNJ5*-Mutation im Schnitt jünger und häufiger weiblich sind<sup>33</sup>. Zudem verzeichneten sie im Mittel höhere Aldosteron-Plasmaspiegel und einen größeren Tumordurchmesser<sup>33</sup>. In einer kürzlich publizierten Studie fanden sich Hinweise, dass das Vorhandensein von *KCNJ5*-Mutationen positiv mit einer Remission der Hypertonie nach Operation assoziiert ist<sup>34</sup>.

Das *KCNJ5*-Gen kodiert für den einwärts-gleichrichtenden Kalium-Kanal Kir3.4<sup>35</sup>. Erstmals beschrieben wurden die heterozygoten *Gain-of-function*-Mutationen G151R und L168R im Jahr

2011 von Choi *et al.*<sup>17</sup>. Beide Mutationen befinden sich innerhalb oder in der Nähe des GYG-Motivs des Selektivitätsfilters<sup>17</sup>. Eine Expression der mutierten Kanäle in 293T-Zellen zeigte eine erhöhte Natrium-Leitfähigkeit, was einen Selektivitätsverlust der mutierten Kir3.4-Kanäle widerspiegelt<sup>17</sup>. In Folge kommt es zu einer Depolarisation der Zelle<sup>17</sup>. Durch Depolarisation aktivierte spannungsabhängige Calcium-Kanäle bewirken einen erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt, welcher wiederum zu einer vermehrten Aldosteronsynthese und -sekretion führt (Abb. 6)<sup>17</sup>.



**Abb. 6: Modell der Aldosteron-Synthese in Zellen mit *KCNJ5*-Mutation in Anlehnung an Choi *et al.*<sup>17</sup>** Die Abbildung zeigt links erneut den physiologischen Ruhezustand der Glomerulosa Zelle. Das Membranpotential ist hyperpolarisiert, spannungsabhängige Calcium-Kanäle sind geschlossen. (s. Abb. 5) Rechts wird gezeigt, wie *KCNJ5*-mutierte Kanäle durch einen Selektivitätsverlust zu einem Natrium-Einstrom und dadurch zu einer Depolarisation führen. Diese hat wiederum einen Calcium-Einstrom und eine vermehrte Aldosteron-Synthese zur Folge. Abkürzungen:  $\text{Ca}^{2+}$ , Calcium; CYP11B2, Aldosteron-Synthase; int., intrazellulär;  $\text{K}^+$ , Kalium;  $\text{Na}^+$ , Natrium

Die Mutationen G151R und L168R sind mit ca. 63 % und ca. 36 % die am häufigsten vorkommenden Mutationen im *KCNJ5*-Gen Aldosteron produzierender Adenome<sup>18,20</sup>. Zudem wurde eine Reihe weiterer somatischer Mutationen im *KCNJ5*-Gen, meist innerhalb oder in der Nähe des Selektivitätsfilters identifiziert<sup>18,21</sup>.

Neben somatischen Mutationen wurden außerdem einige Keimbahnmutationen im *KCNJ5*-Gen bei PatientInnen mit primärem Hyperaldosteronismus gefunden (s.u.).

### 1.4.3 Somatische *CACNA1D*-Mutationen

Im Jahr 2013 identifizierten zwei Arbeitsgruppen (Scholl *et al.* und Azizan *et al.*) erstmals somatische *Gain-of-function*-Mutationen im *CACNA1D*-Gen in APA<sup>24,36</sup>. Scholl *et al.* beschrieben zudem *CACNA1D*-Keimbahnmutationen bei zwei Kindern mit PA (s.u.)<sup>36</sup>. In sieben von 64 APA identifizierten sie die somatischen Mutationen G403R (4x), I770M (1x), P767V (1x) und V1373M (1x)<sup>36</sup>. Azizan *et al.* detektierten insgesamt zwölf *CACNA1D*-Mutationen<sup>24</sup>. Fünf davon wurden in einer Kohorte bestehend aus zehn Glomerulosa-Zell-ähnlichen APA detektiert, weitere sieben in einer Kohorte von 142 APA<sup>24</sup>. Von insgesamt sieben unterschiedlichen Mutationen waren G403R, I750M (entspricht I770M nach Scholl *et al.*, da unterschiedliche Referenzsequenzen verwendet wurden<sup>20</sup>), P1336R, V259D und F747L in jeweils zwei Adenomen vorhanden<sup>24</sup>. Mittlerweile wurde eine Reihe weiterer *CACNA1D*-Mutationen identifiziert<sup>20,23,37</sup>.

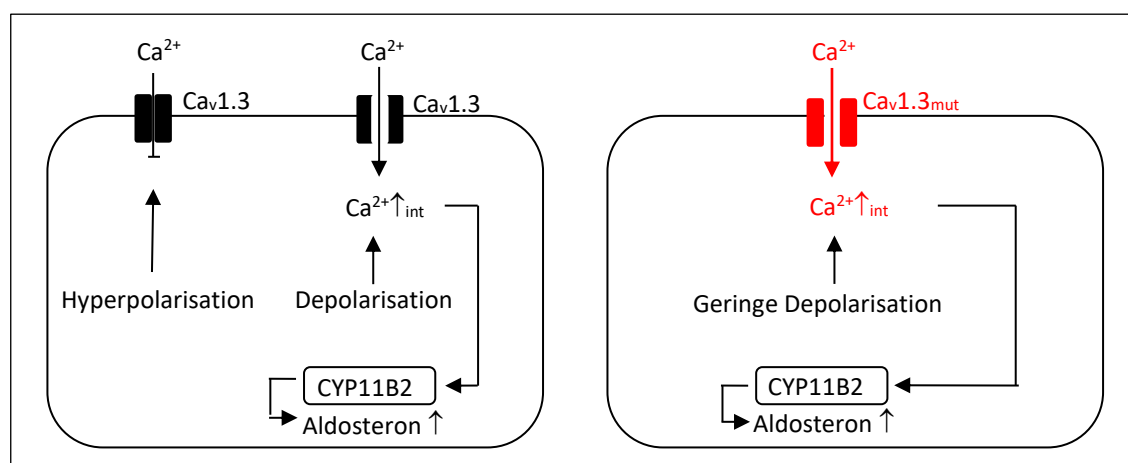


Die bislang größte Multicenter-Studie für die Prävalenz somatischer Mutationen in APA wies in einer europäischen Kohorte mit 474 PatientInnen eine Prävalenz von ca. 9 % für somatische Mutationen im *CACNAID*-Gen nach<sup>20</sup>. Demnach stellt *CACNAID* die zweithäufigste Gruppe von Mutationen in APA dar<sup>20</sup>. Auch hier geht man mittlerweile jedoch von einer höheren Prävalenz aus<sup>22</sup>. Nanba *et al.* identifizierten mittels einer neuer Methodik (s.o.) *CACNAID*-Mutationen in 21 % der 75 untersuchten APA<sup>22</sup>. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigte außerdem eine wesentlich höhere Prävalenz von ca. 42 % in APA in einer Kohorte Schwarzer<sup>23</sup>.

Auch in APCC bei PatientInnen mit idiopathischem Hyperaldosteronismus wurden *CACNAID*-Mutationen mit einer Prävalenz von ca. 58 % identifiziert.<sup>32</sup>

Adenome mit Mutationen im *CACNAID*-Gen verzeichnen in der Regel einen kleineren Tumordurchmesser im Vergleich zu solchen mit anderen Mutationen.<sup>20</sup>

*CACNAID* kodiert für die  $\alpha_1$ -Untereinheit des L-Typ spannungsabhängigen Calcium-Kanals  $Ca_v1.3$ <sup>24, 36</sup>. Die  $\alpha_1$ -Untereinheit ist porenbildend und besteht aus vier sich wiederholenden Domänen, welche sich wiederum aus jeweils sechs Transmembransegmenten (S1-S6) zusammensetzen<sup>36, 38</sup>. Die mehrfach detektierten Mutationen I770M und G403R befinden sich in ähnlichen Positionen in den S6-Segmenten der Domänen I und II<sup>36</sup>. Diese Domänen sind dafür bekannt, dass sie das Aktivierungsgate bilden<sup>24</sup>. In funktionellen Studien zeigten mutierte Kanäle einen maximalen  $Ca^{2+}$ -Einstrom bereits bei einem geringeren Grad an Depolarisation<sup>36</sup>. Bei Kanälen mit G403R Mutation kam es zudem zu einer verminderten Inaktivierung, wohingegen I770M mutierte Kanäle ein stärker hyperpolarisiertes Membranpotential zur Inaktivierung benötigten<sup>36</sup>. Andere Mutationen zeigten ähnliche Veränderungen in der Steuerung des  $Ca_v1.3$ -Kanals<sup>24</sup>. Folge des vermehrten und verlängerten  $Ca^{2+}$ -Einstroms ist, wie oben beschrieben, eine Steigerung der Aldosteron-Synthese (Abb. 7).



**Abb. 7: Modell der Aldosteron-Synthese in Zellen mit *CACNAID*-Mutationen entsprechend Scholl *et al.*<sup>36</sup>**

Die Abbildung zeigt links die normale Regulation des spannungsgesteuerten  $Ca_v1.3$ -Kanals. Bei Hyperpolarisation ist der Kanal inaktiviert. Depolarisation aktiviert den Kanal, was zu einem  $Ca^{2+}$ -Einstrom und Anstieg des intrazellulären Calciums führt. In Folge kommt es zu einer vermehrten Aldosteron-Synthese. Rechts wird gezeigt, dass Mutationen im *CACNAID*-Gen zu einem erhöhten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Gehalt und somit zu einer verstärkten Aldosteron-Synthese führen. Mutierte Kanäle werden bereits bei geringer Depolarisation aktiviert. Zudem ist die Inaktivierung vermindert (G403R), bzw. findet erst bei verstärkter Hyperpolarisation statt (I770M). Abkürzungen:  $Ca^{2+}$ , Calcium; CYP11B2, Aldosteron-Synthase; int., intrazellulär

#### 1.4.4 Keimbahnmutationen bei PatientInnen mit primären Hyperaldosteronismus

Man unterscheidet erbliche und sporadische Keimbahnmutationen. Erbliche Keimbahnmutationen werden zur Gruppe des Familiären Hyperaldosteronismus (FH) zusammengefasst und in vier Typen (FH Typ I-IV) unterteilt<sup>19, 39, 40</sup>. Studien gehen von einer Prävalenz von bis zu 6% (allerdings bei Einschluss von Familien ohne bekannte Mutation und sehr weit gefassten Kriterien) aus<sup>41</sup>.

Beim FH Typ I kommt es zu einer chimären Fusion der Gene *CYP11B1* (11- $\beta$ -Hydroxylase) und *CYP11B2* (Aldosteron-Synthase). Die 11- $\beta$ -Hydroxylase ist an der Cortisol-Produktion beteiligt und wird durch ACTH reguliert. Durch die chimäre Fusion der Gene wirkt ACTH stimulierend auf die Aldosteron-Synthase und führt zu einer vermehrten Aldosteronproduktion. Eine Suppression von ACTH durch Gabe von niedrig-dosiertem Dexamethason oder die Gabe von Mineralocorticoid-Antagonisten sind die Therapien der Wahl. Aus diesem Grund wird FH Typ I auch als Glucocorticoid-supprimierbarer Hyperaldosteronismus (GSH) bezeichnet.<sup>42</sup>

Dem Typ II des FH liegt, wie erst kürzlich entdeckt, eine Mutation im *CLCN2*-Gen zugrunde. Diese bewirkt eine Veränderung im ClC-2-Kanal und führt durch einen Chlorid (Cl<sup>-</sup>)-Ausstrom zu einer Depolarisation der Zelle. Dies führt zu einem intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Anstieg und einer gesteigerten Aldosteron-Synthese (s.o.).<sup>43, 44</sup>

Ursache für den Typ III des FH ist eine Mutation im *KCNJ5*-Gen. (s.u.)

Beim FH Typ IV liegt eine Mutation im *CACNA1H*-Gen vor, die zu einer Veränderung in der Ca<sub>v</sub>3.2-Untereinheit des T-Typ Calcium-Kanals führt. Dadurch kommt es zu einem erhöhten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und einer gesteigerten Aldosteron-Synthese.<sup>45</sup>

Neben den Formen des FH sind zudem sporadische Keimbahnmutationen im *CACNA1D*- (s.u.) und *ARMC5*-Gen, welches für einen Apoptose-Regulator kodiert, identifiziert worden. *ARMC5*-Mutationen wurden zudem bei PatientInnen mit bilateraler makronodulärer Nebennierenhyperplasie und Cushing Syndrom gefunden. Die genaue Rolle von *ARMC5*-Mutationen bei der Entstehung von PA ist bislang unklar.<sup>36, 40, 46</sup>

#### 1.4.5 Keimbahnmutationen im *KCNJ5*-Gen

Der Begriff FH Typ III fasst alle Fälle von primärem Hyperaldosteronismus zusammen, bei denen *KCNJ5*-Keimbahnmutationen vorkommen<sup>39</sup>. Erstmals identifizierten Choi *et al.* die Mutation T158A in einer Familie, in der ein Vater und zwei Töchter im Alter zwischen vier und sieben Jahren mit PA, schwerer Hypertonie und massiver Hyperplasie der Nebennieren diagnostiziert wurden<sup>17</sup>. Funktionelle Studien ergaben, dass auch diese Mutation zu einem Selektivitätsverlust der Kir3.4-Kanals (s.o.), einer Depolarisation und letztlich zu einer erhöhten Aldosteron-Synthese führt<sup>17</sup>. Im Verlauf wurden weitere Keimbahnmutationen, unter anderem G151R, teils vererbt, teils *de-novo* identifiziert<sup>39, 40</sup>. Mutationen, die auch in APA gefunden wurden, waren bis auf eine Ausnahme mit therapieresistentem Hyperaldosteronismus und massiver Hyperplasie der Nebenniere assoziiert<sup>39, 40</sup>. Mutationen wie G151E, welche bislang nur als Keimbahnmutation identifiziert wurde, zeigten keine Assoziation mit einer Hyperplasie der Nebennieren und sprachen auf eine Therapie mit Aldosteronantagonisten an<sup>39, 40</sup>.

#### 1.4.6 Keimbahnmutationen im *CACNA1D*-Gen

Auch im *CACNA1D*-Gen wurden Keimbahnmutationen in zwei Fällen identifiziert<sup>36</sup>. Beide Male handelte es sich um *de-novo* Mutationen<sup>36</sup>. Identifiziert wurde einmal die Mutation I770M, welche auch in APA vorkommt und einmal die Mutation G403D<sup>36</sup>. Die Erkrankung der zwei Mädchen wurden von den Autoren als *Primary Aldosteronism with Seizures and Neurologic Abnormalities* (PASNA), auch als Primärer Hyperaldosteronismus mit Krampfanfällen und neurologischen Anomalien beschrieben<sup>36, 39, 40</sup>. Mutierte Ca<sub>v</sub>1.3-Kanäle führen über einen erhöhten Calcium-Einstrom zu einer vermehrten Aldosteron-Sekretion in der Nebenniere (s.o.)<sup>36</sup>. Ein Vorkommen von mutierten Ca<sub>v</sub>1.3-Kanäle im Gehirn könnte eine gestörte neuronale Calcium-Signalkaskade und damit zusammenhängende neurologische Symptome erklären<sup>39</sup>.

#### 1.5 Genetische Ursachen eines Morbus Cushing

Bis vor kurzem war die genetische Basis von Morbus Cushing im Wesentlichen unklar. Verschiedene Gene und Proteine wurden identifiziert, die insbesondere einen Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus, die POMC-Transkription, sowie die ACTH-Synthese und -Sekretion in der Hypophyse haben. Viele davon sind in corticotropen Adenomen bei Morbus Cushing dereguliert. Betroffen sind unter anderem *Cyclin-dependent kinase* (CDK)-Inhibitoren, wie p27, sowie verschiedene Wachstumsfaktoren bzw. ihre Rezeptoren, wie der *Epithelial growth factor receptor* (EGFR).<sup>47, 48</sup>

Während nur einige seltene Keimbahnmutationen bei PatientInnen mit Morbus Cushing bislang identifiziert werden konnten, wurden kürzlich erstmals rekurrente somatische Mutationen corticotroper Adenome im *Ubiquitin-specific protease 8* (*USP8*)-Gen in ca. 35-60 % und seltener in den Genen *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B* (*BRAF*) und *Ubiquitin-specific protease 48* (*USP48*) detektiert.<sup>49-51</sup>

##### 1.5.1 Somatische *USP8*-Mutationen

2015 identifizierten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander somatische Mutationen im *USP8*-Gen<sup>49, 50</sup>. Reincke *et al.* führten Exomsequenzierungen von zehn Tumor- und zugehörigen Keimbahn-DNA-Proben von PatientInnen mit Morbus Cushing durch und detektierten darunter viermal eine somatische Mutation im *USP8*-Gen<sup>50</sup>. Eine Sanger-Sequenzierung weiterer 43 Hypophysenadenome identifizierte weitere *USP8*-Mutationen in zwei von sieben corticotropen und keine in den nicht corticotropen Adenomen<sup>50</sup>. Somit beträgt die gesamte Mutationsfrequenz dieser Studie ca. 35% bei corticotropen Adenomen<sup>50</sup>. Insgesamt wurden eine Deletion (S718del), vier verschiedene Punktmutationen (S718P (2x), S718C, P720R) und eine Doppelmutation (L713R, T717C) detektiert<sup>50</sup>. Gleichzeitig identifizierten Ma *et al.* mittels Exomsequenzierung somatische Mutationen im *USP8*-Gen in drei von zwölf ACTH-produzierenden Adenomen innerhalb einer asiatischen Kohorte<sup>49</sup>. Eine Sequenzierung weiterer 258 Hypophysenadenome ermittelte *USP8*-Mutationen in 67 von 108 (62 %) ACTH-produzierenden Adenomen<sup>49</sup>. Unter den 17 verschiedenen Mutationen waren S718del (15x), S718P (13x) und P720R (24x) die mit Abstand am häufigsten vorkommenden<sup>49</sup>. *USP8*-Mutationen wurden ausschließlich in corticotropen Adenomen, nicht jedoch in nichtfunktionellen, somatotrophen, sowie Wachstumshormon- und

Prolaktin-produzierenden Hypophysenadenomen gefunden<sup>49, 50</sup>. Auffällig war, dass alle Mutationen in Exon 14 des *USP8*-Gens und damit zum Großteil innerhalb, teils in der Nähe der für das 14-3-3-Bindungsmotiv (s.u.) kodierenden Region lagen<sup>49, 50</sup>.

*USP8* kodiert für die Deubiquitinase *Ubiquitin specific protease 8* (*USP8*), auch bezeichnet als *Ubiquitin specific protease Y* (*UBPY*)<sup>52</sup>. Diese deubiquitiniert unter anderem EGFR und bewahrt diesen damit vor der Degradierung in den Lysosomen<sup>52</sup>. Bindet *USP8* 14-3-3, führt dies zu einer Inaktivierung der Deubiquitinase<sup>53</sup>. Mutationen im 14-3-3-Bindungsmotiv verhindern die 14-3-3-Bindung und haben somit eine verstärkte *USP8*-Aktivität zur Folge<sup>53</sup>. Funktionelle Studien konnten dies für die oben genannten *USP8*-Mutationen (*S718del*, *S718P*, *S718C*, *P720R*) bestätigen<sup>49, 50</sup>. Vermutlich kommt es durch verhinderte 14-3-3-Bindung zu einer proteolytischen Spaltung von *USP8* in seine katalytisch aktive Form<sup>50</sup>. Folglich führen die o.g. Mutationen zu einer verstärkten Deubiquitinierung von EGFR, was wiederum ein erhöhtes Level an EGFR in der Plasmamembran zur Folge hat<sup>49, 50</sup>. Ma *et al.* demonstrierten eine signifikant häufiger EGFR-positive immunhistochemische Färbung bei *USP8*-mutierten Tumoren im Vergleich zu WT<sup>49</sup>. Eine Stimulation von Zellen, die *USP8*-Mutanten exprimieren, mit *Epithelial growth factor* (*EGF*) zeigte eine vermehrte POMC-Promotor-Aktivität und -Transkription, sowie eine stärkere ACTH-Sekretion<sup>49, 50</sup>.

Eine im Juli 2019 veröffentlichte Studie stellt den oben vermuteten Pathomechanismus von *USP8*-Mutationen jedoch in Frage. Verschiedene Proteine, die dafür bekannt sind, dass sie bei PatientInnen mit Morbus Cushing dereguliert sind, wurden in Bezug auf den *USP8*-Mutationsstatus analysiert. Die EGFR-Expression war hier in *USP8*-mutierten Tumoren im Vergleich zu *USP8*-WT Tumoren verringert. Das Ergebnis zeigte darüber hinaus ein signifikant verringertes Vorkommen des CDK-Inhibitors p27, welcher auch mit einer verminderten *CABLES1* (*Cdk5 and ABL enzyme substrate 1*)-Expression in Verbindung gebracht wird (s.u.). Beide spielen eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Zudem konnte eine verstärkte Expression des Chaperons *heat shock protein 90* (*HSP90*) festgestellt werden, welches am korrekten Falten des Glucocorticoid-Rezeptors beteiligt ist. Außerdem verzeichnete die Studie ein vermehrtes Vorkommen von phosphoryliertem CREB (*cAMP response element-binding protein*), welches zu einer erhöhten POMC-Promotor-Aktivität führt und möglicherweise durch *USP8* reguliert wird. Alle diese Faktoren könnten eine Rolle für den Pathomechanismus von *USP8*-mutierten Tumoren spielen. Der genaue Pathomechanismus bleibt bislang also unklar.<sup>54</sup>

Weitere Studien führten gezielte Sequenzierungen von *USP8* Exon 14 durch und bestätigten das Vorhandensein somatischer *USP8*-Mutationen in corticotropen Adenomen mit einer Prävalenz von 36 % (48/134), 35 % (21/60), 31 % (13/42), 37 % (18/48), 24 % (22/92) und 23 % (17/75)<sup>54-59</sup>. Eine Studie, die Tumore von PatientInnen mit Nelson Syndrom (einer Komplikation nach bilateraler Adrenalektomie bei der es zum Wachstum eines corticotropen Adenoms kommt) sequenzierte, identifizierte auch hier *USP8*-Mutationen in 15 von 33 Tumoren (45 %)<sup>60</sup>. In elf stillen corticotropen Adenomen, die sich dadurch auszeichnen, dass sie klinisch inapparent sind, konnte eine Multicenterstudie keine *USP8*-Mutation ermitteln<sup>55</sup>.

Alle identifizierten Mutationen befanden sich innerhalb der Hotspot-Region, die für das 14-3-3-Bindungsmotiv kodiert (s.o.).<sup>49, 50, 55-59</sup>

Die meisten Studien zeigten, dass erwachsene PatientInnen mit *USP8*-Mutationen eher weiblich (ca. 85-100 %) und eher jünger sind<sup>49, 50, 55-59</sup>. Zudem wurden *USP8*-Mutationen in 31 % corticotroper Adenome von Kindern mit Morbus Cushing identifiziert<sup>57</sup>. Zum Teil waren *USP8*-Mutationen mit kleineren Tumoren (meist <0,5 cm, immer <2 cm) assoziiert<sup>49, 56</sup>. Innerhalb der Gruppe der Mikroadenome zeigte sich teilweise eine Assoziation von *USP8*-Mutationen mit einem größeren Tumordurchmesser<sup>55, 59</sup>. Bislang ermittelte keine Studie einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Invasivität der Adenome<sup>56, 57, 59</sup>.

Einige Studien untersuchten die biochemischen Parameter der PatientInnen mit Morbus Cushing in Abhängigkeit vom *USP8*-Mutationsstatus. Während verschiedene Studien keine unterschiedlichen ACTH-Plasmaspiegel feststellten, ermittelten Ma *et al.* höhere ACTH-Spiegel in *USP8*-Mutanten im Verhältnis zur Adenomgröße im Vergleich zu WT<sup>49, 50, 55, 57-59</sup>. Innerhalb der von Hayashi *et al.* beschriebenen Kohorte verzeichneten PatientInnen mit *USP8*-mutierten Adenomen signifikant niedrigere ACTH-Plasmaspiegel<sup>56</sup>. Keine Studie zeigte einen signifikanten Unterschied im Cortisol-Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom Mutationsstatus<sup>49, 55-59</sup>. In der von Albani *et al.* veröffentlichten Studie war das freie Cortisol im Urin bei *USP8*-positiven PatientInnen signifikant erhöht<sup>58</sup>. Zwei andere Studien zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf das freie Cortisol im Urin<sup>49, 57</sup>. Perez-Rivas *et al.* ermittelten, dass bei PatientInnen mit *USP8*-Mutation das postoperative freie Cortisol im Urin signifikant höher war als bei solchen mit WT-Tumoren<sup>55</sup>. Auch in Bezug auf diagnostische Tests waren die Ergebnisse verschiedener Studien inkongruent. Während Reincke *et al.* eine signifikant geringere Cortisol-Stimulation nach 1 mg Dexamethason-Hemmtest bei PatientInnen mit *USP8*-Mutationen verzeichneten, ermittelten Perez-Rivas *et al.* in ihrer Studie keinen signifikanten Unterschied bei dem Ergebnis dieses Tests, jedoch eine signifikant niedrigere Cortisol-Stimulation nach Durchführung des 8mg-Dexamethason-Hemmtests<sup>50, 55</sup>. Losa *et al.* ermittelten hingegen in einer Kohorte von 92 PatientInnen keine signifikanten Unterschiede der Ergebnisse des 8 mg Dexamethason-Hemmtest und des CRH-Tests, sowie des postoperativen ACTH- und Cortisol-Plasmaspiegels in Abhängigkeit vom *USP8*-Mutationsstatus<sup>59</sup>. Zusammenfassend lassen sich keine übereinstimmenden Ergebnisse ermitteln, die einen Zusammenhang zwischen dem *USP8*-Mutationsstatus und der endokrinologischen Diagnostik biochemischer Parameter aufweisen.

Andere Studien untersuchten den postoperativen Outcome der PatientInnen. Dabei ergaben zwei Studien, dass PatientInnen mit *USP8*-Mutation signifikant häufiger eine Remission verzeichneten als solche ohne Mutation (95 % vs. 54 % bzw. 100 % vs. 76 %)<sup>56, 59</sup>. Zwei andere Studien hingegen stellten keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Remission fest<sup>49, 58</sup>. PatientInnen mit WT-Tumoren hatten zudem ein signifikant höheres Risiko, postoperativ eine Nebennierenrindeninsuffizienz zu bekommen<sup>55</sup>. In der Kohorte von Perez-Rivas *et al.* war bei PatientInnen mit *USP8*-Mutation eine kürzere postoperative Glucocorticoid-Substitution notwendig<sup>59</sup>. Vier Studien untersuchten die Rezidiv-Häufigkeit in Abhängigkeit des *USP8*-Mutationsstatus. In zweien war kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen<sup>49, 59</sup>. Die beiden anderen Studien ergaben, dass PatientInnen mit *USP8*-mutierten Tumoren mit einer höheren Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv erleiden<sup>57, 58</sup>.

Eindeutige Aussagen zu klinischen Charakteristika und biochemischen Parametern von PatientInnen mit *USP8*-mutierten Hypophysenadenomen konnten demnach, abgesehen von einem vermehrten Vorkommen in weiblichen Patientinnen, bislang nicht getroffen werden.<sup>49, 50, 55-59</sup>

### 1.5.2 Somatische Mutationen im *USP48*- und *BRAF*-Gen

Eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2018 führte Exomsequenzierungen bei 22 *USP8*-WT corticotropen Hypophysenadenomen durch und identifizierte rekurrente Mutationen in den Genen *USP48* und *BRAF*. Gezielte Sequenzierungen weiterer *USP8*-WT Adenome ermittelten Mutationen im *USP48*- und *BRAF*-Gen mit einer Prävalenz von ca. 23 % (21/91) und 16,5 % (15/91). Wie auch die *USP8*-Mutationen wurden die beiden neuen Mutationen ausschließlich in corticotropen Adenomen detektiert. Funktionelle Studien zeigten, dass die identifizierte *BRAF*-Mutation V600E vermutlich mittels gesteigerter Phosphorylierung von Erk1/2 und den POMC-Transkriptions-Regulatoren *Nur77*, *c-jun* und *c-fos* zu einer erhöhten ACTH-Sekretion führt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die *USP48*-Mutationen M415I/V ebenfalls zu einer erhöhten POMC-Transkription führen. Die Autoren spekulieren, dass eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B, einem Promotor der POMC-Transkription, dem zugrunde liegt. Während *BRAF*-positive Tumore eine signifikante Korrelation mit höheren Plasma-ACTH- und Serum-Cortisol-Spiegeln im Vergleich zu *BRAF/USP48*-WT Adenomen zeigten, konnten keine weiteren signifikanten klinischen Korrelationen in Abhängigkeit vom *BRAF/USP48*-Mutationsstatus identifiziert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von *BRAF*-mutierten Tumorzellen mit dem *BRAF*-Inhibitor Vemurafenib zu einer Reduktion der ACTH-Sekretion führte.<sup>51</sup>

### 1.5.3 Keimbahnmutationen bei Morbus Cushing

Nur in seltenen Fällen ist Morbus Cushing mit genetischen familiären Syndromen assoziiert. Vereinzelt wurden Mutationen in Tumorsuppressor- und Onkogenen bei PatientInnen mit diesen Syndromen und einem Morbus Cushing identifiziert. Dazu zählen unter anderem McCune-Albright (*GNAS*), Multiple Endokrine Neoplasie (MEN) Typ 1 (*MEN1*), Typ 2A/B (*RET*), Typ 4 (*CDKN1B*), Carney Complex (*PRKARIA*), Tuberöse Sklerose (*TSC1/TSC2*) und *Familial isolated pituitary adenomas* (FIPA) (*AIP*). Auf Grund ihrer Seltenheit wird an dieser Stelle nicht näher auf die einzelnen Mutationen und Syndrome eingegangen.<sup>47</sup>

Kürzlich wurden außerdem bei vier Patientinnen mit Morbus Cushing, darunter zwei jungen Erwachsenen und zwei Kindern, heterozygote Punktmutation im *CABLESI*-Gen in der Keimbahn identifiziert<sup>61</sup>. *CABLESI* ist ein Tumorsuppressorgen, das den Zellzyklus negativ reguliert<sup>62</sup>. In corticotropen Adenomen bei Morbus Cushing wird es etwa in der Hälfte der Fälle nicht exprimiert<sup>62</sup>. Erst kürzlich wurde ihm eine Schlüsselrolle in der Regulation der negativen Rückkopplungsmechanismen von Glucocorticoiden auf corticotrope Zellen zugeschrieben<sup>62</sup>. Alle vier betroffenen Patientinnen waren weiblich und hatten große Adenome mit einer hohen Mitoserate<sup>61</sup>. Keines der vier Adenome wies eine somatische *USP8*-Mutation auf<sup>61</sup>. Funktionelle Studien zeigten, dass alle identifizierten *CABLESI*-Mutationen die Fähigkeit verloren, das Zellwachstum Glucocorticoid-abhängig zu hemmen<sup>61</sup>. Der genaue Pathomechanismus und die Rolle von Mutationen im *CABLESI*-Gen bei Morbus Cushing ist bislang unklar<sup>61</sup>.

## 1.6 Ziele der Arbeit

Teile dieser Arbeit wurden in der Arbeit Ballmann *et al.* 2018<sup>1</sup> veröffentlicht. In der folgenden Darstellung werden Teile aus der genannten Arbeit<sup>1</sup> in wörtlicher Übersetzung verwendet.

Aktuelle Studien haben verschiedene Mutationen identifiziert, die beim sekundären Bluthochdruck von Bedeutung sind. Hierzu zählen unter anderem *KCNJ5*- und *CACNAID*-Mutationen bei primärem Hyperaldosteronismus, sowie *USP8*-Mutationen bei Morbus Cushing.<sup>17, 36, 49, 50</sup>

Vorherige Arbeiten, die das Vorkommen von *USP8*-Mutationen in corticotropen Adenomen untersuchten, verwendeten vorwiegend frische, gefrorene Gewebeproben<sup>1, 49, 55-57</sup>. Es liegt jedoch nicht immer frisches gefrorenes Gewebe vor, insbesondere dann nicht, wenn es sich um sehr kleine Tumore handelt<sup>1</sup>. In diesem Fall wird oft das gesamte Gewebematerial in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet (FFPE) und ausschließlich für diagnostische Zwecke verwendet<sup>1</sup>. Dies kann möglicherweise zu einer Verzerrung der Studienergebnisse führen, weil ausschließlich größere Adenome einbezogen werden<sup>56</sup>. Mit dem Ziel, eine dadurch entstandene Verzerrung zu verhindern, wurden 42 FFPE-Gewebeproben von Hypophysenadenomen von PatientInnen mit einem Morbus Cushing sequenziert<sup>1</sup>.

In Bezug auf die Mutationen *KCNJ5* und *CACNAID*, ist es von Interesse den Pathomechanismus des verursachten Hyperaldosteronismus zu verstehen, um aus den gewonnenen Erkenntnissen bestenfalls therapeutische Optionen ableiten zu können. Hierfür sind Zellmodelle von großer Bedeutung. In dieser Arbeit wurden HAC15 Zellen verwendet. Sie entstammen einer Nebennierenkarzinom-Zelllinie, welche Aldosteron produziert und ACTH-, Angiotensin-II- und K<sup>+</sup>-empfindlich ist<sup>63</sup>. Sie bieten sich darum besonders gut an, die zellulären und molekularen Mechanismen und Einflüsse auf die Aldosteron-Produktion zu untersuchen<sup>63</sup>. Diese Arbeit hat das Ziel, die häufigste *KCNJ5*-Mutation G151R und die *CACNAID*-Mutation I770M, in Form heterozygoter Mutationen, wie sie *in vivo* in der Regel vorliegen, in das Genom von HAC15-Zellen zu integrieren. Das Einbringen genetischen Materials in das Genom von Zellen wird als *Genome Editing* bezeichnet. Es können unterschiedliche Methoden verwendet werden. In dieser Arbeit soll eine neue Methode, CRISPR/Cas9, eine *RNA-guided engineered nuclease* (RGEN), verwendet werden, deren genaue Funktionsweise im Methodenteil näher erklärt wird. Die Methode bietet den Vorteil, dass sie leicht zu designen und hoch spezifisch ist<sup>64</sup>. Sie ermöglicht die gezielte Veränderung des Genoms einer Vielzahl von Zelltypen<sup>64</sup>. Mittels CRISPR/Cas9 sollen die heterozygoten Knockin-Mutationen G151R und I770M in HAC15 Zellen erzeugt werden. Die entstandenen Zellmodelle sollen für Untersuchungen zellulärer und molekularer Mechanismen und das Testen von Therapeutika zur Verfügung gestellt werden.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Amaxa 4D Nucleofector	Lonza, Basel (CHE)
CTR500 Mikroskop	Leica, Wetzlar (D)
DFC 380 Kamera	Leica, Wetzlar (D)
Easypet Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf Research Plus Pipetten, Einkanal 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf Research Plus Pipetten, 8-Kanal 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Heracell 150 Brutschrank (für Zellen)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Heraeus Brutschrank B12 Function Line (für Bakterien)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Heraeus Hera Safe HS12 Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Heraeus Hera Safe KS18 Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
JuLi Br Live cell movie analyzer	NanoEnTek, Seoul (KOR)
Mastercycler flexid nexus SX 1(e)	Eppendorf, Hamburg (D)
Mikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss, Oberkochen (D)
Mikrowelle NN-E202-CB	Panasonic, Kadoma (J)
Mini SubCell GT Kammer	Bio-Rad, München (D)
MiSeq sequencer	Illumina, San Diego (US)
Molecular Imager ChemiDoc™XRS	Bio-Rad, München (D)
Nanodrop 2000c Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen (D)
Pharmacia™ Electrophoresis Power Supply EPS 600 GE	Healthcare Life Sciences, Freiburg (D)
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg (D)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York (US)
Wärmeschrank Modell 200 D06058	Memmert, Schwabach (D)
Wasserbad 1002	GFL, Burgwedel (D)
Wasserbad WB22	Memmert, Schwabach (D)
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Zentrifuge Heraeus Multifuge 4KR	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Zentrifuge Modell 5425	Eppendorf, Hamburg (D)
Zentrifuge Perfect Spin	PEQLAB, Erlangen (D)
Zentrifuge Rotixa/RP 4200 für Zellkultur	Hettich, Tuttlingen (D)
Zentrifuge Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf (D)

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

Aspirationspipette steril	Starstedt, Nümbrecht (D)
---------------------------	--------------------------



Biosphere Filter Tips	Starstedt, Nümbrecht (D)
0,5-20 µl, 2-100 µl, 2-200 µl und 100-1000 µl	
CellStar EASYstrainer™ 100 µm	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
CellStar Tubes, 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Corning Cell Culture Dish	Corning Life Science, Corning (US)
100mmx20mm, 150 mm x 25 mm	
Corning Costar Zellkultur-Multischalen	Corning Life Science, Corning (US)
6-Well, 12-Well, 24-Well	
Corning Costar Stripette 5, 10 und 25 ml	Corning Life Science, Corning (US)
Filter 0,45 mm Porengröße, non-pyrogenic, sterile	Starstedt, Nümbrecht (D)
Injekt 10 ml Luer Solo Spritzen	B.Braun, Melsungen (D)
JuLi Br Cell counting slide	NanoEnTek, Seoul (KOR)
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde (DNK)
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Nalgene, Rochester (US)
Multiply-PCR-Platte LP, transparent	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Multiply Pro Gefäße 0,5 ml (PCR)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Nunc EasYflask T25, T75	Nunc, Roskilde (DNK)
Opti-Seal Optical TM	Disposable Adhesive Bioplastics BV, Landgraaf, (NL)
Petrischalen 92x16 mm ohne Nocken	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Pipettenspitzen 20, 200 und 1000 ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Safe Lock Tubes 0,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Safe Seal Tubes 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Schutzgefäße 114x44 mm mit Schraubdeckel	Engelbrecht, Edermünde (D)
Scienceware Cloning Discs 3 mm	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Serologische Pipetten 5, 10 und 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)

### 2.3 Medien und Chemikalien für Molekularbiologische Versuche

Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Ampicillin Na-Salt	Serva, Heidelberg (D)
ATP, 10 mM	New England Biolabs, Ipswich (US)
Betain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
DTT, 10 mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Ethidiumbromidlösung 0,025 %	Carl Roth, Karlsruhe (D)
LB Broth Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
LB + Agar	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
S.O.C. Medium	Invitrogen, Carlsbad, (US)
1 kb plus DNA Ladder	Life Technologies, Darmstadt (D)

### 2.4 Enzyme

BmgBI	New England Biolabs, Ipswich (US=
Fast Digest BbsI	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
KasI	New England Biolabs, Ipswich (US)

Plasmidsafe ATP-Dependent DNase	Lucigen, Middleton (US)
T4 Polynucleotide Kinase	New England Biolabs, Ipswich (US)
T7 Ligase	Enzymatics, Beverly (US)

## 2.5 Kits

Amaza Cell Line Nucleofactor Kit R	Lonza, Basel (CHE)
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden (D)
KAPA2G Fast Hot Start PCR Kit	KapaBiosystems, Wilmington (US)
MiSeq Reagent Nano Kit version 2 for 300 cycles	Illumina, San Diego (US)
Nextera Index Kit	Illumina, San Diego (US)
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden (D)
REPLI-g FFPE Kit	Qiagen, Hilden (D)

## 2.6 Puffer

CutSmart Puffer	New England Biolabs, Ipswich (US)
Plasmidsafe Puffer, 10x	Lucigen, Middleton (US)
Puffer 3.1	New England Biolabs, Ipswich (US)
Tango buffer, 10x	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US) T4
Ligation Buffer, 10x	New England Biolabs, Ipswich (US)
1x TAE Puffer	0,8mM Tris Base
	0,4mM Essigsäure
	10mM EDTA pH 8,0
	titriert mit NaOH auf pH 8,0
5x DNA Ladepuffer	25% Ficoll 400
	25 mM EDTA
	0,1% Bromphenolblau

## 2.7 Bakterienstämme

One Shot Stbl3 Chemically Competent E.coli	Invitrogen, Carlsbad (US)
--	---------------------------

## 2.8 Zelllinien

HAC15 Zellen	Zur Verfügung gestellt durch William Rainey University of Michigan, Ann Arbor (US)
HEK293 Zellen	Zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Christoph Fahlke Forschungszentrum Jülich, Jülich (D)

## 2.9 Medien und Chemikalien für die Zellkultur

Antibiotic-Antimycotic	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
CCS	HyClone, South Logan (US)
DMEM/Hams F-12 GlutaMAX	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
FBS	Biochrom, Berlin (D)
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Insulin/Selenium/Transferrin	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Lipid Mixture	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen, Carlsbad (US)
Non-Essential Amino Acids	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Opti-MEM	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
PBS	Biochrom, Berlin (D)
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Puromycin Dihydrochloride	Life Technologies, Darmstadt (D)
Roxithromycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %)	Biochrom, Berlin (D)
Tryptanblau	NanoEnTek, Seoul (KOR)
Ultrosor G	Pall Life Sciences, Port Washington, (US)
VLE Dulbecco's MEM mit 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 4,5 g/l D-Glukose, stabilem Glutamin und NaPyruvat	Biochrom, Berlin (D)

## 2.10 Primer und Oligonukleotide

Alle Primer und Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei Eurofins Scientific (Luxemburg, LUX) bestellt.

Primer	Sequenz 5' > 3'	Produktgröße (bp)
USP8_F	AGCCACAGATTCCTGCTGAG	124
USP8_R	ACTGTTGGAGTTACTGTTGGCT	
U6-Fwd	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC	
J5cDNA_F	CGACCAAGAGTGGATTCCTT	234
J5cDNA_R	AGGGTCTCCGCTCTCTTCTT	
I770M_F	ATTGTTGGCCGCACGTAG	238
I770M_R	CAACTGTTGCAGGGCTCC	

**Tabelle 1: Primer zur Sanger Sequenzierung**

Primer	Sequenz 5' > 3'	Produktgröße (bp)
USP8big_F	AAAGCCAAGCCACAGATTCC	234
USP8big_R	TCCCTGACACTAACATACTGACA	
USP8bigadap_F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACA GAAAGCCAAGCCACAGATTCC	301
USP8bigadap_R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGAC AGTCCCTGACACTAACATACTGACA	

**Tabelle 2: Primer für das Next-Generation Sequencing**

Oligonukleotid	Sequenz 5' > 3'
sgKCNJ5_1F	CACCGACCGAAACAACCATTGGGTA
sgKCNJ5_1R	AAACTACCCAATGGTTGTTTCGGTC
sgKCNJ5_2F	CACCGGCCATACCCAATGGTTGTTT
sgKCNJ5_2R	AAACAAACAACCATTGGGTATGGCC
sgKCNJ5_3F	CACCGGACTCGGAAGCCATACCCAA
sgKCNJ5_3R	AAACTTGGGTATGGCTTCCGAGTCC
sgCACNAID_1F	CACCGAGCCAAATTGTCTACAGCGA
sgCACNAID_1R	AAACTCGCTGTAGACAATTTGGCTC
sgCACNAID_2F	CACCGGGCCATCGCTGTAGACAATT
sgCACNAID_2R	AAACAATTGTCTACAGCGATGGCCC
sgCACNAID_3F	CACCGTATTCTACTGAATGTCTTCT
sgCACNAID_3R	AAACAGAAGACATTCAGTAGAATAC

**Tabelle 3: sgRNAs**

Oligonukleotid	Sequenz 5' > 3'
templ <i>KCNJ5</i>	TTCGTGTCCGCTTTCCTGTTCTCCATTGAGACCGAAACAACCATTAGGTAT GGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTA
templ <i>CACNAID</i>	CCCTTAAAAAGTTGAAATTAGATATTCTACTGAATGTCTTCTTGCCATG GCTGTAGACAATTTGGCTGATGCTGAAAGTCTGAACACTGCTCAGAAA
templ- <i>KCNJ5</i> large <sup>a</sup>	CGACCAAGAGTGGATTCCCTTGTGTTGAAAACCTCAGTGGCTTCGTGTCCG CTTTCCTGTTCTCCATTGAGACCGAAACAACCATTAGGTATGGCTTCCGA GTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAGGGGATTATACTCCTCTTGTTCAGGC CATCCTGGGCTCCATCGTCAA
templ- <i>CACNAID</i> large <sup>a</sup>	TTGGCCGCACGTAGTTGCATTTAGTAGTGTGTTGTGCCCTTAAAAAGTTG AAATTAGATATTCTACTGAATGTCTTCTTGCCATGGCTGTAGACAATTTG GCTGATGCTGAAAGTCTGAACACTGCTCAGAAAGAAGAAGCGGAAGAAA AGGAGAGGAAAAAGATTGCCA
templ- <i>CACNAID_sil</i> <sup>a</sup>	TTGGCCGCACGTAGTTGCATTTAGTAGTGTGTTGTGCCCTTAAAAAGTTG AAATTAGATATTCTACTGAATGTCTTCTTGCTATGGCTGTAGACAATTTG GCTGATGCTGAAAGTCTGAACACTGCTCAGAAAGAAGAAGCGGAAGAAA AGGAGAGGAAAAAGATTGCCA

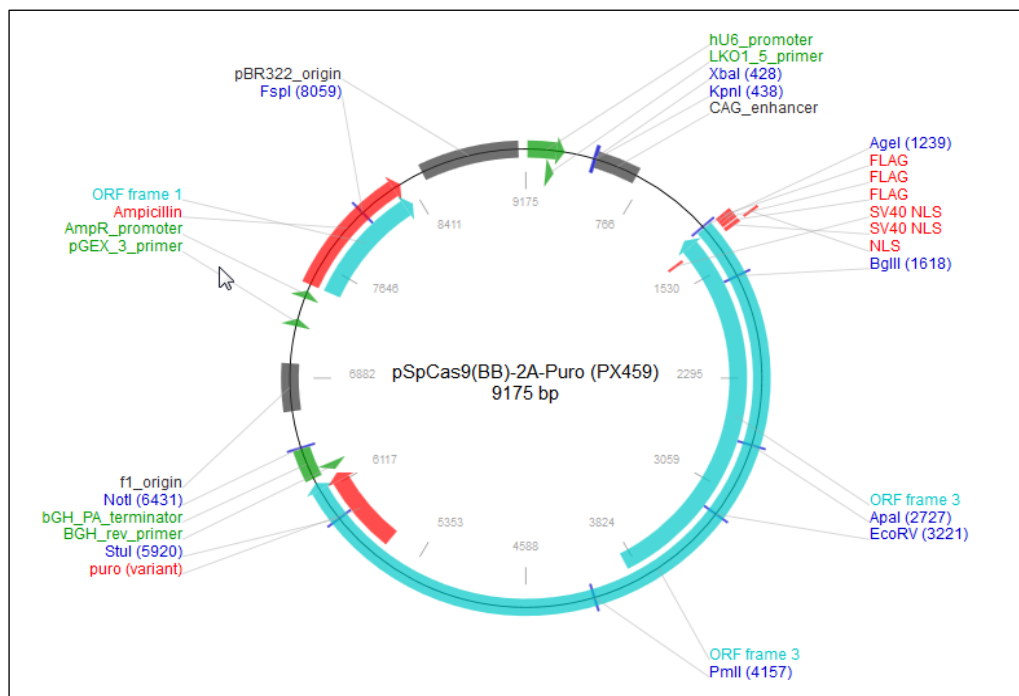
**Tabelle 4: Repair templates**

<sup>a</sup> Bestellung bei IDT, Coralville (US), Mutierte Basen werden **fett** dargestellt

## 2.11 Plasmide

pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)

Addgene, Cambridge (US)



**Abb. 8: Plasmidkarte pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)**

(<https://help.addgene.org/hc/en-us/articles/205432559-Plasmid-citations-in-future-publications>)

<b>Plasmid</b>	<b>Klonierungsstrategie</b>	<b>Insert mit Sequenz 5'&gt;3'</b>	<b>Produkt</b>
pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459)	BbsI	sg <i>KCNJ5</i> _1F CACCGACCGAAACAACCATTGGGTA sg <i>KCNJ5</i> _1R AAACTACCCAATGGTTGTTTCGGTC	pSpCas9 (BB)-2A-Puro_ <i>KCNJ5</i> 1
pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459)	BbsI	sg <i>KCNJ5</i> _2F CACCGGCCATACCCAATGGTTGTTT sg <i>KCNJ5</i> _2R AAACAAACAACCATTGGGTATGGCC	pSpCas9 (BB)-2A-Puro_ <i>KCNJ5</i> 2
pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459)	BbsI	sg <i>KCNJ5</i> _3F CACCGGACTCGGAAGCCATACCCAA sg <i>KCNJ5</i> _3R AAACTTGGGTATGGCTTCCGAGTCC	pSpCas9 (BB)-2A-Puro_ <i>KCNJ5</i> 3
pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459)	BbsI	sg <i>CACNAID</i> _1F CACCGAGCCAAATTGTCTACAGCGA sg <i>CACNAID</i> _1R AAACTCGCTGTAGACAATTTGGCTC	pSpCas9 (BB)-2A-Puro <i>CACNAID</i> 1
pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459)	BbsI	sg <i>CACNAID</i> _2F CACCGGGCCATCGCTGTAGACAATT sg <i>CACNAID</i> _2R AAACAATTGTCTACAGCGATGGCCC	pSpCas9 (BB)-2A-Puro <i>CACNAID</i> 2
pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459)	BbsI	sg <i>CACNAID</i> _3F CACCGTATTCTACTGAATGTCTTCT sg <i>CACNAID</i> _3R AAACAGAAGACATTCAGTAGAATAC	pSpCas9 (BB)-2A-Puro <i>CACNAID</i> 3

Tabelle 5: Plasmide mit Klonierungsstrategie und *insert*

## 2.12 Antikörper

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Firma</b>	<b>RRID</b>
EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor, c-erbB-1, HER1)	Zytomed Klon 2.1.E1, Maus monoklonal	1:1000	Zytomed Systems, Berlin (D)	AB: 2721106
Monoclonal Mouse Anti-Human EGFR	Klon E30, #M7239, Maus monoklonal	1:300	DAKO, Santa Clara (US)	AB: 2721108

Tabelle 6: Antikörper

**2.13 Software/Programme**

Sequencher Version 4.7. Software

SPSS Statistics 25

Image Lab™Software

CLC Genomic Workbench Version 9.5.1

Integrative Genomics Viewer version 2.3.88

Prism 7 Programm

Genecodes, Ann Arbor (US)

IBM, New York (US)

Bio-Rad, München (D)

Qiagen, Hilden (D)

Broad Institute, Cambridge (US)

GraphPad, San Diego (US)

### 3 Methoden

#### 3.1 **USP8-Mutationen in Hypophysenadenomen bei PatientInnen mit Morbus Cushing**

Sämtliche in diesem Teil der Arbeit dargestellten Methoden sind eine Anlehnung an die Veröffentlichung Ballmann *et al.* 2018<sup>1</sup>. Teile aus der genannten Arbeit<sup>1</sup> werden in der folgenden Darstellung in wörtlicher Übersetzung verwendet.

##### 3.1.1 **PatientInnen und klinische Daten**

Für die Studie wurden 42 Proben aus zwei Kohorten untersucht. Die zugehörigen Daten finden sich in Tabelle 16. 38 PatientInnen mit Morbus Cushing wurden zwischen 2008 und 2014 im Johannes Wesling Klinikum in Minden operiert. Die Proben der 38 PatientInnen sind mit HYP001 bis HYP047 gekennzeichnet. Fehlende Nummern spiegeln doppelte Proben oder solche wider, die kein Tumorgewebe enthielten. Die übrigen vier PatientInnen wurden zwischen 2009 und 2014 am Universitätsklinikum Düsseldorf operiert. Sie stellen die Proben HYP050 bis HYP055 dar. Letztere wurden in der Pathologie anhand der ACTH-Positivität ausgewählt und das klinische Erscheinungsbild wurde daraufhin auf einen Morbus Cushing geprüft. Proben, die nicht genügend Tumorgewebe enthielten, wurden nach Beurteilung eines erfahrenen Neuropathologen von der Studie ausgeschlossen.<sup>1</sup>

Morbus Cushing wurde anhand typischer Symptome und/oder der typischen Laborbefunde diagnostiziert. Typische Symptome eines Hypercortisolismus stellen u.a. Stammfettsucht, ein „Mondgesicht“, ein „Stiernacken“, arterielle Hypertonie, Muskelschwäche mit proximalem Muskelschwund, atrophische Haut, Striae rubrae, Neigung zur Hämatombildung nach nur leichtem Trauma, Hirsutismus, Akne, Stimmungsveränderungen, gonadale Dysfunktion mit unregelmäßiger Menstruation, Infertilität, Impotenz, sowie Osteoporose und Frakturen ohne adäquates Trauma dar. Als typische Laborbefunde bei Vorliegen eines Hypercortisolismus wurden erhöhtes freies Urin-Cortisol im 24-Stunden-Urin, ein positiver niedrigdosierter Dexamethason-Hemmtest und/oder erhöhtes mitternächtliches Speichel-Cortisol gewertet. Als Zeichen für das Vorliegen eines hypophysär-bedingten Morbus Cushing wurden zudem erhöhte Plasma-ACTH-Spiegel, ein positiver CRH-Test, ein negativer hochdosierter Dexamethason-Hemmtest und/oder erhöhte zentrale ACTH-Werte im Vergleich zur Peripherie bei Katheterisierung des Sinus Petrosus gewertet.<sup>1, 14, 16</sup>

Die Tumorgröße wurde mittels Schnittbildverfahren bestimmt. Die Größenermittlung von Tumoren, die im Schnittbildverfahren nicht darstellbar waren, erfolgte intraoperativ mittels Ultraschall oder anhand chirurgischer Beurteilung. Verzeichnet wurde der größte Durchmesser.<sup>1</sup>

In den meisten Fällen wurde eine Operation mit transsphenoidalem Zugang durchgeführt. In einem Fall (HYP003) fand eine frontoorbitale Kraniotomie statt, in einem weiteren (HYP017) wurde über einen erweiterten transsphenoidalen Zugang operiert.<sup>1</sup>

Alle Proben wurden unabhängig von mindestens zwei erfahrenen Neuropathologen, Frau Dr. med. Christiane B. Knobbe-Thomsen und Herrn Prof. Dr. med. Guido Reifenberger, beurteilt. In jedem Fall wurde die Diagnose eines ACTH-positiven Hypophysenadenoms gestellt. Zwei hormoninaktive Hypophysenadenome aus Düsseldorf, als HYP056 und HYP063 gekennzeichnet, wurden anhand der ACTH-positiven immunhistochemischen Reaktion ohne klinische oder biochemische Evidenz eines Hypercortisolismus diagnostiziert.<sup>1</sup>



### 3.1.2 Formelle Voraussetzungen

Von allen PatientInnen wurde eine Einverständniserklärung eingeholt. Molekular- und immun-histochemische Analysen des Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebes der Proben wurden nach positivem Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt (Studiennummer 4938).<sup>1</sup>

### 3.1.3 DNA Extraktion, Gelelektrophorese, Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sanger Sequenzierung

Zum Testen der Proben auf eine Mutation im Bereich der *USP8*-Gensequenz wurde aus FFPE Gewebe DNA isoliert und mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurde für die PCR-Produkte zunächst eine Sanger Sequenzierung durchgeführt.<sup>1</sup>

Verwendet wurden frisch angefertigte 10- $\mu$ m dicke Schnitte FFPE Gewebes, welche mittels Skalpell von Objektträgern abgeschabt wurden. Zur Gewinnung von DNA aus dem Gewebe wurde in den meisten Fällen mittels REPLI-g FFPE Kit entsprechend des Protokolls des Herstellers eine Genomamplifikation direkt vom FFPE Gewebe ohne eine vorherige Aufreinigung der DNA durchgeführt.<sup>1</sup>

FFPE-Gewebe hat den Nachteil, dass zum einen die DNA durch das Formaldehyd irreversibel geschädigt und fragmentiert wird und zum anderen oft nur sehr geringe Mengen an DNA zur Verfügung stehen<sup>65, 66</sup>. Die REPLI-g Methode ligiert die Fragmente und amplifiziert das Produkt anschließend mit einer bestimmten DNA-Polymerase, die sich durch eine hohe Prozessivität auszeichnet. Dadurch kommt es zu einer gleichmäßigen Amplifikation aller Abschnitte, trotz Fragmentierung der DNA. Diese Methode ist also besonders geeignet für kleine Mengen FFPE Gewebes und stellt auch hier ausreichende DNA-Mengen für weitere Analysen zur Verfügung.<sup>65</sup>

Bei großen Proben wurde die DNA mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit entsprechend des Protokolls des Herstellers extrahiert<sup>1</sup>.

Hierbei wird das Paraffin gelöst und entfernt. Weitere Zellbestandteile denaturieren und werden gewegewaschen. Anschließend werden durch Formaldehyd entstandene *crosslinks* entfernt. Zum Schluss wird die DNA an eine Membran gebunden, erneut gewaschen und liegt letztlich in aufgereinigter Form zur weiteren Analyse vor.<sup>66, 67</sup>

Zur Trennung und Identifikation der DNA-Fragmente erfolgte für alle Proben eine Gelelektrophorese. Hierfür wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet. Das Gel wurde durch das Aufkochen von 1x TAE Puffer und Agarose hergestellt und zur späteren Sichtbarmachung der DNA-Fragmente mittels UV-Licht mit 4 Tropfen/100 ml Ethidiumbromidlösung 0,025 % versetzt. Unter Zugabe von 5x Ladepuffer wurden die Proben und außerdem eine DNA-Leiter zum Größenabgleich der Fragmente in die Geltaschen pipettiert. Das Gel wurde mit 1x TAE Puffer überdeckt und die DNA-Fragmente bei 90 Volt über 30 min elektrophoretisch aufgetrennt. Wenn nicht anders vermerkt, wurde im Folgenden jede weitere Gelelektrophorese wie beschrieben durchgeführt. Die Auswertung aller Gele erfolgte mittels Molecular Imager ChemiDoc™XRS und der Image Lab™Software.<sup>1</sup>

Um die zu untersuchende Gensequenz, *USP8* Exon 14, zu amplifizieren, wurde eine PCR durchgeführt.<sup>1</sup>

Die PCR besteht im Wesentlichen aus drei Schritten. Zunächst kommt es durch Erhitzung zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge in ihre Einzelstränge. Im zweiten Schritt, dem *Annealing*,

lagern sich die Primer gezielt an die Matrize an. Im dritten Schritt, der Elongation, synthetisiert die DNA-Polymerase von den Primern ausgehend, unter Verwendung von Nukleosidtriphosphaten (dNTPs), komplementäre DNA-Stränge. Diese Schritte werden in einer Vielzahl von Zyklen wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Amplifikation der Gensequenz kommt.<sup>68, 69</sup>

Der PCR-Ansatz setzte sich je *template* wie folgt zusammen:

Menge (µl)	Komponente
9,00	Betain
9,78	ddH <sub>2</sub> O
9,00	Buffer A 5x
7,20	dNTP 1,25 mM
0,18	Polymerase (hot start, KAPA2G)
3,42	USP8_F Primer 4 µM
3,42	USP8_R Primer 4 µM
3,00	<i>template</i> ca. 10 ng
45	Gesamt

**Tabelle 7: PCR Ansatz USP8\_F und \_R, 45 µl**

Verwendet wurden die Primer USP8\_F und \_R (Tabelle 1) und das KAPA2G Fast Hot Start PCR Kit. Die PCR wurde nach folgendem *Step-Down*-Protokoll unter Verwendung des Mastercycler flexid nexus SX 1(e) durchgeführt.<sup>1</sup>

Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1x	Denaturierung	95 °C	3 min
3x	Denaturierung	95 °C	30 s
	<i>Annealing</i>	64 °C	30 s
	Elongation	72 °C	30 s
3x	Denaturierung	95 °C	30 s
	<i>Annealing</i>	62 °C	30 s
	Elongation	72 °C	30 s
3x	Denaturierung	95 °C	30 s
	<i>Annealing</i>	60 °C	30 s
	Elongation	72 °C	30 s
31x	Denaturierung	95 °C	30 s
	<i>Annealing</i>	58 °C	30 s
	Elongation	72 °C	30 s
1x	Elongation	72 °C	1 min
1x	Kühlung	4 °C	∞

**Tabelle 8: Step-Down-Protokoll PCR USP8\_F und \_R**

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese, wie oben beschrieben, aufgetrennt und nachgewiesen. In Fällen, in denen zusätzliche Banden sichtbar waren, wurden die Produkte mittels Molecular Imager ChemiDoc™XRS unter einer UV-Schutzplatte sichtbar gemacht und die

Banden mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde mittels QIAquick Gel Extraction Kit die DNA aus dem Gel extrahiert.<sup>1</sup>

Eine Sanger Sequenzierung von *USP8* Exon 14 erfolgte mittels der oben genannten Primer USP8\_F/R (Tabelle 1).<sup>1</sup>

Bei der Kettenabbruchmethode nach Sanger wird, ähnlich wie bei der PCR, ausgehend von einem Primer mit Hilfe der DNA-Polymerase ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert<sup>70</sup>. Im Unterschied zur PCR enthält der Reaktionsansatz dabei, neben den vier Nukleosidtriphosphaten (dNTPs), zudem Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) aller vier Basen<sup>70</sup>. Wird statt einem dNTP ein ddNTP eingebaut, kann die DNA-Polymerase den Strang nicht weiter verlängern, da das ddNTP keine 3' Hydroxylgruppe besitzt<sup>70</sup>. In diesem Fall kommt es zum Kettenabbruch<sup>70</sup>. Die ddNTPs sind zudem für jede Base mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert<sup>71</sup>. Es kommt zur Entstehung unterschiedlich langer Stränge, an deren Ende sich je ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP befindet<sup>71</sup>. Durch spätere Größenauftrennung der unterschiedlichen langen Ketten und Detektion der verschiedenen Floreszenzen kann daraus die Basensequenz abgeleitet werden<sup>71</sup>.

Die Aufreinigung der PCR und direkte bidirektionale Sanger Sequenzierung wurde durch die Einrichtung Genewiz Sequencing Service (Takeley, UK) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels Sequencher Version 4.7. Software analysiert. Wenn nicht anders erwähnt, gilt dies für alle weiteren Sanger Sequenzierungen.<sup>1</sup>

#### 3.1.4 Gezieltes *Next-Generation Sequencing* und Datenanalyse

*Next-Generation Sequencing* (NGS) ist ein Oberbegriff für verschiedene neuartige Methoden, deren Gemeinsamkeit es ist, dass sie innerhalb kurzer Zeit eine sehr große Menge an DNA-Amplifikationen und gleichzeitig eine entsprechend große Menge an Daten in Form von Sequenzen erzeugen. Dies ermöglicht es unter anderem auch Mutationen mit geringer Allelfrequenz zu identifizieren.<sup>72</sup>

In dieser Arbeit wurde *targeted Next-Generation Sequencing* nach der von Illumina verwendeten Methode des *Sequencing by Synthesis* durchgeführt. Diese lässt sich, wie auch alle anderen NGS Methoden, in verschiedene Schritte untergliedern. Im ersten Schritt werden die Proben für die Sequenzierung vorbereitet. Hierbei werden die PCR Produkte an beiden Enden mit einem unterschiedlichen Adapter versehen. Im zweiten Schritt werden Cluster generiert. Auf einer Flow Cell wird mittels Brückenamplifikation innerhalb kurzer Zeit für jedes Fragment ein Cluster bestehend aus einer Vielzahl klonaler Amplifikationen erzeugt. Dies ist durch Bindung der Adapter an auf der Flow Cell verankerten Oligonukleotiden möglich. In Schritt drei erfolgt die Sequenzierung. Diese findet während der Synthese durch die Polymerase - „*Sequencing by Synthesis*“ - statt. Der an das Nucleotid gebundene Fluoreszenzfarbstoff verhindert die weitere Amplifikation und wird nach der Aufnahme eines Bildes, dem die Sequenz entnommen werden kann, abgespalten, so dass das nächste Nucleotid binden kann. Sämtliche Fragmente werden parallel sequenziert. Schritt vier entspricht der Darstellung und Auswertung der Daten. Das Ergebnis der Sequenzierung sind eine Vielzahl von *reads* für alle Fragmente. Diese wurden in dieser Arbeit jeweils als *paired-end-reads*, also als Kombination aus *forward* und *reverse read*, sequenziert und dargestellt und können mit Hilfe verschiedener Programme ausgewertet werden.<sup>72, 73</sup>

In diesem Fall wurde gezieltes *Next-Generation Sequencing* von *USP8* Exon 14 mittels MiSeq sequencer für alle Proben, in denen mittels Sanger Sequenzierung keine Mutation detektiert wurde, sowie für eine Positivkontrolle durchgeführt. Hierfür wurden die Proben entsprechend des Protokolls des Herstellers vorbereitet. Zur Markierung der Proben wurde ein Barcoding durchgeführt, wofür das Nextera Index Kit verwendet wurde. Die Sequenzierung mittels MiSeq sequencer, welche 150 bp *paired-end reads* umfasst, wurde unter Verwendung des MiSeq Reagent Nano Kits version 2 for 300 cycles am Biologisch-Medizinischem Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.<sup>1</sup>

Zur Analyse der Daten wurden Fastq Dateien, welche den *base call*, sowie Informationen zur Qualität der *reads* enthalten, in Paaren in die CLC Genomic Workbench Version 9.5.1 geladen. Es erfolgte eine Zuordnung der Paare zur *USP8*-Referenz-Sequenz und eine anschließende Analyse der Daten unter Verwendung des *Low-frequency Variant Detection Tools*. Für eine zweite Beurteilung wurden die Daten entsprechend des *PCR Amplicon Workflow Guide* der Illumina MiSeq Reporter Software erneut analysiert. Mittels *Variant Caller* und Verwendung eines erstellten *sample sheets* wurde eine Reihe somatischer Varianten detektiert. Detektierte Einzelnukleotid-Polymorphismen wurden mittels Integrative Genomics Viewer version 2.3.88 beurteilt. Zur weiteren Analyse wurden Protein-verändernde Varianten mit einer Frequenz des selteneren Allels >2 % in den analysierten *reads* in der im Folgenden beschriebenen *hotspot area* (Aminosäure 713 bis 735 in NP\_005145.3<sup>74</sup>) extrahiert.<sup>1</sup>

### 3.1.5 Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie ist es möglich unter der Verwendung spezifischer Antikörper gezielt Strukturen innerhalb eines Gewebes sichtbar zu machen. Angefärbt wurde der EGF-Rezeptor. Für die Proben aus Minden wurde am Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universitätsklinik Essen eine immunhistochemische Färbung von EGFR (EGFR-Antikörper, Tabelle 6) durchgeführt. Für die Proben aus Düsseldorf erfolgte zunächst eine Antigendemaskierung, bevor eine EGFR-Immunhistochemie (Monoclonal Mouse Anti-Human EGFR, Tabelle 6) durchgeführt wurde. Eine Antikörper-Reaktion wurde mittels einer Positivkontrolle bestätigt. Bilder wurden mit einem CTR500 Mikroskop mit DFC 380 Kamera aufgenommen und von zwei erfahrenen Neuropathologen beurteilt.<sup>1</sup>

### 3.1.6 Statistische Analyse

Statistische Analysen wurden unter Verwendung des Prism 7 Programms und/oder des SPSS Statistics 25 Programms durchgeführt. Daten werden, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Normalverteilung wurde mittels des D'Agostino und Pearson Normalitätstests beurteilt. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden unter Verwendung der angegebenen statistischen Tests durchgeführt, und P-Werte <0,05 wurden als signifikante Unterschiede gewertet.<sup>1</sup>

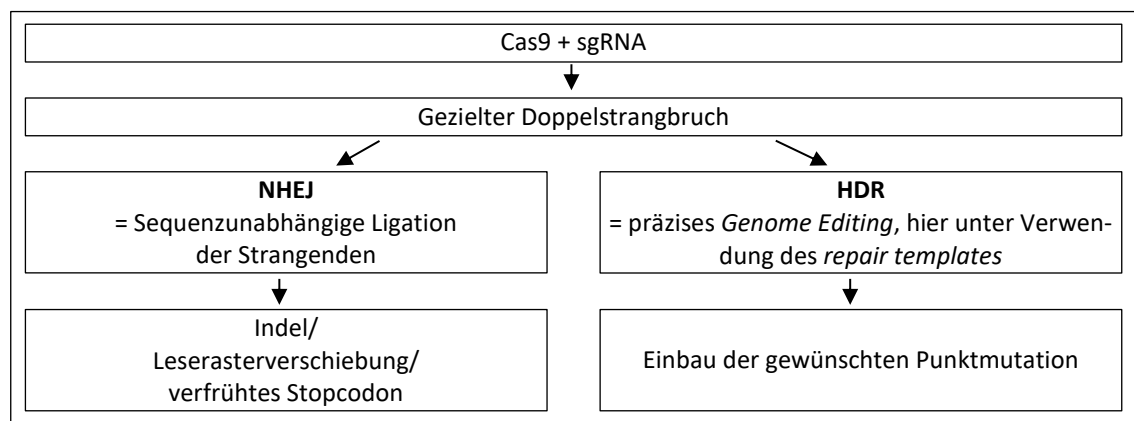
## 3.2 Genome Editing mittels CRISPR/Cas9 in HEK293 und HAC15 Zellen

Unter *Genome Editing* versteht man die gezielte Veränderung genetischen Materials. Mittels verschiedener Techniken kann DNA gezielt verändert werden. Als eine mögliche Methode dient CRISPR/Cas9, welche in dieser Arbeit verwendet wurde.<sup>75</sup>

CRISPR steht dabei für *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*, was sich wiederholende kurze Sequenzabschnitte beschreibt, die ursprünglich als Teil eines adaptiven Immunsystems verschiedener Bakterien entdeckt wurden. Zwischen diesen sich wiederholenden Sequenzabschnitten befinden sich sogenannte *spacer*. Dies sind Sequenzen, die komplementär zu Fremd-DNA sind. Sie können vom Bakterium eingebaut werden, wenn es zu einem Kontakt mit Fremd-DNA z.B. in Form eines Virus kommt. Im Folgenden entsteht durch Transkription der *spacer*-Sequenz eine RNA, welche in Kombination mit einem Cas (CRISPR *associated*) Protein bei erneutem Kontakt mit der Fremd-DNA einen Doppelstrangbruch erzeugt. Somit kommt es zu einer gezielten Abwehrreaktion.<sup>76-78</sup>

Es gibt verschiedene CRISPR Typen, auf welche an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll. In dieser Arbeit wurde mit dem CRISPR/Cas9-System gearbeitet, welches seinen Ursprung in *Streptococcus pyogenes* hat. Cas9 ist dabei die Nuklease, welche den Doppelstrangbruch (DSB) erzeugt. An welcher Stelle Cas9 schneidet, kann modifiziert werden. Eine 20 Basenpaar (bp) lange Sequenz in Form einer *Single Guide RNA* (sgRNA) wird dafür designt. Bedingung, damit es zum DSB kommt, ist, dass auf diese Sequenz unmittelbar das sogenannte *Protospacer Adjacent Motif* (PAM) folgt. Das PAM variiert je nach Bakterienart und enthält eine Sequenz, die im Genom des Bakteriums nicht vorkommt.<sup>64, 77</sup>

Doppelstrangbrüche werden von Zellen im Wesentlichen auf zwei verschiedene Arten repariert (Abb. 9). Häufiger kommt es zum *Non-homologous End Joining* (NHEJ), wobei Strangenden sequenzunabhängig zusammengefügt werden. Auf diese Weise können Insertionen/Deletionen (Indels) entstehen und somit zu Leserasterverschiebungen und verfrühten Stopcodons führen. Wesentlich seltener, aber präziser ist die Variante des *Homology-directed Repair* (HDR). Durch Zugabe eines *repair templates* können gezielt präzise Veränderungen wie Punktmutationen erzeugt werden. Somit ist es möglich unter Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems gezieltes *Genome Editing* durchzuführen.<sup>64</sup>

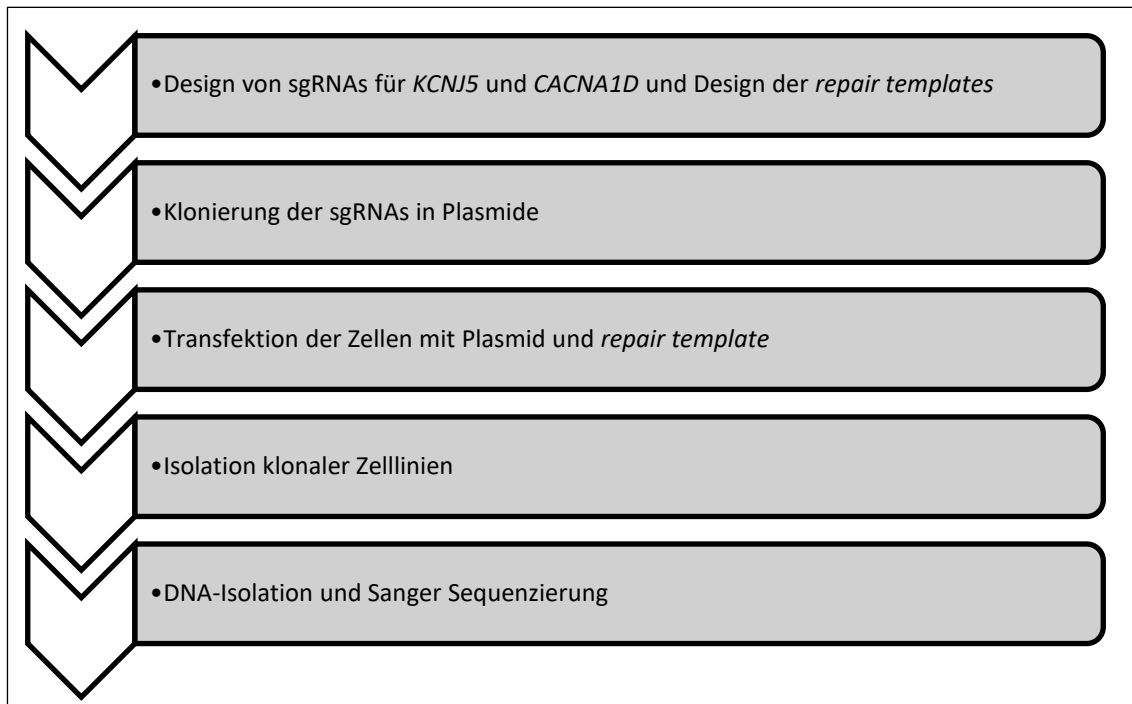


**Abb. 9** Wege des *Genome Editings* durch Reparatur von Doppelstrangbrüchen in Anlehnung an Ran *et al.*<sup>64</sup>

Durch die Nuklease Cas9 erzeugte Doppelstrangbrüche können auf zwei verschiedene Arten repariert werden. Mittels NHEJ kommt es zur Entstehung von Indels, sowie ggf. Leserasterverschiebungen und dem vorzeitigen Einbau eines Stopcodons. HDR ermöglicht dagegen präzises *Genome Editing*, wie hier den Einbau von gewünschten Punktmutationen unter Verwendung des *repair templates*. Abkürzungen: HDR, *Homology-directed Repair*; Indel, Insertion/Deletion; NHEJ, *Non-homologous End Joining*; sgRNA, *Single Guide RNA*

In dieser Arbeit wurde CRISPR/Cas9 verwendet, um zwei bekannte Punktmutationen in das Genom einer Aldosteron-produzierenden Zelllinie (HAC15) einzubauen. Die Mutationen G151R

und I770M im *KCNJ5*- bzw. *CACNA1D*-Gen kommen in Aldosteron produzierenden Adenomen vor und kodieren für den Kaliumkanal Kir3.4 bzw. den Calciumkanal  $Ca_v1.3$  (s.o.).<sup>17,36</sup> Es wurden entsprechende sgRNAs designt und in Plasmide kloniert, welche Cas9 cDNA und ein Puro-mycin-Resistenzgen enthielten. Anschließend wurden die jeweiligen Plasmide zusammen mit dem entsprechenden *repair template*, welches die gewünschte Mutation enthielt, in HAC15 Zellen transfiziert. Es erfolgte die Isolation und Expansion klonaler Zelllinien. Die Sequenzermittlung erfolgte mittels Sanger Sequenzierung. Abb. 10 zeigt eine Skizze des Versuchsaufbaus. Das Protokoll des gesamten Versuchsaufbaus ist eine Anlehnung an die Arbeit von Ran *et al.*<sup>64</sup>.



**Abb. 10: Versuchsaufbau in Anlehnung an das Protokoll von Ran *et al.*<sup>64</sup>**

Zunächst werden zu den Zielbereichen passende sgRNAs designt. Die Zielbereiche stellen in diesem Fall *KCNJ5* (G151R) und *CACNA1D* (I770M) dar. Zudem erfolgt das Design der *repair templates*, welche die gewünschte Punktmutation *KCNJ5* (G151R) bzw. *CACNA1D* (I770M) enthalten. Anschließend werden die sgRNAs in ein Plasmid kloniert, welches zudem Cas9 cDNA enthält. Im nächsten Schritt, der Transfektion, werden sowohl das Plasmid, als auch ein *repair template* in die Zelle eingebracht. Klonale Zelllinien werden isoliert und expandieren, sodass daraus DNA isoliert und mittels Sanger Sequenzierung sequenziert werden kann.

### 3.2.1 Design der sgRNAs und *repair templates*

Zunächst wurden mit Hilfe eines *Online Design Tools* (<http://crispr.mit.edu/>) sgRNAs design, welche komplementär zum Zielbereich sind. Es wurde Folgendes in das *Online Design Tool* eingegeben:

<i>Target</i>	Lokalisation	Sequenz 5' > 3'
<i>KCNJ5</i>	chr11:128781548-128781794	TTCCTTGTGTTGAAAACCTCAGTGGCTTCGTGTCCGC TTTCTGTTCTCCATTGAGACCGAAACAACCATTGGG TATGGCTTCCGAGTCATCACAGAGAAGTGTCCAGAG GGGATTATACTCCTCTTGGTCCAGGCCATCCTGGGCT CCATCGTCAATGCCTTCATGGTGGGGTGCATGTTTGT CAAGATCAGCCAGCCCAAGAAGAGAGCGGAGACCCT CATGTTTTCCAACAACGCAGTCATCTC
<i>CACNAID</i>	chr3:53764386-53764607	TGCAGAGGTGTGTGGCGTTGCCATTGTTGGCCGCACG TAGTTGCATTTAGTAGTGTGTTGTGCCCTTAAAAAGT TGAAATTAGATATTCTACTGAATGTCTTCTTGGCCAT CGCTGTAGACAATTTGGCTGATGCTGAAAGTCTGAA CACTGCTCAGAAAGAAGAAGCGGAAGAAAAGGAGA GGAAAAAGATTGCCAGGTAACCCTATTTTCCCCTGAC GTG

**Tabelle 9: Targets für das Design der sgRNAs**

Folgende Zielsequenzen wurden ermittelt und im Weiteren verwendet:

Zielsequenz	Sequenz 5' > 3'
<i>KCNJ5</i> 1	ACCGAAACAACCATTGGGTATGG
<i>KCNJ5</i> 2	GCCATACCCAATGGTTGTTTCGG
<i>KCNJ5</i> 3	GACTCGGAAGCCATACCCAATGG
<i>CACNAID</i> 1	AGCCAAATTGTCTACAGCGATGG
<i>CACNAID</i> 2	GGCCATCGCTGTAGACAATTTGG
<i>CACNAID</i> 3	TATTCTACTGAATGTCTTCTTGG

**Tabelle 10: Zielsequenzen der sgRNAs**

Zum Designen der sgRNAs wurden die oben genannten Zielsequenzen in folgendes Schema eingefügt:

CACC G Zielsequenz (fwd)  
AAAC Zielsequenz (rev) C

Daraus resultiert die Bestellung der Oligonukleotide sg*KCNJ5*\_1-3F/R und sg*CACNAID*\_1-3F/R (Tabelle 2).

Darüber hinaus wurden zunächst 90-91 bp lange *repair templates* design, welche zentral die gewünschten Punktmutationen enthalten. Im Verlauf wurden für beide Konstrukte außerdem 171 bp lange *repair templates* design. Für das *CACNAID*-Konstrukt wurde zudem ein *repair template* erstellt, welches eine stille Mutation innerhalb des PAM enthält, um ein mehrfaches Schnei-

den der DNA durch CRISPR/Cas9 oder Schneiden des *repair templates* zu verhindern. Die bestellten *repair templates* werden in Tabelle 4 gezeigt, die mutierten Basen sind fett gedruckt dargestellt.

### 3.2.2 Klonierung, Transformation und DNA-Isolation

Als Klonierung bezeichnet man das Einbringen eines DNA-Fragments in einen Vektor. Das Plasmid, welches als Vektor dient, wird mittels eines Restriktionsenzym geschnitten, das DNA-Fragment hinzugegeben und das Gemisch anschließend ligiert. In diesem Fall sollen die sgRNAs in ein Plasmid kloniert werden, welches zudem Cas9 cDNA und ein Puromycin-Resistenzgen enthält.

Verwendet wurde das Plasmid pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) (Abb. 8). Um größere Mengen des Vektors zu erhalten, wurde das Plasmid zunächst auf Agarplatten mittels Dreiösenausstrich ausgestrichen. Die Agarplatten wurden zuvor aus LB + Agar (35 g/l gelöst in bidestilliertem Wasser) hergestellt, 20 min bei 1 Bar Überdruck autoklaviert und mit 1 ml/l Ampicillin versetzt. Das Ampicillin wurde nach Protokoll des Herstellers in bidestilliertem Wasser gelöst und wie die Agar-Platten in dieser Form für alle weiteren Versuche verwendet. Anschließend wurden zur Vervielfältigung zwei Kolonien des Plasmids mittels steriler Pipettenspitze gepickt, in 5 ml LB Medium (20 mg/ml LB-Broth Base gelöst in bidestilliertem Wasser) mit 5 µl Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. 300 µl beider Kulturen wurden mit 150 µl sterilem 50%igem Glycerin versehen und bei -80°C schockgefroren und gelagert. Aus den übrigen Kulturen wurde DNA unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kit nach Protokoll des Herstellers isoliert.

Hierbei wird die Minikultur zentrifugiert und das entstandene Pellet weiterverwendet. Das Prinzip der alkalischen Lyse in modifizierter Form kommt zur Anwendung. Durch eine Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich kommt es zur Lyse von Proteinen, zudem lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der DNA. Durch Zugabe einer RNase wird zudem die RNA gespalten. Nach einer pH-Neutralisierung ist es auf Grund ihrer Konfirmation nur der Plasmid-DNA, nicht aber der Bakterien-DNA, möglich zu renaturieren. Proteine, RNA und Bakterien-DNA werden abzentrifugiert, sodass nur die Plasmid-DNA verbleibt. Diese wird abschließend zur Aufreinigung mittels Isopropanol ausgefällt und mittels Ethanol gewaschen. Auf diese Weise kann aus den Minikulturen saubere Plasmid-DNA gewonnen werden.<sup>79</sup>

Zur Überprüfung wurde der DNA-Gehalt der Proben mittels Nanodrop 2000c Spectrophotometer ermittelt und eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

Bei einer Restriktionsanalyse wird in Form eines Restriktionsverdaus in einem bestimmten Puffer DNA zusammen mit einem Restriktionsenzym inkubiert, welches an einer spezifischen Stelle bindet und die DNA schneidet. Anschließend können durch Gelelektrophorese die unterschiedlich langen DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden und ihre Länge unter Zuhilfenahme einer DNA-Leiter abgeschätzt werden. Mittels einer Restriktionskarte kann ermittelt werden, ob sich das gewünschte Ergebnis zeigt. In diesem Fall wurde ein Restriktionsverdaus der Plasmide mit BmgBI unter Verwendung des Puffers 3.1. durchgeführt. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung des Produkts wurde ein 1,5%iges Agarosegel verwendet (Herstellung, Durchführung und Auswertung der Gelelektrophorese s.o.).



Desweiteren wurde zur Überprüfung des Vorhandenseins der Puromycin-Resistenz ein Restriktionsverdau mit KasI, einem Restriktionsenzym, welches im Puromycin-Resistenzbereich des Plasmids schneidet, durchgeführt. Verwendet wurde der CutSmart Puffer. Der Restriktionsverdau wurde wie oben beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet. Für Klon 1 h wurde zudem eine unidirektionale Sanger Sequenzierung mit dem Primer U6\_Fwd (Tabelle 1) durchgeführt. Alle folgenden Versuche wurden mit dem Klon 1h durchgeführt.

Es erfolgte die Klonierung von je *sgKCNJ5\_1-3F/R* und *CACNAID\_1-3F/R* in das Plasmid pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) (Abb. 8) unter Verwendung des Restriktionsenzym BbsI. Vorgang wurde entsprechend des folgenden Protokolls<sup>64</sup>:

1. Zur Vorbereitung der Oligonukleotide wurde zunächst folgende Reaktion angesetzt:

Menge (µl)	Komponente
1	sgRNA je <i>sgKCNJ5_1-3F</i> , <i>CACNAID_1-3F</i> (100 µM)
1	sgRNA je <i>sgKCNJ5_1-3R</i> , <i>CACNAID_1-3R</i> (100 µM)
1	T4 Ligation Buffer, 10x
1	T4 Polynucleotide Kinase
6	ddH <sub>2</sub> O
10	Gesamt

**Tabelle 11: Reaktion zur Vorbereitung der Oligonukleotide**

2. Im nächsten Schritt erfolgte die Phosphorylierung und Anlagerung des jeweiligen oberen und unteren Strangs (hier \_F und \_R) der Oligonukleotide. Hierfür wurden diese zunächst 30 min bei 37 °C, dann 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend pro Minute um -5 °C auf 25 °C heruntergekühlt. Verwendet wurde der Mastercycler flexid nexus SX 1(e), der auch für alle weiteren Inkubationen, wenn nicht anders gekennzeichnet verwendet wird.

3. Anschließend wurde das Produkt 1:200 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

4. Zur Klonierung wurde folgende Ligationsreaktion angesetzt:

Menge (µl)	Komponente
X	pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459), 100 ng
2	Verdünnte Oligonukleotide aus 3.
2	Tango buffer, 10x
1	DTT, 10 mM
1	ATP, 10 mM
1	Fast Digest BbsI
0,5	T7 Ligase
bis auf 20	ddH <sub>2</sub> O
20	Gesamt

**Tabelle 12: Ligationsreaktion zur Klonierung**

5. Die Ligationsreaktion wurde anschließend für 6 Zyklen bestehend aus je 5 min bei 37 °C und 5 min bei 21 °C insgesamt eine Stunde inkubiert.

6. Um übrig gebliebene lineare DNA zu verdauen, wurde die Ligationsreaktion anschließend mit der PlasmidSafe ATP-Dependent DNase wie folgt behandelt:

Menge (µl)	Komponente
11	Ligationsreaktion aus 4.
1,5	PlasmidSafe Puffer, 10x
1	PlasmidSafe ATP-Dependent DNase
1,5	ATP, 10 mM
15	Gesamt

**Tabelle 13: Plasmid-Safe-Reaktion**

7. Die PlasmidSafe Reaktion wurde anschließend für je 30 min zuerst bei 37 °C und anschließend bei 70 °C inkubiert.

Resultat der Klonierung waren die Plasmide pSpCas9(BB)-2A-Puro *KCNJ5* 1-3 und pSpCas9(BB)-2A-Puro *CACNAID* 1-3 (Tabelle 5).

Anschließend wurde mittels Transformation, welche das nicht-virale Einbringen freier DNA in kompetente Zellen beschreibt, das Plasmid mit der sgRNA in Stb13 kompetente E. coli Zellen eingebracht. Durch Kultivierung und Vermehrung dieser kommt es zu einer raschen Vervielfältigung der Plasmid-DNA, welche im nächsten Schritt isoliert wird.

Die Transformation erfolgte entsprechend der Empfehlung des Protokolls<sup>64</sup>. Zu je 20 µl der Stb13 Zellen wurden 2 µl des Klonierungsprodukts gegeben. Die Reaktion wurde 10 min auf Eis inkubiert, für 30 Sekunden bei 42 °C hitzegeschockt und sofort für 2 min wieder auf Eis gestellt. Anschließend wurden 100 µl S.O.C. Medium je Reaktionsprodukt hinzugegeben und das Produkt für zwei Stunden bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert, dann auf LB-Agar-Platten mit 0,1 % Ampicillin-Gehalt ausplattiert und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Nach der Transformation erfolgte die DNA-Isolation. Hierfür wurden drei Kolonien je Konstrukt wie oben beschrieben gepickt und für das Ansetzen von Mini- und Maxikulturen zunächst in 5ml LB Medium mit 0,1 % Ampicillin gegeben. Minikulturen wurden über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. 300 µl der Kulturen wurden am nächsten Tag mit je 150 µl sterilem Glycerin versehen und bei -80 °C schockgefroren und gelagert. Aus den übrigen Minikulturen wurde DNA unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kit nach Protokoll des Herstellers wie oben beschrieben isoliert.

Maxikulturen wurden für mindestens 6 h bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert, anschließend in 250 ml LB-Medium mit 0,1 % Ampicillin gegeben und in 0,5 l Erlenmeyerkolben über Nacht weiterhin wie oben beschrieben inkubiert. Anschließend erfolgte die DNA-Isolation unter Verwendung des HiSpeed Plasmid Maxi Kit nach Protokoll des Herstellers. Die Maxipräparation unterscheidet sich von der Minipräparation im Wesentlichen dadurch, dass die Anzahl der Bakterien höher ist und somit größere Mengen DNA gewonnen werden.

Zur Überprüfung wurde der DNA-Gehalt aller Proben mittels Nanodrop 2000c Spectrophotometer ermittelt. Von den Plasmiden pSpCas9(BB)-2A-Puro *KCNJ5* 1a-c, 2a-c und pSpCas9(BB)-2A-Puro *CACNAID* 1a-c, 2a-c wurde erneut ein Restriktionsverdau mittels KasI mit gelelektrophoretischer Auswertung durchgeführt. Für alle Plasmide wurde zur Sequenzüberprüfung eine unidirektionale Sanger Sequenzierung mit dem Primer U6\_Fwd (Tabelle 1) durchgeführt.

Ausgewählt und im weiteren Verlauf verwendet wurden die Klone mit dem höchsten DNA-Gehalt. Dies sind pSpCas9(BB)-2A-Puro *KCNJ5* 1c, 2a, 3c/b (im Folgenden beschrieben als Konstrukte *KCNJ5*\_1, 2, 3), sowie pSpCas9(BB)-2A-Puro *CACNAID* 1b, 2a, 3b (im Folgenden beschrieben als Konstrukte *CACNAID*\_1, 2, 3).

### 3.2.3 Zellkultivierung

Alle zellbiologischen Versuche wurden unter einer sterilen Werkbank mit desinfizierter Arbeitsoberfläche durchgeführt.

Verwendet wurden HEK293 Zellen, eine humane embryonale Nierenzelllinie und HAC15 Zellen, ein Subklon der humanen Nebennierenkarzinomzelllinie H295R. Die HEK293 Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in VLE DMEM-Medium mit 10 % FBS und 1% Penicillin/Streptomycin (als HEK-Medium bezeichnet) kultiviert. Die HAC15 Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in DEMEM/Ham's F12-Medium entweder mit 5 % CCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Insulin/Selenium/Transferrin, 1 % Non Essential Amino Acids und 0,1 % Lipid Mix (als HAC15-Medium bezeichnet) oder mit 2,5 % Ultrosor G, 1 % Insulin/Selenium/Transferrin und 1 % Antibiotic-Antimycotic (als HAC15-Ultrosor-Medium bezeichnet) kultiviert. Das Medium der Zellen wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

### 3.2.4 Tauen, Passagieren und Wegfrieren von Zellen

Zellen wurden, wenn nicht anders vermerkt (s. Transfektion), in erster Passage getaut. Hierfür wurden die Zellen, die vorher in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, im Wasserbad angetaut, anschließend in 9 ml Medium gegeben und bei 4 °C und 1000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, es wurden 10 ml frisches Medium hinzugegeben, die Zellen darin vorsichtig resuspendiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal durchgeführt, bevor die Zellen in 10 ml Medium in einer T25 EasYFlask ausgesät wurden.

Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Kultur vorsichtig mit PBS gespült, welches anschließend schnell wieder abgesaugt wurde. Die Zellen wurden zum Lösen mit Trypsin/EDTA bedeckt, im Brutschrank für einige Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend in frischem Medium resuspendiert und entsprechend des Splitverhältnisses ausgesät.

Weggefroren wurden nur HAC15 Zellen. Zur Herstellung des *Freezing*-Mediums wurde der CCS-Gehalt des normalen HAC15-Mediums auf 10 % erhöht und dieses außerdem mit 5 % DMSO versetzt. Die Zellen wurden wie beim Passagieren behandelt, mit dem Unterschied, dass die resuspendierten Zellen nicht ausgesät, sondern 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen dann vorsichtig je nach Zelldichte in 5-10 ml *Freezing*-Medium resuspendiert wurden. Je 1 ml wurde in ein Kryoröhrchen aliquotiert, in einem Mr. Frosty Gefrierbehälter rasch transportiert und über Nacht bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden die Proben in flüssigen Stickstoff überführt.

### 3.2.5 Transfektion, Puromycinselektion, Picken und Splitten von Klonen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von fremder DNA, hier in Form von Plasmiden, in Zellen. In dieser Arbeit wurden folgende Transfektionen durchgeführt:

Trans- fek- tion	Zellen	Plasmid	Template	Transfek- tionsmethode
1	HEK293 Zellen	pSpCas9(BB)-2A-Puro <i>KCNJ5</i> 1	templ <i>KCNJ5</i>	Lipofektion
		pSpCas9(BB)-2A-Puro <i>KCNJ5</i> 2	templ <i>KCNJ5</i>	
		pSpCas9(BB)-2A-Puro <i>CACNAID</i> 1	templ <i>CACNAID</i>	
		pSpCas9(BB)-2A-Puro <i>CACNAID</i> 2	templ <i>CACNAID</i>	
2	HAC15 Zellen (p3 getaut)	pSpCas9(BB)-2A-Puro <i>CACNAID</i> 1	templ <i>CACNAID</i>	Nukleofektion
3	HAC15 Zellen	pSpCas9(BB)-2A-Puro <i>KCNJ5</i> 1	templ <i>KCNJ5</i>	Nukleofektion
		pSpCas9(BB)-2A-Puro <i>CACNAID</i> 1	templ <i>CACNAID</i>	
4	HAC15 Zellen	pSpCas9(BB)-2A-Puro <i>KCNJ5</i> 1	templ <i>KCNJ5</i> large	Nukleofektion
		pSpCas9(BB)-2A-Puro <i>KCNJ5</i> 3	templ <i>KCNJ5</i> large	
		pSpCas9(BB)-2A-Puro <i>CACNAID</i> 1	templ <i>CACNAID</i> large	
		pSpCas9(BB)-2A-Puro <i>CACNAID</i> 3	templ <i>CACNAID</i> large	
5	HAC15 Zellen (p3 getaut)	pSpCas9(BB)-2A-Puro <i>KCNJ5</i> 3	templ <i>KCNJ5</i> large	Nukleofektion
		pSpCas9(BB)-2A-Puro <i>CACNAID</i> 1	templ <i>CACNAID</i> _sil	

**Tabelle 14: Transfektionen, verwendete Plasmide, templates und Transfektionsmethoden**

Die Transfektion der HEK293 Zellen wurde mittels Lipofektion durchgeführt. Um die negativ geladene DNA durch die ebenfalls negativ geladene Zellmembran zu transportieren, bilden die Plasmide mit dem positiv geladenen Lipofectamin Komplexe und können so in die Zelle gelangen<sup>80</sup>. Hierfür wurde zunächst 2 µl Lipofectamine 2000 Reagent und 1 µg Plasmid-DNA + 2 µl *repair template* mit jeweils 60 µl Opti-MEM verdünnt und anschließend zusammen pipettiert. Verwendet wurden Zellen in 12-Well-Platten mit 70-90 % Konfluenz. Das Medium der Zellen wurde abgesaugt und durch frisches HEK-Medium ersetzt. Anschließend wurde der DNA-Lipid-Komplex hinzugegeben und die Reaktion über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Transfektion der HAC15 Zellen wurde mittels Nukleofektion, einer Art von Elektroporation, durchgeführt. Bei der Elektroporation wird Zellen ein elektrischer Impuls gegeben, woraufhin die Permeabilität der Zellmembran steigt und die Plasmid-DNA in die Zelle gelangt<sup>81</sup>. Bei der Nukleofektion gelangt DNA mit Hilfe von Elektroporation und bestimmten Lösungen unmittelbar in den Zellkern<sup>82</sup>. Die Nukleofektion wurde mittels des Amaxa 4D Nucleofactors durchgeführt.

Zunächst wurden die Zellen gezählt. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wie beim Passagieren zum Lösen trypsiniert, inkubiert und anschließend in 9 ml HAC15-Medium vorsichtig resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 750 g für 10 min. Nach erneutem Absaugen des Mediums wurden die Zellen in 5 ml frischem HAC15-Medium resuspendiert und durch einen 100 µM Easy Strainer Zellfilter pipettiert. Die Zellen wurden 1:1 mit Tryptanblau gemischt und es erfolgte die Zellzählung mittels Juli Br Live cell movie analyzer. Für die Transfektion wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen verwendet.

Falls nicht anders vermerkt, wurden für das folgende Experiment Bestandteile des Amaxa Cell Line Nucleofector Kit R verwendet. Zunächst wurde eine Reaktion bestehend aus 100 µl Nucleofector Solution R + 1 µg Plasmid-DNA + 1 µg *repair template* angesetzt. Für die Transfektion wurden die Zellen 10 min bei 20 °C und 700 g zentrifugiert, das Medium abgesaugt und die Zellen mit der o.g. Reaktion resuspendiert und gemeinsam in eine Elektroporationsküvette pipettiert. Anschließend erfolgte unter Verwendung des Programms X-05 des Amaxa 4D Nucleofectors die Transfektion mittels Nucleofektion. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde die Lösung mit den transfizierten Zellen aus der Küvette in ein 15 ml Falcon mit 500 µl HAC15-Medium pipettiert und 10 min bei 20 °C und 700 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wurden die transfizierten Zellen in 10 ml frischem HAC15-Medium resuspendiert und in verschiedenen Verdünnungen mit HAC15-Medium (1:10, 1:50, Rest) auf 15 cm Kulturschalen mit einem Endvolumen von 20 ml ausgesät.

Zellen der 5. Transfektion wurden nach der Transfektion durchgehend mit HAC15-Ultroser-Medium behandelt, dies gilt auch für die Dauer der Puromycinselektion (s.u.). Lediglich zum Wegfrieren wurde hier wie oben beschrieben hergestelltes *Freezing-Medium* auf der Basis vom normalen HAC15-Medium verwendet.

HAC15 Zellen, die mit einem *KCNJ5*-Konstrukt transfiziert wurden, wurden nach der Transfektion in einem HAC15-Medium mit 20 µM Roxithromycin kultiviert, um mutierte *KCNJ5*-Kanäle zu inhibieren und einen Zelltod zu verhindern<sup>83</sup>.

Um die erfolgreich transfizierten Zellen zu selektieren, welche durch Transfektion des Plasmids eine Puromycin-Resistenz erworben hatten, wurden die Zellen für einen gewissen Zeitraum in Puromycin-haltigem Medium kultiviert.

24 Stunden nach Transfektion erfolgte für die HEK293 Zellen eine fünftägige Puromycinselektion. Dafür wurden die Zellen enzymatisch abgelöst, in 800 µl Medium resuspendiert und anschließend in verschiedenen Verdünnungen mit Medium (1:1000 und 1:500) auf 15 cm Kulturschalen mit einem Endvolumen von 20 ml ausgesät. Verwendet wurde HEK-Medium, welches vorher mit 2 µl/ml Puromycin versetzt wurde. Nach fünf Tagen wurde die Versorgung der Zellen mit normalem Medium fortgeführt.

24 Stunden nach der Transfektion wurden die HAC15 Zellen für 48 Stunden mit Puromycin selektioniert. Dafür wurde das Medium abgesaugt und durch neues ersetzt, welches vorher mit 8 µl/ml Puromycin versetzt wurde. Anschließend wurde die Versorgung der Zellen mit dem vorher verwendeten HAC15-Medium/ HAC15-Ultroser-Medium fortgeführt.

Um einzelne Zellklone zu erhalten, wurden die Zellen wachsen gelassen, bis isolierte Kolonien makroskopisch sichtbar wurden. Diese wurden anschließend mittels in Trypsin/EDTA getauchter Scienceware Cloning Discs gepickt und in 1 ml Medium in ein 24-Well gegeben.

Klone mit hoher Konfluenz wurden mit 100 µl Trypsin/EDTA enzymatisch abgelöst, in 1 ml Medium resuspendiert und davon mit je 500 µl Medium zum einen für DNA-Isolation mit 1,5 ml frischem Medium in ein 12 Wells ausgesät, zum anderen zum späteren Wegfrieren mit 9,5 ml Medium in einer T25 EasYFlask ausgesät.

### 3.2.6 DNA Isolation, Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sanger Sequenzierung

Sobald die einzelnen Zellklone eine Konfluenz von 70-90 % erreicht hatten, wurde aus Ihnen unter Verwendung des DNeasy Blood and Tissue Kit nach Protokoll des Herstellers DNA isoliert. Von der isolierten DNA wurde eine PCR gemacht. Die PCR wird bereits weiter oben im Text näher erläutert. In diesem Fall wurde jeweils folgende Reaktion angesetzt:

Menge (µl)	Komponente
3	Betain
3,26	ddH <sub>2</sub> O
3	Buffer A 5x
2,4	dNTP 1,25 mM
0,06	Polymerase (hot start, KAPA2G)
1,14	J5cDNA_F oder I770M_F Primer 4 µM
1,14	J5cDNA_R oder I770M_R Primer 4 µM
1	<i>template</i> ca. 10 ng
15	Gesamt

**Tabelle 15: PCR Ansatz für J5cDNA\_F/R und I770M\_F/R, 15 µl**

Verwendet wurden die Primer J5cDNA\_F und \_R für Zellen, die mit pSpCas9(BB)-2A-Puro\_KCNJ5 1-3 transfiziert wurden, und die Primer I770M\_F und \_R für Zellen, die mit pSpCas9(BB)-2A-Puro\_CACNAID 1-3 transfiziert wurden (Tabelle 1), sowie das KAPA2G Fast Hot Start PCR Kit. Die PCR wurde anschließend unter Verwendung des *Step-Down*-Programms (Tabelle 8) im Mastercycler flexid nexus SX 1(e) durchgeführt. Im Anschluss wurden alle PCR Produkte zur Qualitätskontrolle auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet. Zur Sequenzkontrolle wurde eine bidirektionale Sanger Sequenzierung mit den o.g. Primern durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Sequencher Version 4.7. Software (s.o.).

## 4 Ergebnisse

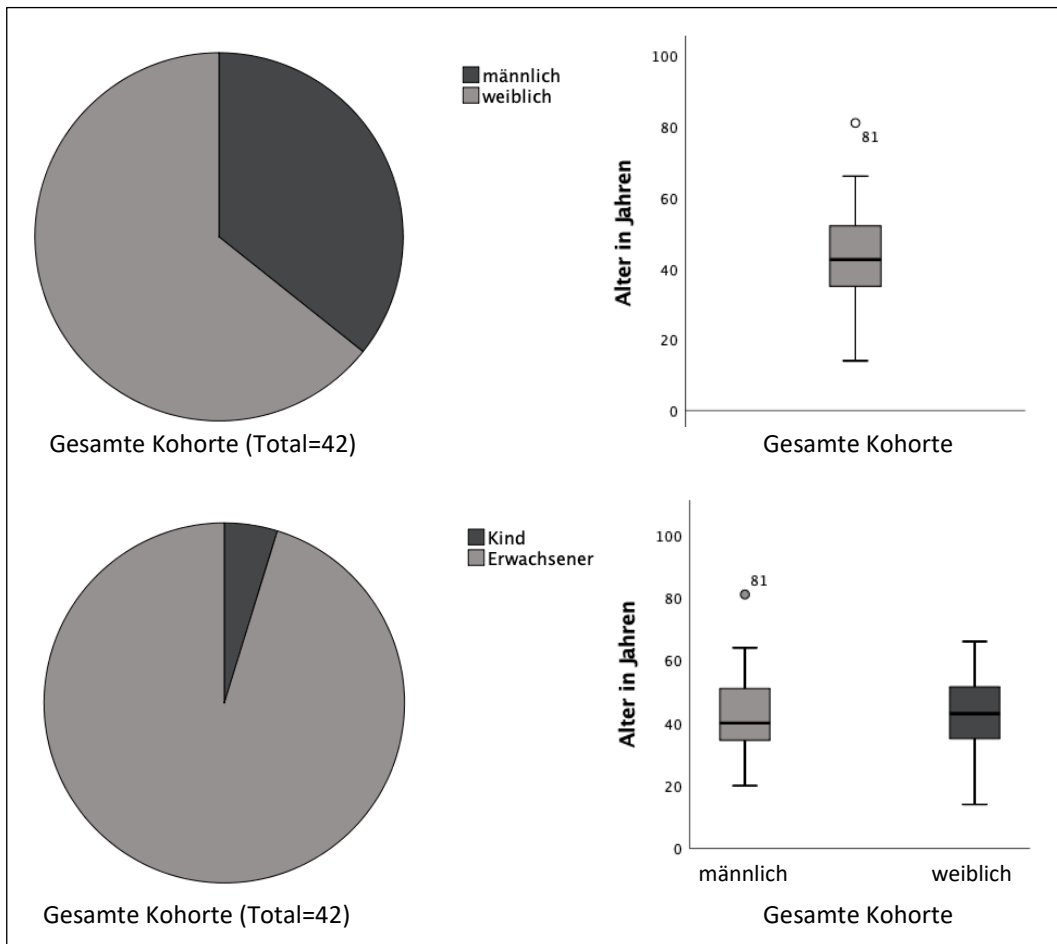
### 4.1 *USP8*-Mutationen in Hypophysenadenomen bei PatientInnen mit Morbus Cushing

Dieser Teil der Ergebnisse wurde bereits veröffentlicht und wird hier in Anlehnung an die Arbeit Ballmann *et al.*<sup>1</sup> dargestellt. Teile aus der genannten Arbeit<sup>1</sup> werden in der folgenden Darstellung in wörtlicher Übersetzung verwendet.

#### 4.1.1 Charakterisierung der Patientenkohorte

Untersucht wurden Proben von 42 PatientInnen aus zwei Kohorten. Bei allen PatientInnen war zuvor ein Morbus Cushing diagnostiziert worden. In 41 Fällen erfolgte eine transnasale transsphenoidale Resektion. Bei einem Patienten wurde über einen erweiterten transsphenoidalen Zugang operiert (HYP017). In einem Fall (HYP003) erfolgte eine frontoorbitale Kraniotomie. In allen 42 Fällen wurde durch einen Pathologen ein Hypophysenadenom diagnostiziert.<sup>1</sup>

Von den 42 untersuchten PatientInnen waren 27 (64,3 %) Frauen und 15 (35,7 %) Männer. Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Operation betrug  $42,5 \pm 14,4$  (Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD), Spannweite (SW) 14-81, Median (M) 42,5) Jahre. Dabei lag das durchschnittliche Alter weiblicher Patientinnen bei  $41,9 \pm 13,7$  (MW  $\pm$  SD, SW 14-66, M 43) Jahren und das männlicher Patienten bei  $43,5 \pm 16,1$  (MW  $\pm$  SD, SW 20-81, M 40) Jahren. Bezüglich des Alters gab es keinen Geschlechtsunterschied ( $P=0,75$ , ungepaarter zweiseitiger t-Test mit Welch-Korrektur). Die zwei pädiatrischen Patientinnen waren 14 und 15 Jahre alt (HYP002, HYP005). Alle übrigen PatientInnen waren Erwachsene ( $>18$  Jahre) (Abb. 11).<sup>1</sup>

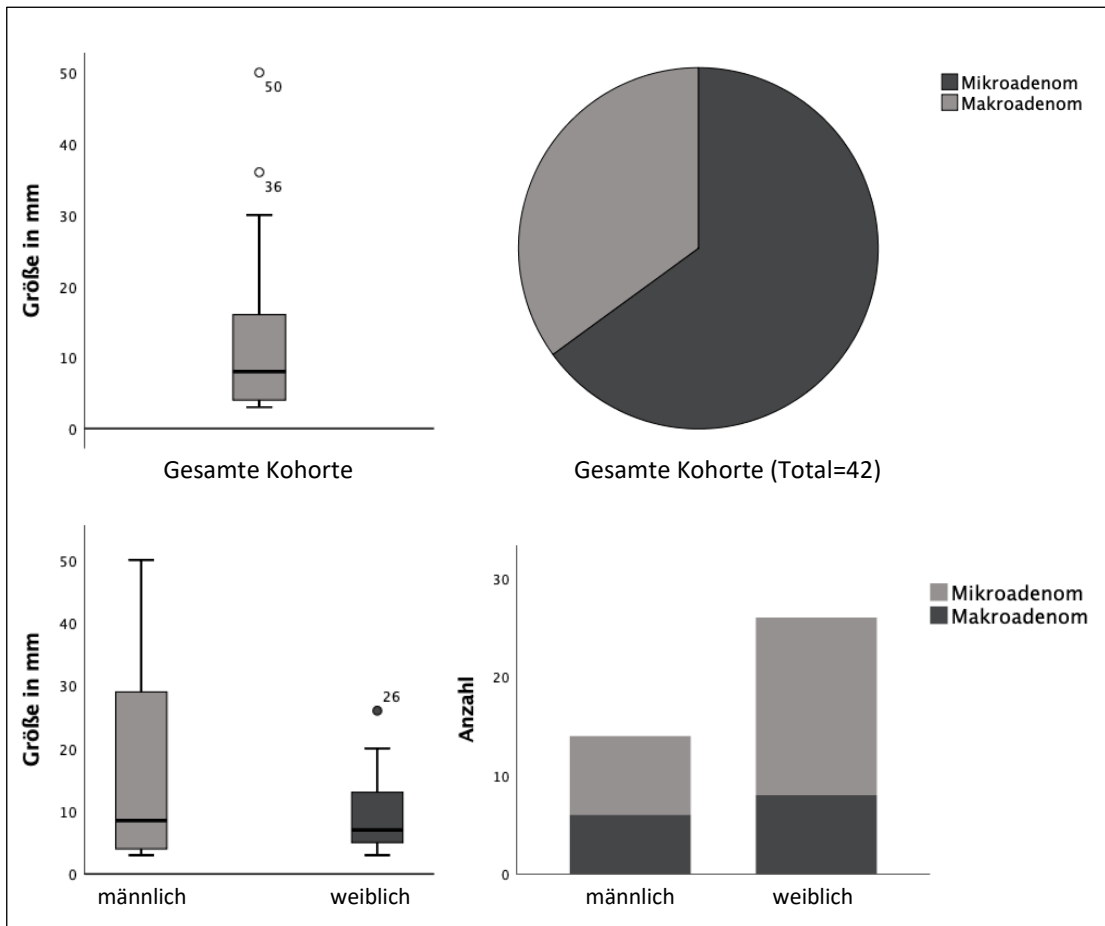


**Abb. 11: Geschlechter- und Altersverteilung der Kohorte, geschlechtsabhängige Altersverteilung**

Die Abbildung zeigt die Verteilung der Geschlechter in Bezug auf die gesamte Kohorte (oben links), sowie die Unterteilung in pädiatrische Fälle und solche von Erwachsenen (unten links). Zudem wird das durchschnittliche Alter in Bezug auf die gesamte Kohorte (oben rechts), sowie in Abhängigkeit vom Geschlecht (unten rechts) dargestellt (Linie, Median; Box, Interquartilsabstand; „Whisker“, 1,5-facher Interquartilsabstand; Punkt, Ausreißer).

Die Größe der Tumore wurde in den meisten Fällen mittels Schnittbildverfahren ermittelt. In zwei Fällen erfolgte die Größenbestimmung mittels Ultraschall (HYP015, HYP044), in einem anhand intraoperativer Beurteilung (HYP022). In zwei Fällen war keine Größenangabe verfügbar (HYP017, HYP030). 26 (65 %) der Proben waren Mikroadenome (<10 mm), wobei auch solche als Mikroadenome gewertet wurden, deren Größe unterhalb der Nachweisgrenze lag. Die übrigen 14 (35 %) Proben stellten Makroadenome dar ( $\geq 10$  mm). Auffällig war die geringe Größe von <5 mm von 16 (40 %) der 40 Proben (inklusive der drei in der Bildgebung nicht nachweisbaren Adenome). Die Hypophysenadenome hatten eine durchschnittliche Größe von  $12,2 \pm 11,2$  (MW  $\pm$  SD, SW 3-50, M 8) mm, wobei der maximale Durchmesser angegeben ist. Nicht nachweisbare Tumore sind von der Berechnung ausgenommen. Bei den Frauen lag die Größe durchschnittlich bei  $9,2 \pm 6,2$  (MW  $\pm$  SD, SW 3-26, M 7) mm, bei den Männern bei  $17,1 \pm 15,4$  (MW  $\pm$  SD, SW 3-50, M 8,5) mm (Abb. 12). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Größe in Abhängigkeit von der Geschlechterverteilung ( $P=0,32$  zweiseitiger Mann-Whitney-Test). Bei Patienten, von denen Tumorrezidive für die genetische Analyse verwendet wurden, wurden Alter und Tumorgöße zum Zeitpunkt der ersten Operation verwendet. Bei zwei solchen Patienten waren Daten zur initialen Größe nicht verfügbar.<sup>1</sup>





**Abb. 12: Maximaler durchschnittlicher Tumordurchmesser und Einteilung in Mikro- und Makroadenome der gesamten Kohorte, sowie in Abhängigkeit vom Geschlecht**

Dargestellt wird der durchschnittliche maximale Tumordurchmesser in Bezug auf die gesamte Kohorte (links oben), sowie in Abhängigkeit vom Geschlecht (links unten) (Linie, Median; Box, Interquartilsabstand; „Whisker“, 1,5facher Interquartilsabstand; Punkt, Ausreißer). Rechts dargestellt wird die Aufteilung in Mikro- und Makroadenome in Bezug auf die gesamte Kohorte (oben), sowie in Abhängigkeit vom Geschlecht (unten).

Des Weiteren wurden zwei hormoninaktive Hypophysenadenome untersucht, die beide von männlichen Patienten im Alter von 57 und 59 Jahren stammten (HYP056, HYP063). Sie verzeichneten einen maximalen Durchmesser von 13 und 15 mm und werden somit beide als Makroadenome gewertet.<sup>1</sup>

Eine Zusammenfassung der klinischen Daten der gesamten Kohorte findet sich in Tabelle 16.<sup>1</sup>

Probe	Ge- schlecht	Alter (Jahre)	Größe (mm)	Repli-G	Sanger Ergebnis	NGS Er- gebnis	EGFR IHC
Morbus Cushing							
HYP002	w	15	5	ja	WT	p.P720R p.S716Y	-
HYP005	w	14	5	ja	WT	p.S716F p.S718P	-
HYP006	w	36	13	ja	p.S718P	NV	-
HYP019	m	50	3	ja	WT	p.P720R	-
HYP024 <sup>a</sup>	w	51	13	ja	p.P720Q	NV	-
HYP026	w	46	6	ja	p.P720R	NV	-
HYP029	w	36	11	ja	p.P720R	p.P720R	-
HYP039	w	66	18	ja	p.P720Q	NV	-
HYP051	m	81	29	nein	p.P720R	NV	-
HYP001	m	34	8	ja	WT	WT	-
HYP003 <sup>b</sup>	m	21	50	ja	WT	WT	(+)
HYP004	w	48	UN	ja	WT	WT	-
HYP007	w	25	4	ja	WT	WT	-
HYP009	w	61	20	ja	WT	WT	-
HYP011	w	42	6	ja	WT	WT	-
HYP013	w	45	UN	ja	WT	WT	-
HYP015	w	56	3 (Ultraschall)	ja	WT	WT	-
HYP016	w	30	14	ja	WT	WT	(+)
HYP017 <sup>b</sup>	w	43	NV	ja	WT	WT	-
HYP018	w	65	3	ja	WT	WT	-
HYP020	w	52	8	ja	WT	WT	-
HYP021	w	24	6	ja	WT	WT	-
HYP022	w	52	3 (chirurgisch)	ja	WT	WT	-
HYP023	m	57	28	ja	WT	WT	-
HYP025	w	42	26	ja	WT	WT	-
HYP027	m	52	30	ja	WT	WT	-
HYP028 <sup>c</sup>	w	36	9	ja	WT	WT	-
HYP030 <sup>b</sup>	m	36	NV	ja	WT	WT	-
HYP032	w	54	8	ja	WT	WT	-
HYP033	m	49	3	ja	WT	WT	-
HYP036 <sup>d</sup>	w	35	5	ja	WT	WT	-
HYP037	m	20	3	ja	WT	WT	-
HYP038	m	35	4	ja	WT	WT	-
HYP041	m	40	4	ja	WT	WT	-
HYP043	w	29	3	ja	WT	WT	-
HYP044	m	38	9 (Ultraschall)	ja	WT	WT	-
HYP045	w	47	UN	ja	WT	WT	-
HYP046	w	47	7	ja	WT	WT	-
HYP047 <sup>a</sup>	m	44	24	ja	WT	WT	-
HYP050	w	35	16	nein	WT	WT	-
HYP053	m	32	8	nein	WT	WT	-
HYP055 <sup>a</sup>	m	64	36	nein	WT	WT	-
Hormoninaktive corticotrope Adenome							
HYP056	m	59	13	nein	WT	WT	-
HYP063	m	57	15	nein	WT	WT	-

**Tabelle 16: Klinische Daten, Ergebnisse der Sequenzierungen und EGFR-Immunhistochemie der Patientenkohorte<sup>1</sup>**

Abkürzungen: IHC, Immunhistochemie; m, männlich; NV, nicht verfügbar; Repli-G, Genomamplifikation der DNA; UN, unterhalb der Nachweisgrenze; w, weiblich; WT, Wildtyp.

<sup>a</sup>Atypisches Adenom, <sup>b</sup>Gewebe von Rezidiv, Alter und Tumorgöße der ersten Operation werden genannt  
<sup>c</sup>Crooke-Zell-Adenom, <sup>d</sup>Ektopisch, Sinus cavernosus (Patient 2 in Knappe *et al.*<sup>84</sup>)

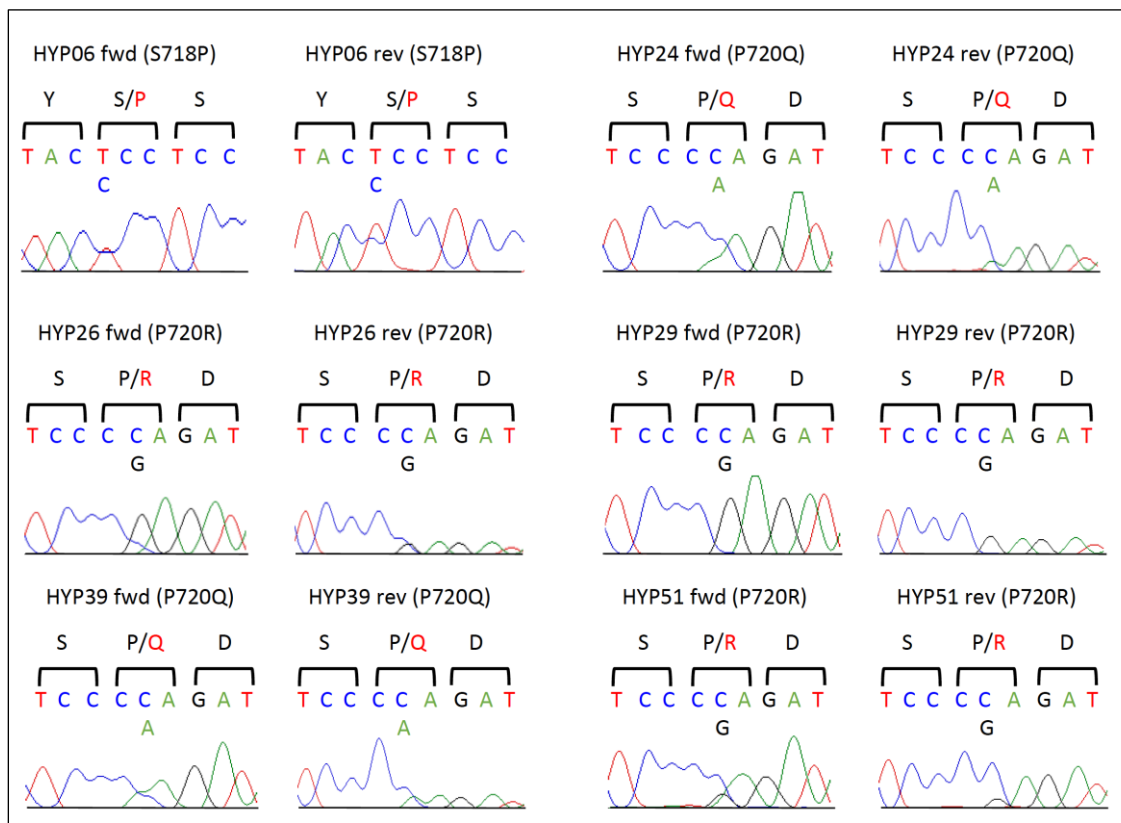
#### 4.1.2 Identifizierung von *USP8*-Mutationen in sechs von 42 Proben mittels Sanger Sequenzierung

Zunächst erfolgte die DNA-Isolation aus FFPE-Gewebe und eine anschließende Sanger Sequenzierung von *USP8* Exon 14, in welchem sich das 14-3-3-Bindungsmotiv befindet<sup>1</sup>. In diesem Bereich wurden zuvor verschiedene somatische *Gain-of-Function*-Mutationen detektiert<sup>49, 50, 55, 56</sup>.

In sechs (14,3 %) von 42 Proben wurden Mutationen im *USP8*-Gen identifiziert (HYP006, HYP024, HYP026, HYP039, HYP051). Es wurden die bekannten Mutationen p.P720R (n=3), p.P720Q (n=2) und p.S718P (n=1) detektiert. Alle Mutationen wurden in Tumoren mit >5 mm Durchmesser gefunden.<sup>1</sup>

In HYP029 konnte keine Sequenz des Wildtyps (WT), sondern ausschließlich der Variante p.P720R detektiert werden. Es ist in diesem Fall von einer homozygoten Mutation oder einem Verlust der Heterozygotie auszugehen. Alle anderen Mutationen waren heterozygot, wie alle in bisher beschriebenen Studien detektierten Mutationen. In den zwei hormoninaktiven Hypophysenadenomen konnten keine Mutationen identifiziert werden.<sup>1</sup>

Eine Darstellung der Chromatogramme mittels Sanger Sequenzierung ermittelter Mutationen zeigt Abb. 13.



**Abb. 13: Chromatogramme der sechs Mutationen, die mittels Sanger Sequenzierung identifiziert wurden<sup>1</sup>**

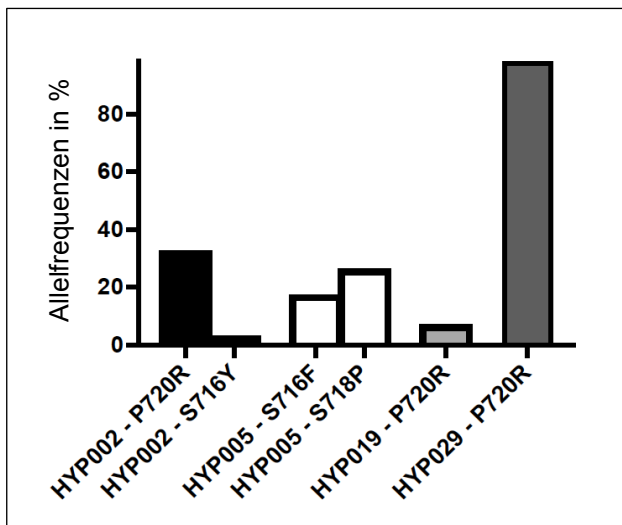
Die Abbildung zeigt sechs Mutationen im *USP8*-Gen. Dargestellt sind die Chromatogramme mit Beschriftung der Basen. Im Bereich der Mutationen stehen die beiden Basen untereinander, wobei die obere die Wildtyp-Base darstellt, die untere die Variante. Zudem sind die zu den Basentriplets zugehörigen Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code dargestellt. Rot gekennzeichnet ist jeweils die veränderte Aminosäure. HYP029 erscheint homozygot oder hemizygot für die Variante.

#### 4.1.3 Identifizierung dreier weiterer Mutationen mittels NGS

Mittels Sanger Sequenzierung wurde eine Mutationsfrequenz von 14,3 % ermittelt. Alle bisherigen Studien verzeichneten eine höhere Mutationsfrequenz, die zwischen 35 % und 62 % lag<sup>49, 50, 55, 56</sup>. Aus diesem Grund wurden für alle Proben, die in der Sanger Sequenzierung keine Mutation zeigten, sowie für eine Positivkontrolle (HYP029), gezieltes *Next-Generation Sequencing* von *USP8* Exon 14 unter Verwendung des Illumina MiSeq Sequencer durchgeführt. *Next-Generation Sequencing* ermöglicht es, auch Mutationen mit geringer Allelfrequenz zu identifizieren, die in der Sanger-Sequenzierung nicht nachgewiesen werden können<sup>1</sup>.

Auf diese Weise konnten in drei weiteren Proben (HYP002, HYP005, HYP019) bekannte Mutationen identifiziert werden (Abb. 14). Ein weiteres Mal wurde die Mutation p.P720R in HYP019 mit einer geringen Allelfrequenz von 7,09 % detektiert. Diese liegt unterhalb der Nachweisgrenze der Sanger Sequenzierung. Zudem konnten in zwei Proben jeweils zwei verschiedene Mutationen identifiziert werden. HYP005 zeigte die Mutation p.S716F (Allelfrequenz 18,55 %), welche zuvor in Assoziation mit malignen Melanomen beschrieben wurde, sowie die bekannte Mutation p.S718P (Allelfrequenz 26,33 %). Beide Mutationen wurden auf dem gleichen Allel detektiert (Abb. 15). In der Probe HYP002 wurden auf unterschiedlichen Allelen die bekannte Mutation p.P720R mit einer Allelfrequenz von 32,67 %, sowie die Mutation p.S716Y mit der geringen Allelfrequenz von 3,3% identifiziert. (Abb. 15) Letztere Variante wurde bislang nicht in öffentlichen Datenbanken verzeichnet. Es erfolgte die Übermittlung der Sequenzierungsergebnisse von HYP002 an das NCBI Sequence Read Archive unter der Nummer SRR6448768.<sup>1</sup>

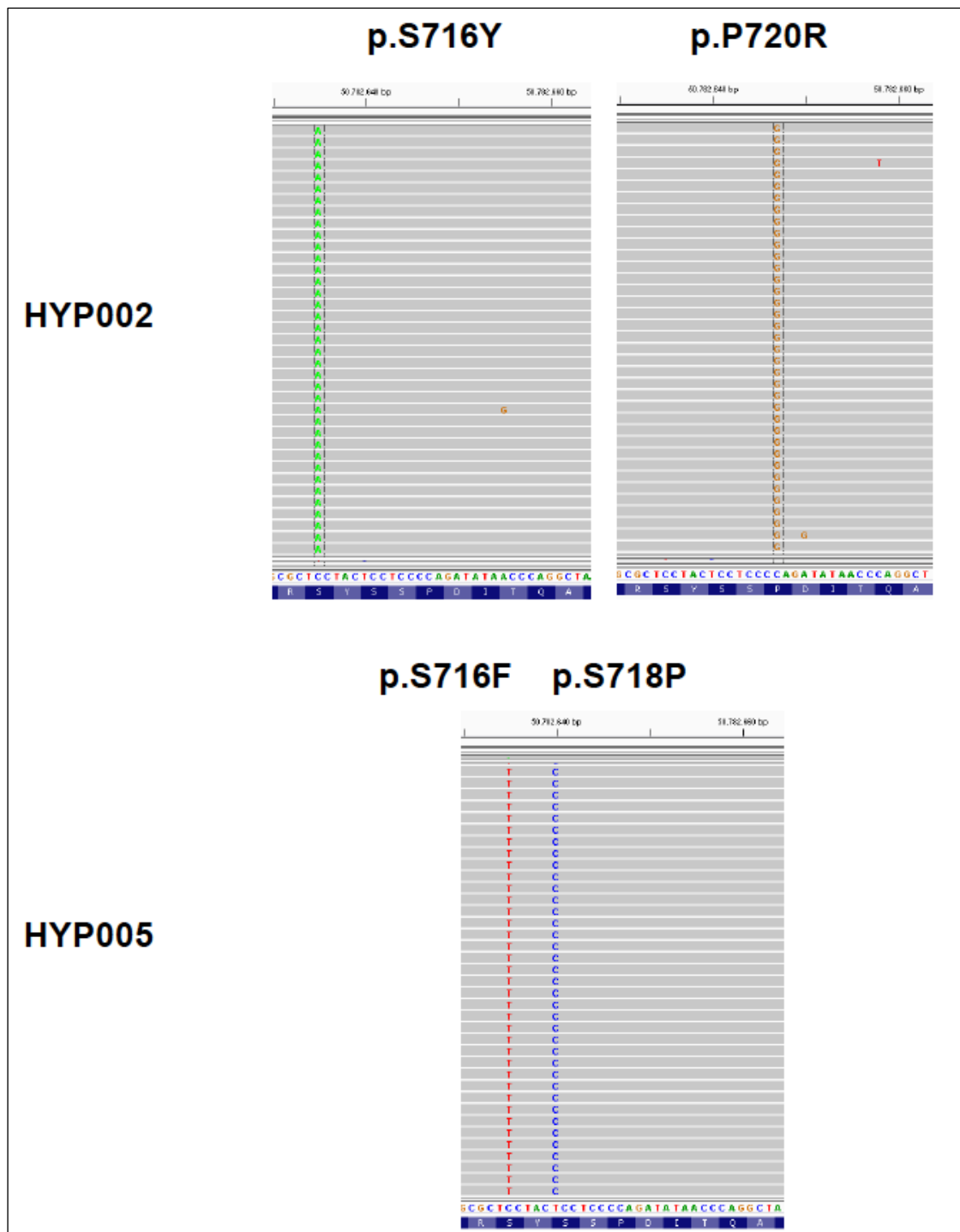
Zudem ergab das NGS für die Positivkontrolle HYP029 ein mit der Sanger Sequenzierung übereinstimmendes Ergebnis. Eine Allelfrequenz von 98,5 % bestätigte den Verdacht entweder einer homozygoten Mutation oder des Verlustes der Heterozygotie.<sup>1</sup>



**Abb. 14: Allelfrequenzen mittels NGS identifizierter *USP8*-Varianten<sup>1</sup>**

Dargestellt werden vier mittels NGS identifizierte *USP8*-Varianten mit den zugehörigen Allelfrequenzen. Die Frequenzen wurden unter Verwendung des Programms CLC Workbench ermittelt. HYP029 zeigt eine Allelfrequenz von 98,5 %, was den Verdacht einer Homo- oder Hemizygotie bestätigt

Abb. 15 zeigt die NGS *reads* der Proben HYP002 und HYP005 und demonstriert die Verteilung der Mutationen auf ein (HYP005) bzw. zwei Allele (HYP002).



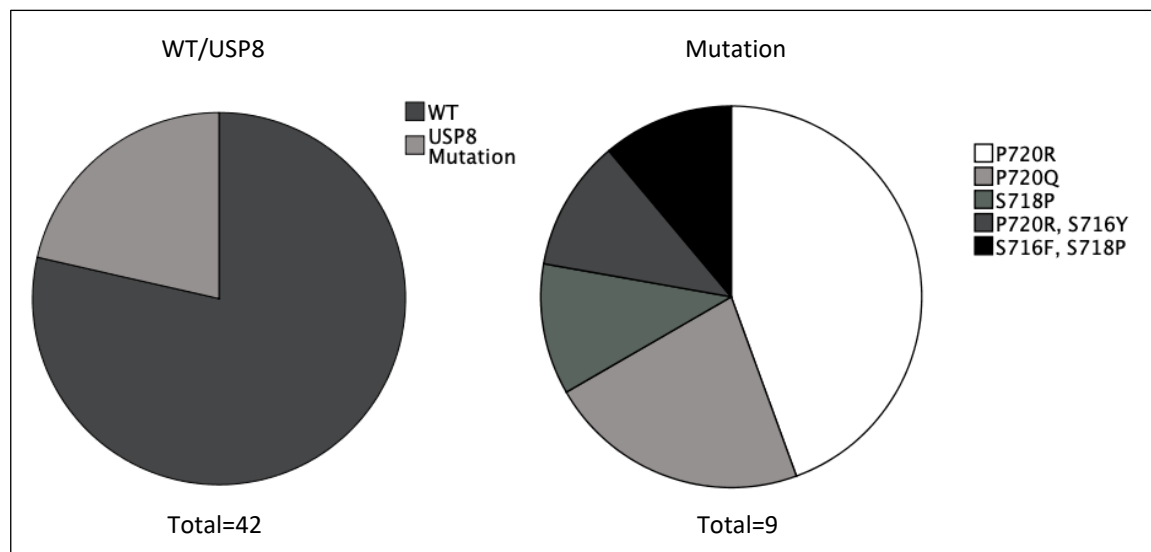
**Abb. 15: NGS reads der Tumore mit jeweils zwei Mutationen<sup>1</sup>**

Die Analyse der NGS reads mittels Integrative Genomic Viewer zeigt, dass die jeweils zwei Mutationen von HYP002 sich auf zwei Allele verteilt sind, während sich bei HYP005 beide Mutationen auf demselben Allel befinden.

Alle Tumore in denen ausschließlich mittels NGS Mutationen identifiziert wurden, hatten eine Größe <5 mm und waren somit Mikroadenome. Zudem lässt sich feststellen, dass beide Adenome mit Doppelmutationen von pädiatrischen Patientinnen stammen. In den beiden hormoninaktiven Hypophysenadenomen wurden auch mittels NGS keine Mutationen festgestellt.<sup>1</sup>

#### 4.1.4 Ermittlung von insgesamt neun Mutationen in 42 corticotropen Hypophysenadenomen

Zusammenfassend wurden insgesamt neun Mutationen in 42 Proben identifiziert. Die Mutationsfrequenz beträgt somit insgesamt 21,4 %. In fünf (55,6 %) der mutierten Adenome wurde die Variante p.P720R identifiziert, davon einmal als Doppelmutation zusammen mit p.S716Y auf unterschiedlichen Allelen und einmal als homozygote oder hemizygote Mutation. Die Variante p.P270Q konnte in zwei (22,2 %) Adenomen mittels Sanger Sequenzierung detektiert werden. Zweimal (22,2 %) wurde auch die Variante p.S718P identifiziert, davon einmal als Doppelmutation zusammen mit p.S716F auf dem gleichen Allel (Abb. 16).<sup>1</sup>



**Abb. 16: Mutationsfrequenz und Art der Mutationen**

Die Abbildung zeigt links den Anteil der Tumore mit detektierter USP8-Mutation und rechts die Häufigkeit der fünf verschiedenen Mutationen, wobei Doppelmutationen separat beschrieben werden.

Bis auf die eine genannte Ausnahme waren alle Mutationen heterozygot. Es wurde keine Deletion oder Insertion detektiert. Eine Darstellung der jeweiligen Genloki und Datenbankkennung der Einzelnukleotid-Polymorphismen zeigt Tabelle 17.<sup>1</sup>

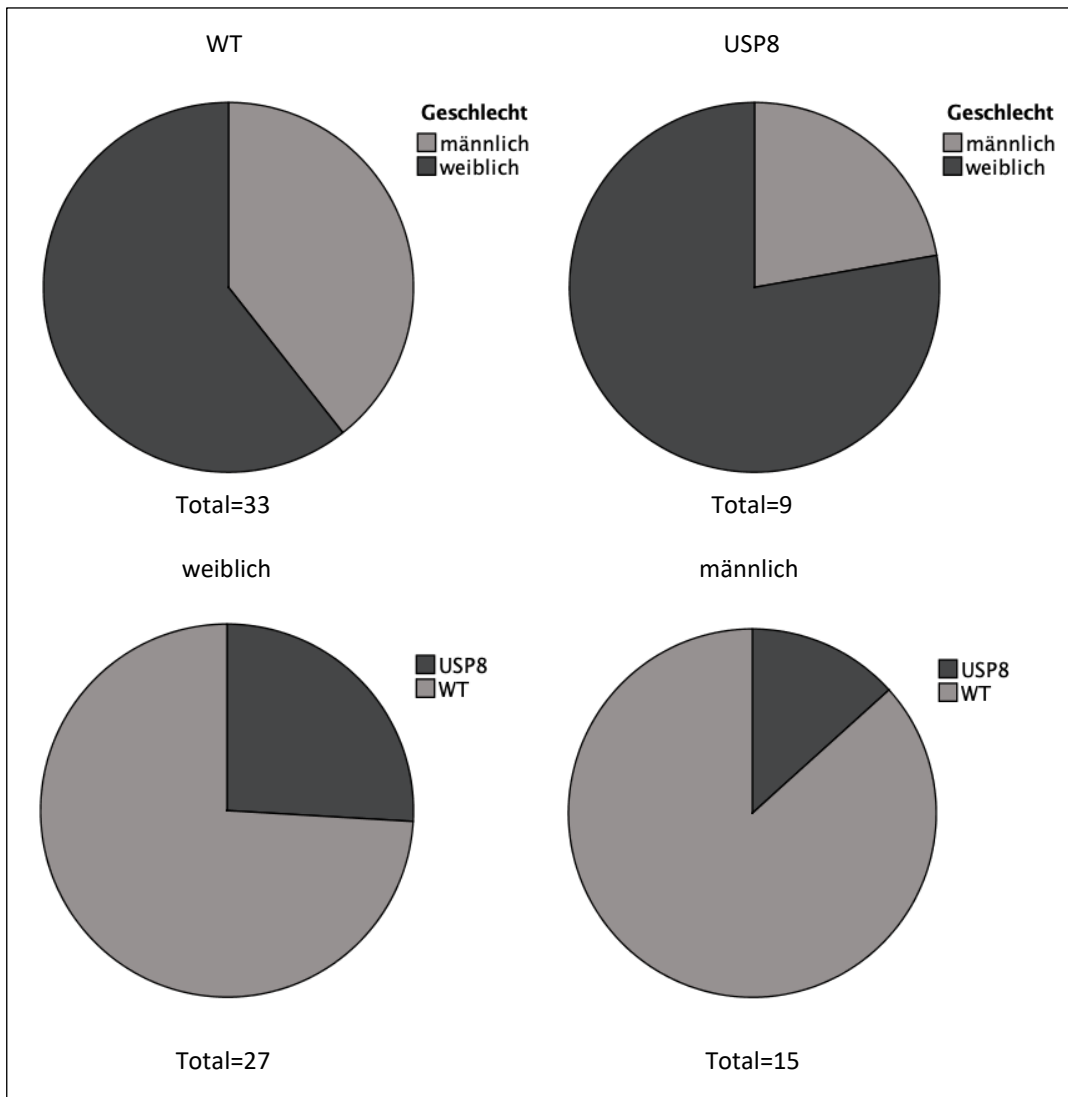
rs Nr. oder COSMIC Nr	Genlokus	Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch
rs672601311	15:50490450	C>G	P720R
rs672601307	15:50490443	C>T	S718P
In dieser Studie identifiziert	15:50490438	C>A	S716Y
COSM416905	15:50490450	C>A	P720Q
rs753615462	15:50490438	C>T	S716F

**Tabelle 17: Identifizierte USP8-Varianten<sup>1</sup>**

Der Genlokus bezieht sich auf die Datenbank des *Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 7* (GRCh38.p7). Der Austausch der Aminosäure bezieht sich auf NP\_005145.3. Abkürzungen: COSMIC Nummer, *catalog of somatic mutations in cancer database* Datenbankkennung für Einzelnukleotid-Polymorphismen, die nicht in der *Single Nucleotide Polymorphism database* vorhanden sind; rs Nummer, Referenz Einzelnukleotid Polymorphismus in der *Single Nucleotide Polymorphism database dbSNP*.

#### 4.1.5 Korrelation klinischer Daten mit dem *USP8*-Mutationsstatus

Von 27 Frauen trugen sieben eine Mutation im *USP8*-Gen. Dies ergibt eine Mutationsfrequenz von 25,9 % für Frauen. Von 13 Männern wurde bei zweien eine Mutation detektiert, was eine Mutationsfrequenz der Männer von 13,3 % ergibt. Auch in der Gruppe der Wildtypen waren die Frauen mit einer Anzahl von 20 (60,6 %) gegenüber 13 Männern (39,4 %) überrepräsentiert (Abb. 17). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Geschlechterverteilung im Vergleich zwischen Mutanten und Wildtypen ( $P=0,45$ , zweiseitiger Fisher-Test). Beide pädiatrischen Patientinnen mit *USP8*-Mutationen waren weiblich.<sup>1</sup>

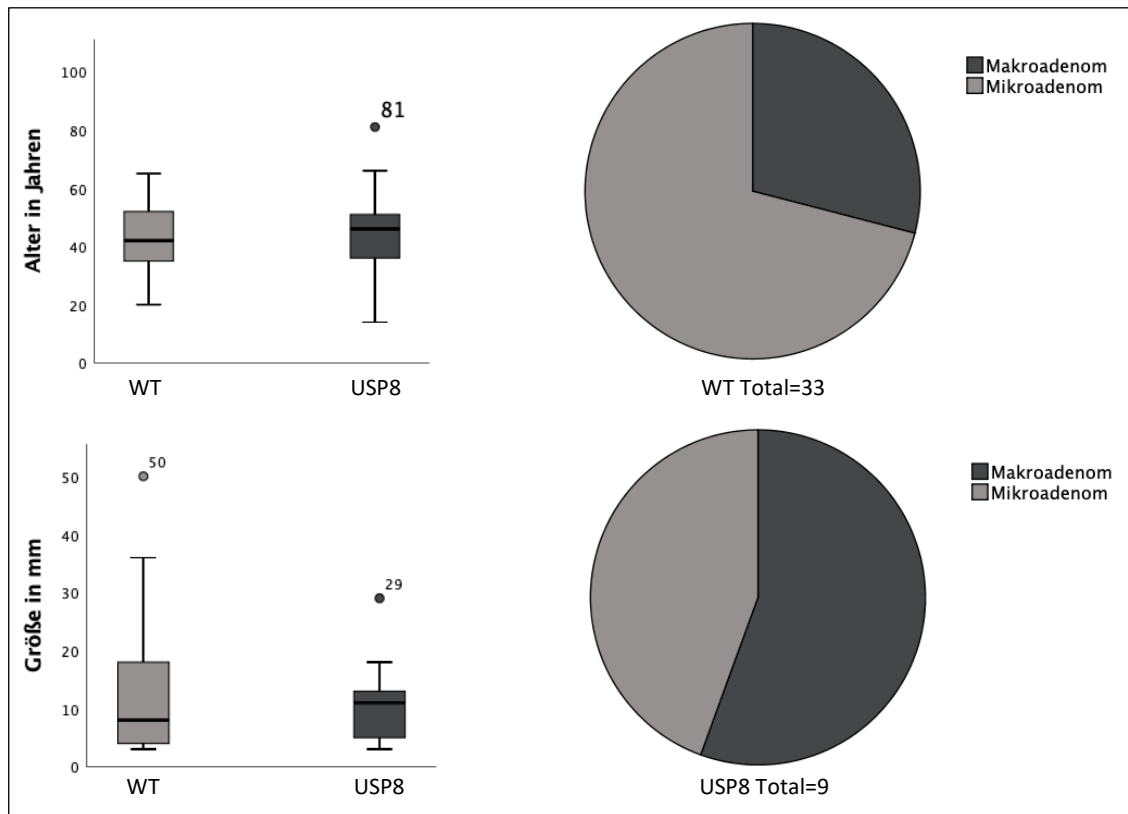


**Abb. 17: Geschlechterverteilung in Abhängigkeit vom Mutationsstatus<sup>1</sup>**

Die Abbildung zeigt oben die Geschlechterverteilung für WT (links) und USP8-Mutationen (rechts) und unten die Verteilung von USP8-Mutationen und WT bei weiblichen (links) und männlichen (rechts) PatientInnen.

Auch in Bezug auf das Alter der PatientInnen zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $P=0.82$ , ungepaarter zweiseitiger t-Test mit Welch-Korrektur). Das durchschnittliche Alter der PatientInnen mit *USP8*-Mutationen lag bei  $43,9 \pm 21,8$  (MW  $\pm$  SD) Jahren, das Alter der PatientInnen ohne *USP8*-Mutationen lag bei  $42,1 \pm 12,0$  (MW  $\pm$  SD) Jahren (Abb. 18).<sup>1</sup>

Vier (44,4 %) der mutierten Tumore stellten Mikroadenome dar, wogegen fünf (55,6 %) Makroadenome waren. Unter den Wildtypen fanden sich 22 (71,0 %) Mikro- und neun (29,0 %) Makroadenome. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtypen und Mutanten in Bezug auf die Zuordnung zu Mikro-/Makroadenomen feststellen ( $P=0,23$ , zweiseitiger Fisher-Test). Die durchschnittliche Größe mutierter Tumore betrug  $11,4 \pm 8,2$  (MW  $\pm$  SD) mm, die nicht-mutierter Tumore  $12,43 \pm 12,1$  (MW  $\pm$  SD) mm. (Abb. 18) Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $P=0,72$ , zweiseitiger Mann-Whitney-Test) zwischen WT und Mutanten in Bezug auf die Größe.<sup>1</sup>



**Abb. 18: Verteilung von Alter, Größe und Mikro-/Makroadenomen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus (In Anlehnung an <sup>1</sup>)**

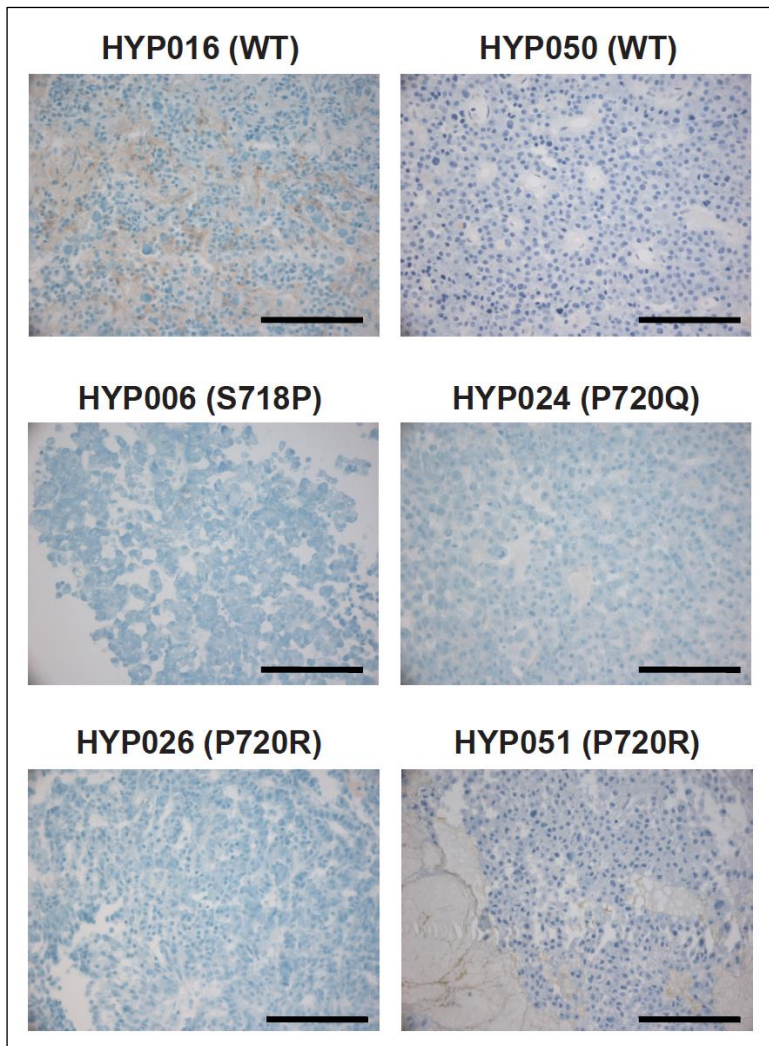
Die Abbildung zeigt links das Alter der PatientInnen (oben) und den maximalen Tumordurchmesser (unten) von WT- und USP8-mutierten Tumoren (Linie, Median; Box, Interquartilsabstand; „Whisker“, 1,5facher Interquartilsabstand; Punkt, Ausreißer). Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Rechts dargestellt sind die Anzahl an Mikro- und Makroadenomen für WT (oben) und USP8 (unten).

#### 4.1.6 Keine Hochregulation der EGFR-Expression bei Tumoren mit USP8-Mutationen

Da Studien zuvor einen Zusammenhang zwischen USP8-Mutationen und einer EGFR-Überexpression vermuteten<sup>49, 50</sup>, wurde eine Immunhistochemie der Proben mit EGFR-Antikörpern durchgeführt. Keine der mutierten Proben zeigte eine Hochregulation der EGFR-Expression. Vereinzelt wurde eine sehr schwache EGFR-Positivität für angrenzendes Gewebe verzeichnet.<sup>1</sup>

Abb. 19 zeigt beispielhaft die EGFR-Immunhistochemie von vier mutierten Adenomen, die mittels Sanger Sequenzierung identifiziert wurden, sowie von zwei Wildtyp-Tumoren.





**Abb. 19: EGFR Immunhistochemie<sup>1</sup>**

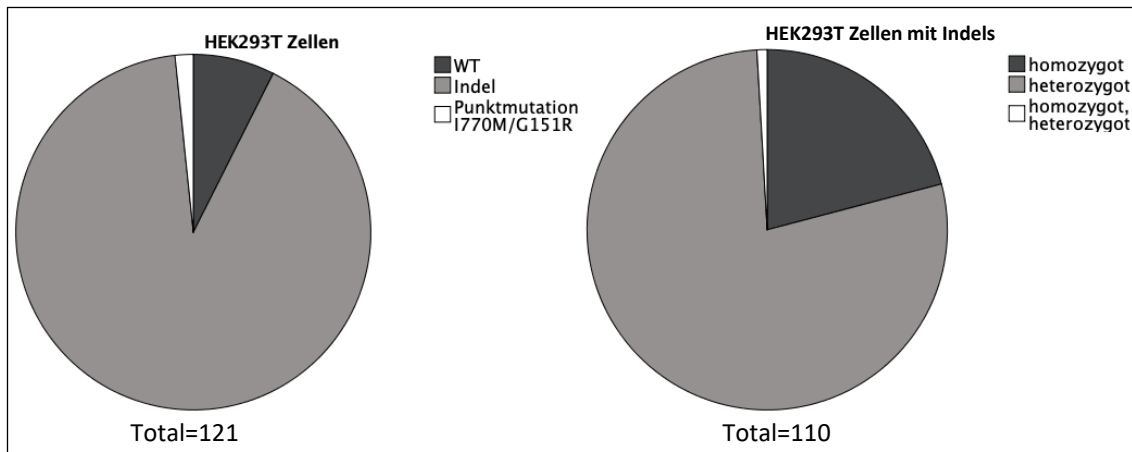
Die Abbildung zeigt: HYP016: *USP8*-WT mit positiver EGFR-Immunhistochemie (Positivkontrolle); HYP050 *USP8*-WT mit negativer EGFR-IHC; keiner der Tumore mit *USP8*-Mutation zeigt eine EGFR-positive IHC, als repräsentative Beispiele gezeigt werden Bilder von HYP006, HYP024, HYP026, HYP051. HYP051 demonstriert beispielhaft die schwache EGFR-Positivität angrenzenden Gewebes, die vereinzelt vorkommt. Maßstabsbalken 100 $\mu$ m

## 4.2 Genome Editing mittels CRISPR/Cas9 in HEK293 und HAC15 Zellen

### 4.2.1 Identifizierung von zwei homozygoten I770M-Mutationen und 110 Indels in 121 HEK293 Zellklonen

Zunächst wurden je zwei unterschiedliche sgRNAs für *KCNJ5* und *CACNAID* designt und in Plasmide, die Cas9 cDNA und ein Puromycin-Resistenzgen enthalten, kloniert. Es erfolgte testweise eine Transfektion von schnell wachsenden HEK293 Zellen mit je zwei *KCNJ5* (*KCNJ5* 1, 2) und *CACNAID* (*CACNAID* 1, 2) Konstrukten und einem je 90 bp langen *repair template* (*templKCNJ5* bzw. *templCACNAID*) (Tabelle 14).

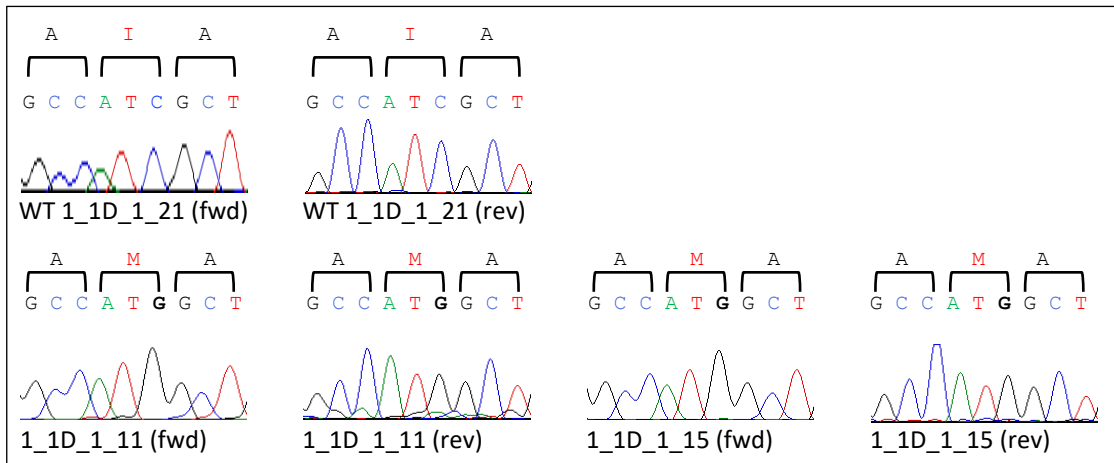
Nach erfolgreicher Transfektion wurden ca. 220 (je Konstrukt ca. 50-60) HEK293 Zellklone gepickt. Bei 121 (55 %) konnte DNA isoliert und sequenziert werden. Die übrigen Zellklone sind nicht angewachsen. Unter den sequenzierten Klonen wurden neun (7,4 %) WT, 110 (90,9 %) Indels und zweimal (1,7 %) die homozygote Mutation I770M im *CACNAID*-Gen identifiziert. 23 (20,9 %) der Indels waren homozygot, 86 (78,2 %) heterozygot. In einem Zellklon (0,9 %) konnten mindestens zwei Indels identifiziert werden, wovon eine als homozygot und eine als heterozygot interpretiert werden konnte. (Abb. 20)



**Abb. 20: Anteil an WT, Indels und Punktmutationen (I770M/G151R), sowie Zygosität der Indels im Vergleich zwischen transfizierten HEK293 Zellen**

Links: Anteil an WT, Indels und Punktmutationen (I770M/G151R), rechts: Zygosität der Indels, wobei homozygot, heterozygot bedeutet, dass mindestens zwei Indels vorhanden sind, wovon mindestens eine homo- und eine heterozygot ist.

Beide Zellklone (1\_1D\_1\_11, 1\_1D\_1\_15), in denen die homozygote Mutation I770M im *CACNAID*-Gen identifiziert wurde, wurden mit dem Konstrukt *CACNAID\_1* und dem *repair template* *templCACNAID* transfiziert. Eine Darstellung der Chromatogramme der I770M-mutierten Zellklone zeigt Abb. 21.

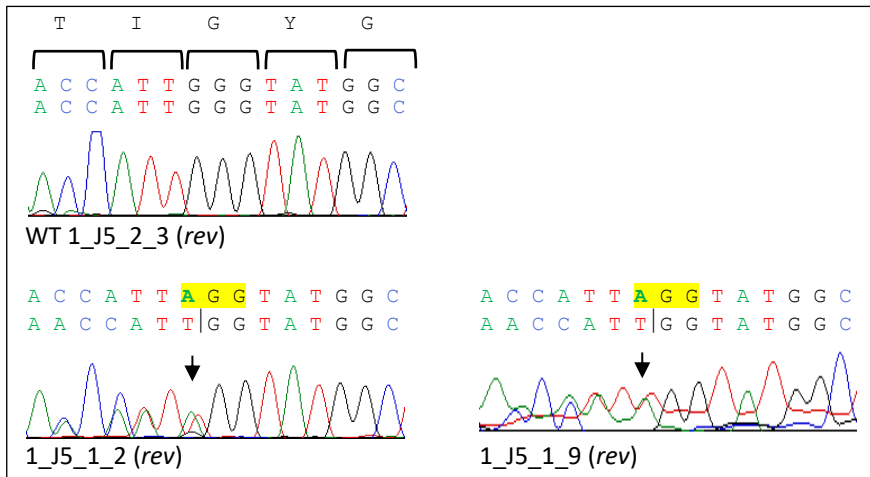


**Abb. 21: Chromatogramme zweier homozygoter I770M Mutationen im *CACNAID*-Gen**

Die Sanger Sequenzen zeigen eine WT-Sequenz (oben) und zweimal die homozygote Mutation I770M im *CACNAID*-Gen (unten). Dargestellt sind die Chromatogramme mit Beschriftung der Basen. Mutierte Basen werden **fett** dargestellt. Oberhalb werden die zu den Basentriplets zugehörigen Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code gezeigt. Rot gekennzeichnet ist jeweils die veränderte Aminosäure. Abkürzungen: fwd, forward, rev, reverse

Ein Klon kann zusätzlich zu einer Indel auf dem gleichen oder dem anderen Allel eine I770M- oder G151R-Mutation tragen. In 10 (8,3%) der HEK293 Zellklone mit einer Indel war dies der Fall. Zwei Klone mit einer Indel zeigten zusätzlich die Mutation G151R und acht die Mutation I770M. Um die genannten Punktmutationen eindeutig identifizieren zu können und zu beurteilen, ob diese auf dem gleichen Allel wie die Indel oder auf dem anderen Allel vorkommt, wäre eine Klonierung der PCRs mit anschließender Sequenzierung der einzelnen Stränge notwendig. Eine solche Untersuchung war an dieser Stelle nicht möglich. Deshalb werden derartige Veränderungen in dieser Arbeit als fragliche I770M- bzw. G151R-Mutationen beschrieben.

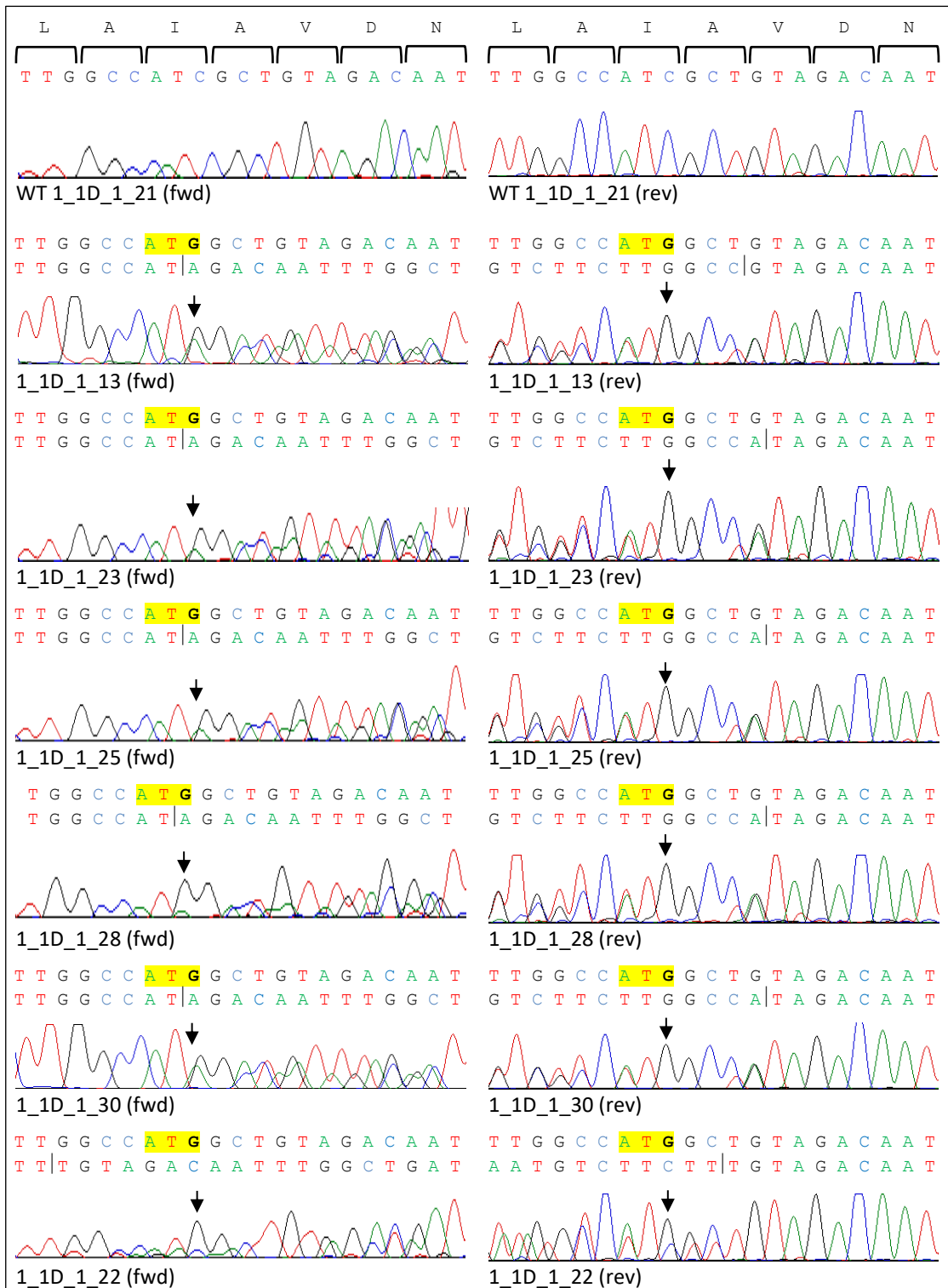
Beide fraglichen G151R-Mutationen wurden in Zellklonen (1\_J5\_1\_2, 1\_J5\_1\_9) identifiziert, welche mit dem Konstrukt *KCNJ5\_1* und dem *repair template* *templKCNJ5* transfiziert wurden. Abb. 22 zeigt die zugehörigen Chromatogramme. In beiden Fällen lassen die Sequenzen vermuten, dass auf einem Allel die G151R-Mutation aufgetreten ist und auf dem anderen Allel eine 1 bp-Deletion vorhanden ist. Auf Grund der Indel, lassen sind nur die *reverse*-Sequenzen eindeutig lesen, weshalb aus Einfachheitsgründen auf die Darstellung der *forward*-Sequenzen verzichtet wird.



**Abb. 22: Chromatogramme fraglicher G151R Mutationen in HEK293 Zellklonen**

Die Sanger Sequenzen zeigen eine WT-Sequenz (oben) und zwei Zellklone mit fraglicher G151R-Mutation. Dargestellt sind die Chromatogramme mit Beschriftung der Basen beider Allele. Für den WT werden oberhalb die zu den Basentriplets zugehörigen Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code gezeigt. Gelb markiert ist das fraglich G151R-mutierte Basentriplett. Senkrechte Striche markieren eine Deletion und damit den Beginn einer Leserasterverschiebung. In beiden Fällen lassen die Sequenzen vermuten, dass auf einem Allel die G151R-Mutation aufgetreten ist (jeweils obere Sequenz, gelb markiert) und auf dem anderen Allel eine 1 bp-Deletion vorhanden ist (jeweils untere Sequenz, senkrechter Strich). Auf Grund der Indel, lassen sind nur die *reverse*-Sequenzen eindeutig lesen, weshalb auf die Darstellung der *forward*-Sequenzen verzichtet wird. Die Pfeile zeigen die fragliche Mutation an. Abkürzungen: rev, *reverse*

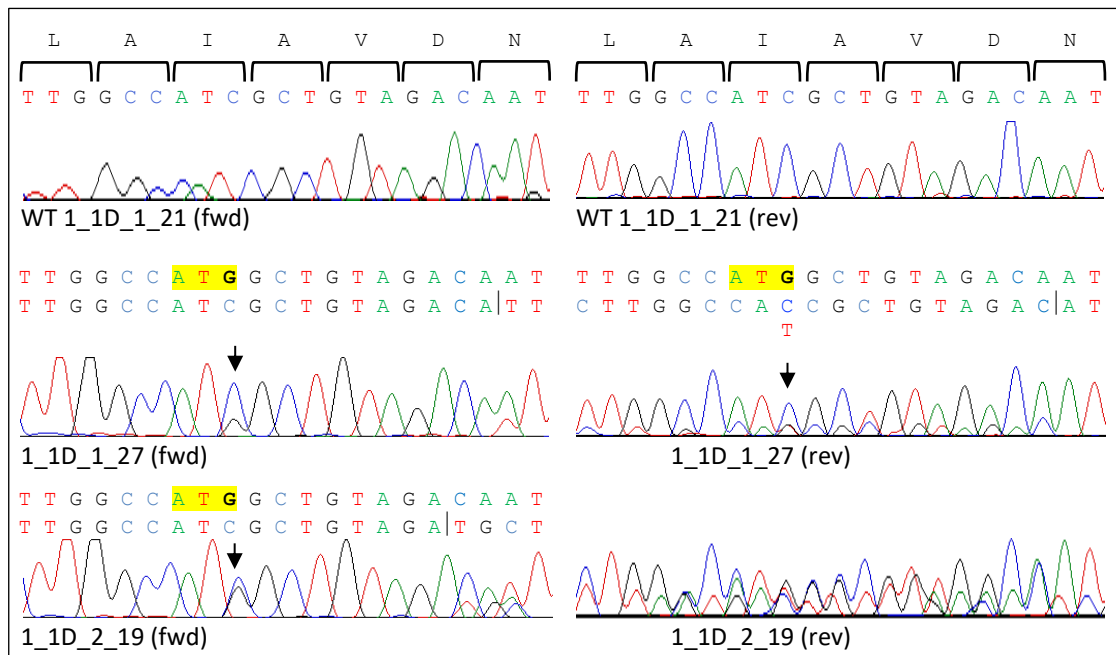
Sieben der acht fraglichen I770M-Mutationen wurden in Zellklonen identifiziert, welche mit dem Konstrukt *CACNAID\_1* transfiziert wurden. In einem Fall (1\_1D\_2\_19) erfolgte eine Transfektion mit dem Konstrukt *CACNAID\_2*. In allen Fällen wurde das *repair template* *templ-CACNAID* verwendet. In sechs Fällen lassen die Sequenzen vermuten, dass auf einem Allel die I770-Mutation aufgetreten ist und auf dem anderen Allel eine 6 bp-Deletion (1\_1D\_1\_13, 23, 25, 28, 30) oder eine 9 bp-Deletion (1\_1D\_1\_22) vorhanden ist. Abb. 23 zeigt die zugehörigen Chromatogramme.



**Abb. 23: Chromatogramme fraglicher I770M Mutationen in HEK293 Zellklonen (1)**

Die Sanger Sequenzen zeigen eine WT-Sequenz (oben) und fünf Zellklone mit fraglicher I770M-Mutation. Dargestellt sind die Chromatogramme mit Beschriftung der Basen beider Allele. Für den WT werden oberhalb die zu den Basentriplets zugehörigen Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code gezeigt. Gelb markiert ist das fraglich I770M-mutierte Basentriplett. Senkrechte Striche markieren eine Deletion und damit den Beginn einer Leserasterverschiebung. In allen Fällen lassen die Sequenzen vermuten, dass auf einem Allel die G151R-Mutation aufgetreten ist (obere Sequenz, gelb markiert) und auf dem anderen Allel eine 6 bp-Deletion (1\_D\_1\_13, 23, 25, 28, 30) oder 9 bp-Deletion (1\_D\_1\_22) vorhanden ist. Die Pfeile zeigen die fragliche Mutation an. Abkürzungen: rev, *reverse*

In einem Zellklon (1\_1D\_1\_27) lässt die *forward*-Sequenz eine heterozygote I770M-Mutation mit einer zusätzlichen Indel 11 bp von dieser Position entfernt entweder auf dem gleichen oder dem anderen Allel vermuten. Die zugehörige *reverse*-Sequenz zeigt am ehesten auf einem Allel eine I770M-Sequenz und auf dem anderen eine Indel. Um eine sichere Aussage zu treffen, wäre insbesondere hier eine Klonierung der PCRs mit anschließender Sequenzierung der einzelnen Stränge notwendig (s.o.). In einem mit dem Konstrukt *CACNAID\_2* transfizierten Zellklon (1\_1D\_2\_19) zeigte die *forward*-Sequenz am ehesten eine heterozygote I770M-Mutation und zusätzlich zwei Indels. Es ist unklar, ob diese auf einem oder auf unterschiedlichen Allelen auftritt. Vermutlich auf Grund der Indel ist die *reverse*-Sequenz nicht eindeutig lesbar.



**Abb. 24: Chromatogramme fraglicher I770M Mutationen in HEK293 Zellklonen (3)**

Die Sanger Sequenzen zeigen eine WT-Sequenz (oben) und zwei Zellklone mit fraglicher I770M-Mutation. Dargestellt sind die Chromatogramme mit Beschriftung der Basen beider Allele. Für den WT werden oberhalb die zu den Basentriplets zugehörigen Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code gezeigt. Gelb markiert ist das fraglich I770M-mutierte Basentriplett. Senkrechte Striche markieren eine Deletion und damit den Beginn einer Leserasterverschiebung. In einem Fall (1\_1D\_1\_27) lässt die *forward*-Sequenz eine heterozygote I770M-Mutation und 11 bp entfernt eine Indel vermuten. Die *reverse*-Sequenz zeigt am ehesten auf einem Allel eine I770M-Sequenz und auf dem anderen eine Indel. Das untere Chromatogramm (1\_1D\_2\_19) zeigt in der *forward*-Sequenz am ehesten eine heterozygote I770M-Mutation und zusätzlich zwei Indels. Die *reverse*-Sequenz wird dargestellt, jedoch ohne Beschriftung der Basen, da die Sequenz vermutlich auf Grund der Indels nicht eindeutig lesbar ist.

Das Ergebnis aller Sequenzierungen der HEK293 Zellklone im Detail zeigen Tabelle 18-Tabelle 20. Um einen Überblick über das Spektrum der erzeugten Indels zu bekommen, wurden die homozygoten Indels genauer beschrieben (s.u.). Die verlässliche Identifizierung von heterozygoten Indels ist nur im Rahmen einer Klonierung und Auftrennung der Allele möglich (s.o.), was im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde, da die Erzeugung von Indels nicht primäres Ziel der Arbeit war.

Konstrukt	Repair template	Klon	Sequenzierungsergebnis	Zygotie	Charakterisierung homozygoter Indels		
<i>KCNJ5</i> 1	<i>KCNJ5</i>	1_J5_1_1	Indel	heterozygot			
		1_J5_1_2	Indel (vermutlich 1 bp-Deletion) + fraglich G151R	heterozygot			
		1_J5_1_3	Indel	heterozygot			
		1_J5_1_4	Indel	heterozygot			
		1_J5_1_5	Indel	heterozygot			
		1_J5_1_6	Indel	heterozygot			
		1_J5_1_7	Indel	homozygot	p.Ile150AsnfsTer102		
		1_J5_1_8	Indel	heterozygot			
		1_J5_1_9	Indel (vermutlich 1 bp-Deletion) + fraglich G151R	heterozygot			
		1_J5_1_10	Indel	homozygot	p.Ile150AsnfsTer102		
		1_J5_1_11	Indel	homozygot	p.Ile150AsnfsTer102		
		1_J5_1_12	Indel	homozygot	p.Ile150AsnfsTer102		
		1_J5_1_13	Indel	heterozygot			
		1_J5_1_14	Indel	homozygot	p.Ile150AsnfsTer102		
		<i>KCNJ5</i> 2	<i>KCNJ5</i>	1_J5_2_1	Indel	heterozygot	
				1_J5_2_2	Indel	heterozygot	
				1_J5_2_3	WT		
				1_J5_2_4	Indel	heterozygot	
				1_J5_2_5	Indel	heterozygot	
				1_J5_2_6	Indel	heterozygot	
1_J5_2_7	Indel			heterozygot			
1_J5_2_8	Indel			heterozygot			
1_J5_2_9	Indel			heterozygot			
1_J5_2_10	Indel			heterozygot			
1_J5_2_11	Indel			heterozygot			
1_J5_2_12	Indel			heterozygot			
1_J5_2_13	Indel			heterozygot			
1_J5_2_14	Indel			heterozygot			
1_J5_2_15	Indel			heterozygot			
1_J5_2_16	Indel			heterozygot			
1_J5_2_17	Indel			heterozygot			
1_J5_2_18	Indel			heterozygot			
1_J5_2_19	Indel			heterozygot			
1_J5_2_20	Indel			heterozygot			
1_J5_2_21	Indel			heterozygot			
1_J5_2_22	Indel			heterozygot			
1_J5_2_23	Indel			homozygot	p.(Glu145_Ile150del)		
1_J5_2_24	Indel			heterozygot			
1_J5_2_25	Indel			heterozygot			
1_J5_2_26	Indel			heterozygot			
1_J5_2_27	Indel			heterozygot			
1_J5_2_28	Indel			heterozygot			
1_J5_2_29	Indel			heterozygot			
1_J5_2_30	Indel			heterozygot			
1_J5_2_31	Indel			homozygot	p.Thr148IlefsTer101		
1_J5_2_32	Indel			heterozygot			

Tabelle 18: Sequenzierungsergebnisse aller HEK293 Zellklone im Detail (1)

Konstrukt	Repair template	Klon	Sequenzierungsergebnis	Zygotie	Charakterisierung homozygoter Indels
<i>KCNJ5</i> 2	templ <i>KCNJ5</i>	1_J5_2_33	Indel	heterozygot	
		1_J5_2_34	Indel	heterozygot	
		1_J5_2_35	Indel	heterozygot	
		1_J5_2_36	Indel	heterozygot	
<i>CACNAID</i> 1	templ <i>CACNAID</i>	1_1D_1_1	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_2	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_3	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_4	WT		
		1_1D_1_5	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_6	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_7	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_8	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_9	Indel	heterozygot, homozygot	
		1_1D_1_10	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_11	I770M	homozygot	
		1_1D_1_12	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_13	Indel (vermutlich 6 bp-Deletion) + fraglich I770M	heterozygot	
		1_1D_1_14	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_15	I770M	homozygot	
		1_1D_1_16	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_17	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_18	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_19	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_20	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_21	WT		
		1_1D_1_22	Indel (vermutlich 9 bp-Deletion) + fraglich I770M	heterozygot	
		1_1D_1_23	Indel (vermutlich 6 bp-Deletion) + fraglich I770M	heterozygot	
		1_1D_1_24	WT		
		1_1D_1_25	Indel (vermutlich 6 bp-Deletion) + fraglich I770M	heterozygot	
		1_1D_1_26	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_27	Indel + fraglich I770M	heterozygot	
		1_1D_1_28	Indel (vermutlich 6 bp-Deletion) + fraglich I770M	heterozygot	
		1_1D_1_29	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_30	Indel (vermutlich 6 bp-Deletion) + fraglich I770M	heterozygot	

Tabelle 19: Sequenzierungsergebnisse aller HEK293 Zellklone im Detail (2)



Konstrukt	Repair template	Klon	Sequenzierungsergebnis	Zygotie	Charakterisierung homozygoter Indels
<i>CACNAID</i> 1	templ <i>CACNAID</i>	1_1D_1_31	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_32	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_33	WT		
		1_1D_1_34	WT		
		1_1D_1_35	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_36	WT		
		1_1D_1_37	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_38	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_39	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_40	Indel	heterozygot	
		1_1D_1_41	WT		
<i>CACNAID</i> 2	templ <i>CACNAID</i>	1_1D_2_1	Indel	heterozygot	
		1_1D_2_2	WT		
		1_1D_2_3	Indel	homozygot	p.Asn774LysfsTer4
		1_1D_2_4	Indel	heterozygot	
		1_1D_2_5	Indel	heterozygot	
		1_1D_2_6	Indel	homozygot	p.Asn774MetfsTer5
		1_1D_2_7	Indel		
		1_1D_2_8	Indel		
		1_1D_2_9	Indel	homozygot	p.Asn774LysfsTer4
		1_1D_2_10	Indel	homozygot	p.Asn774LysfsTer4
		1_1D_2_11	Indel	homozygot	p.Asn774LysfsTer4
		1_1D_2_12	Indel	homozygot	p.Asn774LysfsTer4
		1_1D_2_13	Indel	heterozygot	
		1_1D_2_14	Indel	homozygot	p.Asn774LysfsTer4
		1_1D_2_15	Indel	homozygot	p.Asn774LysfsTer4
		1_1D_2_16	Indel	homozygot	p.Asn774LysfsTer4
		1_1D_2_17	Indel	homozygot	p.Asn774LysfsTer4
		1_1D_2_18	Indel	homozygot	p.Asn774LysfsTer4
		1_1D_2_19	Indel + fraglich I770M	heterozygot	
		1_1D_2_20	Indel	homozygot	p.Asn774LysfsTer4
1_1D_2_21	Indel	homozygot	p.Asn774LysfsTer4		
1_1D_2_22	Indel	heterozygot			
1_1D_2_23	Indel	heterozygot			
1_1D_2_24	Indel	homozygot	p.Asn774LysfsTer4		
1_1D_2_25	Indel	homozygot	p.Asn774LysfsTer4		
1_1D_2_26	Indel	homozygot	p.Asn774LysfsTer4		
1_1D_2_27	Indel	heterozygot			
1_1D_2_28	Indel	heterozygot			
1_1D_2_29	Indel	heterozygot			
1_1D_2_30	Indel	heterozygot			

Tabelle 20: Sequenzierungsergebnisse aller HEK293 Zellklone im Detail (3)

#### 4.2.2 Ergebnisse des erfolgreichen *Genome Editings* in HEK293 Zellen in Abhängigkeit vom verwendeten Konstrukt – Überlegenheit der Konstrukte *CACNAID\_1* und *KCNJ5\_1*

Vergleicht man den Erfolg des gezielten *Genome Editings* in HEK293 Zellen in Abhängigkeit vom verwendeten Konstrukt (Tabelle 21), fällt zunächst auf, dass Zellen, die mit *KCNJ5\_1* transfiziert wurden, nur in 28 % der Fälle erfolgreich sequenziert werden konnten. Die restlichen Zellklone sind nicht angewachsen. Bei Zellen, die mit einem der anderen Konstrukte transfiziert wurden, lag der Anteil der Zellen, die erfolgreich sequenziert werden konnten, dagegen bei ca. 50-70 %.

Zellen, die mit *CACNAID\_1* transfiziert wurden, zeigten den höchsten Anteil an WT (17,1%) im Vergleich zu allen anderen Konstrukten (0-3,3 %). Innerhalb der Gruppe der Indels kamen nach Transfektion mit *KCNJ5\_2* und *CACNAID\_1* fast ausschließlich (94,3 % und 96,9 %) heterozygote Indels vor. Indels von Zellklonen, die mit *KCNJ5\_1* und *CACNAID\_2* transfiziert wurden, waren dagegen nur zu 64,3 % bzw. 55,2 % heterozygot. Da in zwei (4,9 %) Zellklonen, die mit *CACNAID\_1* transfiziert wurden, die homozygote Mutation I770M identifiziert werden konnte und zudem sieben (17,1 %) weitere Zellklone zusätzlich zu einer Indel fraglich die Mutation I770M zeigten, wurde dieses Konstrukt im Folgenden für das *Genome Editing* in HAC15 Zellen verwendet.

Zudem wurde das Konstrukt *KCNJ5\_1* weiterhin verwendet, da nach Transfektion bei zwei (14,3 %) Zellklonen zusätzlich zu einer Indel fraglich die Mutation G151R identifiziert wurde. Einen Überblick der Sequenzierungsergebnisse in Abhängigkeit vom Konstrukt zeigt Tabelle 21.

Zell- linie	Konstrukt	Repair template	Ge- pickt	Se- quen- ziert	WT	Indel gesamt	Indel homo- zygot	Indel hetero- zygot	Indels homo- zygot, hetero- zygot	Punkt- muta- tion I770M/ G151R	Punkt- muta- tion I770M/ G151R fraglich
HEK 293	alle		ca. 220	121	9	110	23	86	1	2	10
				55 %	7,4 %	90,9 %	20,9 %	78,2 %	0,9 %	1,7 %	8,3 %
	<i>KCNJ5</i> (gesamt)	templ <i>KCNJ5</i>	ca. 100	50	1	49	7	42	-	-	2
				50 %	2 %	98 %	14,3 %	85,7 %			4%
	<i>KCNJ5_1</i>	templ <i>KCNJ5</i>	ca. 50	<b>14</b> <b>28 %</b>	-	14	5	9	-	-	<b>2</b> <b>14,3%</b>
	<i>KCNJ5_2</i>	templ <i>KCNJ5</i>	ca. 50	36 72 %	1 2,8 %	35 97,2 %	2 5,7 %	33 94,3 %	-	-	-
	<i>CACNAID</i> (gesamt)	templ <i>CACNAID</i>	ca. 120	71	8	61	16	44	1	2	8
				59,2 %	11,3 %	85,9 %	26,2 %	72,1 %	1,6%	2,8%	11,3 %
	<i>CACNAID_1</i>	templ <i>CACNAID</i>	ca. 60	41 68,3 %	7 17,1 %	32 78 %	-	31 96,9 %	1 3,1%	<b>2</b> <b>4,9%</b>	<b>7</b> <b>17,1 %</b>
	<i>CANCAID_2</i>	templ <i>CACNAID</i>	ca. 60	30 50 %	1 3,3 %	29 96,7 %	16 55,2 %	13 44,8 %	-		1 3,3 %

**Tabelle 21: Sequenzierungsergebnisse von HEK293 Zellklonen in Abhängigkeit von verwendetem Konstrukt und *repair template***

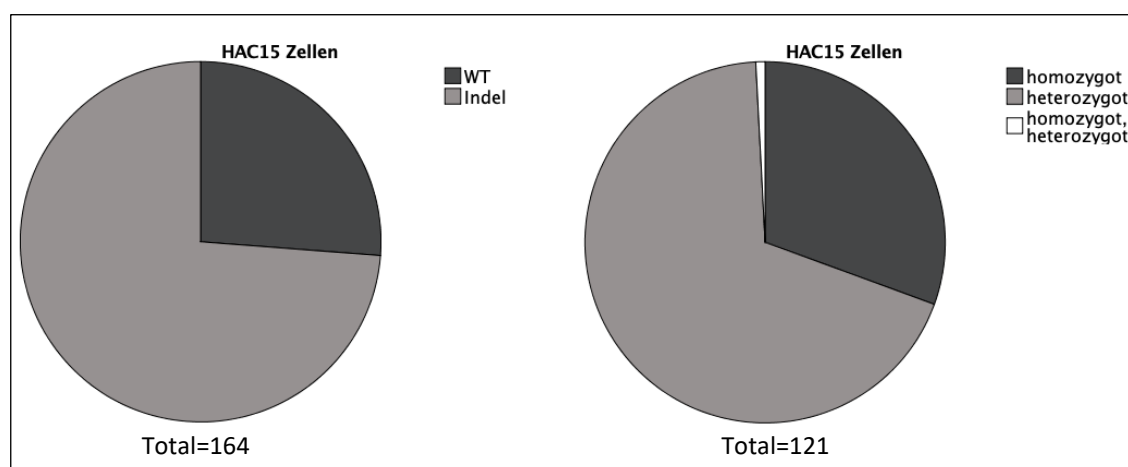
#### 4.2.3 Identifizierung von 121 Indels in 164 HAC15 Zellklonen

Es erfolgten vier Transfektionen (2-5) von HAC15 Zellen. Verwendet wurden wie oben beschrieben die Konstrukte *CACNAID\_1* (Transfektion 2-5) und *KCNJ5\_1* (Transfektion 3,4). Im Verlauf wurde zudem je eine weitere sgRNA für *KCNJ5* (*KCNJ5\_3*) und *CACNAID* (*CACNAID\_3*) designiert, in Plasmide, die Cas9 cDNA und ein Puromycin-Resistenzgen enthalten, kloniert und für die Transfektionen 4 (*CACNAID\_3*, *KCNJ5\_3*) und 5 (*KCNJ5\_3*) verwendet. Zudem kamen folgende *repair templates* zur Verwendung: *templCACNAID* (Transfektion 2,3), *templKCNJ5* (Transfektion 3), *templCACNAID\_large* (Transfektion 4), *templ-KCNJ5\_large* (Transfektion 4,5) und *templCACNAID\_sil* (Transfektion 5). Tabelle 22 zeigt eine Übersicht der Transfektionen und den dabei verwendeten Konstrukten und *repair templates*.

Zelllinie	Transfektion	Konstrukt	Repair template
HAC15	2	<i>CACNAID_1</i>	<i>templ CACNAID</i>
	3	<i>KCNJ5_1</i>	<i>templ KCNJ5</i>
	3	<i>CACNAID_1</i>	<i>templ CACNAID</i>
	4	<i>KCNJ5_1</i>	<i>templ KCNJ5_large</i>
	4	<i>KCNJ5_3</i>	<i>templ KCNJ5_large</i>
	4	<i>CACNAID_1</i>	<i>templ CACNAID_large</i>
	4	<i>CACNAID_3</i>	<i>templ CACNAID_large</i>
	5	<i>KCNJ5_3</i>	<i>templ KCNJ5_large</i>
	5	<i>CACNAID_1</i>	<i>templ CACNAID_sil</i>

**Tabelle 22: Übersicht der Transfektionen mit verwendeten Konstrukten und *repair templates***

Von insgesamt 360 gepickten HAC15 Zellklonen, wurde von 164 (45,6 %) die DNA isoliert und sequenziert. Die übrigen Zellklone sind nicht angewachsen. Die Sequenzierung ergab 43 (26,2 %) WT und 121 (73,8 %) Indels. Eine I770M- oder G151R-Mutation konnte nicht identifiziert werden. Von den Indels waren 37 (30,6 %) homozygot, 83 (68,6 %) heterozygot. In einem Zellklon (0,8 %) konnten mindestens zwei Indels identifiziert werden, wovon eine als homozygot und eine als heterozygot interpretiert werden konnte. Keiner der Klone mit einer Indel zeigte zusätzlich eine I770M oder G151R Mutation.



**Abb. 25: Anteil an WT und Indels sowie Zygosität der Indels transfizierter HAC15 Zellen**  
Links: Anteil an WT und Indels. Rechts: Zygosität der Indels.

#### 4.2.4 Ergebnisse des erfolgreichen *Genome Editings* in HAC15 Zellen in Abhängigkeit von der Transfektion, dem verwendeten Konstrukt und *repair template*

Da die Ergebnisse je nach Transfektion, sowie verwendetem Konstrukt und *repair template* stark variierten, wird im Folgenden eine Auswertung in Abhängigkeit dieser Variablen vorgenommen. Tabelle 23 zeigt eine Übersicht.

Zell- linie	Trans- fektion	Konstrukt	Repair template	Gepickt	Sequen- ziert	WT	Indel gesamt	Indel homo- zygot	Indel hetero- zygot	Indels homo- zygot, hetero- zygot
HAC 15		alle		ca. 360	164 45,6 %	43 26,2 %	121 73,8 %	37 30,6 %	83 68,6 %	1 0,8 %
	2	<i>CACNAID_1</i>	templ <i>CACNAID</i>	ca. 60	2 3,3%	2 100%	-	-	-	-
	3	<i>KCNJ5_1</i>	templ <i>KCNJ5</i>	-	-	-	-	-	-	-
	3	<i>CACNAID_1</i>	templ <i>CACNAID</i>	ca.100	<b>72</b> <b>72 %</b>	14 19,4 %	<b>58</b> <b>80,6 %</b>	12 20,7 %	46 79,3 %	-
	4	<i>KCNJ5_1</i>	templ <i>KCNJ5_</i> large	-	-	-	-	-	-	-
	4	<i>KCNJ5_3</i>	templ <i>KCNJ5_</i> large	-	-	-	-	-	-	-
	4	<i>CACNAID_1</i>	templ <i>CACNAID_</i> large	ca. 50	<b>12</b> <b>24 %</b>	<b>10</b> <b>83,3 %</b>	2 16,7 %	-	2 100 %	-
	4	<i>CACNAID_3</i>	templ <i>CACNAID_</i> large	ca. 50	<b>8</b> <b>16 %</b>	<b>7</b> <b>87,5 %</b>	1 12,5 %	-	1 100 %	-
	5	<i>KCNJ5_3</i>	templ <i>KCNJ5_</i> large	ca. 50	<b>38</b> <b>76 %</b>	1 2,6 %	37 97,4 %	15 40,5 %	22 59,5 %	-
	5 <sup>a</sup>	<i>CACNAID_1</i>	templ <i>CACNAID_</i> sil	ca. 50	<b>32</b> <b>64 %</b>	9 28,1 %	<b>23</b> <b>71,9 %</b>	10 43,5 %	12 52,2 %	1 4,3 %

**Tabelle 23: Sequenzierungsergebnisse von HAC15 Zellklonen in Abhängigkeit von der Transfektion, dem verwendeten Konstrukt und *repair template***

<sup>a</sup>Verwendung von Ultraser G Medium für diese Transfektion

Aufgrund des erfolgreichen Einbaus zweier homozygoter I770M-Mutationen in das Genom von HEK293 Zellen (s.o.) unter Verwendung des Konstrukts *CACNAID\_1* und des *repair templates* templ*CACNAID*, erfolgte zunächst eine Transfektion von HAC15 Zellen mit dieser Kombination (*CACNAID\_1* + templ*CACNAID*) (Transfektion 2) (Tabelle 23). Von ca. 60 gepickten Klonen konnten nur zwei erfolgreich sequenziert werden, da die restlichen Zellen nicht angewachsen waren. Beide sequenzierten Zellklone zeigten einen WT. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Transfektion nicht erfolgreich war, bzw. dass ein Großteil der Zellen die Transfektion nicht längerfristig überlebt hat.

Es erfolgte eine erneute Transfektion von HAC15 Zellen mit der o.g. Kombination (*CACNAID\_1* + templ*CACNAID*), sowie mit einer *KCNJ5*-Kombination (*KCNJ5\_1* + templ*KCNJ5*) (Transfektion 3) (Tabelle 23). Es konnten keine mit der *KCNJ5*-Kombination transfizierten Zellen gepickt werden, da alle Zellen nach Transfektion starben. Die Transfektion der HAC15 Zellen mit der *CACNAID*-Kombination war erfolgreich. 72 der 100 gepickten Zellklone konnten isoliert und sequenziert werden. Ähnlich wie auch bei HEK293 Zellen, die mit dieser Kombination

(*CACNAID\_1* + templ*CACNAID*) transfiziert wurden, waren ca. 80 % (58) der sequenzierten Klone Indels und ca. 20 % (14) WT. Im Unterschied zu den HEK293 Zellklonen konnte jedoch keine alleinige I770M-Mutation identifiziert werden. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die HDR-Effizienz bei Transfektion gleicher Konstrukte und *repair templates* in HAC15 Zellen möglicherweise geringer ist als in HEK293 Zellen.

Es wurden modifizierte *repair templates* mit 171 bp Länge (templ*KCNJ5\_large*, templ*CACNAID\_large*), sowie zwei neue Konstrukte (*KCNJ5\_3*, *CACNAID\_3*) designt, um eine höhere HDR zu erzielen. Anschließend erfolgte eine erneute Transfektion mit je zwei *KCNJ5*-Kombinationen (*KCNJ5\_1* + templ*KCNJ5\_large* und *KCNJ5\_3* + templ*KCNJ5\_large*) und zwei *CACNAID*-Kombinationen (*CACNAID\_1* + templ*CACNAID\_large* und *CACNAID\_3* + templ*CACNAID\_large*) (Transfektion 4) (Tabelle 23). Auch nach dieser Transfektion starben alle mit einer *KCNJ5*-Kombination transfizierten HAC15 Zellen. Die Transfektion mit den o.g. *CACNAID*-Kombinationen war hingegen erfolgreich. Von ca. 50 je Konstrukt gepickten Zellklonen wuchsen jedoch nur 12 (24 %) (*CACNAID\_1*) bzw. 8 (16 %) (*CACNAID\_3*) an und konnten sequenziert werden. In beiden Fällen zeigten je ca. 15% der der Zellklone eine Indel, die übrigen ca. 85% waren WT. Es konnte keine I770M-Mutation identifiziert werden.

Für eine weitere Transfektion wurde ein weiteres 171 bp langes *repair template* (templ*CACNAID\_sil*) mit der I770M-Mutation designt, welches zusätzlich eine stille Mutation innerhalb des PAM enthält, um ein mehrfaches Schneiden der DNA durch CRISPR/Cas9 bzw. Schneiden des *repair templates* zu verhindern (s.o.). Die Zellen der Transfektion 5 wurden mit Ultrosor G Medium behandelt, um das Zellüberleben nach Transfektion zu steigern. Es erfolgte die Transfektion mit einer *KCNJ5*-Kombination (*KCNJ5\_3* + templ*KCNJ5\_large*) und einer *CACNAID*-Kombination (*CACNAID\_1* + templ*CACNAID\_sil*). Transfektion 5 war für beide Kombinationen erfolgreich. Erstmals konnten HAC15 Zellklone isoliert und sequenziert werden, die mit einer *KCNJ5*-Kombination transfiziert wurden. Von ca. 50 gepickten Klonen, wurden 38 (76 %) sequenziert, die übrigen sind nicht angewachsen. 37 (97,4 %) der HAC15 Zellklone wiesen eine Indel auf, wovon 22 (59,5 %) heterozygot waren. Von ca. 50 gepickten Zellklonen, die mit der *CACNAID*-Kombination transfiziert wurden, konnten 32 (64 %) sequenziert werden. 23 (71,9 %) der Zellklone wiesen eine Indel auf, wovon ca. die Hälfte (12) heterozygot war.

Zusammenfassend waren insbesondere Transfektionen mit *CACNAID\_1* in Kombination mit unterschiedlichen *repair templates* zielführend, auch wenn in HAC15 Zellen weder eine alleinige I770M-Mutation identifiziert werden konnte, noch eine I770M-Mutation zusätzlich zu einer Indel anhand der Sequenzen vermutet werden konnte. Die Transfektion von HAC15 Zellen mit einem *KCNJ5*-Konstrukt war nur in einem Fall unter Verwendung von *KCNJ5\_3* möglich. Auffällig ist, dass diese Zellen im Vergleich zu allen anderen mit Ultrosor G Medium behandelt wurden.

Das Ergebnis aller Sequenzierungen der HAC15 Zellklone im Detail zeigt Tabelle 24-Tabelle 27. Um einen Überblick über das Spektrum der erzeugten Mutationen zu bekommen, wurden die homozygoten Mutationen genauer beschrieben (s.u.). Die verlässliche Identifizierung von heterozygoten Indels ist nur im Rahmen einer Klonierung und Auftrennung der Allele möglich (s.o.), was im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde, da die Erzeugung von Indels nicht primäres Ziel dieser Arbeit war. Eine Ausnahme stellt eine Compound-Heterozygotie dar, welche weiter unten näher erläutert wird.

Transfektion	Konstrukt	Repair template	Klon	Sequenzierungsergebnis	Zygotie	Charakterisierung homozygoter Indels/Compound-Heterozygotie
2	<i>CACNAID</i> 1	templ <i>CACNAID</i>	2_ID_1_1	WT		
			2_ID_1_2	WT		
3	<i>CACNAID</i> 1	templ <i>CACNAID</i>	3_ID_1_1	Indel	homozygot	p.Ala771LeufsTer2
			3_ID_1_2	WT		
			3_ID_1_3	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_4	Indel	homozygot	p.(Ile770_Asp773del)
			3_ID_1_5	Indel	homozygot	p.(Ile770_Asp773del)
			3_ID_1_6	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_7	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_ID_1_8	Indel	homozygot	p.(Ile770_Asp773del)
			3_ID_1_9	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_10	WT		
			3_ID_1_11	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_ID_1_12	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_13	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_ID_1_14	WT		
			3_ID_1_15	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_ID_1_16	Indel	homozygot	p.(Ile770_Asp773del)
			3_ID_1_17	WT		
			3_ID_1_18	WT		
			3_ID_1_19	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_20	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_21	WT		
			3_ID_1_22	WT		
			3_ID_1_23	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_24	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_ID_1_25	WT		
			3_ID_1_26	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_ID_1_27	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_ID_1_28	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_29	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_ID_1_30	Indel	homozygot	p.Ala771LeufsTer2
			3_ID_1_31	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_32	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_33	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_34	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_35	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_36	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_37	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_38	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_ID_1_39	Indel	heterozygot	
			3_ID_1_40	Indel	homozygot	p.Ala771LeufsTer2
			3_ID_1_41	Indel	heterozygot	

Tabelle 24: Sequenzierungsergebnisse aller HAC15 Zellklone im Detail (1)

Trans-fektion	Konstrukt	Repair template	Klon	Sequenzierungsergebnis	Zygotie	Charakterisierung homozygoter Indel/Compound-Heterozygotie
3	<i>CACNAID</i> 1	templ <i>CACNAID</i>	3_1D_1_42	Indel	homozygot	p.Ala771LeufsTer2
			3_1D_1_43	Indel	heterozygot	
			3_1D_1_44	Indel	heterozygot	
			3_1D_1_45	Indel	heterozygot	
			3_1D_1_46	Indel	heterozygot	
			3_1D_1_47	Indel	heterozygot	
			3_1D_1_48	Indel	heterozygot	
			3_1D_1_49	Indel	heterozygot	
			3_1D_1_50	Indel	homozygot	p.Ala771LeufsTer2
			3_1D_1_51	Indel	homozygot	p.Ala771LeufsTer2
			3_1D_1_52	Indel	heterozygot	
			3_1D_1_53	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_1D_1_54	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_1D_1_55	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_1D_1_56	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_1D_1_57	Indel	heterozygot	
			3_1D_1_58	Indel	heterozygot	
			3_1D_1_59	WT		
			3_1D_1_60	Indel	homozygot	p.(Ile770_Asp773del)
			3_1D_1_61	WT		
			3_1D_1_62	Indel	heterozygot	
			3_1D_1_63	WT		
			3_1D_1_64	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_1D_1_65	WT		
			3_1D_1_66	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_1D_1_67	Indel	homozygot	p.(Ile770_Asp773del)
			3_1D_1_68	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_1D_1_69	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_1D_1_70	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			3_1D_1_71	WT		
			3_1D_1_72	WT		
			4	<i>CACNAID</i> 1	templ <i>CACNAID</i> large	4_1D_1_1
4_1D_1_2	Indel	heterozygot				p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
4_1D_1_3	WT					
4_1D_1_4	Indel	heterozygot				
4_1D_1_5	WT					
4_1D_1_6	WT					
4_1D_1_7	WT					
4_1D_1_8	WT					
4_1D_1_9	WT					
4_1D_1_10	WT					
4_1D_1_11	WT					

Tabelle 25: Sequenzierungsergebnisse aller HAC15 Zellklone im Detail (2)

Trans-fektion	Konstrukt	Repair template	Klon	Sequenzierungsergebnis	Zygotie	Charakterisierung homozygoter Indels/Compound-Heterozygotie
4	<i>CACNAID</i> 1	templ <i>CACNAID</i> large	4_1D_1_12	WT		
			<i>CACNAID</i> 3	templ <i>CACNAID</i> large	4_1D_3_1	WT
			4_1D_3_2	Indel	heterozygot	
			4_1D_3_3	WT		
			4_1D_3_4	WT		
			4_1D_3_5	WT		
			4_1D_3_6	WT		
			4_1D_3_7	WT		
			4_1D_3_8	WT		
5	<i>KCNJ5</i> 3	templ <i>KCNJ5</i> large	5_J5_3_1	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_2	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_3	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_4	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_5	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_6	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_7	Indel	homozygot	p.Thr150ValfsTer111
			5_J5_3_8	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_9	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_10	Indel	homozygot	p.Tyr152MetfsTer101
			5_J5_3_11	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_12	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_13	Indel	homozygot	p.Tyr152MetfsTer101
			5_J5_3_14	WT		
			5_J5_3_15	Indel	homozygot	p.Tyr152MetfsTer101
			5_J5_3_16	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_17	Indel	homozygot	p.Tyr152MetfsTer101
			5_J5_3_18	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_19	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_20	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_21	Indel	homozygot	p.Tyr152MetfsTer101
			5_J5_3_22	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_23	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_24	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_25	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_26	Indel	homozygot	p.Tyr152MetfsTer101
			5_J5_3_27	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_28	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_29	Indel	homozygot	p.Tyr152MetfsTer101
			5_J5_3_30	Indel	homozygot	p.Tyr152MetfsTer101
			5_J5_3_31	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_32	Indel	homozygot	p.Tyr152MetfsTer101
			5_J5_3_33	Indel	homozygot	p.Tyr152MetfsTer101
			5_J5_3_34	Indel	homozygot	p.Tyr152MetfsTer101
			5_J5_3_35	Indel	homozygot	p.Tyr152MetfsTer101
			5_J5_3_36	Indel	homozygot	p.Tyr152ValfsTer111
			5_J5_3_37	Indel	heterozygot	
			5_J5_3_38	Indel	homozygot	p.Tyr152MetfsTer101

Tabelle 26: Sequenzierungsergebnisse aller HAC15 Zellklone im Detail (3)



Transfektion	Konstrukt	Repair template	Klon	Sequenzierungsergebnis	Zygotie	Charakterisierung homozygoter Indels/Compound-Heterozygotie
5	<i>CACNAID</i> 1	templ <i>CACNAID</i> sil	5_1D_1_1	Indel	heterozygot	
			5_1D_1_2	Indel	heterozygot	
			5_1D_1_3	Indel	heterozygot	
			5_1D_1_4	Indel	homozygot	p.Ala771ValfsTer2
			5_1D_1_5	Indel	heterozygot	
			5_1D_1_6	Indel	homozygot	p.Ala771ValfsTer2
			5_1D_1_7	WT		
			5_1D_1_8	Indel	heterozygot	
			5_1D_1_9	WT		
			5_1D_1_10	Indel	heterozygot	
			5_1D_1_11	Indel	homozygot	p.Ala771LeufsTer2
			5_1D_1_12	WT		
			5_1D_1_13	Indel	homozygot	p.Ala771LeufsTer2
			5_1D_1_14	Indel	heterozygot	
			5_1D_1_15	Indel	homozygot	p.Ala771LeufsTer2
			5_1D_1_16	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			5_1D_1_17	Indel	homozygot	p.Val766LeufsTer2
			5_1D_1_18	Indel	homozygot	p.Val772LeufsTer2
			5_1D_1_19	WT		
			5_1D_1_20	WT		
			5_1D_1_21	Indel	heterozygot	
			5_1D_1_22	WT		
			5_1D_1_23	Indel	homozygot	p.Ala771ValfsTer2
			5_1D_1_24	Indel	homozygot, heterozygot	
			5_1D_1_25	Indel	homozygot	p.Ala771AspfsTer7
			5_1D_1_26	Indel	homozygot	p.Ala769LeufsTer2
			5_1D_1_27	Indel	heterozygot	
			5_1D_1_28	Indel	heterozygot	p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2
			5_1D_1_29	Indel	heterozygot	
			5_1D_1_30	WT		
			5_1D_1_31	WT		
			5_1D_1_32	WT		

Tabelle 27: Sequenzierungsergebnisse aller HAC15 Zellklone im Detail (4)

#### 4.2.5 Homozygote Indels in HAC15 Zellen führen zu Knockouts im *CACNA1D*-Gen

Von allen sequenzierten HAC15 Zellklonen wiesen 37 (30,6 %) eine homozygote Indel vor. Darunter waren 12 Zellklone, die mit *CACNAID*\_1 und templ*CACNAID* (Transfektion 3) transfiziert wurden, 10, die mit *CACNAID*\_1 und templ*CACNAID*\_sil (Transfektion 5) transfiziert wurden, sowie 15, die mit *KCNJ5*\_3 und templ*KCNJ5*\_large (Transfektion 5) transfiziert wurden. Homozygote Indels wurden genauer beschrieben, um einen Überblick über das Spektrum der erzeugten Mutationen zu bekommen (Tabelle 28).

Homozygote Indel	Konstrukt, <i>repair template</i> , Transfektion	
	<i>CACNAID</i>	
	<i>CACNAID_1</i> templ <i>CACNAID</i> (Transfektion 3)	<i>CACNAID_1</i> templ <i>CACNAID_sil</i> (Transfektion 5)
<b>Gesamt</b>	12	10
<b>p.Ala771LeufsTer2</b>	6	3
<b>p.(Ile770 Asp773del)</b>	6	
<b>p.Ala771ValfsTer2</b>		3
<b>p.Val766LeufsTer2</b>		1
<b>p.Val772LeufsTer2</b>		1
<b>p.Ala771AspfsTer7</b>		1
<b>p.Ala769LeufsTer2</b>		1
	<i>KCNJ5</i>	
	<i>KCNJ5_3</i> templ <i>KCNJ5_large</i> Transfektion 5)	
<b>Gesamt</b>		15
<b>p.Thr150ValfsTer111</b>		1
<b>p.Tyr152MetfsTer101</b>		13
<b>p.Tyr152ValfsTer111</b>		1

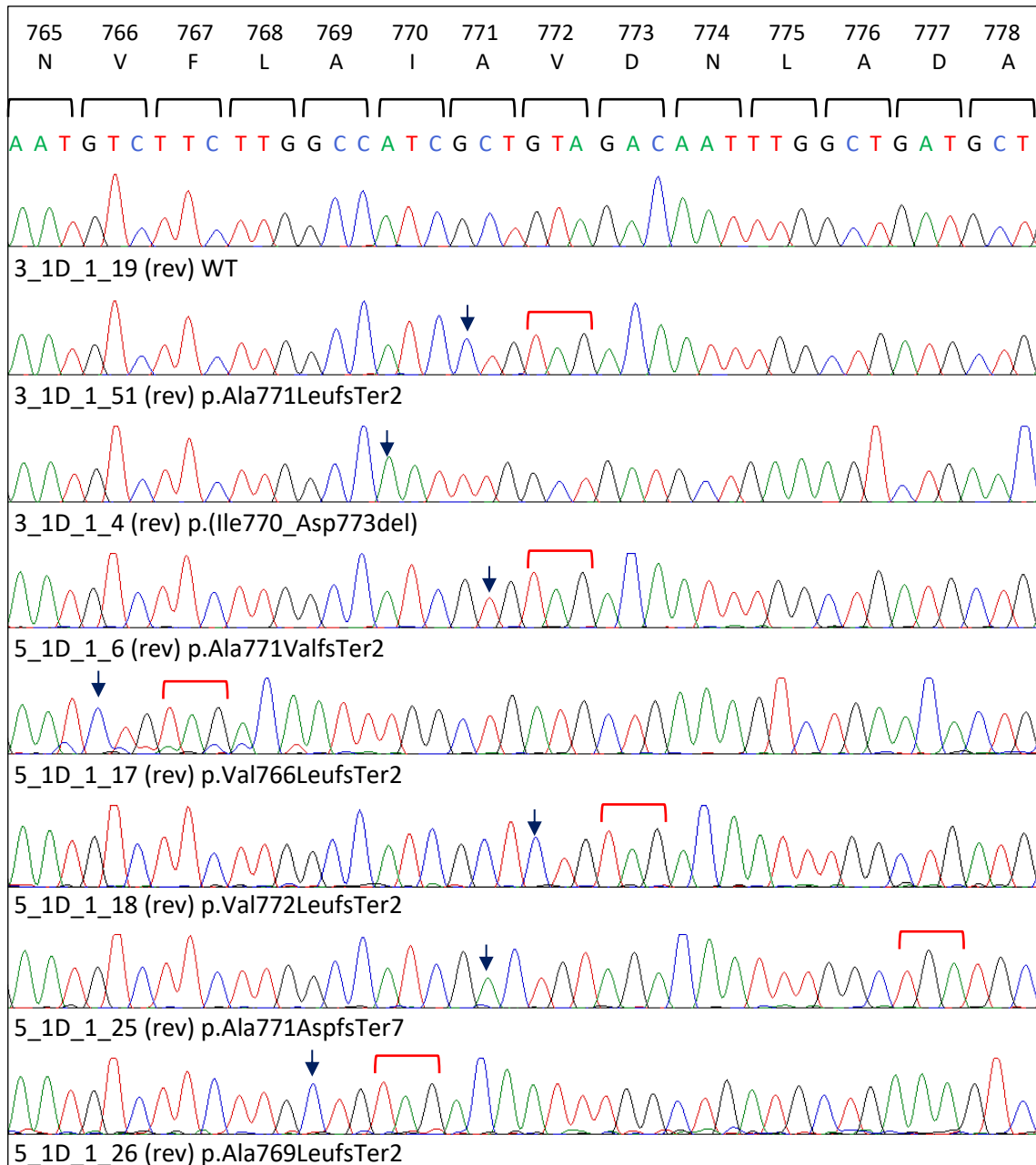
Tabelle 28: Homozygote Indels transfizierter HAC15 Zellen

Sieben verschiedene homozygote Indels wurden in 22 HAC15 Zellklonen identifiziert, die mit einem *CACNAID*-Konstrukt transfiziert wurden. Dabei erfolgte immer eine Transfektion mit dem Konstrukt *CACNAID\_1*. In sechs Fällen kam es zu einer Leserasterverschiebung (p.Ala771LeufsTer2, p.Ala771ValfsTer2, p.Val766LeufsTer2, p.Val772LeufsTer2, p.Ala771AspfsTer7, p.Ala769LeufsTer2). In allen Fällen führte dies zu einem Stopp-Codon unmittelbar oder kurz nach der Mutation, was ein Knockout zur Folge hat. Abb. 26 und Abb. 27 zeigen die Nukleotidsequenzen bzw. Chromatogramme der homozygoten Indels von HAC15 Zellklonen, die mit *CACNAID*-Konstrukten transfiziert wurden.

Chr3: 54764480-537644521	
WT	AATGTCCTTCTTGGCCATCGCTGTAGACAATTTGGCTGATGCT
3_1D_1_51	AATGTCCTTCTTGGCCATC. <b>CT</b> GTAGACAATTTGGCTGATGCT
3_1D_1_4	AATGTCCTTCTTGGCC.....AATTTGGCTGATGCT
5_1D_1_6	AATGTCCTTCTTGGCCATCG. <b>T</b> GTAGACAATTTGGCTGATGCT
5_1D_1_26	AATGTCCTTCTTGT..... <b>CT</b> GTAGACAATTTGGCTGATGCT
5_1D_1_36	AAT..... <b>CT</b> GTAGACAATTTGGCTGATGCT
5_1D_1_18	AATGTCCTTCTTGGCCATCGCT <b>CT</b> GTAGACAATTTGGCTGATG
5_1D_1_25	AATGTCCTTCTTGGCCATCG <b>ACT</b> GTAGACAATTTGGCTGATGC

Abb. 26: Nukleotidsequenzen homozygoter Indels in HAC15 Zellen, die mit *CACNAID*-Konstrukten transfiziert wurden

Dargestellt werden die an die WT-Sequenz *alignten* Nukleotidsequenzen der sieben Indels. Deletierte Nukleotidsequenzabschnitte werden als Punkte dargestellt, zusätzlich eingefügte Nukleotidsequenzen sind **fett** dargestellt und gelb hinterlegt.



**Abb. 27: Sanger Sequenzierungen genetischer Varianten homozygoter Indels in Zellen, die mit *CACNAID*-Konstrukten transfiziert wurden**

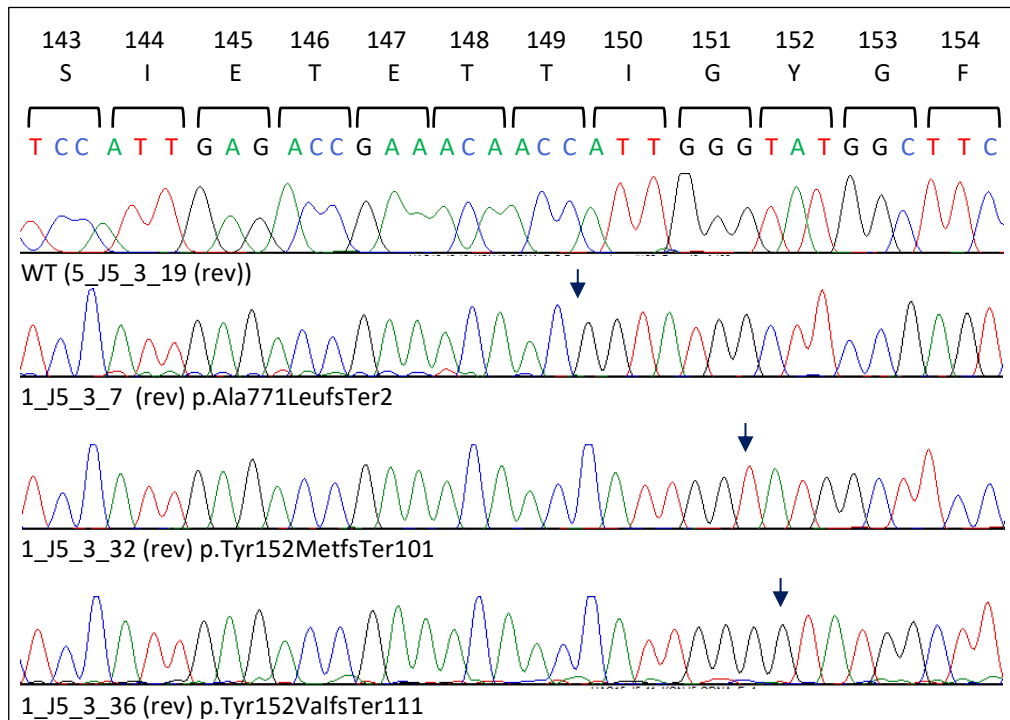
Die Abbildung zeigt die Chromatogramme der Sanger Sequenzierung der sieben verschiedenen Indels. Oben dargestellt ist eine WT-Sequenz mit Basensequenz, sowie darüber die zu den Basentriplets zugehörigen Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code. Die Pfeile markieren die Position der Insertion/Deletion. Eine rote Klammer markiert ein Stopp-Codon nach Leserasterverschiebung.

Drei verschiedene homozygote Indels wurden in 15 HAC15 Zellklonen identifiziert, die mit einem *KCNJ5*-Konstrukt transfiziert wurden. Dabei erfolgte immer eine Transfektion mit dem Konstrukt *KCNJ5\_3* und *templKCNJ5\_large*. In allen Fällen kam es zu einer Leserasterverschiebung (p.Thr150ValfsTer111, p.Tyr152MetfsTer101, p.Tyr152ValfsTer111) mit einem Stopp-Codon 100 bzw. 111 Aminosäurepositionen nach der Mutation. Die zugehörigen Nukleotidsequenzen und Chromatogramme zeigen Abb. 28 und 29.

**Chr11:128781595-128781630**  
 WT TCCATTGAGACCGAAACAACCATTTGGGTATGGCTTC  
 1\_J5\_3\_7 TCCATTGAGACCGAAACAAC.....GGTATGGCTTC  
 1\_J5\_3\_32 TCCATTGAGACCGAAACAACCATTTGG TATGGCTTC  
 1\_J5\_3\_36 TCCATTGAGACCGAAACAACCATTTGGG**G**TATGGCTT

**Abb. 28: Nukleotidsequenzen homozygoter Indels in HAC15 Zellen, die mit *KCNJ5*-Konstrukten transfiziert wurden**

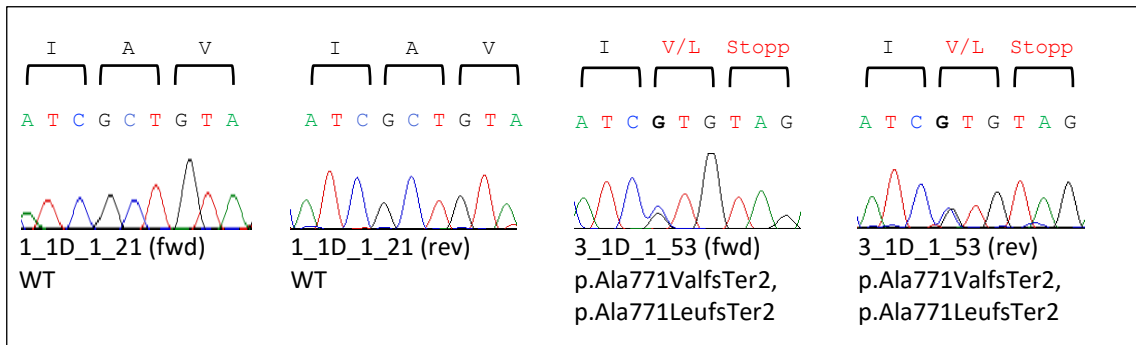
Dargestellt werden die an die WT-Sequenz *alignen* Nukleotidsequenzen der drei Indels. Deletierte Nukleotidsequenzabschnitte werden als Punkte dargestellt, zusätzlich eingefügte Nukleotidsequenzen sind **fett** dargestellt und gelb hinterlegt.



**Abb. 29: Chromatogramme homozygoter Indels in HAC15 Zellen, die mit einem *KCNJ5*-Konstrukt transfiziert wurden**

Dargestellt sind die Chromatogramme der Sanger Sequenzierung der drei homozygoten Indels. Das oberste Chromatogramm zeigt eine WT-Sequenz, sowie darüber die zu den Basentriplets zugehörigen Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code. Die Pfeile markieren die Position der Indels.

Die verlässliche Identifizierung von heterozygoten Indels ist nur im Rahmen einer Klonierung und Auftrennung der Allele möglich (s.o.), was im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar war. Eine Ausnahme stellt eine Compound-Heterozygotie dar (Abb. 30). Die Compound-Heterozygotie p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2 konnte insgesamt in 23 Zellklonen sowohl in HEK293 Zellen (18), als auch in HAC15 Zellen (8) identifiziert werden. In allen Fällen erfolgte eine Transfektion mit dem Konstrukt *CACNAID\_1*.



**Abb. 30: Compound-Heterozygotie p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2**

Die Abbildung zeigt links einen WT und rechts die Compound-Heterozygotie p.Ala771ValfsTer2, p.Ala771LeufsTer2. Dargestellt sind die Nukleotidsequenzen beider Allele, sowie darüber die zu den Basentriplets zugehörigen Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code. Im Rahmen der Compound-Heterozygotie kommen die Nukleotide C und G auf jeweils einem der zwei Allele vor. Diese sind **fett** dargestellt. Rot markiert sind die veränderten Aminosäuren, sowie das Stopp-Codon nach Leserasterverschiebung.

## 5 Diskussion

### 5.1 USP8-Mutationen in Hypophysenadenomen bei PatientInnen mit Morbus Cushing

Dieser Teil der Diskussion wurde zum Teil bereits veröffentlicht und wird hier in Anlehnung an die Arbeit Ballmann *et al.*<sup>1</sup> dargestellt. Teile aus der genannten Arbeit<sup>1</sup> werden in der folgenden Darstellung in wörtlicher Übersetzung verwendet.

#### 5.1.1 Next Generation Sequencing von FFPE-Gewebeschnitten als mögliche Methode zur molekulargenetischen Diagnostik von Hypophysenadenomen

In dieser Arbeit wurden 42 Hypophysenadenome von PatientInnen mit Morbus Cushing identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass *Next Generation Sequencing* (NGS) eine nützliche Methode ist, um insbesondere Tumore mit einem Durchmesser <5 mm auf das Vorhandensein von *USP8*-Mutationen zu prüfen.<sup>1</sup>

Viele Umstände erschweren die molekulargenetische Diagnostik von Hypophysenadenomen. Zum einen sind die Tumore oft sehr klein. Zum anderen kommt hinzu, dass das Material nach einer transsphenoidalen Resektion häufig nicht mehr als Ganzes, sondern fragmentiert vorliegt. Das macht es schwierig, Tumor- von Normalgewebe zu unterscheiden. Oft steht außerdem kein frisches Gewebe für eine molekulargenetische Untersuchung zur Verfügung, da das gesamte Gewebe in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wird. Selbst wenn für die DNA-Extraktion FFPE-Gewebe verwendet wird, welches vorher histologisch und immunhistochemisch gefärbt wurde, bleibt eine Unterscheidung zwischen Tumor- und Normalgewebe schwierig.<sup>1, 85</sup>

Eine Möglichkeit Mutationen trotz einer eventuellen Kontamination mit Normalgewebe zu identifizieren bietet NGS. Es kann auch Mutationen mit einer sehr geringen Allelfrequenz detektieren. In dieser Arbeit wurde die erfolgreiche Durchführung von gezieltem NGS nach DNA-Extraktion aus 10-µm dicken Schnitten FFPE Gewebes demonstriert. Auf diese Weise kann eine molekulargenetische Diagnostik nach stattgehabter Routine-Histologie durchgeführt werden. Hiermit wurde eine Möglichkeit präsentiert, wie die übliche Diagnostik (klinische Beurteilung, Histologie und Immunhistochemie) von Hypophysenadenomen bei PatientInnen mit Morbus Cushing in Zukunft sinnvoll durch eine molekulargenetische Diagnostik ergänzt werden kann.<sup>1</sup>

#### 5.1.2 Mögliche Gründe für eine niedrige Mutationsfrequenz

Mittels NGS wurde eine Mutationsfrequenz von 21,4 % ermittelt<sup>1</sup>. Diese liegt unterhalb dessen, was andere Studien ergaben<sup>49, 50, 54-59</sup>. Eine Ausnahme stellt eine Arbeit dar, die nur zwölf corticotrope Adenome untersuchte (davon acht Makroadenome) und darunter keine *USP8*-Mutation identifizierte<sup>86</sup>. Andere Studien, die vor der Veröffentlichung dieser Arbeit publiziert wurden, zeigten mit ca. 35 % eine deutlich höhere Prävalenz von *USP8*-Mutationen in corticotropen Adenomen<sup>50, 55, 56</sup>. Eine asiatische Studie verzeichnete sogar eine Mutationsfrequenz von 62 %, welche möglicherweise durch ethnische Unterschiede bedingt ist<sup>1, 49</sup>.

Eine niedrigere Mutationsfrequenz kann durch Unterschiede des verwendeten Materials, der angewendeten Analyseverfahren oder der Zusammensetzung der Kohorte bedingt sein.

Die meisten der o.g. Arbeiten verwendeten frisches, gefrorenes Gewebe. Auffällig ist, dass drei aktuelle Studien, die teils oder ausschließlich FFPE-Gewebe mittels Sanger Sequenzierung untersuchten, *USP8*-Mutationen in nur 23 %, 23,9 % (FFPE und frisches Gewebe) und 31 % (FFPE)

identifizierten<sup>54, 57, 59</sup>. Sie verzeichneten also ebenfalls eine niedrigere Mutationsfrequenz. Ob ein Zusammenhang mit der verwendeten Gewebeart besteht, ist jedoch fraglich. Man könnte vermuten, dass die Adenome von welchen FFPE Gewebe verwendet wurde im Schnitt kleiner waren, als solche, für die frisches Gewebe zur Verfügung stand. In diesem Fall ließe sich ein Zusammenhang nicht zur Gewebeart, sondern zur Tumorgöße und der Mutationsfrequenz innerhalb einer Kohorte herstellen. In der hier durchgeführten Studie betrug die durchschnittliche Größe der Tumore  $12,2 \pm 11,2$  (MW  $\pm$  SD, SW 3-50, M 8) mm. Losa *et al.* (Mutationsfrequenz 23,9 %) geben eine durchschnittliche Tumorgöße von  $11,7 \pm 7,9$  mm innerhalb ihrer Kohorte an<sup>59</sup>. Faucz *et al.* (Mutationsfrequenz 31 %) verzeichneten eine durchschnittliche Tumorgöße von  $6,2 \pm 6$  mm<sup>57</sup>. Zum Vergleich: Hayashi *et al.*, welche eine Mutationsfrequenz von 35 % verzeichneten, untersuchten Tumore mit einer durchschnittlichen Größe von 10,7 mm<sup>56</sup>. Diese beispielhaften Zahlen würden der oben genannten Vermutung widersprechen. Nicht aus allen Studien gehen die Angaben zur durchschnittlichen Tumorgöße eindeutig hervor, weshalb an dieser Stelle keine abschließende Aussage getroffen werden kann. Möglicherweise spielt hier zudem nicht die durchschnittliche Größe eine Rolle, sondern die Anzahl von Tumoren, welche kleiner einer bestimmten Größe sind. Alle Tumore dieser Kohorte, welche eine Mutation trugen, verzeichneten einen Durchmesser  $<5$  mm<sup>1</sup>. Insgesamt 38 % der Adenome hatten einen Tumordurchmesser  $<5$  mm<sup>1</sup>.

Zunächst wurde vermutet, dass eine Kontamination mit Normalgewebe zu falsch negativen Ergebnissen der vorliegenden Studie geführt haben könnte. Doch die Mutationsfrequenz dieser Kohorte blieb auch nach Durchführung von NGS, wodurch Mutationen mit einer Allelfrequenz von bis zu  $<3$  % identifiziert werden können, niedriger als in allen anderen Studien (mit der o.g. Ausnahme<sup>86</sup>)<sup>1</sup>. Eine Möglichkeit, die trotz NGS zu falsch negativen Ergebnissen geführt haben könnte, ist das Vorliegen von Mutationen ausschließlich in Teilbereichen eines Tumors, welche im sequenzierten Gewebe nicht angeschnitten wurden<sup>1</sup>.

Zudem bieten verschiedene Faktoren der Zusammensetzung dieser Kohorte Anhaltspunkte, die eine niedrige Mutationsfrequenz innerhalb der Kohorte erklären könnten<sup>1</sup>. Viele Publikationen zeigen, dass Frauen signifikant häufiger *USP8*-mutierte Tumore haben als Männer<sup>49, 50, 55-57, 59</sup>. Diese Kohorte wies mit 64 % einen geringeren Frauenanteil auf, als die meisten anderen Studien, deren Frauenanteil vielmals bei ca. 80 % lag<sup>1, 49, 56, 58, 59</sup>. So wurde insbesondere eine geringe Mutationsfrequenz innerhalb der Gruppe der Frauen mit 25,9 % ermittelt, welche in anderen Studien oftmals zwischen ca. 40-67 % lag<sup>1, 49, 50, 55-58</sup>. Möglicherweise wirkt sich der geringere Frauenanteil dieser Kohorte negativ auf die Gesamtmutationsfrequenz aus<sup>1</sup>. Interessanterweise ist in beiden Studien, die eine ähnlich niedrige Gesamtmutationsfrequenz von 23 % bzw. 23,9 % beschreiben, die Mutationsfrequenz der Frauen mit 32 % und 28,7 % ebenfalls verhältnismäßig niedrig<sup>54, 59</sup>. Nur eine der beiden Kohorten hatte jedoch auch insgesamt einen niedrigen Frauenanteil (53 %) <sup>54</sup>. Die Mutationsfrequenz innerhalb der Gruppe der Männer war in dieser Studie zwar gering, jedoch in etwa vergleichbar mit der anderer Arbeiten<sup>55, 57</sup>. Eine weitere Besonderheit dieser Kohorte ist, dass viele der untersuchten Adenome auffällig klein waren (s.o.)<sup>1</sup>.

Darüber hinaus wurden ausschließlich Punktmutationen identifiziert, überraschenderweise jedoch keine Deletion, insbesondere nicht S718del<sup>1</sup>. Eine manuelle Auswertung der Illumina *reads* bestätigte die Abwesenheit von Deletionen<sup>1</sup>. Andere Publikationen ermittelten einige seltene Deletionen<sup>49, 55-58</sup>. Das Vorhandensein von S718del wurde teils mit einer Prävalenz von über 20 % bis zu ca. 43 % beschrieben<sup>49, 56</sup>. In funktionellen Studien zeigte S718del *in vitro* die höchste

Deubiquitinaseaktivität aller untersuchten *USP8*-Varianten<sup>50</sup>. Ob ein Einfluss von S718del auf die klinische Symptomatik der PatientInnen im Zusammenhang mit einem möglicherweise dadurch bedingten Ausschluss der Betroffenen von dieser Studie steht, ist unklar<sup>1</sup>. Es ist möglich, dass dies zu einer niedrigeren Mutationsfrequenz innerhalb dieser Kohorte geführt hat<sup>1</sup>.

### 5.1.3 Hinweise für das Auftreten unabhängiger Hits

Bereits in vorherigen Studien fiel auf, dass in einigen Tumoren zwei *USP8*-Varianten vorkamen<sup>49, 50</sup>. Auch in dieser Kohorte hatten zwei Adenome eine Doppelmutation<sup>1</sup>. Auffällig war, dass die einzigen beiden untersuchten Kinder Träger von jeweils zwei Mutationen waren. Die bislang größte Studie, die pädiatrische PatientInnen untersuchte, identifizierte in einer Kohorte von 42 Kindern keine Doppelmutation<sup>57</sup>. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass Faucz *et al.* eine Sanger Sequenzierung durchführten und die Allelfrequenz von weiteren *USP8*-Varianten möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze dieser Methode gelegen haben mag<sup>57</sup>. Diese Stichprobe mit lediglich zwei pädiatrischen Fällen ist an dieser Stelle nicht repräsentativ.

Da in beiden Fällen (HYP005 und HYP002) die jeweiligen *USP8*-Varianten in unterschiedlichen Allelfrequenzen vorkamen, ist von zwei unabhängigen Hits auszugehen<sup>1</sup>. Tumore mit *USP8*-Varianten sind also nicht unbedingt klonal, sondern können einen heterogenen Genotyp vorweisen<sup>1, 87, 88</sup>. Dies kann wiederum dazu führen, dass Mutationen nicht identifiziert werden, wenn der Teil des Tumors, in dem sie vorkommen, nicht sequenziert wird (s.o)<sup>1</sup>. Dass in HYP002 beide Mutationen auf unterschiedlichen Allelen lokalisiert waren, ist ein weiterer Hinweis für die Hypothese mehrerer unabhängiger Hits<sup>1</sup>. Ein Artefakt ist jedoch nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen<sup>1</sup>. Amplifikationsartefakte von FFPE-Gewebe oder solche, die durch Exomsequenzierung entstehen, können zu Varianten mit geringen Allelfrequenzen führen, wie sie bei den Proben HYP019 (7,09 %) und HYP002 (3,3 %) detektiert wurden<sup>1</sup>. Typische C.T Muster waren in beiden Proben nicht nachweisbar<sup>1</sup>. Diese entstehen bei der Durchführung einer PCR nach einer durch Formalin-Fixierung bedingten Desaminierung von Cytosin zu Uracil<sup>1, 66</sup>.

Alle bislang beschriebenen Mutationen waren heterozygot<sup>49, 50, 55-59</sup>. Zudem wurde eine homozygote oder hemizygoten *USP8*-Variante (HYP029) identifiziert<sup>1</sup>. Ursächlich dafür kann ein Verlust der Heterozygotie oder eine Rekombination während der Mitose sein<sup>1</sup>. Auch dieses Resultat kann ein Hinweis für unabhängige Hits sein und dafür, dass *USP8*-mutierte Tumore nicht zwangsläufig klonal sind<sup>1</sup>. Dennoch ist auch an dieser Stelle ein FFPE Artefakt nicht auszuschließen<sup>1</sup>.

### 5.1.4 Keine erhöhte EGFR-Expression in *USP8*-mutierten Adenomen

In dieser Arbeit zeigte sich in keiner der mutierten Proben eine Hochregulation der EGFR-Expression<sup>1</sup>. Dies widerspricht den Ergebnissen einer von Ma *et al.* durchgeführten Studie, in der *USP8*-mutierte Tumore in 80 % der Fälle EGFR-positiv waren und eine stärkere Intensität der Färbung verzeichneten, als WT Adenome, welche sich nur in 50 % der Fälle EGFR-positiv anfärbten<sup>49</sup>. Hayashi *et al.* konnten diese Ergebnisse interessanterweise nicht bestätigen<sup>56</sup>. Sie verzeichneten keinen Unterschied der EGFR-Positivität zwischen *USP8*-Varianten und WT<sup>56</sup>. Das Ergebnis der EGFR-Immunhistochemie ist abhängig vom verwendeten Antikörper. Es finden unter anderem Antikörper gegen zytoplasmatische und extrazelluläre EGFR-Domänen Verwendung<sup>89</sup>. In dieser Studie wurden Antikörper verwendet, die auch in der klinischen Routine-Diagnostik Anwendung finden<sup>1</sup>. Zudem wurde eine Positivkontrolle durchgeführt<sup>1</sup>. Reincke *et al.*



zeigten, dass mutierte USP8 insbesondere im Zellkern vorkommen<sup>50</sup>. Fraglich ist, welche Bedeutung dies für die vermutete Deubiquitinierung von EGFR hat. EGFR kann auch statt in der Plasmamembran im Nukleus vorhanden sein und hier die Transkription von Proteinen beeinflussen, die den Zellzyklus regulieren<sup>89, 90</sup>. Möglicherweise ist dies bei *USP8*-mutierten Tumoren der Fall und hat ggf. einen Einfluss auf die Anfärbung von EGFR in der Immunhistochemie, vielleicht auch in Abhängigkeit des verwendeten Antikörpers.

Es kann auch sein, dass es sich bei der Wirkung von *USP8*-Mutationen auf den EGFR-Signalweg um einen sehr kleinen oder vorübergehenden Effekt handelt, der deshalb nicht nachgewiesen werden konnte<sup>1</sup>. Hierfür spricht, dass *USP8*-Varianten in Zellkulturen zwar einen Einfluss auf den EGFR-Signalweg haben, dieser Zusammenhang *in vivo* jedoch nur partiell nachgewiesen werden konnte<sup>1, 91</sup>.

Eine aktuelle Studie untersuchte verschiedene Proteine, die bei Morbus Cushing dereguliert sind, in Bezug auf ihre Expression in Abhängigkeit vom *USP8*-Mutationsstatus (s.o.)<sup>54</sup>. Auch das Ergebnis dieser Arbeit zeigte, dass die EGFR-Expression in *USP8*-mutierten Tumoren sogar geringer war, als in *USP8*-WT Tumoren<sup>54</sup>. Andere Proteine, die in Zusammenhang mit der Zellzyklusregulation (p27, CABLES1), dem Glucocorticoid-Rezeptor (HSP90) und der POMC-Transkription (CREB) stehen, waren dagegen in *USP8*-mutierten Tumoren signifikant dereguliert<sup>54</sup>. Der von Reincke *et al.* und Ma *et al.* angenommene Pathomechanismus ist anhand dieser Ergebnisse in Frage zu stellen. Sie vermuteten, dass *USP8*-Mutationen über eine erhöhte USP8-Deubiquitinaseaktivität zu einer vermehrten EGFR-Deubiquitinierung führen<sup>49, 50</sup>. Dies hat ihrer Annahme nach einen verstärkten EGFR-Einbau in die Zellmembran zur Folge, was wiederum zu einer vermehrten POMC-Transkription und ACTH-Sekretion führt<sup>49, 50, 54</sup>. Das Ergebnis dieser Arbeit, welches zeigt, dass kein Zusammenhang zwischen *USP8*-Varianten und einer vermehrten EGFR-Expression besteht, kann als ein Hinweis interpretiert werden, den von Reincke *et al.* und Ma *et al.* postulierten Pathomechanismus zu hinterfragen. Weitere Studien werden notwendig sein, um abschließend zu klären, welche Folgen *USP8*-Mutationen auf zellulärer Ebene haben und welche Rolle EGFR dabei spielt.

#### 5.1.5 Limitationen der Studie und mögliche Inhalte zukünftiger Arbeiten

Diese Arbeit hat einige Limitationen. Eine Limitation der Studie stellt das retrospektive Format dar. Retrospektiv konnten nicht alle endokrinologischen Untersuchungsergebnisse einheitlich ermittelt werden, was eine Analyse biochemischer Parameter unmöglich machte<sup>1</sup>. Um aussagekräftige Daten zu einer klinischen Korrelation mit dem *USP8*-Mutationsstatus zu erhalten, wäre die Durchführung einer prospektiven Multicenter-Studie mit einer großen Stichprobe wünschenswert. Erschwerend könnte die Seltenheit des Morbus Cushing sein. Die Studie müsste demnach über einen langen Zeitraum durchgeführt werden. Ein zudem einheitliches, leitliniengerechtes Vorgehen bei der Diagnosestellung und Durchführung der Therapie würde die Aussagekraft einer solchen Studie erhöhen. Eine mögliche Methode, um Tumore aller Größen, insbesondere auch kleine Adenome, einzubeziehen, ist die hier beschriebene Durchführung gezielter NGS von FFPE-Gewebeschnitten. Alternativ könnte auch die Untersuchung klinischer Charakteristika von PatientInnen mit unterschiedlichen *USP8*-Varianten, insbesondere den am häufigsten vorkommenden (S718P, S718del, P720R), Aufschluss über mögliche Zusammenhänge geben. Unterschiedliche *KCNJ5*-Mutationen, welche in Aldosteron produzierenden Adenomen vorkommen,

sind beispielsweise zum Teil mit verschiedenen klinischen Erscheinungsbildern assoziiert und sprechen unterschiedlich auf Therapeutika an<sup>39, 40</sup>.

Die Mutation S716Y, welche im Rahmen dieser Arbeit das erste Mal ermittelt wurde, wurde an dieser Stelle nicht näher charakterisiert. Funktionelle Studien, die ihren Einfluss auf die Ubiquitinase-Aktivität von USP8 prüfen und eine Untersuchung des verursachten Pathomechanismus vornehmen, sind an dieser Stelle erforderlich.<sup>1</sup>

Weiterhin wäre eine Untersuchung insbesondere *USP8*-negativer Tumore auf neu entdeckte Mutationen beispielsweise im *CABLES1*-, *BRAF*-, und/oder *USP48*-Gen möglich.<sup>51, 61</sup>

## 5.2 Genome Editing mittels CRISPR/Cas9 in HAC15 Zellen

### 5.2.1 Erzeugung von Knockout-Modellen in HAC15 Zellen mittels CRISPR/Cas9

In dieser Arbeit wurde *Genome Editing* in HEK293 Zellen und HAC15 Zellen durchgeführt. Dafür wurde mit CRISPR/Cas9 eine neue Methode verwendet. CRISPR/Cas9 konnte erfolgreich eingesetzt werden, um gezielt Doppelstrangbrüche zu erzeugen.

In ca. 80 % der Zellklone ergaben Sequenzierungen das Vorhandensein von Indels unmittelbar oder in der Nähe des mittels sgRNA angesteuerten Genlokus. Viele der entstandenen genetischen Veränderungen führen zu einer Leserasterverschiebung oder dem Einbau eines frühzeitigen Stopp-Codons und somit zu einem Knockout. Diese erzeugten Zellklone können als Modelle verwendet werden, um die Wirkung eines Knockouts von *KCNJ5* bzw. *CACNAID*, z.B. auf die Aldosteron-Synthese, näher zu untersuchen.

CRISPR/Cas9 konnte somit als Methode zur Erzeugung von Knockout-Modellen in HEK293 und HAC15 Zellen erfolgreich etabliert werden.

### 5.2.2 Geringe Effizienz von HDR in HAC15 Zellen

Wie im Methodenteil bereits erläutert, gibt es im Wesentlichen zwei Mechanismen, wie Zellen Doppelstrangbrüche in der DNA reparieren. In den meisten Fällen passiert dies mittels *Non-homologous End Joining* (NHEJ)<sup>64</sup>. Das Ergebnis dieser Art der Reparatur, bei der Strangenden unspezifisch ligiert werden, ist die Entstehung von Indels (s.o.)<sup>64</sup>. Nur in einem von  $10^6$  bis  $10^7$  Fällen erfolgt eine präzise *Homology-directed Repair* (HDR)<sup>75</sup>. Eine HDR unter Verwendung des zugefügten *repair templates* ist erforderlich, um gezielt eine Punktmutation (G151R/I770M) in das Genom einzubauen und somit ein Knockin zu erzielen<sup>64</sup>.

Durch eine hohe Anzahl transfizierter Zellen sollte erreicht werden, dass einige Zellklone mittels HDR repariert werden und die Punktmutationen des *repair templates* in ihr Genom integrieren. Experimente mit der schnellwachsenden Testzelllinie HEK293 führten zum Einbau einer homozygoten I770M-Mutation in zwei Zellklonen. In HAC15 Zellen konnte kein Knockin der o.g. Mutationen erreicht werden. Dies war der Fall, obwohl 164 HAC15 und 121 HEK293 Zellklone sequenziert wurden. Hierfür gibt es verschiedene mögliche Gründe.

Die Effektivität von HDR hängt von vielen Faktoren ab. Dazu zählen der Zelltyp, der angesteuerte genomische Locus, das *repair template*, sowie der aktuelle Zustand der Zelle<sup>64</sup>. So findet HDR in der Regel nur in sich teilenden Zellen statt<sup>64</sup>. Die Aktivität von HDR ist typischer Weise sogar beschränkt auf die S- und G2-Phase des Zellzyklus<sup>92</sup>.

Es ist möglich, dass HDR in HEK293 Zellen aktiver und/oder effektiver ist. In jedem Fall unterscheidet sich diese Zelllinie von HAC15 Zellen darin, dass sie schneller wächst und sich somit häufiger teilt. Da sich die Zellen dadurch öfter in der S- und G2-Phase befinden, in der HDR aktiv ist, bietet dies eine mögliche Erklärung, warum ein erfolgreiches Knockin in HEK293 Zellen wahrscheinlicher ist. Interessanterweise gibt es viele Publikationen, die *Genome Editing* mittels CRISPR/Cas9 bei HEK293 Zellen durchgeführt haben und auch die Häufigkeit von HDR untersucht und optimiert haben, zu HAC15 Zellen konnten jedoch keine entsprechenden Publikationen identifiziert werden<sup>93-102</sup>. Weitere Studien, die die Aktivität und Effektivität von HDR speziell in HAC15 Zellen untersuchen wären wünschenswert.

Mittlerweile haben viele Studien Methoden entwickelt, die die Effizienz von HDR in unterschiedlichen Zelltypen erhöhen und somit ein gezieltes Knockin effizienter ermöglichen sollen<sup>92, 103</sup>. Hierfür gibt es eine Reihe unterschiedlicher Möglichkeiten, die teils insbesondere in Kombination effizient sind<sup>92, 95</sup>.

Eine Möglichkeit ist die Synchronisation des Zellzyklus<sup>104</sup>. Yang *et al.* konnten zeigen, dass eine Zellzyklussynchronisation verschiedener Zelltypen unabhängig vom genomischen Locus zu einer drei bis fünffach höheren Rate von HDR führt<sup>104</sup>. Verwendet wurden ABT-751 und Nocodazol<sup>104</sup>. Beide führen zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase<sup>104</sup>. Eine weitere Möglichkeit, um höhere HDR-Raten zu erzielen, ist es anstelle von Cas9 Plasmiden Cas9 Ribonukleoprotein mittels Elektroporation zu transfizieren<sup>92</sup>. Ribonucleoproteine haben den Vorteil, dass sie nahezu unmittelbar nach Transfektion zu DSB führen und anschließend schnell degradieren<sup>105</sup>. Dadurch werden *off-target* Effekte reduziert<sup>105</sup>. Eine Transfektion mit Plasmiden, wie hier durchgeführt, kann für Zellen zudem eine Belastung sein und ist oft ineffizient, wenngleich in dieser Arbeit erfolgreiche Plasmidtransfektionen durchgeführt wurden<sup>105</sup>. Ein optimierter Ansatz hierzu ist von Lin *et al.* beschrieben<sup>96</sup>. Die Autoren kombinierten Zellzyklussynchronisation und die Transfektion von Ribonukleoprotein und konnten eine höhere HDR-Rate von bis zu 38% feststellen<sup>96</sup>. Auch mittels *Cas9-geminin fusion protein*, welches die Cas9 Expression in der G1 Phase reduziert und in der S/G2/M Phase erhöht, konnten höhere HDR Raten erzielt werden<sup>92</sup>.

Einige Studien haben verschiedene niedermolekulare Verbindungen und ihren Einfluss auf HDR getestet. So konnte gezeigt werden, dass L755507 und Brefeldin A, wenn auch auf bislang ungeklärte Weise, HDR in pluripotenten Stammzellen induziert<sup>92</sup>.

Andere Arbeiten befassten sich näher mit den Reparaturmechanismen und dessen Schlüsselenzymen. Chu *et al.* erzielten über eine Inhibition des NHEJ-Wegs mittels Suppression von KU70, DNA Ligase IV, sowie der Co-Expression der Adenovirus 4 Proteine E1B55K und E4orf6, eine vier- bis fünffach bzw. achtfach höhere HDR Effektivität<sup>94</sup>. Studienergebnisse, die die Wirkung von SCR7, einem DNA Ligase IV Inhibitor, untersuchten, zeigten unterschiedliche Ergebnisse bezüglich einer Steigerung der HDR Rate<sup>92</sup>. Verschiedene Arbeiten befassten sich mit den Mechanismen nicht des NHEJ sondern der HDR selbst. Dabei lassen sich zwei Wege unterscheiden<sup>106</sup>. Es kann entweder eine *single-stranded template repair* (SSTR) oder eine *homologous recombination* (HR) stattfinden<sup>106</sup>. Dabei spielen unterschiedliche Proteine eine Rolle<sup>106</sup>. Wird als Donor Einzelstrang-DNA z.B. in Form von ssODN verwendet, wie in dieser Arbeit, so erfolgt eine SSTR<sup>106</sup>. In diesem Fall kann eine Inhibition/Suppression von 53BP1 und eine ektope Expression von RAD52 zu einer höheren HDR Effizienz führen, ohne *off-target* Effekte zu begünstigen<sup>93, 99, 106</sup>. Bei der Verwendung von einem Doppelstrang-Donor, wenn also HR stattfindet,

zeigte RS-1, welches im Zusammenhang mit Rad51 steht, sowie eine Überexpression von BRCA1, eine drei- bis sechsfache bzw. zwei- bis dreifache Steigerung der HDR Effizienz<sup>103, 107</sup>. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass SSTR wesentlich effizienter als HR ist<sup>108</sup>. Zudem fanden die Autoren heraus, dass SSTR mit dem *Fanconi anemia pathway* zusammenhängt<sup>108</sup>. Diese Erkenntnis und daran anknüpfende weitere Studien könnte wesentlich zum Verständnis von HDR und zur Entwicklung weiterer Möglichkeiten zur HDR Effizienzsteigerung beitragen<sup>106</sup>. Obwohl mittlerweile viele Optionen bestehen, wie durch eine Steigerung der HDR Effizienz ein erfolgreiches Knockin mittels CRISPR/Cas9 erzielt werden kann, bergen diese Optionen zum einen Nebenwirkungen, wie z.B. Toxizität und *off target* Effekte<sup>101, 109</sup>. Zum anderen gibt es immer noch keine universelle Methode<sup>92</sup>. Der Erfolg einzelner Möglichkeiten ist stets abhängig von vielen Faktoren, unter anderem auch dem Zelltyp<sup>64</sup>. Zukünftige Versuche sind notwendig, um die Aktivität von HDR in HAC15 Zellen und an den in dieser Arbeit angesteuerten genomischen Loci zu evaluieren. Es gilt verschiedene Möglichkeiten der Steigerung der HDR Effektivität an HAC15 Zellen zu erproben, um letztlich ein erfolgreiches Knock in der Mutationen I770M/G151R in das Genom der Zellen durchführen zu können.

### 5.2.3 Effektivität unterschiedlicher sgRNAs

Neben dem Zelltyp und dem Zustand der Zelle sind auch der genomische Locus, sowie das verwendete *repair template* von Bedeutung für die Effektivität von CRISPR/Cas9 und HDR<sup>64</sup>. Der genomische Locus ist im Detail abhängig von der verwendeten sgRNA, welche bestimmt, wo genau Cas9 schneidet. In dieser Arbeit wurden je drei verschiedene sgRNAs für *KCNJ5* (1-3) und *CACNAID* (1-3) verwendet.

An HEK293 Zellen wurden zunächst die Konstrukte *CACNAID\_1* und *\_2* getestet. Da zwei der *CACNAID\_1* transfizierten Zellklone die homozygote Mutation I770M enthielten und diese in weiteren zehn Zellklonen fraglich vorhanden war, wurde dieses Konstrukt auch für die Transfektion von HAC15 Zellen verwendet. Dass ein Knockin in HAC15 Zellen nicht erfolgreich war, ist vermutlich auf eine geringe HDR Effektivität zurückzuführen (s.o.). Weitere Versuche mit dem *CACNAID\_1* Konstrukt, die so moduliert sind, dass HDR hochreguliert wird (s.o.), könnten erfolgsversprechend sein. Es ist jedoch zu bedenken, dass in der Testzelllinie lediglich zwei homozygote Mutationen erzielt wurden. Das Ziel ist es jedoch, die Mutation heterozygot, wie sie in Aldosteron produzierenden Adenomen vorkommt, in das Genom der HAC15 Zellen zu integrieren. Paquet *et al.* berichteten einen Zusammenhang zwischen dem Abstand der Mutation zu der Stelle an dem Cas9 den Doppelstrangbruch erzeugt und der Zygotität der erzeugten Mutation<sup>98</sup>. Ist der Doppelstrangbruch nahe der Mutation lokalisiert, kommt es eher zum Einbau homozygoter Mutationen, ist er weiter weg, eher zum Einbau heterozygoter Mutationen<sup>98</sup>. Dies sollte bei der Auswahl von sgRNAs bei weiteren Versuchen in Betracht gezogen werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Effizienz von HDR insgesamt nahe der Schnittstelle von Cas9 am höchsten ist<sup>95</sup>. Bei ohnehin niedriger HDR Rate, könnte die Wahl einer sgRNA mit etwas von der Mutation entferntem *target* also kontraproduktiv sein. Eine alternative Möglichkeit, um heterozygote Mutationen zu erzeugen, ist die Zugabe von zwei verschiedenen *repair templates*, von denen eins die Punktmutation enthält und eins nicht<sup>98</sup>. Bei der Reparatur kommt es durch Verwendung beider *templates* zur Entstehung einer heterozygoten Mutation<sup>98</sup>.

Des Weiteren wurden HAC15 Zellen mit *CACNAID\_3* transfiziert. Die entstandenen Zellklone waren fast ausschließlich WT, weshalb dieses Konstrukt nicht weiterverwendet wurde. Es ist jedoch fraglich, ob eine niedrige Cas9 Effektivität mit dem Konstrukt zusammenhängt, oder ob es einen anderen Grund für die hohe WT Rate gab. Auffälligerweise waren auch mit *CACNAID\_1* transfizierte Zellklone der gleichen Transfektion (4) fast ausschließlich WT. Eine erneute Transfektion mit *CACNAID\_3* könnte Antworten geben, wie effektiv das Konstrukt tatsächlich ist und ob es für ein gezieltes Knockin von I770M in Frage kommt.

Da zwei der *KCNJ5\_1* transfizierten HEK293 Zellklone fraglich die G151R Mutation enthielten, wurden HAC15 Zellen mit diesem Konstrukt transfiziert. Auffällig war, dass nach der Transfektion keine Zellen wuchsen. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass HAC15 Zellen, welche die *KCNJ5*-Mutation erfolgreich in ihr Genom integriert haben, an den Folgen der Mutation sterben. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden die Zellen im Folgenden nach Transfektion mit Roxithromycin behandelt, welches als Inhibitor des mutierten *KCNJ5*-Kanals identifiziert wurde<sup>83</sup>. Doch auch mit Roxithromycin behandelte Zellen, die mit *KCNJ5\_1* transfiziert wurden, starben, so auch *KCNJ5\_3* transfizierte HAC15 Zellen der gleichen Transfektion (4). Erfolgreich war lediglich eine HAC15 Transfektion (5) mit *KCNJ5\_3*. Auch hier erfolgte eine Behandlung mit Roxithromycin unmittelbar nach Transfektion. Im Unterschied zu den anderen Transfektionen wurde hier Ultrosor G Medium verwendet. Da bei vorherigen Transfektionen nicht nur einige, sondern alle Zellen starben, jedoch nicht davon auszugehen ist, dass alle Zellen die Mutation enthielten, ist es wahrscheinlicher, dass dies nicht die Ursache für den Zelltod ist. Eine Möglichkeit ist, dass die Zellen die Transfektion als solche nicht überlebt haben. Möglicherweise kann eine andere Transfektionsart oder Anpassung des Transfektionsprotokolls schonender sein. Zukünftige Versuche sollten auf Grund der Erfahrung dieser Studie bestenfalls unter Verwendung des Ultrosor G Mediums durchgeführt werden und *KCNJ5* transfizierte Zellen nach Transfektion mit Roxithromycin behandelt werden. Welche sgRNA hier zukünftig verwendet werden sollte, bleibt zum aktuellen Zeitpunkt unklar. In zwei Zellklonen, die mit *KCNJ5\_1* transfiziert wurden, war fraglich die Mutation G151R vorhanden. Es ist nicht sicher, ob tatsächlich ein Einbau der Mutationen mittels HDR stattgefunden hat. Interessanterweise konnten Paquet *et al.* feststellen, dass Zellklone, welche die von ihnen eingebaute heterozygote Mutation enthielten, fast immer Indels auf dem anderen Allel hatten<sup>98</sup>. Eine Limitation dieser Arbeit ist es, dass keine Auftrennung der beiden Einzelstränge der Zellklone mit fraglicher Mutation stattgefunden hat. Nur so hätte eine Aussage dazu getroffen werden können, ob die fraglichen Mutationen tatsächlich vorhanden waren und somit HDR stattgefunden hat. Hierfür wären weitere Versuche notwendig. Eine Möglichkeit dies herauszufinden, wäre beispielsweise die Durchführung einer TOPO-Klonierung (Thermo Fisher Scientific). Sollte diese ergeben, dass ein heterozygoter Einbau stattgefunden hat, könnte die sgRNA *KCNJ5\_1* für weitere Versuche verwendet werden. Wie oben beschrieben könnten Versuchsmodulationen, die zu einer höheren HDR Rate führen, einen erfolgreichen Knockin begünstigen. Alternativ könnten weitere sgRNAs designt und getestet werden. Dabei gilt es wie oben beschrieben zu beachten, dass die Lokalisation des *targets* einen Einfluss auf die Effektivität von HDR, sowie die Zygotität der eingebauten Mutation hat. Mittels eines Endonuclease Assays wie beispielsweise des Surveyor Mutation Detection Kits (IDT) können gezielt Mutationen und Polymorphismen detektiert werden<sup>110</sup>. Unter Verwendung eines solchen Assays könnten viele sgRNAs auf ihre Schneideeffizienz geprüft und nur die effizienteste verwendet werden.

#### 5.2.4 Einfluss verschiedener *repair templates* auf ein erfolgreiches Knockin

Eine besondere Bedeutung für die Effizienz von HDR hat neben oben Beschriebenem das verwendete *repair template*<sup>100</sup>. Da kein Knockin erzielt werden konnte, wurden die *repair templates* modifiziert. Während für die ersten Transfektionen 90 bp lange ssODN (*single-stranded oligonucleotides*) als Donor verwendet wurden, kamen ab Transfektion 4 171 bp lange ssODN zum Einsatz. Dabei wurde einer von Addgene veröffentlichten Empfehlung von Dr. Le Cong, dem Erstautor des Papers „Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems“ gefolgt<sup>111, 112</sup>. Dieser empfiehlt 50-80 bp lange Homologiearme auf beiden Seiten der gewünschten Mutation<sup>111, 112</sup>. Doch auch die längeren *repair templates* führten nicht zu dem gewünschten Knockin. Längere ssODN sind oft von schlechterer Qualität<sup>95</sup>. Die in dieser Arbeit verwendeten IDT Ultramer Oligos haben jedoch laut Angaben des Herstellers bis zu einer Länge von 200 bp eine gute Qualität und entsprechen der Empfehlung von Dr. Le Cong. Dennoch kann es sein, dass die Wahl längerer ssODN tatsächlich die HDR Effizienz nicht gesteigert, sondern reduziert hat, was auch als Möglichkeit publiziert ist<sup>95</sup>.

Verschiedene Arbeiten haben sich mit der Optimierung der HDR Rate durch Modifikation des *repair templates* befasst. Dabei wurde die Verwendung unterschiedlicher Donoren (ssODN, zirkuläre und linearisierte Plasmide, PCR Produkte, Doppelstrang-DNA), unterschiedlich langer Homologiearme, symmetrischer und asymmetrischer Donoren, sowie die Verwendung von Donoren, die komplementär entweder zum sgRNA- oder PAM-Strang sind, untersucht<sup>95, 100, 101, 113</sup>. Auch die Konzentration des *repair templates*, sowie der Zeitpunkt, zu dem der Donor transfiziert wird, scheinen eine Rolle zu spielen<sup>95</sup>. Wenn man wie in dieser Arbeit ssODN als Donoren verwendet, so wird die beste HDR Effizienz erzielt, wenn man asymmetrische ssODN mit gleichzeitig 30-35 bp bzw. 60-67 langen Homologiearmen am 3' bzw. 5' Ende der gewünschten Mutation verwendet<sup>95, 100</sup>. Es bleibt fraglich, ob die Verwendung von Donoren, die komplementär zum PAM-Strang sind, wie von Richardson *et al.* beschrieben, zu einer gesteigerten HDR führt<sup>95, 100</sup>. Eine sequentielle Transfektion, zuerst von Cas9 Ribonucleoproteinen (s.o.) und anschließend des *repair templates*, optimaler Weise in einer Konzentration von 1 µM, kann ebenfalls die HDR Rate erhöhen<sup>95</sup>. Es ist jedoch darauf zu achten, wie empfindlich die verwendete Zellart auf mehrfaches Transfizieren reagiert<sup>95</sup>. Trotz Abhängigkeit von Zelltyp und genomischen Locus scheint HDR effektiver zu sein, wenn die *edit site* nahe der Schnittstelle (des DSB) lokalisiert ist<sup>95</sup>. Die Verwendung von Thiophosphat-modifizierten ssODNs führt ebenso zu einer erhöhten HDR Rate<sup>95, 109</sup>.

Weitere Versuche sind notwendig, um die *repair templates* entsprechend der oben genannten Punkte anzupassen und somit die HDR Effizienz zu erhöhen und ein gezieltes Knockin zu erzielen. Auch wenn die HDR Effizienz in der Regel mittels SSTR bei der Verwendung von ssODN höher ist, als die von HR unter Verwendung von Doppelstrang-DNA, ist auch hier zu beachten, dass dies stark abhängig vom Zelltyp ist<sup>108</sup>. Da keine Angaben bezüglich HAC15 Zellen ausfindig gemacht werden konnten, kann es sinnvoll sein für zukünftige Versuche auch Doppelstrang-DNA *templates* zu testen. Um dennoch eine hohe HDR Rate zu erzielen bietet sich die Verwendung entweder eines linearisierten Plasmids mit 5' Überhang oder Doppelstrang-DNA mit 30-35 bp langem 3' Überhang an<sup>95, 101</sup>.

### 5.2.5 Mehrfaches Schneiden von Cas9 – unerwünschte Indels und *off target* Effekte

In zehn Zellklonen waren die Mutationen G151R/I770M fraglich vorhanden. Auf Grund des fraglichen Vorkommens der Mutationen wurde vermutet, dass möglicherweise eine HDR stattgefunden hat. Durch erneutes Schneiden von Cas9 und Erzeugen eines Doppelstrangbruchs, der mittels NHEJ repariert wurde, könnte es zusätzlich zur Entstehung von einer oder mehrerer Indels gekommen sein<sup>98</sup>. Um ein mehrfaches Schneiden von Cas9 zu verhindern, wurde für *CACNAID* ein *repair template* designt, welches innerhalb des PAM (der kurzen Erkennungssequenz für CRISPR/Cas9) eine stille Mutation enthielt<sup>98</sup>. Sobald das *repair template* ins Genom eingebaut wird, ist ein weiteres Schneiden durch Cas9 nicht möglich, da dieses den Genlokus mit verändertem PAM nicht erkennt<sup>98</sup>. Paquet *et al.* konnten auf diese Weise auch die HDR Effizienz erhöhen<sup>98</sup>. Nach Transfektion 5, bei der das *template CACNAID\_sil* verwendet wurde, konnte auf diese Weise keine alleinige I770M-Mutation erzielt werden.

Eine Limitation dieses Teils der Arbeit ist es, dass *off target* Effekte nicht untersucht wurden. Die am häufigsten vorkommenden *off targets* können gezielt mittels Sanger Sequenzierung kontrolliert werden. Für eine sichere Identifizierung sämtlicher *off targets* ist jedoch eine Sequenzierung des gesamten Genoms notwendig<sup>64</sup>. Zukünftige Versuche sollten zumindest eine Untersuchung der häufigsten *off targets* einbeziehen.

Das in dieser Arbeit verwendete *online tool* zum Designen von sgRNA identifiziert potentielle *off targets*<sup>64</sup>. Es wurden *guide* RNAs mit möglichst wenig *off targets* verwendet. Dennoch können *off target* Effekte dadurch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Neben der oben beschriebenen Modulation des Versuchsaufbaus der Integration einer stillen Mutation in das PAM, gibt es weitere Möglichkeiten, um ein mehrfaches Schneiden von Cas9 und damit die Entstehung von Indels und *off target* Effekten zu verhindern. Eine Möglichkeit ist die Titration von Cas9 und sgRNA<sup>64</sup>. Darüber hinaus können, wie oben beschrieben, anstelle von Cas9 Plasmiden Cas9 Ribonucleoproteine verwendet werden<sup>105</sup>. Diese degradieren relativ schnell nach Transfektion, was die Wahrscheinlichkeit, dass Cas9 mehrfach schneidet und somit die Entstehung von *off target* Effekten verringert<sup>105</sup>. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Cas9 Nickase<sup>64</sup>. Diese modifizierte Form der Cas9 Nuklease benötigt zwei sgRNAs und erzeugt einen Doppelstrangbruch mittels zwei einzelner *nicks*<sup>64</sup>. Dadurch erhöht sich die Spezifität der Nuklease, was weniger *off target* Effekte zur Folge hat<sup>64</sup>. HDR wird durch den Schnitt der Cas9 Nickase in gleicher Weise induziert, wie durch die Cas9 Nuklease<sup>64</sup>. Eine weitere Möglichkeit CRISPR/Cas9 besser zu regulieren ist die Verwendung von Licht- oder Arzneimittelinduzierten CRISPR/Cas9 Systemen, auf die an dieser Stelle jedoch nicht näher eingegangen werden soll<sup>114</sup>.

Zukünftige Arbeiten, die ein gezieltes Knockin von I770M/G151R in das Genom von HAC15 Zellen beabsichtigen, sollten eine der hier genannten Strategien anwenden, um ein mehrfaches Schneiden von Cas9 und dadurch entstandene unerwünschte Indels, sowie *off target* Effekte zu vermeiden. Die Verwendung eines *repair templates* mit einer stillen Mutation im PAM scheint, soweit anhand der Ergebnisse dieser Arbeit evaluierbar, alleinig nicht ausreichend. Zudem sind andere Methoden nicht vom genomischen Locus bzw. sgRNA/*repair template* abhängig und somit auch für Experimente mit den in dieser Arbeit verwendeten *KCNJ5* Konstrukten anwendbar. Vor kurzem wurden neue Methoden publiziert, welche das Problem des gezielten Einbaus von Punktmutationen aufgreifen und zudem weniger unerwünschte Effekte erzielen. Zunächst machte es das so genannte *Base Editing* möglich, durch Kopplung eines katalytisch inaktiven CRISPR-

Cas9 an eine Cytidin- bzw. Adenosin-Deaminase, gezielt vier Transitionsmutationen (eine Punktmutation innerhalb einer Klassen von Basen: C→T, T→C, G→A und A→G) zu erzeugen<sup>115</sup>. Der Vorteil hierbei besteht darin, dass es nicht zur Erzeugung eines Doppelstrangbruchs kommt, sodass der Prozess nicht von HDR abhängig ist<sup>115</sup>. Zudem wird kein Donor benötigt und es treten weniger Indels auf<sup>115</sup>. Für die G151R Mutation eignet sich diese Methode, da hier Guanin durch Adenin ersetzt wird. Die I770M-Mutation ersetzt Cytosin durch Guanin, weshalb die Methode des *Base Editings* hier unbrauchbar ist. Seit neustem gibt es eine noch weiter fortgeschrittene Methode, das so genannte *Prime Editing*<sup>116</sup>. Dieses ermöglicht es beliebige Punktmutationen zu erzeugen<sup>116</sup>. Dabei kombiniert es die Verwendung einer Cas9-Nickase, welche wie oben beschrieben einen gezielten Einzelstrangbruch erzeugt, mit einer reversen Transkriptase und einer *guide RNA*, welche gleichzeitig als Donor fungiert<sup>116</sup>. Die Erzeugung des Einzelstrangbruchs am gewünschten Genlokus durch die Cas9-Nickase *primed* die reverse Transkriptase, welche die *guide RNA* in DNA transkribiert<sup>116</sup>. Diese wird wiederum unmittelbar am gewünschten Lokus ins Genom integriert<sup>116</sup>. Da beim *Prime Editing* kein Doppelstrangbruch erzeugt wird, was wie oben beschrieben zu NHEJ führen kann, wird auch hier die Entstehung von Indels, wie sie im Rahmen dieser Arbeit unerwünschter Weise aufgetreten sind, verhindert<sup>116</sup>.

Beide Methoden bieten eine Möglichkeit, in dieser Arbeit aufgetretene Schwierigkeiten beim Einbau gezielter Punktmutationen zu umgehen. Sie können effizienter sein als HDR, erzeugen weniger Indels und führen zu weniger *off target* Effekten<sup>115, 116</sup>. *Base Editing* kommt jedoch nur für den Einbau der G151R Mutation in Frage (s.o.). Für beide Methoden bleibt es zudem zu prüfen, ob sie sich auf HAC15 Zellen und den spezifischen Genlokus tatsächlich erfolgreich anwenden lassen.



### 5.3 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde FFPE Gewebe von 42 Hypophysenadenomen erfolgreich mittels NGS sequenziert. Dabei verzeichneten 38 % der untersuchten Proben einen Tumordurchmesser von  $<5$  mm<sup>1</sup>. Die geringe Größe von Hypophysenadenomen kann in der Praxis zu Schwierigkeiten bei der Aufbereitung und histologischen, sowie molekularbiologischen Beurteilung des Gewebes mittels einfacher Sanger Sequenzierung führen<sup>1,117</sup>. Bei Tumoren mit einem Durchmesser  $<3$  mm sind MRT-Untersuchungen häufig falsch negativ<sup>1,117</sup>. In diesen Fällen kann die molekulare Diagnostik mittels NGS hilfreich sein<sup>1</sup>. Das gilt insbesondere für Rezidivfälle<sup>1</sup>. Einige Studien ergaben, dass PatientInnen mit *USP8*-mutierten Tumoren mit einer höheren Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv erleiden<sup>57,58</sup>. Eine molekulare Diagnostik ist insbesondere dann vielversprechend, wenn darauf eine spezifische Therapie folgt. Verschiedene Studien ziehen im Falle von *USP8*-Mutationen die Anwendung von Somatostatin-Analoga, EGFR-Inhibitoren, sowie einem HSP90-Inhibitor in Betracht<sup>1,54,56,118,119</sup>. Weitere Studien sind notwendig, um die Wirksamkeit der genannten Substanzen auf *USP8*-mutierte Tumore zu prüfen. Abschließend lässt sich jedoch sagen, dass gezeigt werden konnte, dass gezieltes *Next Generation Sequencing* Potential birgt, in Zukunft Bestandteil der Diagnostik bei Morbus Cushing zu sein<sup>1</sup>.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit erfolgreiches *Genome Editing* mittels CRISPR/Cas9 in HAC15 Zellen durchgeführt werden. Die Methode bietet sich an, um gezielt Knockouts zu erzeugen. Die Integration spezifischer Punktmutationen (I770M/G151R) in das Genom von HAC15 Zellen birgt dahingegen verschiedene Schwierigkeiten, welche trotz unterschiedlichster Anpassungen des Versuchsaufbaus nicht überwunden werden konnten. Sie erfordert eine HDR, welche generell nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit stattfindet<sup>75</sup>. Zudem konnte keine Publikationen zur HDR Effizienz in HAC15 Zellen ausfindig gemacht werden. In der Zeit seit der Durchführung der Experimente dieser Arbeit haben sich viele Studien damit beschäftigt, wie die HDR Effizienz in verschiedenen Zelltypen und bei der Verwendung unterschiedlicher *targets* gesteigert werden kann. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die meisten Optimierungsmöglichkeiten zum Zeitpunkt der in dieser Arbeit erfolgten Versuche noch nicht publiziert waren. Die oben diskutierten Vorschläge, wie der Versuchsaufbau weiterer Experimente aussehen könnte, basieren weitgehend auf den neueren Studien. Auffallend ist, dass trotz dieser fortschreitenden Entwicklungen, keine Publikationen identifiziert werden konnten, die eine HDR Optimierung speziell in HAC15 Zellen vornehmen. Dies unterstreicht, dass es offensichtlich schwierig ist, ein gezieltes Knockin mittels CRISPR/Cas9 in HAC15 Zellen durchzuführen. Ein Versuchsaufbau, der entsprechend des aktuellen Kenntnisstandes unterschiedliche Möglichkeiten zur Steigerung der HDR Effizienz in HAC15 Zellen und an den in dieser Arbeit angesteuerten *targets* testet, ist notwendig. Möglicherweise können auch neuartige Methoden wie das *Base Editing* oder *Prime Editing*, welche auf die Notwendigkeit von HDR verzichten, den gezielten Einbau spezifischer Punktmutationen in das Genom von HAC15 Zellen möglich machen und bieten eine Grundlage für weitere Studien. Die Erzeugung von Knockouts in HAC15 Zellen mittels CRISPR/Cas9 konnte erfolgreich etabliert werden. Die erzeugten *KCNJ5*- bzw. *CACNAID*-Knockoutzelllinien können für funktionelle Studien verwendet werden, die beispielsweise die Aldosteronproduktion untersuchen. Mittels CRISPR/Cas9 ein Zellmodell zu erzeugen, welches gezielt die heterozygoten Punktmutationen I770M und G151R enthält, wie es in Aldosteron produzierenden Adenomen der Fall ist, erfordert jedoch weitere Studien.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Ballmann C, Thiel A, Korah HE, et al. USP8 Mutations in Pituitary Cushing Adenomas-Targeted Analysis by Next-Generation Sequencing. *J Endocr Soc.* 2018;2(3):266-278.
2. Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2018;39(33):3021-3104.
3. Chow CK, Teo KK, Rangarajan S, et al. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. *JAMA.* 2013;310(9):959-968.
4. Forouzanfar MH, Liu P, Roth GA, et al. Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mm Hg, 1990-2015. *JAMA.* 2017;317(2):165-182.
5. Spat A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev.* 2004;84(2):489-539.
6. Funder JW, Carey RM, Mantero F, et al. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2016;101(5):1889-1916.
7. Williams TA, Reincke M. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Diagnosis and management of primary aldosteronism: the Endocrine Society guideline 2016 revisited. *Eur J Endocrinol.* 2018;179(1):R19-R29.
8. Monticone S, Burrello J, Tizzani D, et al. Prevalence and Clinical Manifestations of Primary Aldosteronism Encountered in Primary Care Practice. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(14):1811-1820.
9. Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, et al. A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(11):2293-2300.
10. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, et al. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(8):1243-1248.
11. Monticone S, D'Ascenzo F, Moretti C, et al. Cardiovascular events and target organ damage in primary aldosteronism compared with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(1):41-50.
12. Mulatero P, Monticone S, Bertello C, et al. Long-term cardio- and cerebrovascular events in patients with primary aldosteronism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2013;98(12):4826-4833.
13. Nussey S, Whitehead S. *Endocrinology: An Integrated Approach.* Oxford 2001.
14. Lacroix A, Felders RA, Stratakis CA, et al. Cushing's syndrome. *Lancet (London, England).* 2015;386(9996):913-927.
15. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2008;93(5):1526-1540.
16. Boscaro M, Barzon L, Fallo F, et al. Cushing's syndrome. *Lancet (London, England).* 2001;357(9258):783-791.

17. Choi M, Scholl UI, Yue P, et al. K<sup>+</sup> channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science*. 2011;331(6018):768-772.
18. Gomez-Sanchez CE. Channels and pumps in aldosterone-producing adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(4):1152-1156.
19. Prada ETA, Burrello J, Reincke M, et al. Old and New Concepts in the Molecular Pathogenesis of Primary Aldosteronism. *Hypertension*. 2017;70(5):875-881.
20. Fernandes-Rosa FL, Williams TA, Riester A, et al. Genetic spectrum and clinical correlates of somatic mutations in aldosterone-producing adenoma. *Hypertension*. 2014;64(2):354-361.
21. El Zein RM, Boulkroun S, Fernandes-Rosa FL, et al. Molecular genetics of Conn adenomas in the era of exome analysis. *Presse Med*. 2018;47(7-8 Pt 2):e151-e158.
22. Nanba K, Omata K, Else T, et al. Targeted Molecular Characterization of Aldosterone-Producing Adenomas in White Americans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2018;103(10):3869-3876.
23. Nanba K, Omata K, Gomez-Sanchez CE, et al. Genetic Characteristics of Aldosterone-Producing Adenomas in Blacks. *Hypertension*. 2019;73(4):885-892.
24. Azizan EA, Poulsen H, Tuluc P, et al. Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nat Genet*. 2013;45(9):1055-1060.
25. Tauber P, Aichinger B, Christ C, et al. Cellular Pathophysiology of an Adrenal Adenoma-Associated Mutant of the Plasma Membrane Ca<sup>(2+)</sup>-ATPase ATP2B3. *Endocrinology*. 2016;157(6):2489-2499.
26. Akerstrom T, Maharjan R, Sven Willenberg H, et al. Activating mutations in CTNNB1 in aldosterone producing adenomas. *Sci Rep*. 2016;6:19546.
27. Wu VC, Wang SM, Chueh SJ, et al. The prevalence of CTNNB1 mutations in primary aldosteronism and consequences for clinical outcomes. *Sci Rep*. 2017;7:39121.
28. Rhayem Y, Perez-Rivas LG, Dietz A, et al. PRKACA Somatic Mutations Are Rare Findings in Aldosterone-Producing Adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(8):3010-3017.
29. Dutta RK, Arnesen T, Heie A, et al. A somatic mutation in CLCN2 identified in a sporadic aldosterone-producing adenoma. *Eur J Endocrinol*. 2019;181(5):K37-K41.
30. Nanba K, Blinder AR, Rege J, et al. Somatic CACNA1H Mutation As a Cause of Aldosterone-Producing Adenoma. *Hypertension*. 2020;75(3):645-649.
31. Nishimoto K, Tomlins SA, Kuick R, et al. Aldosterone-stimulating somatic gene mutations are common in normal adrenal glands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(33):E4591-4599.
32. Omata K, Satoh F, Morimoto R, et al. Cellular and Genetic Causes of Idiopathic Hyperaldosteronism. *Hypertension*. 2018;72(4):874-880.
33. Lenzini L, Rossitto G, Maiolino G, et al. A Meta-Analysis of Somatic KCNJ5 K<sup>(+)</sup> Channel Mutations In 1636 Patients With an Aldosterone-Producing Adenoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(8):E1089-1095.

34. Vilela LAP, Rassi-Cruz M, Guimaraes AG, et al. KCNJ5 somatic mutation is a predictor of hypertension remission after adrenalectomy for unilateral primary aldosteronism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2019.
35. Scholl UI, Lifton RP. New insights into aldosterone-producing adenomas and hereditary aldosteronism: mutations in the K<sup>+</sup> channel KCNJ5. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013;22(2):141-147.
36. Scholl UI, Goh G, Stolting G, et al. Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nat Genet*. 2013;45(9):1050-1054.
37. Zennaro MC, Boulkroun S, Fernandes-Rosa F. Genetic Causes of Functional Adrenocortical Adenomas. *Endocrine reviews*. 2017;38(6):516-537.
38. Monticone S, Buffolo F, Tetti M, et al. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: The expanding genetic horizon of primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol*. 2018;178(3):R101-R111.
39. Perez-Rivas LG, Williams TA, Reincke M. Inherited Forms of Primary Hyperaldosteronism: New Genes, New Phenotypes and Proposition of A New Classification. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019;127(2-03):93-99.
40. Korah HE, Scholl UI. An Update on Familial Hyperaldosteronism. *Horm Metab Res*. 2015;47(13):941-946.
41. Mulatero P, Tizzani D, Viola A, et al. Prevalence and characteristics of familial hyperaldosteronism: the PATOGEN study (Primary Aldosteronism in TORino-GENetic forms). *Hypertension*. 2011;58(5):797-803.
42. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, et al. A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature*. 1992;355(6357):262-265.
43. Fernandes-Rosa FL, Daniil G, Orozco IJ, et al. A gain-of-function mutation in the CLCN2 chloride channel gene causes primary aldosteronism. *Nat Genet*. 2018;50(3):355-361.
44. Scholl UI, Stolting G, Schewe J, et al. CLCN2 chloride channel mutations in familial hyperaldosteronism type II. *Nat Genet*. 2018;50(3):349-354.
45. Scholl UI, Stolting G, Nelson-Williams C, et al. Recurrent gain of function mutation in calcium channel CACNA1H causes early-onset hypertension with primary aldosteronism. *Elife*. 2015;4:e06315.
46. Assie G, Libe R, Espiard S, et al. ARMC5 mutations in macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome. *N Engl J Med*. 2013;369(22):2105-2114.
47. Albani A, Theodoropoulou M, Reincke M. Genetics of Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018;88(1):3-12.
48. Sbiera S, Deutschbein T, Weigand I, et al. The New Molecular Landscape of Cushing's Disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(10):573-583.
49. Ma ZY, Song ZJ, Chen JH, et al. Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing's disease. *Cell Res*. 2015;25(3):306-317.
50. Reincke M, Sbiera S, Hayakawa A, et al. Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease. *Nat Genet*. 2015;47(1):31-38.

51. Chen J, Jian X, Deng S, et al. Identification of recurrent USP48 and BRAF mutations in Cushing's disease. *Nat Commun.* 2018;9(1):3171.
52. Mizuno E, Iura T, Mukai A, et al. Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes. *Mol Biol Cell.* 2005;16(11):5163-5174.
53. Mizuno E, Kitamura N, Komada M. 14-3-3-dependent inhibition of the deubiquitinating activity of UBPY and its cancellation in the M phase. *Exp Cell Res.* 2007;313(16):3624-3634.
54. Weigand I, Knobloch L, Flitsch J, et al. Impact of USP8 Gene Mutations on Protein Deregulation in Cushing Disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2019;104(7):2535-2546.
55. Perez-Rivas LG, Theodoropoulou M, Ferrau F, et al. The Gene of the Ubiquitin-Specific Protease 8 Is Frequently Mutated in Adenomas Causing Cushing's Disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2015;100(7):E997-1004.
56. Hayashi K, Inoshita N, Kawaguchi K, et al. The USP8 mutational status may predict drug susceptibility in corticotroph adenomas of Cushing's disease. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(2):213-226.
57. Faucz FR, Tirosh A, Tatsi C, et al. Somatic USP8 Gene Mutations Are a Common Cause of Pediatric Cushing Disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2017;102(8):2836-2843.
58. Albani A, Perez-Rivas LG, Dimopoulou C, et al. The USP8 mutational status may predict long-term remission in patients with Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2018.
59. Losa M, Mortini P, Pagnano A, et al. Clinical characteristics and surgical outcome in USP8-mutated human adrenocorticotrophic hormone-secreting pituitary adenomas. *Endocrine.* 2018.
60. Perez-Rivas LG, Theodoropoulou M, Puar TH, et al. Somatic USP8 mutations are frequent events in corticotroph tumor progression causing Nelson's tumor. *Eur J Endocrinol.* 2018;178(1):57-63.
61. Hernandez-Ramirez LC, Gam R, Valdes N, et al. Loss-of-function mutations in the CABLES1 gene are a novel cause of Cushing's disease. *Endocr Relat Cancer.* 2017;24(8):379-392.
62. Roussel-Gervais A, Couture C, Langlais D, et al. The Cables1 Gene in Glucocorticoid Regulation of Pituitary Corticotrope Growth and Cushing Disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2016;101(2):513-522.
63. Parmar J, Key RE, Rainey WE. Development of an adrenocorticotropin-responsive human adrenocortical carcinoma cell line. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2008;93(11):4542-4546.
64. Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-2308.
65. REPLI-g® FFPE Handbook Available: <https://www.qiagen.com/cn/resources/download.aspx?id=6a981bbe-f5d2-46d7-b3c5-9c5e25064a60&lang=en>. Accessed 07.05.2019.
66. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem.* 2015;61(1):64-71.

67. QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook Available: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=63a84dc7-d904-418e-b71a-1521cf318e82&lang=en>. Accessed 07.05.2019.
68. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-350.
69. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239(4839):487-491.
70. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-5467.
71. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 1986;321(6071):674-679.
72. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews Genetics.* 2010;11(1):31-46.
73. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology Available: [https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina\\_sequencing\\_introduction.pdf](https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf).
74. Perez-Rivas LG, Reincke M. Genetics of Cushing's disease: an update. *J Endocrinol Invest.* 2016;39(1):29-35.
75. Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature reviews Genetics.* 2014;15(5):321-334.
76. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science.* 2010;327(5962):167-170.
77. Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods.* 2013;10(10):957-963.
78. Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature.* 2015;526(7571):55-61.
79. QIAprep® Miniprep Handbook Available: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=22df6325-9579-4aa0-819c-788f73d81a09&lang=en>. Accessed 07.05.2019.
80. Dalby B, Cates S, Harris A, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods.* 2004;33(2):95-103.
81. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, et al. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1982;1(7):841-845.
82. Hamm A, Krott N, Breibach I, et al. Efficient transfection method for primary cells. *Tissue Eng.* 2002;8(2):235-245.
83. Scholl UI, Abriola L, Zhang C, et al. Macrolides selectively inhibit mutant KCNJ5 potassium channels that cause aldosterone-producing adenoma. *J Clin Invest.* 2017;127(7):2739-2750.
84. Knappe UJ, Jaspers C, Buschsieweke D, et al. Ectopic Adrenocorticotrophic Hormone-Secreting Pituitary Adenomas: An Underestimated Entity. *Neurosurgery.* 2017;80(4):525-533.

85. Kleinschmidt-DeMasters BK, Lopes MB, Prayson RA. An algorithmic approach to sellar region masses. *Arch Pathol Lab Med.* 2015;139(3):356-372.
86. de Araujo LJ, Lerario AM, de Castro M, et al. Transcriptome Analysis Showed a Differential Signature between Invasive and Non-invasive Corticotrophinomas. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:55.
87. Gicquel C, Le Bouc Y, Luton JP, et al. Monoclonality of corticotroph macroadenomas in Cushing's disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1992;75(2):472-475.
88. Schulte HM, Oldfield EH, Allolio B, et al. Clonal composition of pituitary adenomas in patients with Cushing's disease: determination by X-chromosome inactivation analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1991;73(6):1302-1308.
89. Theodoropoulou M, Reincke M, Fassnacht M, et al. Decoding the genetic basis of Cushing's disease: USP8 in the spotlight. *Eur J Endocrinol.* 2015;173(4):M73-83.
90. Lin SY, Makino K, Xia W, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol.* 2001;3(9):802-808.
91. Issaenko OA, Amerik AY. Chalcone-based small-molecule inhibitors attenuate malignant phenotype via targeting deubiquitinating enzymes. *Cell Cycle.* 2012;11(9):1804-1817.
92. Pawelczak KS, Gavande NS, VanderVere-Carozza PS, et al. Modulating DNA Repair Pathways to Improve Precision Genome Engineering. *ACS Chem Biol.* 2018;13(2):389-396.
93. Canny MD, Moatti N, Wan LCK, et al. Inhibition of 53BP1 favors homology-dependent DNA repair and increases CRISPR-Cas9 genome-editing efficiency. *Nat Biotechnol.* 2018;36(1):95-102.
94. Chu VT, Weber T, Wefers B, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2015;33(5):543-548.
95. Liang X, Potter J, Kumar S, et al. Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *J Biotechnol.* 2017;241:136-146.
96. Lin S, Staahl BT, Alla RK, et al. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife.* 2014;3:e04766.
97. Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol.* 2015;33(5):538-542.
98. Paquet D, Kwart D, Chen A, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature.* 2016;533(7601):125-129.
99. Paulsen BS, Mandal PK, Frock RL, et al. Ectopic expression of RAD52 and dn53BP1 improves homology-directed repair during CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biomed Eng.* 2017;1(11):878-888.
100. Richardson CD, Ray GJ, DeWitt MA, et al. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat Biotechnol.* 2016;34(3):339-344.
101. Song F, Stieger K. Optimizing the DNA Donor Template for Homology-Directed Repair of Double-Strand Breaks. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2017;7:53-60.

102. Wang Y, Liu KI, Sutrisnoh NB, et al. Systematic evaluation of CRISPR-Cas systems reveals design principles for genome editing in human cells. *Genome Biol.* 2018;19(1):62.
103. Liu M, Rehman S, Tang X, et al. Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Front Genet.* 2018;9:691.
104. Yang D, Scavuzzo MA, Chmielowiec J, et al. Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. *Sci Rep.* 2016;6:21264.
105. Kim S, Kim D, Cho SW, et al. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 2014;24(6):1012-1019.
106. Bashir S, Kuhn R. Enhanced precision and efficiency. *Nat Biomed Eng.* 2017;1(11):856-857.
107. Pinder J, Salsman J, Dellaire G. Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(19):9379-9392.
108. Richardson CD, Kazane KR, Feng SJ, et al. CRISPR-Cas9 genome editing in human cells occurs via the Fanconi anemia pathway. *Nat Genet.* 2018;50(8):1132-1139.
109. Renaud JB, Boix C, Charpentier M, et al. Improved Genome Editing Efficiency and Flexibility Using Modified Oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 Nucleases. *Cell Rep.* 2016;14(9):2263-2272.
110. Qiu P, Shandilya H, D'Alessio JM, et al. Mutation detection using Surveyor nuclease. *Biotechniques.* 2004;36(4):702-707.
111. CRISPR Design FAQ Available: <https://www.addgene.org/crispr/zhang/faq/>. Accessed 03.09.2019.
112. Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013;339(6121):819-823.
113. Yang LH, Guell M, Byrne S, et al. Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(19):9049-9061.
114. Zhang J, Chen L, Zhang J, et al. Drug Inducible CRISPR/Cas Systems. *Comput Struct Biotechnol J.* 2019;17:1171-1177.
115. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A\*T to G\*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature.* 2017;551(7681):464-471.
116. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature.* 2019;576(7785):149-157.
117. Ludecke DK, Flitsch J, Knappe UJ, et al. Cushing's disease: a surgical view. *J Neurooncol.* 2001;54(2):151-166.
118. Ben-Shlomo A, Cooper O. Role of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of pituitary tumours: from bench to bedside. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2017;24(4):301-305.
119. Fukuoka H, Cooper O, Ben-Shlomo A, et al. EGFR as a therapeutic target for human, canine, and mouse ACTH-secreting pituitary adenomas. *J Clin Invest.* 2011;121(12):4712-4721.





## Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Ute Scholl für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe der Experimentellen Nephrologie und Hypertensiologie in der Klinik für Nephrologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) zu promovieren. Mein Dank gilt an dieser Stelle auch Herrn Prof. Dr. med. Lars Christian Rump in seiner Stellung als Leiter der Klinik für Nephrologie UKD.

Frau Prof. Dr. med. Ute Scholl danke ich darüber hinaus für Ihre ansteckende Begeisterung für die Wissenschaft und die experimentelle Arbeit im Labor, ihre jederzeitige Ansprechbarkeit, die große Unterstützung, sowie intensive Betreuung bei der Planung, Einarbeitung, Umsetzung und Korrektur dieser Arbeit.

Ich danke Dr. rer. nat. Anne Thiel und Dr. rer. nat. Esther Reimer, sowie allen anderen Mitgliedern der AG Scholl für Ihre wertvolle Unterstützung, andauernde Hilfsbereitschaft und die gemeinsame Zeit im Labor. Mein Dank gilt an dieser Stelle auch den technischen Assistentinnen Frau Blanka Duvnjak, Frau Nicola Kuhr und Frau Christina Schwandt und dem gesamten Team der Experimentellen Nephrologie für Ihre Hilfe. Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Anne Thiel für ihre detailgenaue Einarbeitung, die gute Zusammenarbeit und ihre großzügige Unterstützung bei gemeinsamen Projekten, insbesondere bei der DNA-Extraktion und Sanger Sequenzierung der Hypophysenadenome und für die Durchführung und Auswertung des NGS.

Mein Dank gilt zudem allen teilnehmenden PatientInnen für ihren unschätzbaren großen Beitrag zu diesem Projekt. Ich danke Herrn PD Dr. med. Ulrich J. Knappe (Klinik für Neurochirurgie des Johannes Wesling Klinikums Minden), für die Ermittlung klinischer Daten und die Fallauswahl der PatientInnen aus Minden. Frau Dr. med. Christiane Knobbe-Thomson und Herrn Prof. Dr. med. Guido Reifenberger (Institut für Neuropathologie des UKD) danke ich für die Auswahl der Düsseldorfer Fälle, Zurverfügungstellung des Gewebes und der Durchführung und Auswertung der Immunhistochemie der Düsseldorfer Proben. Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. med. Anna-Carina Reis (Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen) und Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Saeger (Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) für die Zurverfügungstellung von Gewebe, die histologische Beurteilung, sowie die Durchführung und Auswertung der Immunhistochemie der Proben aus Minden. Ich danke zudem Herrn Prof. Dr. Karl Köhrer und Frau Dr. rer. nat. Stefanie Stepanow (BMFZ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) für die Durchführung und Auswertung des NGS. Weiterer Dank gilt dem Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen (Dr. K.W. Schmid, F.a. Saballs, I. Albertz und G. Ladwig) für die Unterstützung, sowie den Mitarbeitern der Abteilungen für Neurochirurgie des Johannes Wesling Klinikums Minden und des Universitätsklinikums Düsseldorf, die an der PatientInnenbetreuung mitgewirkt haben, sowie Holger Willenberg (Sektion Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen des Universitätsklinikums Rostock) für die hilfreichen Diskussionen.

Mein Dank gilt Prof. William E. Rainey, PhD (Institut für Molekulare und Intergrative Physiologie und Innere Medizin der Universität Michigan) für die Zurverfügungstellung der HAC15 Zellen. Ich danke Prof. Dr. med. Rainer Haas, Dr. rer. nat. Ron-Patrick Cadeddu und Dr. rer. nat. Stefanie Geyh (Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der UKD) für die Zurverfügungstellung ihres Amaxa Geräts und die ausgesprochene Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

Mirjam Pfeffer und Franziska Wohlfarth – Ohne eure Begleitung durch diese Zeit mit all ihren Tiefpunkten und Höhenflügen, euer offenes Ohr bei stundenlangen Küchengesprächen und die gegenseitige Motivation, genauso wie die Ablenkung, wäre ich das ein oder andere Mal verzweifelt. Danke für eure wunderbare Freundschaft und die gemeinsamen Jahre in Düsseldorf.

Danke, Rainer Vogt, für die volle Rückendeckung, deine endlose Geduld, dein liebevolles Verständnis in allen Stimmungslagen, die Ablenkung und all die Energie, die du mir gegeben hast.

Der größte Dank gilt meiner Familie. Danke, Lea und Franca Ballmann, für eure bedingungslose Schwesternliebe und das Aushalten etlicher Gespräche zu diesem Thema. Vor allem aber Danke, Papa und Mama, Manfred Ballmann und Regine Harksen-Ballmann, für eure Unterstützung auf allen Ebenen, etliche Telefonate, das Korrekturlesen dieser Arbeit, nicht zuletzt eure Hilfe bei der Finanzierung, vor allem aber, dass ihr immer für mich da seid und fest an mich glaubt – euch ist diese Arbeit gewidmet.