



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2013 – 2014

Ontwikkeling van *genome editing*
constructen voor de creatie van
laminopathie modelcellijnen.

Joke Robijns

Promotor: Prof. dr. ir. Winnok H. De Vos

Tutor: ir. Tom Sieprath

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de bio-ingenieurswetenschappen cel- en genbiotechnologie

De auteur en de promotor geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze scriptie.

Promotor

Prof. dr. ir. Winnok H. De Vos

Tutor

ir. Tom Sieprath

Auteur

Joke Robijns

Universiteit Gent

6 juni 2014

Voorwoord

Het maken van deze masterproef was niet mogelijk geweest zonder de hulp van een heleboel mensen die mij op verschillende vlakken hebben bijgestaan. Zonder de steun van mijn vrienden en familie had ik dit werk niet tot een goed einde kunnen brengen. Ze stonden voor me klaar wanneer ik nood had aan een babbel of het even niet meer zag zitten, vooral **Dieter Baets**. Ook waren ze bereid om mijn teksten met een kritisch oog te bekijken en te evalueren. Hiervoor wil ik in het bijzonder mijn broer, **Stijn Robijns**, bedanken die veel tijd heeft gestoken in het grondig nalezen van mijn schrijfsels.

Ik zou graag ook alle mensen van het departement moleculaire biotechnologie (**MOBI**) willen bedanken. Aan hen kon ik elke vraag die ik had stellen en ze waren bereid me steeds met een glimlach te helpen met eventuele problemen. Dankzij **Lander Bauters** werden het bacteriële werk en de restricties en ligaties een koud kunstje. **Katrien Curvers** wil ik bedanken voor haar hulp bij de HRM-analyse, die trouwens niet mogelijk was zonder het gebruik van het toestel en hulp van de **IMMUNO** vakgroep.

Natuurlijk wil ik ook iedereen van **CSI** zelf bedanken. Aan **Tobias Corne** kon ik alle vragen stellen die ik maar wilde, hij stond steeds klaar met een antwoord. Mijn mede student **Sara Devos** was een grote hulp bij het labowerk en een fijn persoon om alle goede en slechtere momenten mee te delen. Mijn promotor **Winnok De Vos** wil ik graag bedanken voor de mogelijkheden die hij mij gegeven heeft. Met zijn kritisch wetenschappelijk inzicht gaf hij advies waar nodig en leerde ik streven naar perfectie. Bovenal zou ik graag mijn tutor **Tom Sieprath** bedanken die me alles van labowerk heeft geleerd en alle experimenten mee bedacht en opvolgde. Bij hem kon ik steeds rekenen op steun en advies wanneer dit nodig was.

Voor het geval ik nog personen ben vergeten, zou ik gewoon in het algemeen, tegen iedereen die heeft bijgedragen aan deze masterproef, willen zeggen: **bedankt!**

Samenvatting

Laminopathieën zijn ziekten waarbij problemen met de nucleaire lamina leiden tot uiteenlopende ziektefenomenen. De nucleaire lamina bevindt zich aan de binnenkant van de kernmembraan en bestaat uit een netwerk van intermediaire filamenten, de lamines. Het uitgebreid arsenaal aan functies van deze lamines, gaande van het ondersteunen van de celkern tot het beïnvloeden van genexpressie, ligt aan de basis van de brede waaier aan fenotypische kenmerken die voorkomen bij deze ziekten.

Er zijn nog veel fundamentele principes van deze ziekten onbekend en aangezien patiëntenmateriaal schaars is, zijn goede modelsystemen nodig om studies te kunnen uitvoeren. Een stabiel celmodel met de exacte genetische afwijkingen van een bepaalde laminopathie is ideaal voor de studie van deze ziekte. Zo een model kan bekomen worden door gerichte genetische veranderingen aan te brengen in normale cellen met behulp van *genome editing*. Het doel van deze masterproef is het ontwikkelen van *genome editing* constructen voor de *knock-out* van LMNA en ZMPSTE24, twee genen die essentieel zijn voor het normale functioneren van de nucleaire lamina. Hiervoor wordt zowel het TALEN als het CRISPR/Cas9 systeem gebruikt. Beide systemen induceren op een specifieke plaats in het genoom een dubbelstrengige breuk die wordt gecorrigeerd door de herstelenzymen van de cel. Omdat het cellulair herstelmechanisme niet foutloos werkt kan dit resulteren in het uitschakelen van het gen.

In totaal werden drie TALEN paren en vier CRISPR/Cas9 constructen aangemaakt. Om deze constructen te testen, werden verschillende technieken gebruikt en geoptimaliseerd. De drie TALEN paren blijken in staat om beoogde mutaties te genereren in plasmide DNA, aanwezig in humane cellen. Voor de CRISPR/Cas9 systemen werd aangetoond dat drie ervan in staat zijn om de beoogde mutaties te genereren in het genomisch DNA van humane cellen. Deze veelbelovende resultaten zijn een belangrijke stap richting het creëren van stabiele modelcellijnen, met een LMNA of ZMPSTE24 *knock-out*, voor de studie van laminopathieën.

Inhoudsopgave

Voorwoord	III
Samenvatting	V
Lijst met afkortingen	IX
1 Inleiding.....	1
1.1 Lamines en laminopathieën	1
1.1.1 Lamines	1
1.1.1.1 Locatie en structuur	1
1.1.1.2 Soorten lamines	2
1.1.1.3 Maturatie en polymerisatie	3
1.1.1.4 Functies	5
1.1.2 Laminopathieën	7
1.1.2.1 Oorzaak	7
1.1.2.2 Laminopathieën van de dwarsgestreepte spieren	8
1.1.2.3 Perifere neuropathieën.....	8
1.1.2.4 Lipodystrofieën	9
1.1.2.5 Verouderingslaminopathieën.....	9
1.1.2.6 Lamines en veroudering	10
1.1.2.7 Lamines en kanker.....	10
1.2 Wetenschappelijke modellen.....	11
1.2.1 Modelorganismen	11
1.2.2 Modelcellen	11
1.2.2.1 Patiëntencellen.....	11
1.2.2.2 Experimentele behandelingen	12
1.3 <i>Genetic engineering</i>	13
1.3.1.1 Zink-vinger nucleasen	14
1.3.1.2 Transcription activator-like effector nucleasen (TALEN)	14
1.3.1.3 CRISPR-Cas9	16
1.4 Doel	18
2 Materiaal en methoden	20
2.1 Algemene laboratorium technieken.....	20
2.1.1 Celcultuur	20
2.1.2 Transfectie	20
2.1.3 DNA extractie.....	21
2.1.4 Bacteriële transformatie en plasmide opzuivering	21
2.1.5 DNA sequencerig	21
2.1.6 Microscopie	21
2.1.7 Immunokleuring	22
2.1.8 <i>Polymerase chain reaction</i>	22
2.1.8.1 Basis PCR.....	23
2.1.8.2 Kolonie PCR.....	23
2.2 Aanmaak en controle van <i>genome editing</i> constructen	24
2.2.1 TALEN.....	24
2.2.1.1 TALEN ontwerp.....	24
2.2.1.2 TALEN productie.....	26
2.2.1.3 TALEN validatie	30
2.2.1.3.1 T7 endonuclease assay	30

2.2.1.3.2	<i>High resolution melt-analysis</i>	30
2.2.1.3.3	Surrogaat reporter.....	31
2.2.2	CRISPR/Cas9.....	34
3	Resultaten.....	37
3.1	Genomische sequenties.....	37
3.2	TALEN ontwikkeling.....	37
3.2.1	Monomeer bibliotheek.....	37
3.2.2	Hexameren.....	38
3.2.3	Kolonie PCR.....	38
3.3	TALEN controle.....	38
3.3.1	Sequeneringsresultaten.....	38
3.3.2	Transfectie efficiëntie.....	39
3.3.3	T7 endonuclease.....	40
3.3.4	HRM-analyse.....	40
3.3.5	Surrogaat reporter.....	43
3.4	CRISPR/Cas9 systemen.....	46
4	Discussie.....	51
4.1	TALEN constructie.....	51
4.2	CRISPR/Cas9 constructie.....	52
4.3	Controle systemen.....	52
5	Algemeen besluit en toekomstperspectieven.....	55
6	Bibliografie.....	57
7	Bijlagen.....	65
7.1	Media voor Micro-organismen.....	65
7.1.1	SOC-medium.....	65
7.1.2	LB-medium.....	65
7.1.3	LB-agar platen.....	65
7.2	PCR.....	66
7.2.1	TAE-buffer.....	66
7.2.2	Primers.....	66
7.3	Coderende sequenties.....	67
7.4	Alingment ZMPSTE24 exon 1.....	68
7.5	TALEN ontwikkelingsprotocol [92].....	69
7.5.1	Monomeer bibliotheek amplificatie en normalisatie.....	69
7.5.2	TALEN hiërarchische ligatie.....	70
7.5.3	TALEN transformatie en sequentie verificatie.....	72

Lijst met afkortingen

AZ	aminozuur
bp	basenparen
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Cas	CRISPR associated gene
CRISPR	clusters of regularly interspaced short palindromic repeats
DAPI	4,6-diamidino-2-fenylindool
DSB	double strand break
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eGFP	enhanced green fluorescent protein
FBS	fetal bovine serum
GFP	green fluorescent protein
HEK	human embryonic kidney
HeLa	Henrietta Lacks
HD	histidine asparaginezuur
HGPS	Hutchinson-Gilford progeria syndrome
HR	homologe recombinatie
HRM	high resolution melt
IF	intermediaire filamenten
Ig	immunoglobuline
Indels	inserties en deleties
INM	inner nuclear membrane
LAP	lamina-associated polypeptides
LINC	linker of nucleoskeleton and cytoskelton
MAR	matrix attachment region
mRFP	monomeric red fluorescent protein
NE	nucleaire envelop
NG	asparagine glycine
NH	asparagine histidine
NHEJ	non-homologous end joining
NHDF	normal human dermal fibroblast
NI	asparagine isoleucine
NLS	nucleair lokalisatie signaal
NN	asparagine asparagine
NPC	nuclear pore complex
PCR	polymerase chain reaction
PSL	penicilline-streptomycine-L-glutamine
qPCR	quantitatieve PCR
RFP	red fluorescent protein
RPM	revolutions per minute
RVD	repeat-variable di-residue
SNP	single nucleotide polymorphism
TALEN	transcription activator like effector nuclease
ZFN	zinc-finger nuclease
ZFP	zinc-finger protein
ZMPSTE24	zinkmetalloproteinase STE24

1 Inleiding

De meeste mensen kennen het Hutchinson-Gilford Progeria Syndroom (HGPS) waarbij jonge kinderen versneld verouderingssymptomen vertonen. HGPS is echter slechts één van de bekendere ziekten in een breed spectrum van verwante aandoeningen die laminopathieën worden genoemd. Deze laminopathieën vormen de basis voor het onderzoek in deze masterproef. Het zijn zeldzame ziekten waarbij er, zoals de naam doet vermoeden, problemen zijn met de nucleaire lamina. De bouwstenen van deze structuur zijn de lamines die zich vernetten tot een dichts netwerk aan de binnenzijde van de kernmembraan en zo de nucleaire lamina vormen. De nucleaire lamina speelt een rol in verscheidene cellulaire processen zoals ondersteuning van de kern en stabilisatie van DNA (1.1.1.4). Een belangrijke groep lamines (de A-type lamines) wordt gecodeerd door het LMNA gen. Mutaties in dit gen resulteren in uiteenlopende ziektefenomenen gaande van problemen met het vetmetabolisme tot spierverzwakking en systemische verouderingsziekten. Hiernaast bestaat er ook een link tussen de nucleaire lamina en normale veroudering.

Daar de ziekten zeer zeldzaam zijn, is het verwerven van voldoende representatief patiëntenmateriaal een hele opgave. Daarom is er, voor het ontcijferen van de mechanismen achter deze ziekten, een grote nood aan een goed modelsysteem waarin bepaalde laminopathieën worden nagebootst op celniveau. Zulke modelcellen kunnen gecreëerd worden door gezonde cellen te behandelen met chemische producten of door transiënte *knock-down* of overexpressie van betrokken genen. Het ideale cellulaire model beschikt echter stabiel over de exacte ziekteveroorzakende mutatie. De aanzet voor het ontwikkelen van deze modelcellen wordt gegeven in deze masterproef.

In het literatuuroverzicht dat nu volgt, wordt dieper ingegaan op de lamines (1.1.1) om vervolgens over te gaan naar de laminopathieën (1.1.2). Verschillende wetenschappelijke modellen worden verder kort uiteengezet met hun voor- en nadelen (1.2) om daarna over te gaan op de technieken die kunnen worden gebruikt voor het maken van een modelcellijn (1.3).

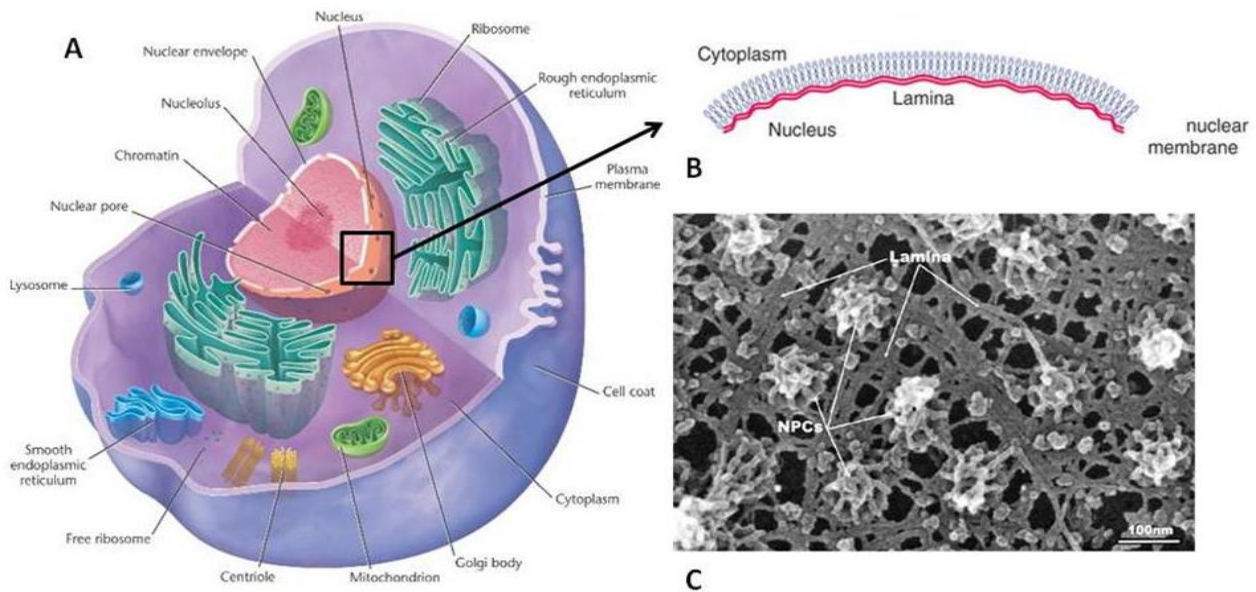
1.1 Lamines en laminopathieën

1.1.1 Lamines

1.1.1.1 Locatie en structuur

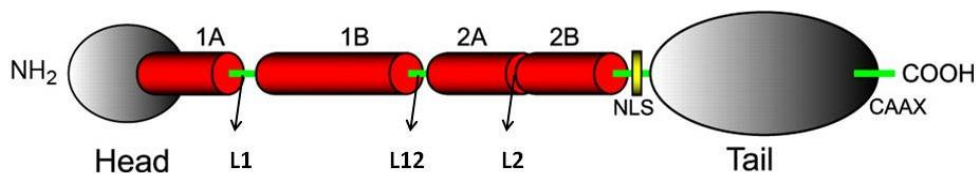
De kern van de cel wordt omgeven door een dubbele kernmembraan (nucleaire envelop = NE) die zorgt voor de afscheiding van de kern ten opzichte van het cytoplasma. Enkel de nucleaire poriën (*nuclear pore complex* = NPC) laten bidirectioneel transport toe¹. Aan de binnenkant van de binnenste kernmembraan (*inner nuclear membrane* = INM) ligt de nucleaire lamina (Figuur 1), een netwerk dat bestaat uit een aaneenschakeling van verschillende lamines die sterk verbonden zijn met een aantal eiwitten in de INM [1] en een dikte heeft van 30 tot 100 nm [2]. De nucleaire lamina zorgt hier voor ondersteuning van de kernmembraan, maar speelt ook een rol in onder meer DNA replicatie en transcriptie [3]. In kleinere hoeveelheden kunnen de lamines ook voorkomen als foci tijdens de G1-fase in de celkern [4] en als intranucleaire kanalen [5].

¹ Uitgezonderd enkele kleine moleculen die vrij door de kernmembraan kunnen diffunderen.



Figuur 1: De lokalisatie van de nucleaire lamina in de cel. (A) Een globaal overzicht van een dierlijke cel. (B) Een detailweergave van de nucleaire envelop [6]. (C) Een *scanning* elektronen microscopisch beeld van de nucleaire lamina met daartussen de *nuclear pore complexes* (NPC) [7].

Lamines zijn type V intermediaire filamenten² (IF) en zijn de enige IF die gelokaliseerd zijn in de celkern. Algemeen bestaan IF uit drie verschillende domeinen (Figuur 2): een hoofddomein (*head*), een staafdomein en een staartdomein (*tail*) [8]. Het staafdomein maakt eiwit-eiwit interacties mogelijk zodat een netwerk gevormd kan worden [9] en bestaat uit vier delen opgebouwd uit α -helices *coiled-coils*³, 1A, 1B, 2A en 2B. Deze vier delen worden gescheiden door drie sterk geconserveerde linker domeinen, L1, L12 en L2 [7]. Het staartdomein bevat een structuur die lijkt op de structuur van een immunoglobuline (Ig), wat een typische structuur is voor eiwitten die veel met andere stoffen interageren [10]. Tussen het staafdomein en het staartdomein zit bij lamines een nucleair lokalisatie signaal (NLS) dat niet aanwezig is bij andere soorten IF [11]. De lamines zijn mogelijk de voorlopers van alle IF daar alle cellen die andere types IF hebben ook lamines bezitten, maar andersom is dit niet het geval [12].



Figuur 2: Algemene structuur van lamines. Een N-terminaal hoofddomein gevolgd door het staafvormig domein dat vier α -helix segmenten (1A, 1B, 2A en 2B) bevat die met elkaar verbonden zijn via linkers (L1, L12 en L2) en als laatste het staartdomein met Ig structuur en CaaX-motief (1.1.1.3). Tussen het staaf- en staartdomein zit een nucleair lokalisatie signaal (NLS) [7].

1.1.1.2 Soorten lamines

Er worden twee soorten lamines onderscheiden, de B-type lamines blijven geassocieerd met delen van de kernmembraan tijdens mitose, dit in tegenstelling tot de A-type lamines welke loskomen van de kernmembraan [13]. Daarnaast vertonen beide types ook een ander expressieprofiel [14]. B-type lamines komen constitutief tot expressie en zijn noodzakelijk voor celoverleving en -ontwikkeling. A-type lamines komen differentieel tot expressie [15] en spelen een rol bij de differentiatie van cellen

² Intermediaire filamenten zijn componenten van het cytoskelet naast actine filamenten en microtubuli.

³ Twee α -helices die rond elkaar gedraaid zijn.

[16]. Uit het verschillende expressiepatroon van lamine B en A kan men besluiten dat B-type lamines de basisbouwstenen zijn van de nucleaire lamina en de A-type lamines een meer gespecialiseerde functie uitoefenen [7].

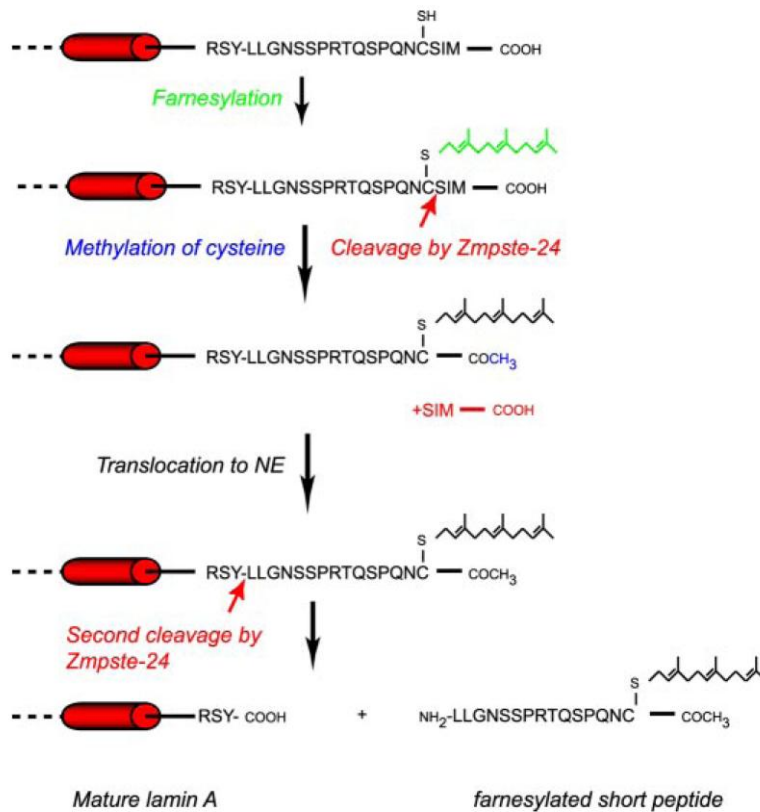
In totaal zijn er drie lamine genen aanwezig in het humane genoom die aanleiding geven tot zeven verschillende eiwitten. Het LMNA gen is gelegen op chromosoom één en codeert voor de A-type lamines. Door alternatieve *splicing* kunnen hieruit vier verschillende eiwitten worden gevormd. Lamine A en C komen algemeen voor in normale cellen waarbij lamine C 98 aminozuren (AZ) minder heeft dan prelamine A⁴ aan de C-terminus [17]. Twee minder voorkomende A-type lamines zijn lamine AΔ10 en lamine C2. De groep van de B-type lamines bevat drie verschillende eiwitten, komende van twee verschillende genen. Lamine B1 is het enige genproduct van het LMNB1 gen op chromosoom vijf [18]. Het LMNB2 gen op chromosoom 19 geeft aanleiding tot twee eiwitten, lamine B2 en B3, ook via alternatieve *splicing*. Lamine B2 komt in de meeste cellen tot expressie in tegenstelling tot lamine B3, dat enkel in spermatocyten voorkomt [7].

1.1.1.3 Maturatie en polymerisatie

Maturatie van lamines gebeurt door middel van posttranslationele modificaties (Figuur 3), welke afhankelijk zijn van het soort lamine. Voor lamine A en B zijn deze modificaties gebaseerd op de aanwezigheid van een CaaX-motief⁵ aan de C-terminus van het eiwit. Dit motief is afwezig in lamine C dat door alternatieve *splicing* een andere C-terminus heeft [19]. De posttranslationele modificaties van lamine A worden weergegeven in Figuur 3, deze van lamine B gebeurt op gelijkaardige wijze. In een eerste stap vindt een isoprenylatie plaats, van het cysteïne in het eindstandig CaaX-motief, door de toevoeging van een farnesyl isoprenoïd. De isoprenylatie is waarschijnlijk belangrijk voor de translocatie van de lamines naar de binnenste kernmembraan [20]. Na de isoprenylatie wordt het aaX deel van het motief proteolytisch verwijderd met behulp van het zinkmetalloproteïnase ZMPSTE24 of RCE1 (*Ras converting enzyme-1*) [21]. Na een carboxymethylatie van het gefarnesylerde cysteïne is de maturatie van de B-type lamines afgerond. De maturatie van lamine A gaat echter nog verder en wordt gevolgd door het verwijderen van de 18 terminale aminozuren door ZMPSTE24. Hierbij wordt dus ook de isoprenylgroep op het cysteïne mee verwijderd en zo wordt het prelamine A omgezet in het eigenlijke, mature lamine A [7]. Naast deze maturatie zijn er ook nog fosforylaties mogelijk op de lamines. In lamine A zijn een dertigtal fosforylatieposities gekend [12]. Deze fosforylaties spelen onder meer een rol bij het loskoppelen van de lamines ten opzichte van elkaar tijdens de mitose [22].

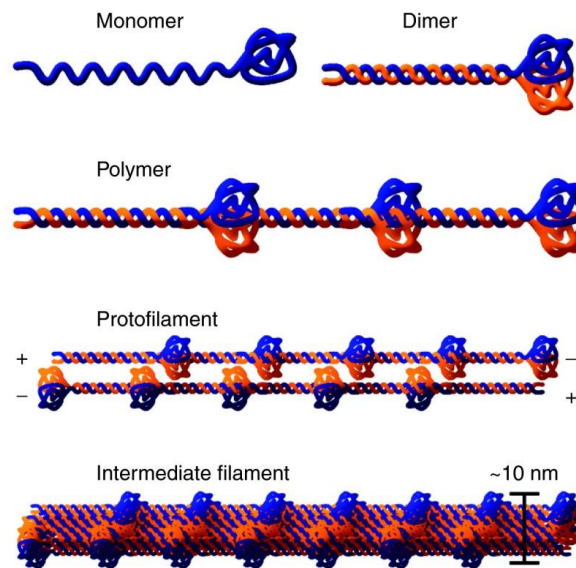
⁴ Prelamine A is een vorm van lamine A voor de posttranslationele modificaties (zie 1.1.1.3).

⁵ Een aminozuur sequentie: een cysteïne gevolgd door twee alifatische aminozuren en afgesloten met een willekeurig aminozuur.



Figuur 3: Posttranslationele modificatie van lamine A. Farnesylatie van het cysteine uit het CaaX-motief wordt gevolgd door methylering van dit cysteine. Vervolgens wordt het aaX-motief proteolytisch verwijderd door ZMPSTE24. Lamine A ondergaat nog een verdere verkorting door het weghalen van 18 terminale AZ door ZMPSTE24. De weergegeven letters staan voor de overeenkomstige AZ [7].

De assemblage van lamines tot een dichts netwerk begint met het vormen van dimeren (Figuur 4) waarbij twee lamines zich met hun staafdomen rond elkaar wikkelen. Er ontstaan vooral dimeren van hetzelfde type lamine (homodimeren). Deze dimeren kunnen vervolgens in een hoofd aan staart structuur samenklitten tot een polymeer. Wanneer verschillende van deze polymeren associëren in een antiparallelle oriëntatie ontstaat een protofilament. Drie tot vier van deze protofilamenten samen resulteren in een IF met een diameter van ongeveer 10 nm [12]. Het aanmaken van IF van 10 nm is in vitro enkel gelukt in *Caenorhabditis elegans* [23]. De structuur die gevormd wordt door de lamines kan verschillen tussen celtypen en per type lamine [24]. Bij humane cellen worden vooral onregelmatige filamenteuze netwerken aangetroffen. Lamine A en lamine B blijken sterk verankerd te zijn in de kernmembraan in tegenstelling tot lamine C dat mobieler is [7].



Figuur 4: Lamine polymerisatie. Twee monomeren wikkelen rond elkaar om een dimeer te vormen. Een polymeer komt tot stand door hoofd aan staart polymerisatie van dimeren. Protofilamenten bestaan uit antiparallel geassocieerde polymeren. Verschillende protofilamenten samen kunnen een IF vormen [12].

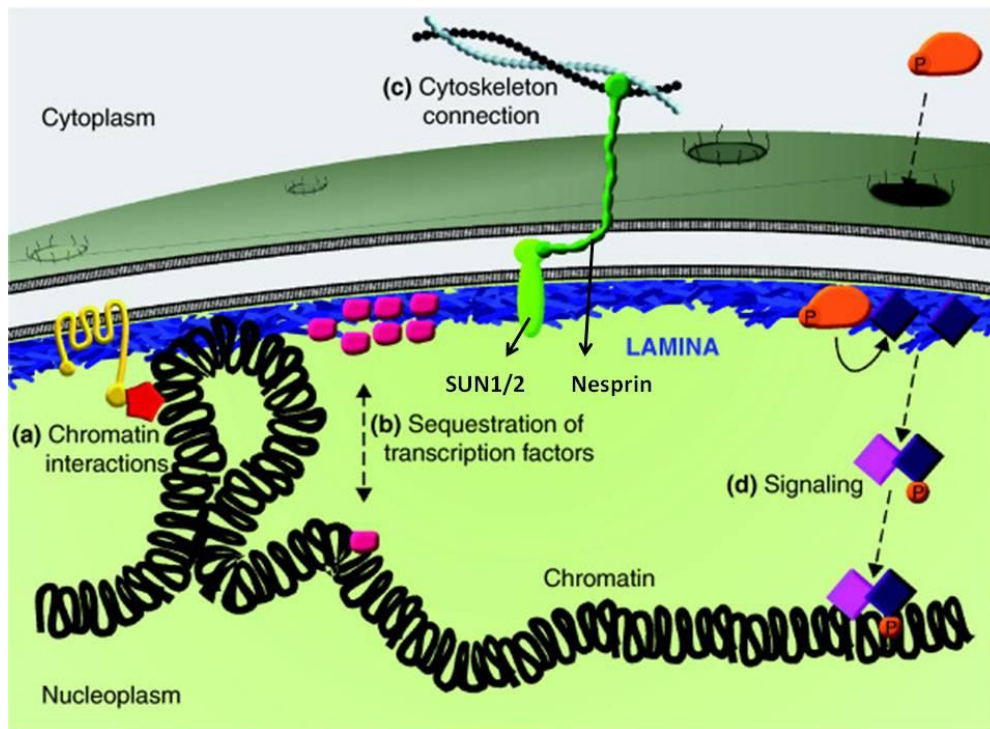
1.1.1.4 Functies

De meest voor de hand liggende functie van de lamines is het zorgen voor stevigheid van de celkern. Door de aanwezigheid van de nucleaire lamina wordt de vorm van de celkern behouden [7]. Mutaties in het LMNA gen kunnen dan ook resulteren in misvormde kernen [25]. Naast versteviging hebben de lamines ook een invloed op de lokalisatie en verankering van de NPC (Figuur 1c) [26].

De positie en migratie van de celkern wordt bewerkstelligd met behulp van lamines. Via interacties met linkereiwitten staan de lamines, en zo ook de celkern, in contact met het cytoskelet in het cytoplasma. De connectie wordt gemaakt met behulp van het LINC eiwitcomplex (*linker of nucleoskeleton and cytoskelton*, Figuur 5c). Twee eiwitten, SUN1 en SUN2 binden aan lamines en overspannen de binnenste kernmembraan. In het lumen van de kernmembraan maken ze contact met nesprines, eiwitten die de buitenste kernmembraan overspannen en in het cytoplasma met actine microfilamenten, microtubuli en vimentine IF binden. Deze verschillende eiwitten samen vormen het LINC complex [27] [7].

Behalve met de eiwitten van het LINC complex, gaan lamines interacties aan met verschillende andere eiwitten. Zoals de *lamina-associated polypeptides* (LAP), emerine en de lamine B receptor [7]. Voor lamine A zijn er tot 30 directe en 100 indirecte interactiepartners geïdentificeerd [12]. Dit toont de centrale rol aan van lamines in veel verschillende processen in de cel [7].

Ook met DNA kunnen lamines interageren (Figuur 5a). Delen van het genoom die niet tot expressie komen (heterochromatine) zijn typisch gelokaliseerd ter hoogte van de nucleaire lamina. Bij afwezigheid van A-type lamines is er een reorganisatie en condensatie van chromatine [28]. Lamines hebben één chromatine bindend domein in hun staartdomein [29] en een tweede in het staafvormig domein [12]. Bepaalde sequenties in het genoom zijn gekend voor hun binding aan delen van de NE. Deze *matrix attachment regions* (MARs) blijken ook te binden aan lamines [30]. MARs zijn betrokken bij transcriptie regulatie, DNA replicatie, chromosoomcondensatie en de organisatie van chromatine [12].



Figuur 5: Functies van lamines. (A) Interacties met chromatine. (B) Binding met transcriptiefactoren. (C) Verankering met cytoskelet in cytoplasma via LINC complex. (D) Signaaltransductie [12].

B-type lamines zijn vermoedelijk belangrijk bij DNA replicatie, vermits het ontbreken van B-type lamines replicatie blokkeert. Wanneer de lamines pas verwijderd worden nadat replicatie reeds is gestart, gaat deze wel door. Hetgeen aangeeft dat B-type lamines nodig zijn voor de initiatie van DNA replicatie [31]. Een andere studie toont daarnaast aan dat de B-type lamines mogelijk belangrijk zijn bij DNA elongatie [32].

Naast verankering van DNA en invloeden op replicatie hebben beide laminetypes een functie in transcriptie. B-type lamines zijn in het transcriptieproces zelf betrokken aangezien ze kunnen binden aan RNA polymerase II dat bij afwezigheid van lamines geïnhibeerd wordt [7] [33]. De invloed van A-type lamines op transcriptie komt door binding aan transcriptie regulatoren (Figuur 5b). Een voorbeeld hiervan is het retinoblastoma (Rb) eiwit. Om een goede werking te hebben, moet Rb bevestigd zijn aan nucleaire filament structuren die A-type lamines bevatten [34] [7]. Afwezigheid van lamine A leidt tot de afbraak van Rb in het proteasoom [35]. Er zijn nog verschillende signaaltransductiewegen (Figuur 5d) gekend waarin lamines een rol spelen onder meer de productie van *tumor growth factor* β en de *mitogen activating protein* kinase signaaltransductie [12].

Tijdens mitose verdwijnt tijdelijk de kernmembraan en dus ook de lamina om achteraf terug samengesteld te worden [36]. Tijdens de celdeling worden de lamines gefosforyleerd door kinasen, waardoor ze depolymeriseren. Als eerste komen de A-type lamines vrij in het nucleoplasma, gevolgd door de B-type lamines [37]. Initieel blijven de B-type lamines geassocieerd met nucleaire membraan fragmenten om daarna in het endoplasmatisch reticulum terecht te komen [13]. Na het herverdelen van het genetisch materiaal worden de kinasen geïnactiveerd en treden fosfatasen in actie. Deze defosforyleren de lamines waardoor sommige reeds gaan binden met chromatine. Het grootste deel van de lamines zal echter pas assembleren tot de nucleaire lamina nadat de NE terug transport toelaat [3].

In contrast met celdeling staat gecontroleerde celdood (apoptose) waarbij de lamines eveneens een rol spelen. Bij aanzet van apoptose worden lamines afgebroken door caspases [38] [39]. Nog voor

chromatine condensatie en DNA afbraak worden lamines geknipt op geconserveerde plaatsen. Geknipt lamine A komt terecht in het cytoplasma en nucleoplasma. De B-type lamines blijven vooral gelokaliseerd aan de nucleaire periferie [40]. Dit verschil is te verklaren door de afwezigheid van de isoprenylstaart in lamine A in tegenstelling tot lamine B. Beide lamines interageren met andere eiwitten in de nucleaire enveloppe waardoor hun verschillende reactie bij apoptose ook verklaard kan worden [7]. Indien de caspase knipplaatsen niet aanwezig zijn in de lamines, wordt de nucleaire degradatie tijdens apoptose sterk vertraagd [41].

1.1.2 Laminopathieën

1.1.2.1 Oorzaak

Vermits lamines een verscheidenheid aan functies vervullen, kunnen problemen met lamines leiden tot sterke verstoringen in de cel en ziekteontwikkeling (1.1.1.4). Er zijn tussen de vijftien en zeventien ziekten beschreven die verband houden met mutaties in het LMNA gen [12]. Dit aantal is variabel omdat het soms moeilijk te bepalen valt of een bepaalde ziekte nieuw is of een variant van een ander syndroom [19]. Mutaties in andere genen dan LMNA kunnen ook aanleiding geven tot zeer gelijkaardige symptomen omdat de genproducten interageren met de lamines. Hier spreekt men van secundaire laminopathieën omdat het probleem niet rechtstreeks door lamines wordt veroorzaakt [2].

Laminopathieën zijn ziekten met sterk uiteenlopende symptomen zoals spierverswakking, verstoring van het vetmetabolisme en vroegtijdige veroudering. Mutaties kunnen enerzijds zorgen voor een verlies van de normale functie van de lamines (*loss of function*) anderzijds kunnen gemuteerde lamines nieuwe functies krijgen die kunnen bijdragen aan de ziektefenomenen (*gain of function*) [42]. Verschillende theorieën kunnen een deel van de ziektefenomenen verklaren hoewel ze waarschijnlijk worden veroorzaakt door een combinatie ervan.

Door functieverlies van de A-type lamines wordt de structuur en stevigheid van de celkern beïnvloed. De **structurele hypothese** gaat ervan uit dat verzwakkingen en vervormingen van de kernmembranen, de cellen minder resistent maken tegen mechanische stress [43] [44] [45]. Hiermee kunnen vooral de symptomen van spierverswakking verklaard worden aangezien de spiercellen aan veel krachten worden blootgesteld. De meeste spiercellen hebben echter meerdere celkernen waardoor de symptomen traag vorderen. De hartspiercellen hebben slechts één celkern wat kan verklaren waarom veel laminopathiepatiënten sterven aan hartfalen [7]. Aangezien in spiercellen lamine B1 niet tot expressie komt, zijn de cellen gevoeliger aan mutaties in LMNA dan andere cellen in het lichaam. In spiercellen kan enkel nog lamine B2 het functieverlies van de A-type lamines opvangen [2].

Celdifferentiatie van skeletspiercellen is afhankelijk van herstructureringen van nucleoplasmatische lamine spikkels. Tijdens de celproliferatie worden de lamine A epitopen gemaskeerd door binding met Rb en zullen de spikkels zich hervormen tot een diffuus netwerk [46]. De **celproliferatie hypothese** gaat ervan uit dat binding van Rb aan de lamine spikkels noodzakelijk is voor differentiatie. Bij mutaties kan deze binding en reorganisatie geïnhibeerd worden. Spierproblemen kunnen dus door de twee eerste hypothesen verklaard worden. Enerzijds ontstaat celdood door de zwakkere kernen (structurele hypothese) en anderzijds kunnen deze cellen niet goed worden vervangen door problemen met de celproliferatie [7].

Volgens de **genexpressie hypothese** wordt de pathologie bepaald door de (in)directe interacties tussen lamines en transcriptiefactoren. Zo kunnen gemuteerde lamines interageren met transcriptiefactoren waarmee voorheen geen interacties plaatsvonden of net omgekeerd. Deze nieuwe functies kunnen leiden tot het verstoren van allerhande processen in de cel zoals het vetmetabolisme. Transcriptiefactoren, die genen van het vetmetabolisme beïnvloeden, kunnen namelijk binden met

prelamine A. In laminopathieën kan prelamine A accumuleren ter hoogte van de kernmembraan. De transcriptiefactoren worden zo vastgelegd aan de NE waardoor hun aanwezigheid in de celkern daalt en ze geen genen meer kunnen reguleren [16]. Naast transcriptiefactoren hebben de lamines ook invloed op de vorming van heterochromatine met behulp van eiwitinteracties. Verstoring van de lamines kan ook op deze manier leiden tot veranderde genexpressie [2]. Een combinatie van de structurele hypothese en deze genexpressie hypothese wordt gezien bij openbarstingen in de kernmembraan ten gevolge van een zwakker nucleaire lamina. Deze openbarstingen leiden tot het tijdelijk verlies van cellulaire compartimentalisatie waardoor er een uitwisseling bestaat van cytosolische en nucleaire regulatorische factoren en de genexpressie beïnvloed kan worden [44].

Eén van de grootste problemen bij veel laminopathieën is de opstapeling van onafgewerkte vormen van lamine A. Deze kunnen ontstaan door problemen in het LMNA gen zelf of door mutaties in het gen van ZMPSTE24 dat verantwoordelijk is voor de maturatie van de lamines. Accumulatie van deze onafgewerkte lamines is toxisch voor veel cellen. Men spreekt dan ook van de **toxiciteit hypothese**. Prelamine A dat een farnesylstaart bevat accumuleert in de nucleaire lamina waar het interfereert met de normale polymeervorming [40]. Dit kan leiden tot misvormingen van de celkern [47]. Toevoeging van farnesyltransferase inhibitoren kan de vervormde kernen deels tegengaan. Hierbij vindt niet langer accumulatie van de toxische vormen aan de kernmembraan plaats [48].

Ondanks het vele onderzoek naar laminopathieën, blijft er nog onduidelijkheid bestaan over de correlatie tussen de lamines en de verschillende ziektebeelden. De laminopathieën kunnen worden verdeeld in vier grote groepen. Enkele voorbeelden worden hieronder verder uitgewerkt.

1.1.2.2 Laminopathieën van de dwarsgestreepte spieren

Een laminopathie van de dwarsgestreepte spieren⁶ is *Emery-Dreifuss muscular dystrophy*. Bij deze ziekte verkorten verschillende spieren zoals deze van de nek en deze verbonden met de ellebogen en de achillespees. Eerst ontwikkelt zich een spierverswakking die na een aantal jaren gevolgd wordt door levensbedreigende hartproblemen. Er zijn twee genen die een rol spelen in het manifesteren van de ziekte. Mutaties in LMNA zorgen voor de autosomale vorm van de ziekte [49] waarvan zowel een dominante als een minder voorkomende recessieve vorm bestaan [7]. De X-chromosoom gekoppelde variant wordt veroorzaakt door mutaties in het EMD gen dat codeert voor emerine, een INM eiwit dat interacties aangaat met lamines [50]. Deze interactie verklaart waarom beide mutaties tot hetzelfde ziektebeeld kunnen leiden [51].

1.1.2.3 Perifere neuropathieën

Charcot-Marie-Tooth type 2 is een laminopathie waarbij er problemen zijn met het perifere zenuwstelsel. Er vindt een degeneratie van de zenuwcellen plaats, wat leidt tot verslapping en vermindering van de spieren in de onderste ledematen, voeten en handen [52]. De mutatie die verantwoordelijk is voor de autosomaal recessieve variant, ligt in het LMNA gen c.829C>T [53]. Er is grote variabiliteit in de leeftijd waarop de ziekte tot uiting komt en ook hoe ernstig de ziekte zich manifesteert [7]. Naast de eerder vermelde recessieve vorm is er ook een dominant genotype gekend [54].

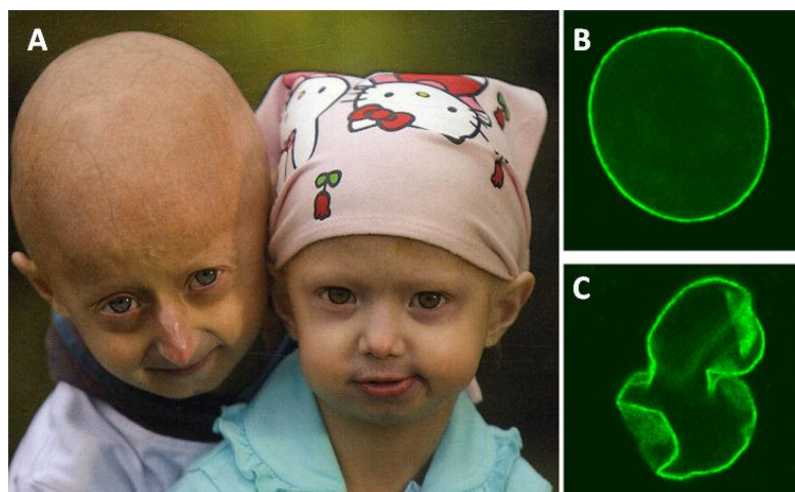
⁶ De dwarsgestreepte spieren zijn spieren die verbonden zijn met het skelet en die bewuste beweging mogelijk maken. Ook de hartspier wordt hier soms bij ingedeeld.

1.1.2.4 Lipodystrofieën

Bij een lipodystrofie is er een probleem met de verdeling van het onderhuids vetweefsel. *Familial partial lipodystrophy Dunningan type 2* patiënten ontwikkelen rond de puberteit een vermindering van vet in de regio van de romp en de ledematen. Anderzijds wordt een opstapeling van vet geobserveerd ter hoogte van het gezicht, de kin, de nek en in de onderbuik [55]. Hiernaast zijn er ook nog metabolische problemen zoals diabetes die bij vrouwelijke patiënten meer tot uiting komen [56]. De verantwoordelijke mutaties liggen geclusterd in exon 8 en 11 van LMNA die coderen voor het globulaire staartdomein van de A-type lamines [2].

1.1.2.5 Verouderingslaminopathieën

Eén van de meest gekende en aangrijpende laminopathieën is het Hutchinson-Gilford progeria syndroom (HGPS of gewoon progeria). Bij deze zeldzame⁷ kinderziekte zorgt een nucleotide substitutie (c.1824C>T [2]) in LMNA ervoor dat vroegtijdige verouderingssymptomen voorkomen. Jonge kinderen zien er lichamelijk uit als oude mensen hoewel ze psychologisch ontwikkelen zoals elk ander kind [57]. Ze sterven gemiddeld rond de leeftijd van 13.5 jaar ten gevolge van hartproblemen [43]. Andere symptomen zijn onder meer haarverlies, verlies van subcutaan vet, groeiachterstand en skelet abnormaliteiten (Figuur 6) [58].

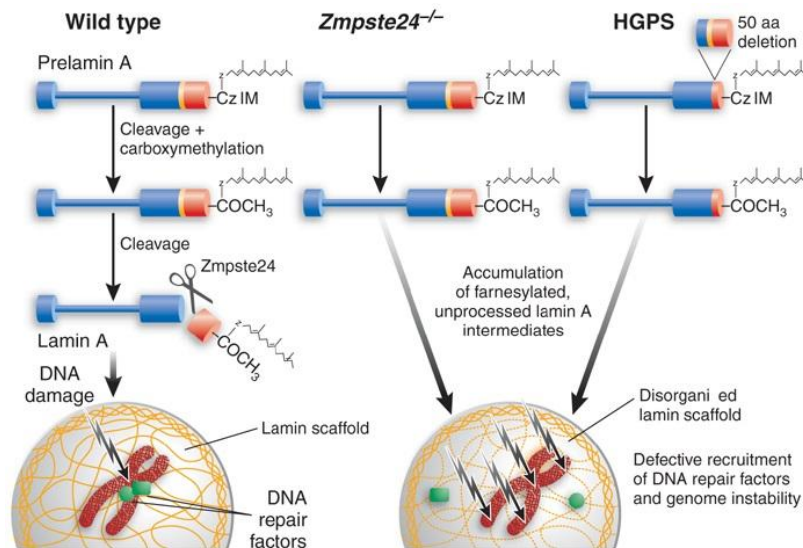


Figuur 6: (A) Twee HGPS patiënten uit België [57]. (B) Een normale humane celkern (C) Een celkern van een HGPS patient [43].

De causale mutatie zorgt niet voor een verandering van aminozuursequentie (G608G) maar veroorzaakt wel het ontstaan van een cryptische *splice site* in het mRNA. Dit resulteert in het verwijderen van een deel van het mRNA waardoor er 50 aminozuren in het C-terminale deel van lamine A tekort zijn (Figuur 7). Het eiwit dat nu ontstaat, wordt progerine genoemd. Door de deletie kan het eiwit niet meer geknipt worden door ZMPSTE24 en zal het gefarnesyleerd blijven waardoor een toxische *gain of function* ontstaat [59]. Er ontstaat een accumulatie van progerine ter hoogte van de kernmembraan wat aanleiding geeft tot misvormde kernen (Figuur 6c) en lokale vervormingen van de kernmembraan [7]. Er ontstaan eveneens veranderingen in histonmodificaties en de hoeveelheid perifeer heterochromatine [60]. Bij cellen van HGPS patiënten worden 352 genen anders tot expressie gebracht dan in normale cellen [61]. Al deze onregelmatigheden leiden tot verminderde weerbaarheid van de cellen tegen bijvoorbeeld DNA schade en tot hogere concentraties van reactieve zuurstof moleculen in de cel [62] [63].

⁷ 1 op 8 miljoen geboortes [7]

Een andere verouderingslaminopathie is restrictieve dermatopathie. Wanneer er mutaties optreden in het ZMPSTE24 gen, belangrijk bij de maturatie van lamines, krijgt men een opstapeling van onafgewerkte lamines (Figuur 7) [64]. Verschillende mutaties die resulteren in functieverlies van ZMPSTE24 leiden tot restrictieve dermatopathie [65]. Bij deze ziekte overlijden pasgeboren kinderen na enkele uren tot dagen. Typische kenmerken zijn een stijve huid en duidelijke gelaatskenmerken zoals laag gepositioneerde oren en een puntige neus. Door de beperkte bewegingsvrijheid als gevolg van de stijve huid is ook de beweging van de gewrichten beperkt en zijn er problemen met de ademhaling wat leidt tot de dood [66] [67]. Dit ziektebeeld kan ook worden veroorzaakt door mutaties in het LMNA gen.



Figuur 7: De maturatie van lamine A in wild type, ZMPSTE24^{-/-} cellen zoals bij restrictieve dermatopathie en HGPS cellen. Bij het wild type cellen verloopt de laminematuratie normaal. Bij de ZMPSTE24^{-/-} cellen ontbreekt ZMPSTE24 waardoor het terminale laminedeel niet wordt afgeknipt. Een deletie van 50 AZ leidt bij de HGPS cellen tot het verwijderen van de knipplaats van ZMPSTE24 hetgeen resulteert in ophoping van onafgewerkt lamine A (progerine) aan de kernmembran [144].

1.1.2.6 Lamines en veroudering

Verouderingsziekten bieden de mogelijkheid om inzicht te verwerven in het normale verouderingsproces. Zo heeft men gezien dat in gezonde, oude cellen ook een accumulatie van lamine A aan de NE plaatsvindt. Hierdoor worden gelijkaardige, hoewel zwakkere symptomen waargenomen als in HGPS cellen [68]. Progerine komt sporadisch tot expressie in zowel jonge als oude cellen door het gebruik van de cryptische *splice site*. Mogelijk zijn oude cellen minder bestand tegen de negatieve effecten van progerine waardoor de vervormingen meer tot uiting komen. Verschillende nucleaire defecten verdwijnen wanneer splicing op de cryptische *splice site* wordt geïnhibeed [69]. De abundantie van progerine speelt hoogstwaarschijnlijk een rol bij gezonde cellen tijdens het verouderingsproces [62].

1.1.2.7 Lamines en kanker

In kankercellen worden vaak veranderingen in de nucleaire morfologie waargenomen. De vorm van celkernen wordt in veel diagnostische testen voor kanker gebruikt (bijvoorbeeld in de *pap smear* test voor baarmoederhalskanker [70]). Verschillende kankertypes vertonen een heterogene expressie van A-type lamines. Ook werd aangetoond dat in tumorweefsel, progerine 20 keer meer tot expressie komt in vergelijking met normaal weefsel [71]. Lamines kunnen mogelijk gebruikt worden als biomarker voor bepaalde soorten kanker [72]. Aangezien de kans op kanker toeneemt met toenemende leeftijd zou progerine hier een rol in kunnen spelen.

1.2 Wetenschappelijke modellen

Wanneer men onderzoek doet naar bepaalde menselijke ziekten, maakt men vaak gebruik van modellen. Deze modellen kunnen gaan van cellijnen tot proefdieren. Hieronder worden verschillende mogelijke modellen voor het bestuderen van ziekten (waaronder laminopathieën) kort besproken.

1.2.1 Modelorganismen

Wetenschappelijk onderzoek maakt vaak gebruik van zeer goed gekarakteriseerde modelorganismen om testen uit te voeren. De bevindingen die hierbij worden gedaan kunnen duidelijkheid verschaffen over dezelfde mechanismen in andere organismen zoals de mens. Twee modelorganismen die vaak worden gebruikt zijn de rondworm *Caenorhabditis elegans* en de muis (*mus musculus*). Voordelen van *C. elegans* zijn de korte levenscyclus, kleine omvang en eenvoudige cultuurcondities [73]. De eenvoud van dit organisme is eveneens zijn grootste nadeel: veel processen die aanwezig zijn in *C. elegans* en daardoor ook niet te onderzoeken zijn in dit modelorganisme. Op het gebied van lamines wordt in *C. elegans* maar één soort lamine geobserveerd, het Ce-lamine [74]. Dit organisme kan afhankelijk van de onderzoeksvraag evenwel nuttige informatie bieden voor onderzoek.

Muismodellen zitten op vlak van complexiteit al dichterbij de mens hoewel grote verschillen blijven bestaan [75]. De complexiteit van het organisme resulteert in meer intensief werk en een hoge kost om het in leven te houden en te verzorgen. Anderzijds wordt meestal maar een beperkt aantal dieren onderzocht wat statistische relevantie vermindert. Daarnaast komen ook ethische problemen aan de orde. Deze verschillende redenen zorgen ervoor dat het gebruik van dergelijke modelorganismen niet altijd wenselijk is.

1.2.2 Modelcellen

Om de complexiteit van muismodellen te omzeilen en de fysiologische relevantie te behouden wordt voor fundamenteel onderzoek vaak beroep gedaan op menselijke cellen. Dit wordt gedaan met behulp van cellen die worden geïsoleerd uit humaan weefsel en vervolgens in cultuur worden gebracht. Wanneer een celcultuur kan blijven delen zonder af te sterven spreekt men van een immortale cellijn. Een nadeel aan celculturen ten opzichte van proefdieren is dat de cellen zich niet in een echt weefsel bevinden. De interacties met de rest van het organisme en de 3D structuur kunnen hierbij niet worden onderzocht. Het onderhoud van de cellen moet gebeuren onder strikte, aseptische condities om contaminatie te voorkomen. Deze speciale condities kunnen zorgen dat de kostprijs voor het onderhouden van cellen hoog wordt [76]. Bovendien zijn cellen in cultuur soms genetisch onstabiel, voornamelijk immortale cellijnen [77].

1.2.2.1 Patiëntencellen

Het voordeel van het gebruik van patiëntencellen is dat een goede reflectie wordt gegeven van de ziektestatus van de patiënt. Nadelig, vooral bij laminopathieën, is het beperkt aantal patiënten, waardoor de beschikbaarheid van cellen laag is. Een bijkomend nadeel is dat de inherente genetische variabiliteit tussen verschillende patiënten een grotere rol speelt door dit laag aantal stalen [78]. Hoewel deze variabiliteit zich ook manifesteert bij gezonde personen, kan deze hier worden uitgemiddeld door een groot aantal stalen te onderzoeken. Bij studies naar bijvoorbeeld differentiële genexpressie is het ideaal dat men het expressiepatroon kan vergelijken met gezonde cellen die eenzelfde genetische achtergrond hebben. Dit is onmogelijk te bekomen met stalen van verschillende proefpersonen. Bovendien kennen de patiëntencellen, net omwille van hun herkomst ook een lagere fitheid, waardoor ze sneller senescent worden.

1.2.2.2 Experimentele behandelingen

Minder genetische variabiliteit kan bekomen worden door het gebruik van gezonde celculturen, bestaande uit cellen met dezelfde genetische achtergrond. Deze cellen kunnen worden behandeld zodat ze gelijkaardige fenotypes vertonen als de patiëntencellen. Hierbij kan steeds vergeleken worden met controlecellen die geen behandeling hebben ondergaan.

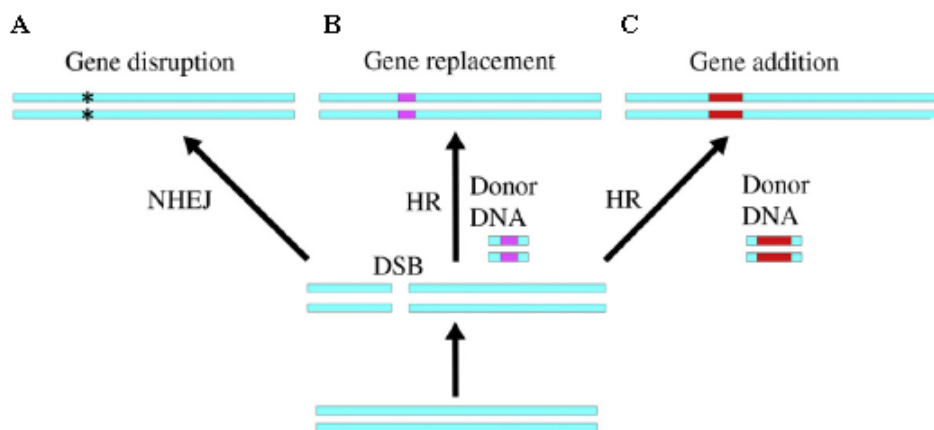
Er bestaan zowel chemische als genetische behandelingen om moleculaire wijzigingen van patiëntencellen na te bootsen in normale (gezonde) cellen. Een voorbeeld van een chemische behandeling is het gebruik van saquinavir, een stof die wordt gebruikt als HIV-protease inhibitor maar als bijwerking ook ZMPSTE24 (1.1.1.3) inhibeert. Toepassing van deze stof op gezonde cellen kan als een celmodel voor restrictieve dermopathie aanzien worden [79]. Een nadeel van een chemische behandeling echter is het risico op dosis-afhankelijke, ongewenste bijwerkingen zoals bijvoorbeeld fragmentatie van de mitochondria bij saquinavir behandeling [80]. Genetische behandelingen omvatten overexpressie van mutante gensequenties via plasmiden of *knock-down* van de genexpressie van betrokken genen met RNA *interference*. Dit mechanisme resulteert in afbraak van mRNA van de genen die worden gekozen en is een snelle, relatief goedkope methode. De *knock-down* die wordt bekomen is echter niet volledig, kan verschillen tussen experimenten en laboratoria en is transiënt [81].

De bovenvermelde problemen kunnen vermeden worden door de aanmaak van een stabiele modelcellijn die de specifieke mutatie van een bepaalde ziekte bevat. Deze cellen verschillen enkel in de specifieke mutatie ten opzichte van de cellijn waaruit vertrokken werd. Hierdoor zullen verschillen in genexpressie tussen beide cellijnen enkel te wijten zijn aan de mutatie en niet aan andere genetische verschillen zoals bij patiëntencellen. Dit resulteert in een lagere ruis en dus een hogere resolutie voor het onderscheiden van subtiele verschillen in genexpressie. De genomische wijziging zorgt ervoor dat het fenotype stabiel is en niet transiënt zoals bij *knock-down*. Problemen van neveneffecten zoals bij chemische behandelingen zullen ook niet aanwezig zijn. Kortom, stabiele cellijnen zijn het ideale model voor doeleinden als differentieële expressie analyse en kunnen worden gecreëerd met behulp van *genome editing* technieken.

1.3 Genetic engineering

Onder *genetic engineering* verstaat men het aanpassen van DNA van een organisme zodat het bruikbaar wordt voor een welbepaalde toepassing. Dit werd eerst gedemonstreerd door Stanley Cohen en Herbert Boyer die er, in 1973, in slaagden om recombinant DNA van *Xenopus laevis* (klawwikker) in *Escherichia coli* (*E. coli*) binnen te brengen en te laten repliceren [82]. Dit leidde tot een internationale discussie over de mogelijke gevaren van deze techniek [83], een discussie die nog steeds brandend actueel is. In 1974 werd de eerste transgene muis geproduceerd door Rudolf Jaenisch [84]. De opkomst van DNA sequenceringsmethoden in 1977 zorgde voor een boost van deze technologieën [85]. Verschillende ontwikkelingen bleven elkaar opvolgen en in 1979 werd het menselijke hormoon insuline geproduceerd met behulp van *E. coli* [86]. Met de komst van technieken die homologe recombinatie gebruiken, werd specifieke *gene targeting* mogelijk.

Recent werden veel nieuwe technieken ontwikkeld om specifieke locaties in het genoom te wijzigen, algemeen beschreven als *genome editing* [81]. Verschillende van deze nieuwe technieken zijn gebaseerd op eenzelfde basisprincipe. Eén component van het systeem zorgt voor specifieke herkenning van een sequentie waarna een ander deel, een nuclease, de beide strengen van het DNA kan doorknippen om zo een dubbelstrengige breuk (*double strand break, DSB*) te genereren. Deze breuken in het DNA worden vervolgens hersteld door het DNA herstel apparaat van de cel. Dit herstel apparaat kan gebruikt worden om veranderingen aan te brengen in het genoom. De cel kent twee belangrijke herstelmechanismen, *non-homologous end joining* (NHEJ) en homologe recombinatie (HR) [87]. Het eerste proces is gebaseerd op het willekeurig verbinden van losse DNA uiteinden. Dit is het dominante herstelmechanisme maar is gevoelig voor fouten waardoor inserties en deleties (indels) van nucleotiden voorkomen in het herstelde DNA [88]. Bijgevolg kan een leesraamverschuiving (*frame shift*) plaatsvinden waardoor een gen kan worden uitgeschakeld en een *knock-out* bekomen kan worden (Figuur 8a). Bij HR wordt na DNA replicatie de overeenkomstige sequentie op het homologe chromosoom gebruikt als template voor het herstellen van de DNA beschadiging. Men kan dit proces echter in de hand werken door het toedienen van een exogene DNA template. Hierdoor kunnen ook specifieke (punt)mutaties ingebracht worden. (Figuur 8b,c) [89].



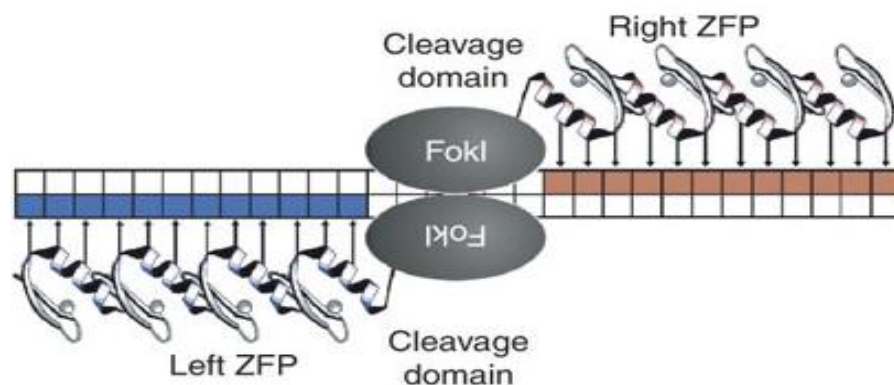
Figuur 8: Verschillende mogelijkheden van DNA herstel na DSB. (A) Herstel door NHEJ zorgt voor inserties en deleties waardoor genen onderbroken kunnen worden en een knock-out gegeneerd wordt. (B) Bij het toevoegen van donor DNA met homologe regio's kan dit via homologe recombinatie worden binnengebracht. (C) Zelfs hele genen kunnen zo worden toegevoegd [89].

Hieronder worden drie recente technieken besproken die worden gebruikt voor *genome editing* en waarvoor protocols voor de aanmaak recent zijn gepubliceerd, namelijk zink-vinger nucleasen (2006, [90][91]), *transcription activator-like effector* nucleasen (2012, [92]) en *clusters of regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9* systemen (2013, [93]).

1.3.1.1 Zink-vinger nucleasen

Zinc-finger nucleasen (ZFN) bestaan uit een aaneenschakeling van een aantal zink-vingers die gekoppeld zijn aan een deel van het FokI (*Flavobacterium okeanoikoites*) nuclease. Zink-vingers zijn eiwitten met DNA bindende eigenschappen, die worden gestabiliseerd door een centraal zink atoom. De tertiaire structuur bestaat uit twee antiparallelle β -sheets en een α -helix (Figuur 9). Eén zink-vinger kan specifiek contact maken met drie nucleotiden in het DNA met behulp van drie van zijn aminozuren (triplet) [94]. Verschillende zink-vingers die een ander triplet herkennen, kunnen aan elkaar geschakeld worden tot een *zinc-finger protein* (ZFP), om een groter domein te herkennen [95]. In een zink-vinger nuclease wordt een aaneenschakeling van zink-vingers geassocieerd met een deel van het FokI nuclease.

In zijn normale voorkomen kan FokI willekeurig binden aan DNA en de twee strengen van DNA knippen. Het DNA herkendingsdomein kan echter gescheiden worden van het knipdomein om zo een ander, specifiek herkendingsdomein te combineren met het knipdomein [96]. Dit mechanisme wordt gebruikt bij ZFN waarbij men een aaneenschakeling van zink-vingers combineert met het FokI endonuclease knipdomein. Eén FokI domein is echter niet in staat DNA te knippen, hiervoor is dimerisatie van twee van deze domeinen nodig [97] [98]. Men combineert dus twee ZFN die nabijgelegen DNA sequenties binden. Wanneer er binding optreedt met het DNA zullen de twee FokI domeinen bij elkaar worden gebracht en zal het DNA geknipt worden (Figuur 9) [99]. Een groot nadeel van de ZFN is dat ze gepatenteerd zijn en hierdoor een zeer hoge kostprijs hebben.



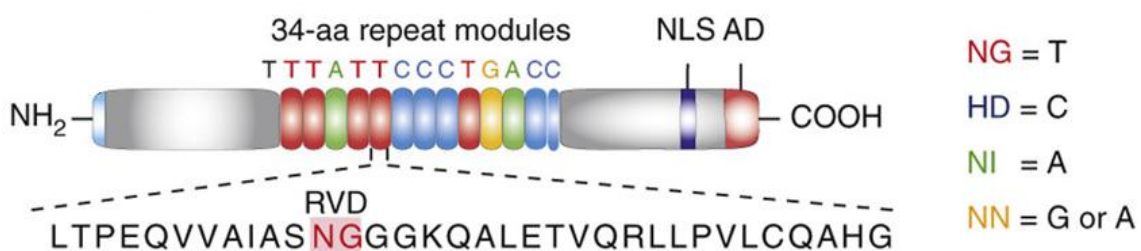
Figuur 9: Structuur van een zink-vinger nuclease. Vier zink-vingers aan elkaar vormen een *zinc-finger protein* (ZFP). Een sequentie van 12 nucleotiden wordt in dit voorbeeld herkend. Beide ZFPs zijn verbonden met een FokI nuclease-domein, deze domeinen vormen samen een FokI nuclease dimeer dat het DNA zal knippen [143].

1.3.1.2 Transcription activator-like effector nucleasen (TALEN)

Transcription activator-like effectors (TALEs) zijn eiwitten die voorkomen in de plantenpathogeen *Xanthomonas*. Deze bacteriën stellen effectormoleculen vrij in de plantencel die kunnen binden aan DNA sequenties van het gastheergenoom en zo de transcriptie kunnen beïnvloeden [100]. Deze DNA bindende eigenschap is wat deze eiwitten bruikbaar maakt voor *genome editing*. Wanneer deze

domeinen gekoppeld worden aan een nuclease spreekt men van een TALE nuclease (TALEN) en kunnen ze een gelijkaardige werking uitvoeren als de ZFN.

De TALE eiwitten uit *Xanthomonas* bestaan uit herhalingen van 34 AZ, die sterk op elkaar gelijken in aminozuursamenstelling. Per herhaling wordt één nucleotide in het DNA herkend. Verschillende van deze herhalingen worden aan elkaar geschakeld om een langere sequentie te herkennen. Het specifiek herkende nucleotide wordt bepaald door het twaalfde en dertiende AZ van de herhaling die samen de *repeat-variable di-residue* (RVD) vormen [101]. Een TALE eiwit herkent dus elk nucleotide apart en niet in een triplet zoals bij ZFN. Het eerste nucleotide dat wordt herkend is steeds een thymine. De laatste herhaling lijkt slechts in twintig aminozuren op de vorige herhalingen, hiernaar wordt verwezen als de halve herhaling [100]. Naast deze herhalingen bevat een natuurlijk voorkomend TALE ook een NLS en een activatiedomein dat transcriptie in de gastheer kan activeren (Figuur 10) [102].

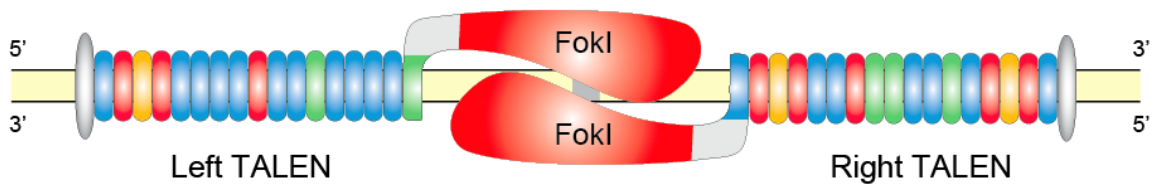


Figuur 10: Algemene structuur van een TALE in *Xanthomonas*. Verschillende herhalingen van 34 AZ zijn weergegeven in verschillende kleuren die overeenstemmen met hun doelnucleotide. Het twaalfde en dertiende AZ vormen de RVD die de specificiteit bepaald. C-terminaal zijn een NLS en transcriptie activatiedomeinen (AD) te zien. De RVDs met overeenkomstig nucleotide worden rechts weergegeven. G wordt ook specifiek herkend door NH (niet op de figuur weergegeven) [92].

De RVD code, die zorgt voor de herkenning van een specifiek nucleotide, werd ontrafeld door twee onderzoeksgroepen in hetzelfde jaar [100] [101]. Wanneer het twaalfde en dertiende AZ bestaat uit histidine gevolgd door asparaginezuur (HD⁸) wordt een cytosine gebonden. Een asparagine gevolgd door glycine (NG) resulteert in een binding met thymine. Binding met adenine wordt gerealiseerd door een RVD met asparagine gevolgd door isoleucine (NI) [103]. Voor guanine was eerst nog geen specifieke RVD gekend. Twee asparagines na elkaar (NN) herkennen zowel guanine als adenine met een grotere voorkeur voor guanine. In 2012 ontdekte men dat asparagine gevolgd door histidine (NH) meer specifiek bindt aan guanine dan (NN) [104]. Er zijn nog meerdere AZ combinaties die nucleotiden herkennen maar de bovenvermelde zijn het meest voorkomend [89]. Samengevat resulteert dit in volgende code C(HD), T(NG), A(NI) en G(HD). Dankzij deze code kan men herhalingen aan elkaar koppelen om zo een gewenste sequentie te binden.

Analoog als bij ZFN zijn er twee TALENs nodig met elk een FokI domein. De twee TALENs (*forward* en *reverse*) herkennen elk de tegenovergestelde streng (Figuur 11) er moeten dus steeds twee constructen in de cel worden gebracht die elk 20 nucleotiden kunnen herkennen. Bij binding komen de twee FokI domeinen bij elkaar en zorgen ze voor het knippen van beide DNA strengen. Dit wordt gevolgd door NHEJ of HR zoals eerder vermeld (1.3).

⁸ Dit zijn de afkortingen voor de respectievelijke AZ.



Figuur 11: Structuur van TALEN. Herkenningsequenties bestaande uit verschillende herhalingen zijn verbonden met het FokI nuclease. Binding van de linker of *forward* TALEN en de rechter of *reverse* TALEN resulteert in dimerisatie van twee FokI domeinen die het DNA kunnen knippen [92].

TALEN vertonen een aantal voordelen ten opzichte van ZFN. Zo is, doordat ZFN steeds een herkenning doen van drie nucleotiden tegelijkertijd, de verscheidenheid aan sequenties die herkend kunnen worden groter bij TALEN [92]. Bij ZFN komen er daarnaast ook problemen voor met specificiteit [105]. Een studie toonde aan dat TALEN eenzelfde activiteit vertonen als ZFN en bovendien minder toxisch zijn voor de cellen [106]. In zebrafissen werd zelfs een tien keer grotere mutatie activiteit gezien voor TALEN [107]. Kortom TALEN werken beter dan ZFN op basis van efficiëntie, specificiteit en reproduceerbaarheid [108]. In tegenstelling tot ZFN, welke al vaker gebruikt werden, zijn TALEN nog niet zo lang ontwikkeld waardoor nog minder hulpmiddelen beschikbaar zijn.

1.3.1.3 CRISPR-Cas9

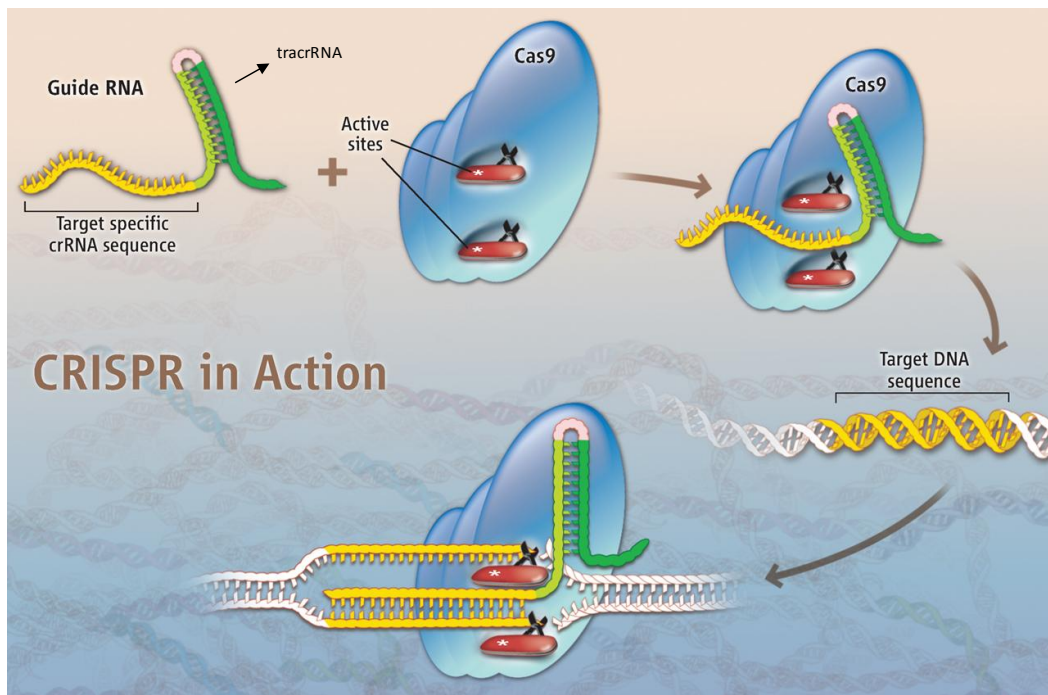
Recent hebben nieuwe ontdekkingen geleid tot de vorming van een nieuwe *genome editing* techniek. In bacteriën en archaea werd een immuunrespons ontdekt die specifiek DNA van indringers kan afbreken, het *clusters of regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) verdedigingsmechanisme [109]. Dit systeem bestaat uit RNA moleculen, die via specifieke basepaar herkenning exogeen DNA binden en vervolgens eiwitten rekruteren die het herkende DNA kunnen afbreken [110] [111]. De gerekruteerde eiwitten zijn afkomstig van de *CRISPR associated genes* (Cas) en staan onder meer in voor het verwerken van het RNA tot korte CRISPR RNAs (crRNA) [112] en het afbreken van exogeen DNA en RNA na herkenning [113].

Het type II CRISPR/Cas systeem⁹ van *Streptococcus pyogenes* werd gebruikt als basis voor de ontwikkeling van deze nieuwe *genome editing* techniek [114] [115]. Bij dit CRISPR/Cas9 systeem zijn drie elementen noodzakelijk voor de werking in humane cellen: een crRNA dat specifieke herkenning mogelijk maakt, een trans-activating crRNA (tracrRNA) en het Cas9 eiwit [115]. Het tracrRNA speelt een rol in de maturatie van het crRNA [116]. Het crRNA en het tracrRNA zullen een chimere RNA molecule of gids RNA vormen, dat de herkenning van het DNA bewerkstelligt en zo leidt tot specifieke breuken gegenereerd door het Cas9 nuclease [117].

Met deze techniek kunnen specifieke locaties in het genoom herkend worden op basis van Watson en Crick complementariteit. Dit in tegenstelling tot de ZFN en TALEN die gebaseerd zijn op eiwit-DNA interacties. De enige vereiste voor herkenning is het voorkomen van een *protospacer-adjacent motif* (PAM) bestaande uit drie nucleotiden NGG¹⁰, na de herkenningsequentie. Van het totaal genoom kan nog 40% als doel worden gebruikt rekening houdend met deze PAM sequentie [111]. CRISPR/Cas9 systemen knippen steeds drie bp in 5' positie van de PAM sequentie.

⁹ Er zijn drie CRISPR/Cas systemen gekend.

¹⁰ Een willekeurig nucleotide gevolgd door twee guanine nucleotiden.



Figuur 12: Het CRISPR/Cas9 werkingsprincipe. Het gids RNA bestaande uit het crRNA en tracrRNA zal interageren met het Cas9 eiwit. Een specifieke sequentie wordt herkend door het crRNA en resulteert in de vorming van een DSB door het Cas9 eiwit [145].

Het CRISPR/Cas9 systeem is nog recenter dan de TALENs en toont een aantal duidelijke voordelen. Eerst en vooral is de aanmaak van CRISPR/Cas9 constructen eenvoudiger dan deze van TALENs en zijn ze gebaseerd op DNA baseparing en niet op DNA-eiwit herkenning [111]. Daarnaast is maar transfectie van één plasmide nodig bij CRISPR/Cas9 systemen omdat alle benodigdheden aanwezig zijn op dit plasmide. Bij TALENs moeten steeds twee plasmiden worden gebruikt aangezien er een *forward* en *reverse* TALEN nodig zijn. Dit zorgt wel voor een hogere specificiteit aangezien er twee sequenties van 20 bp worden herkend in tegenstelling tot het CRISPR/Cas9 systeem waarbij slechts één maal 20 bp worden herkend [118]. Dit kan worden opgelost door het gebruik van twee CRISPR/Cas9 systemen met een gemuteerd Cas9 eiwit. Dit eiwit is aangepast zodat het slechts één DNA streng kan knippen waardoor twee zulke systemen nodig zijn om een DSB te creëren en dus ook twee herkenningsequenties [117]. Een laatste voordeel van het CRISPR/Cas9 systeem is dat het op een specifieke positie knipt in tegenstelling tot TALENs die willekeurig knippen in de regio tussen de twee herkenningsequenties en dat het knippen niet beïnvloed wordt door DNA methylaties wat wel het geval is bij TALEN en ZFN [119].

1.4 Doel

Voor de celbiologische studie van laminopathieën, worden in deze masterproef *genome editing* constructen ontwikkeld, die het mogelijk moeten maken om robuuste modelcellen te ontwikkelen. Door het ontwikkelen van TALEN en CRISPR/Cas9 constructen wordt het mogelijk selectief het LMNA gen of het ZMPSTE24 gen te treffen. Deze constructen kunnen in cellen een *knock-out* van het gen op één of beide allelen genereren. Bij LMNA *genome editing* moet dit resulteren in cellen met minder of helemaal geen lamine A/C wat een model vormt voor musculaire dystrofie [120]. De cellen behandeld met de ZMPSTE24 *genome editing* constructen, zouden een ophoping moeten vertonen van onafgewerkte vormen van lamine A wat overeenkomt met het fenotype van restrictieve dermatopathie.

Het ontwikkelen van deze constructen kan eveneens expertise en kennis opleveren om in de toekomst analoog ontwikkelde constructen te gebruiken voor het invoeren van specifieke puntmutaties. Zo kunnen genetische ziekten exact worden nagebootst, het doel van het project waarbinnen deze masterproef kadert.

2 Materiaal en methoden

2.1 Algemene laboratorium technieken

2.1.1 Celcultuur

Er werden verschillende celtypes gebruikt (Tabel 1) die op gelijkaardige wijze werden onderhouden. De cellen werden opgegroeid in *advanced Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM, Gibco, 12491-015) met toevoeging van 1% penicilline-streptomycine-L-glutamine (PSL) en *foetal bovine serum* (FBS, Sigma-Aldrich, F9665). Het percentage FBS is afhankelijk van het celtype en wordt weergegeven in Tabel 1 als ook de oorsprong van de cellen.

Tabel 1: Gebruikte celtypes met de naam, celtype en oorsprong. Ook het percentage FBS toegevoegd aan *advanced* DMEM en het percentage van trypsine gebruikt voor het losmaken van de cellen.

Naam	Celtype	Afkorting	% FBS	% Trypsine	Oorsprong
<i>Normal human dermal fibroblasts</i>	Humane dermale fibroblasten	NHDF	2	0.25	Promocell
<i>Henrietta Lax</i>	Cervix carcinoma epitheel cellen	HeLa	2	0.25	American type culture collection
<i>Human embryonal kidney</i>	Humane embryonale niercellen	HEK 293T ¹¹	10	0.05	American type culture collection
<i>Hutchinson-Gilford progeria syndrome</i>	Humane dermale fibroblasten van een HGPS patiënt (G608G mutatie)	HGPS	10	0.05	Prof. Ramaekers, Universiteit van Maastricht

Het splitsen van de cellen gebeurde op de hierna beschreven manier (voor een T25 weefselkweekfles). Het medium werd afgenomen en de cellen werden gewassen met 3ml *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS, Gibco, 14190-094). Na verwijdering van DPBS werd 1 ml trypsine-EDTA (Gibco, 25200-072) toegevoegd aan een concentratie afhankelijk van het celtype (Tabel 1). De cellen werden één minuut geïncubeerd bij 37 °C waarna het enzym geneutraliseerd werd met 5 ml gesupplementeerd *advanced* DMEM. Na een aantal keer spoelen, werden de losgemaakte cellen overgebracht in een falcon (15 ml) om te centrifugeren (5 min aan 1000 *revolutions per minute* (rpm)). Na centrifugatie werd het supernatans afgegoten en werden de cellen geresuspendeerd in 3 ml medium. Per celtype werd de volgende hoeveelheid cellen toegevoegd in een nieuwe weefselkweekfles in een totaal volume van 6 ml: NHDF/HGPS: 65000, HEK 293T: 125000, HeLa: 65000.

2.1.2 Transfectie

Transfecties werden gedaan met een geoptimaliseerd protocol gebaseerd op het transfectie protocol uit Sanjana et al. [92]. Cellen werden opgegroeid in een 6-well plaat met 2 ml DMEM en de gewenste hoeveelheid FBS maar zonder antibiotica (PSL). Nadat er voldoende cellen groeiden op de bodem van de wells (70-80 % confluent) werd volgend protocol toegepast per cm² cultuuroppervlakte. 0.9375 µl/cm² lipofectamine 2000 (invitrogen, 11669-027) werd toegevoegd aan 26 µl/cm² DMEM zonder supplementen (FBS en PSL), om interferentie te voorkomen. 0.42 µg/cm² DNA werd toegevoegd aan 26 µl/cm² DMEM zonder supplementen. DNA concentraties werden bepaald met behulp van een Nanodrop (Isogen, ND 2000). Na 1 tot 5 minuten incubatie werd het mengsel met lipofectamine toegevoegd aan het DNA mengsel en volgde 20 min incubatie bij kamertemperatuur.

¹¹ De oorspronkelijke cellijn kwam voort uit het 293^{ste} experiment van Frank Graham. De 'T' slaat op de toevoeging van een *large T antigen* dat replicatie van vectoren met een SV40 promotor in de cellen toelaat.

Dit mengsel werd toegevoegd aan het medium dat reeds aanwezig was in de wells met cellen. Na het zacht over en weer schudden van de plaat werden de cellen 24 uur geïncubeerd bij 37 °C en 5 % CO₂. Wanneer meerdere plasmiden gelijktijdig werden getransfecteerd, werd de totale hoeveelheid DNA toegevoegd per well, gedeeld door het aantal plasmiden.

2.1.3 DNA extractie

Voor de extractie van DNA uit cellen werden twee verschillende methoden gebruikt, een snelle methode en een tragere zuiverdere methode. De snelle methode werd uitgevoerd met behulp van de QuickExtract DNA extraction solution (Epicentre, QE9050). 100 µl van deze oplossing werd toegevoegd per well van een 6-well plaat. Deze oplossing werd een aantal keer op en neer gepipetteerd. Hierna werd de oplossing overgebracht in PCR-epjes en werd het DNA geëxtraheerd door incubatie bij 68 °C voor 15 min en 95 °C voor 8 min. Deze methode bevatte naast DNA ook nog celdebris.

Dit was niet het geval bij extractie met de DNeasy blood & tissue kit (Qiagen, 69504) waarbij de cellen eerst werden losgemaakt van het recipiënt om vervolgens het DNA op te zuiveren volgens het protocol geleverd bij deze kit. Hierbij werden de cellen gelyseerd en wordt het DNA gebonden aan een silica membraan terwijl de andere ongewenste stoffen werden doorgelaten.

2.1.4 Bacteriële transformatie en plasmide opzuivering

Transformatie werd gedaan in competente *E. coli* DH5α cellen. Aan 50 µl cellen, die werden bewaard bij -80 °C en werden ontdooid op ijs, werd 5 µl plasmide toegevoegd. Na 5 min incubatie op ijs werd 45 s geïncubeerd bij 42 °C om vervolgens weer 5 min op ijs te incuberen. De cellen werden overgebracht in 800 µl SOC medium (bijlage 7.1.1) en opgeroed gedurende één uur bij 37 °C in een schudder (200 rpm). Hierna werd 280 µl van de bacteriesuspensie uitgeplaat op LB agar platen (bijlage 7.1.3) met de juiste antibiotica (Duchefa biochemie) en overnacht opgegroeid door de plaat ondersteboven bij 37 °C te zetten. Na controle van de juiste aanwezige plasmiden met behulp van kolonie PCR (2.1.8.2) werden de correcte kolonies opgegroeid in vloeibaar LB medium (bijlage 7.1.2) met de juiste antibiotica en na incubatie overnacht bij 37 °C, werden de plasmiden geëxtraheerd met de GeneJET plasmid miniprep kit (Thermo Scientific, K0502).

2.1.5 DNA sequencer

Wanneer DNA sequenties bepaald moesten worden, werd dit gedaan door stalen op te sturen naar LGC genomics (Ready-to-run, Sanger sequencing). Hierbij werd steeds 10 µl DNA toegevoegd met een concentratie van 100 ng/µl en 4 µl primer met een concentratie van 5 µM. De bekomen resultaten werden gecontroleerd ten opzichte van referentie sequenties door sequence alignment (Clustal Omega)¹². Ook de ruwe sequenceringsdata werden bekeken met Bioedit (Ibis biosciences) om eventueel sequenceringsfouten op te sporen.

2.1.6 Microscopie

Cellen bestemd voor microscopie werden opgegroeid op microscoop dekglasjes (0.17 mm dikte). Alvorens de cellen bekeken werden onder de microscoop, werden ze gefixeerd. Dit gebeurde door eerst het aanwezige medium af te nemen en te wassen met 1x PBS. De gebruikte volumes zijn afhankelijk van het type well plaat (6-well plaat: 2 ml, 12-well plaat: 1 ml). Na het wassen werden de cellen gefixeerd met 4% paraformaldehyde (Alfa Aesar, 43368). Na nogmaals wassen werden de

¹² <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

cellen gepermeabiliseerd met 1 % Triton X (Sigma-Aldrich, T8787) in 1x PBS voor 5 min. Dehydratatie gebeurde, na nog een laatste keer wassen met 1x PBS, door 3 min te incuberen met stijgende concentratie ethanol (70%, 90%, 100%). Vervolgens werd een DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen, D-1306) kleuring van het kern DNA uitgevoerd door de glaasjes met de cellen naar beneden op een druppel VectaShield (Vector laboratories, H-1000) met 1 µg/ml DAPI te brengen, die gelegen was op een draagglaasje. De glaasjes werden vastgemaakt met transparante nagellak en onder de fluorescentie microscoop (Eclipse Ti, Nikon instruments) bekeken. Er werden drie filter kubussen gebruikt om de gewenste golflengten uit te sturen en op te vangen (Tabel 2) . De gebruikte lenzen zijn een 20x/0.75 Plan Apo droge lens en een 40x/1.3 Plan Apo olielens. De opnames gebeurden met een Andor Ixon EM-CCD camera en de beelden werden verwerkt met behulp van Fiji freeware¹³.

Tabel 2: De excitatie en emissie golflengten doorgelaten door specifieke filter kubussen gebruikt bij cel visualisatie met de fluorescentie microscoop. De golflengte wordt aangeduid als de gemiddelde waarde met daarna de breedte van het interval van het golflengte bereik. 377/50 heeft dus een bereik van 352 tot 402 nm. De waarde bij de dichroïsche spiegel geeft de grenswaarde waarboven golflengten doorgelaten worden en waaronder golflengten worden geblokkeerd.

Filter kubus	Excitatie golflengte (nm)	Emissie golflengte (nm)	Dichroïsche spiegel (nm)
DAPI	377/50	477/61	409
GFP	472/30	520/35	495
TRITC	540/2	605/55	565
CY5	620/60	700/75	660

2.1.7 Immunokleuring

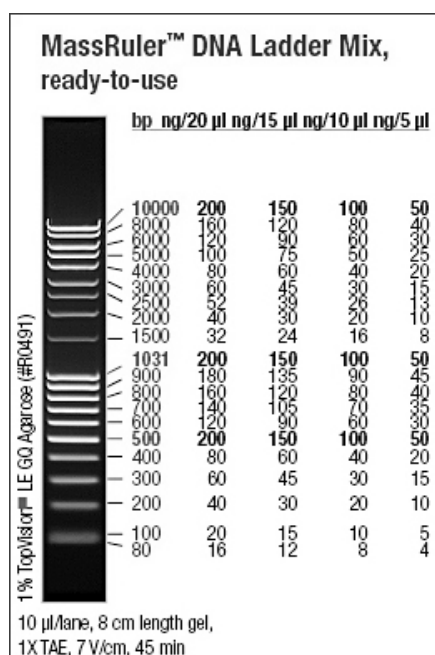
Bij immunokleuring van cellen werden antilichamen gebruikt om specifieke eiwitten in de cel te kleuren. Hierbij werd eerst een specifiek antilichaam toegevoegd zonder label waaraan in een volgende stap een gelabeld, secundair antilichaam toegevoegd werd dat bindt aan het primair antilichaam. Om te wassen werd steeds drie keer 1x PBS toegevoegd en elke keer 5 min geïncubeerd.

Cellen werden gefixeerd in 4% paraformaldehyde gevolgd door een eerste reeks wasstappen, daarna werd 5 min gepermeabiliseerd met Triton X (1 %). Volgend op een tweede reeks wasstappen werd 20 min geblokkeerd met 50 % FBS. Vervolgens werden de cellen gedurende 1 u geïncubeerd in een oplossing met primair antilichaam (opgelost in 50 % FBS). Na opnieuw een reeks wasstappen volgde 30 min incubatie met het secundaire antilichaam, een laatste reeks wasstappen en kleuring met DAPI in VectaShield zoals beschreven in 2.1.6.

2.1.8 Polymerase chain reaction

Op verschillende momenten in de experimenten werd een *polymerase chain reaction* (PCR) uitgevoerd voor het vermenigvuldigen van DNA. Wanneer het niet anders werd vermeld, werd hiervoor de basis PCR gebruikt die hieronder wordt beschreven. Na de PCR werd amplificatie van het correcte DNA fragment gecontroleerd met behulp van gelelektroforese. Hierbij werd een deel van het PCR product geladen op een 1.5 % agarosegel (1.5 g agarose in 100 ml 0.5x TAE (Tris acetaat EDTA)-buffer (bijlage 7.2.1)) en voor 20 min blootgesteld aan 135 V. Na scheiding van het DNA werd de gel 15 min geïncubeerd in een ethidiumbromide oplossing die het DNA kleurt. Vervolgens werd het resultaat bekomen door de gel te belichten met UV en een foto te nemen van het uitgezonden fluorescentie licht. Op elke gel werd eveneens 4 µl DNA ladder (Thermo Scientific, SM0403) geladen waarvan de lengte van de afzonderlijke fragmenten wordt weergegeven in Figuur 13.

¹³ <http://fiji.sc>



Figuur 13: DNA ladder gebruikt tijdens gelelektroforese met de lengte van de overeenkomstige DNA fragmenten.

2.1.8.1 Basis PCR

Voor één reactie werd 1 µl DNA samengevoegd met 3 µl van elke primer (5 µM), 3 µl PCR buffer, 2 µl dNTP (5 µM), 0.3 µl Taq-polymerase en 17.7 µl steriel water (gedeïoniseerd en geautoclaveerd) tot een totaal volume van 30 µl. De reactiecondities zijn weergegeven in Tabel 3. Alle gebruikte primers (Biologio) werden eerst getest met dit PCR programma op specificiteit en zijn opgelijst in bijlage 7.2.2.

Tabel 3: PCR condities van de basis PCR. Tijdens denaturatie zal het dubbelstrengig DNA loskomen tot alleen enkelstrengig DNA aanwezig is. Tijdens de annealfase zullen primers binden op het enkelstrengig DNA. Tijdens de extensiefase wordt van elke DNA streng de complementaire streng gegenereerd startend van de primer met behulp van het Taq-polymerase en de dNTPs.

Cyclus nummer	Denaturatie	Annealfase	Extensiefase
1	5 min 95 °C		
2-36	35 s 95 °C	35 °C 60 °C	50 s 70 °C
37			5 min 70 °C

2.1.8.2 Kolonie PCR

Na transformatie (2.1.4) werden gegroeide kolonies getest op de aanwezigheid van het juiste plasmide met kolonie PCR. Een kolonie werd opgepikt met een pipettip waarna een streep werd gezet op een *back-up* plaat met hetzelfde antibioticum als de plaat waarop de bacteriën werden gegroeid. De pipettip werd vervolgens overgebracht in 100 µl steriel water en even op en neer gepipetteerd om overblijvende kolonie af te spoelen in het water. Dit mengsel werd 10 min gedenuceerd bij 95 °C waarna 1 µl van de koloniesuspensie werd toegevoegd aan een PCR mengsel (Tabel 4). In deze reactie zat ook nog 0.25 µl dNTP (25 mM), 2.5 µl Taq-polymerase buffer, 0.125 µl van elke primer (10 µM), 0.1 µl Taq-polymerase en 20.9 µl steriel water. Afhankelijk van de lengte van het gegenereerde PCR product werd de extensiefase ingekort.

Tabel 4: PCR condities van de kolonie PCR. Tijdens denaturatie zal het dubbelstrengig DNA loskomen tot alleen enkelstrengig DNA aanwezig is. Tijdens de annealfase zullen primers binden op het enkelstrengig DNA. Tijdens de extensiefase wordt van elke DNA streng de complementaire streng gegenereerd startend van de primer met behulp van het Taq-polymerase en de dNTPs.

Cyclus nummer	Denaturatie	Annealfase	Extensiefase
1	3 min 94 °C		
2-31	30 s 94 °C	30 °C 60 °C	2 min 68 °C
31			5 min 68 °C

2.2 Aanmaak en controle van *genome editing* constructen

Om stabiele gen *knock-out* te bekomen in cellen werden twee soorten *genome editing* constructen aangemaakt, TALEN en CRISPR/Cas9 systemen. Deze werden zo ontwikkeld dat ze een DSB konden genereren in één van de eerste exonen van de gewenste genen (LMNA, ZMPSTE24). De eerste exonen werden gekozen omdat een *frameshift* mutatie in het begin van een gen de kans op een *knock-out* sterk verhoogt. Immers, indien de mutatie in het laatste exon zou zijn, zou het grootste deel van het eiwit nog correct kunnen worden gevormd. De genomische sequenties werden geraadpleegd op NCBI (LMNA: NG_008692.2; ZMPSTE24: gene 10269).

2.2.1 TALEN

De ontwikkeling van de TALENs was gebaseerd op het protocol van Sanjana et al. [92]. Hieronder wordt hiervan een korte uiteenzetting gegeven, een meer gedetailleerde beschrijving wordt gegeven in bijlage 7.5 en het artikel zelf [92].

2.2.1.1 TALEN ontwerp

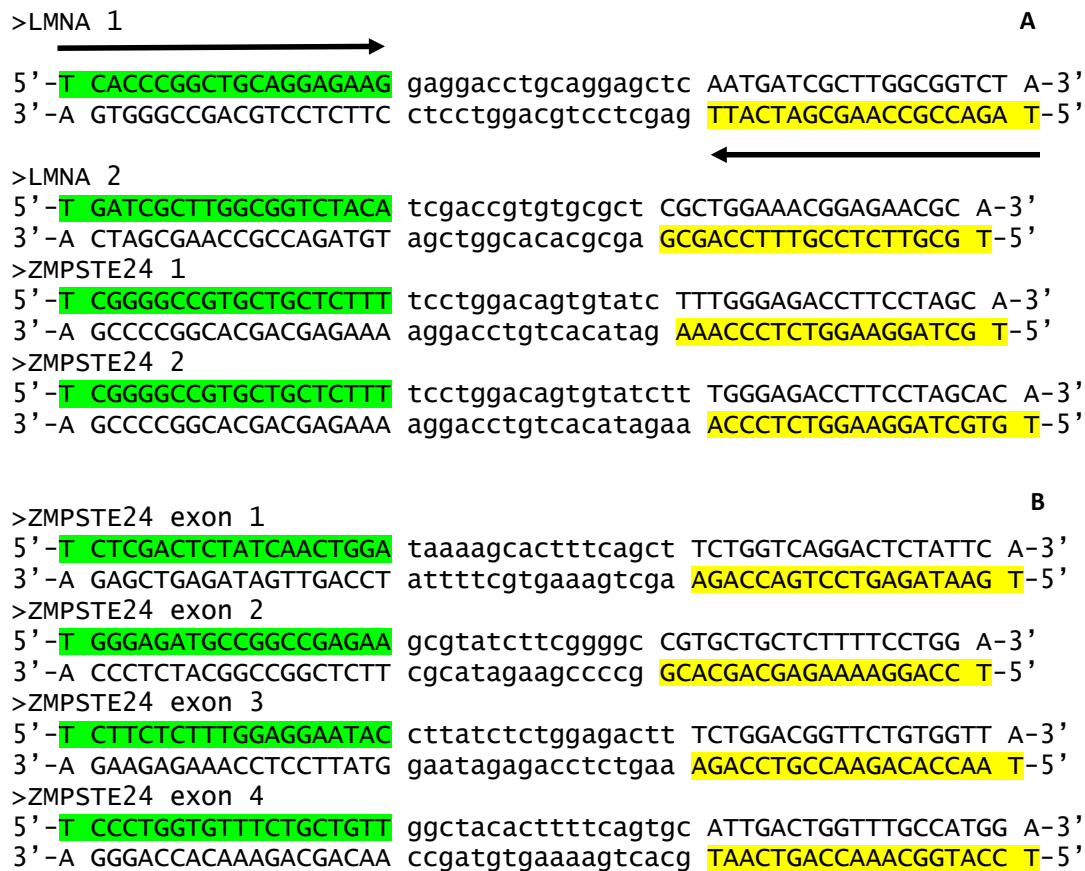
Vermits de TALENs moeten binden aan een specifieke genomsequentie werden de doelsequenties in het exon geïdentificeerd, met behulp van de TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0¹⁴ [121]. Bij het ingeven van de exonsequenties werden er verschillende mogelijke TALEN paren gegenereerd rekening houdend met de richtlijnen van Streubel et al. [122]. Er werd gezocht naar TALEN binding sequenties van 20 bp en een opening (*spacer*) tussen de twee TALEN binding sequenties (*forward* en *reverse*) van 14 tot 20 bp. De sequenties werden zo gekozen dat ze niet in een regio vielen waar gekende SNPs (single nucleotide polymorphism¹⁵) aanwezig waren via NCBI (13/8/13). Enkel deze die specifiek één plaats in het genoom konden herkennen, zonder niet specifieke binding, werden bewaard. Hieruit werden voor LMNA en ZMPSTE24 twee TALEN paren gekozen in exon 1 (Figuur 14).

Bij een tweede raadpleging van de sequenties (7/1/14) werd geconstateerd dat er door nieuwe updates veel potentiële SNPs waren toegevoegd. Daarom werd besloten om de relevante sequenties van de gebruikte cellen te sequencen en dit als basis te gebruiken voor de TALEN ontwikkeling. De eerste vier exonen van ZMPSTE24 en de eerste vijf exonen samen met exon 11 van LMNA werden vermenigvuldigd met PCR (primers zie bijlage 7.2, nummer 4 tot en met 20) en na PCR opzuivering (Qiaquick PCR purification kit, Qiagen, 28104) opgestuurd voor sequencering naar LGC genomics. De sequencering werd gedaan op DNA van HEK 293T en NHDF cellen na DNeasy DNA extractie. Voor HGPS cellen werd exon 11 van het LMNA gen gesequeneerd om te kijken of de gekende heterozygote mutatie aanwezig was. Op basis van deze sequenties werden nieuwe TALEN paren ontwikkeld voor

¹⁴ <https://tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/talen>

¹⁵ Verandering van één nucleotide.

ZMPSTE24 (Figuur 14b). Een aantal algemene eigenschappen van de verschillende constructen, evenals hun posities in de coderende sequentie van de genen (bijlage 7.3) wordt getoond in Tabel 5.



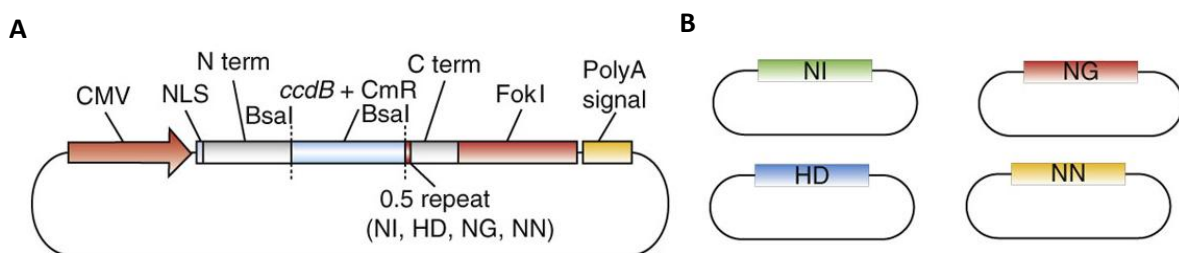
Figuur 14: Sequenties die worden herkend door de TALEN paren ontwikkeld op (A) 13/8/13 (B) 7/1/14. De TALEN binding sequenties worden weergegeven in hoofdletters. De kleine letters stellen de *spacer* regio voor tussen beide TALEN bindingsequenties. De *forward* TALEN is weergegeven in groen en loopt volgens de pijl net als de gele *reverse* TALEN. Het eerste herkende nucleotide is steeds een thymine.

Tabel 5: Algemene informatie over de eerder vermelde TALEN paren. De naamgeving is analoog aan figuur 14, lengte van de *spacer*, de totale lengte en de positie in de coderende sequentie.

Naam	Spacerlengte	Totale lengte	Positie
LMNA1	18	58	77-134
LMNA2	15	55	117-171
ZMPSTE24 1	16	56	59-114
ZMPSTE24 2	18	58	59-116
ZMPSTE24 ex1	17	57	31-87
ZMPSTE24 ex2	15	55	199-255
ZMPSTE24 ex3	17	57	276-332
ZMPSTE24 ex4	18	58	367-424

2.2.1.2 TALEN productie

De sequentie van het volledige TALEN werd in de cel gebracht met behulp van een plasmide. Hierin is de sequentie van het Fok I endonuclease aanwezig en de sequentie van 20 herhalingen (monomeren) die de doelsequentie kunnen herkennen. De algemene structuur van het plasmide zonder herkenningsequentie, het *backbone* plasmide, wordt weergegeven in Figuur 15. In deze *backbone* werd de sequentie, coderend voor het TALEN, aangebracht. Deze bestaat uit 20 monomeren per TALEN waarbij één monomeer resulteert in 34 AZ. Aangezien er 20 nucleotiden worden herkend, elk door een monomeer van 34 AZ (102 bp), resulteert dit in een totaal van 2040 bp die in het plasmide aanwezig moeten zijn om specifieke herkenning te kunnen bekomen. Door de hoge gelijkheid tussen de sequentie van de verschillende monomeren¹⁶ is het moeilijk om deze in de juiste volgorde in de vector te krijgen. Hiervoor werd de Golden Gate methode toegepast waarbij aan de verschillende monomeren adaptors bevestigd werden, zodat na het knippen met een type II restrictie-enzym¹⁷, slechts ligatie in een bepaalde volgorde kon gebeuren. Eerst werden de monomeren per zes samengevoegd tot een hexameer waarna drie hexameren in een tweede Golden Gate reactie aan elkaar en in de *backbone* vector werden gebracht. De *backbone* bevatte reeds de herkenning voor het thymine, dat aanwezig is als eerste in elk TALEN en voor de laatste halve herhaling (1.3.1.2).



Figuur 15: (A) Algemene structuur van het TALEN plasmide zonder de herkenningsequentie. CMV: cytomegalovirus promotor, NLS: nucleair lokalisatie signaal, N term: N-terminus van *Xanthomonas* eiwit. BsaI: herkenningsequentie van type II restrictie enzym, *ccdB* (*control of cell death B*): negatieve selectie cassette waardoor cellen met niet geknipt plasmide zullen afsterven, CmR: chloramfenicol resistentiegen, C term: C terminus van *Xanthomonas* eiwit, FokI: de sequentie van het FokI nuclease, poly A signal: polyadenylatiesignaal (B) Plasmiden die een monomeer sequentie bevatten en gebruikt worden als basis voor de constructie van de monomeer bibliotheek [92].

Ter verduidelijking wordt de constructie van de *forward* TALEN van het eerste paar tegen exon 1 van LMNA, uiteengezet. Deze heeft als TALEN bindings sequentie **TCACCCGGCTGCAGGAGAAG**, waarvan de herkenning van de eerste thymine en de laatste glutamine reeds in de *backbone* aanwezig zijn. De 18 andere kunnen worden opgedeeld in drie hexameren: CACCCG, GCTGCA, GGAGAA. Voor het maken van hexameer één heeft men dus op de eerste positie een monomeer nodig die een cytosine herkent en de specifieke adaptors bevat voor positie één (C1). In tweede positie moet de monomeer adenine kunnen herkennen en specifieke adaptors hebben voor deze positie (A2), analoog voor de andere posities (C3, C4, C5, G5).

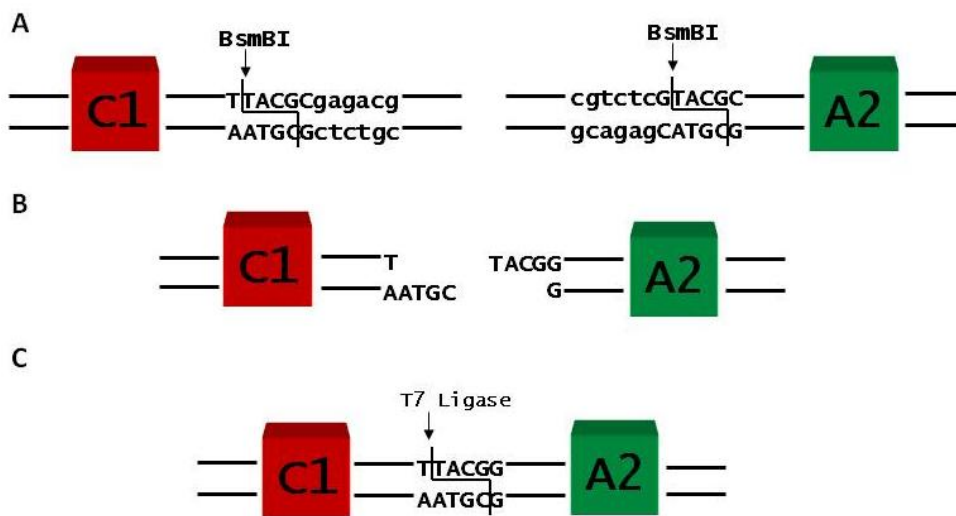
Eerst moesten de monomeren worden gegenereerd met de correcte adaptors aan beide uiteinden. Dit werd gedaan met behulp van PCR waarbij de adaptors vervat zitten in de uiteindes van de primers. Als startproduct werden plasmiden gebruikt die de sequentie van de monomeren bevatten (Figuur 15b) (Addgene, pNI_v2(32180), pNG_v2(32181), pHD_v2(32183), pNH_V2(37527)). Om meerdere TALENs te kunnen genereren werd een bibliotheek van monomeren gemaakt waarin elke monomeer

¹⁶ Enkel het twaalfde en dertiende AZ verschillen (de RVD).

¹⁷ Type II restrictie-enzymen zijn enzymen die een specifieke sequentie herkennen maar een aantal bp voor of achter hun herkenningsequentie knippen.

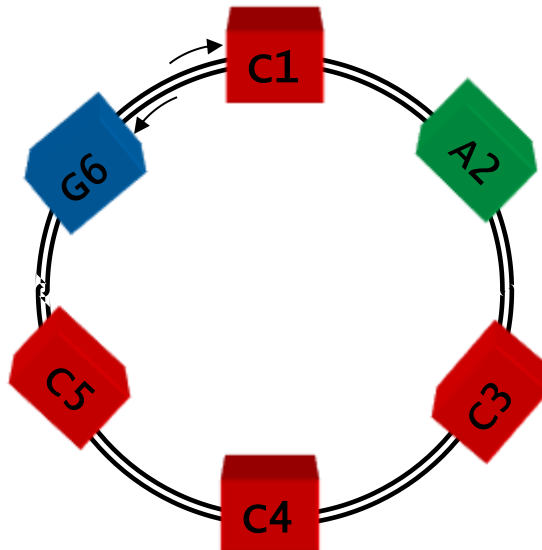
met de specifieke adaptors voor elke positie aanwezig was. Dit gaf een totaal van vier monomeren met elk 18 mogelijke posities.

Voor het maken van de eerste hexameer uit het voorbeeld werden dus de monomeren voor C1, A2, C3, C4, C5 en G6 bij elkaar gevoegd tijdens de eerste Golden Gate reactie [123]. De connectie van de eerste twee monomeren wordt gevisualiseerd in figuur 14. Aan weerszijden van de monomeer sequenties zijn er specifieke sequenties afkomstig van de adaptors, die een herkenningssequentie van BsmBI (cgtctc) bevatten (Figuur 16a). Dit enzym knipt na zijn herkenningssequentie en genereert zo overhangende uiteindes (Figuur 16b). Het uiteinde gegenereerd bij C1 is compatibel met het uiteinde gegenereerd bij A2 waardoor ze aan elkaar kunnen worden bevestigd met behulp van een T7 ligase (Figuur 16c).



Figuur 16: Koppeling van de eerste twee monomeren in een hexameer. (A) Monomeer C1 en A2 met hun specifieke adaptors die een herkenningssequentie van BsmBI bevatten. (B) Dezelfde monomeren die na het knippen met BsmBI compatibele uiteindes vertonen. (C) De aan elkaar bevestigde monomeren met behulp van het T7 ligase.

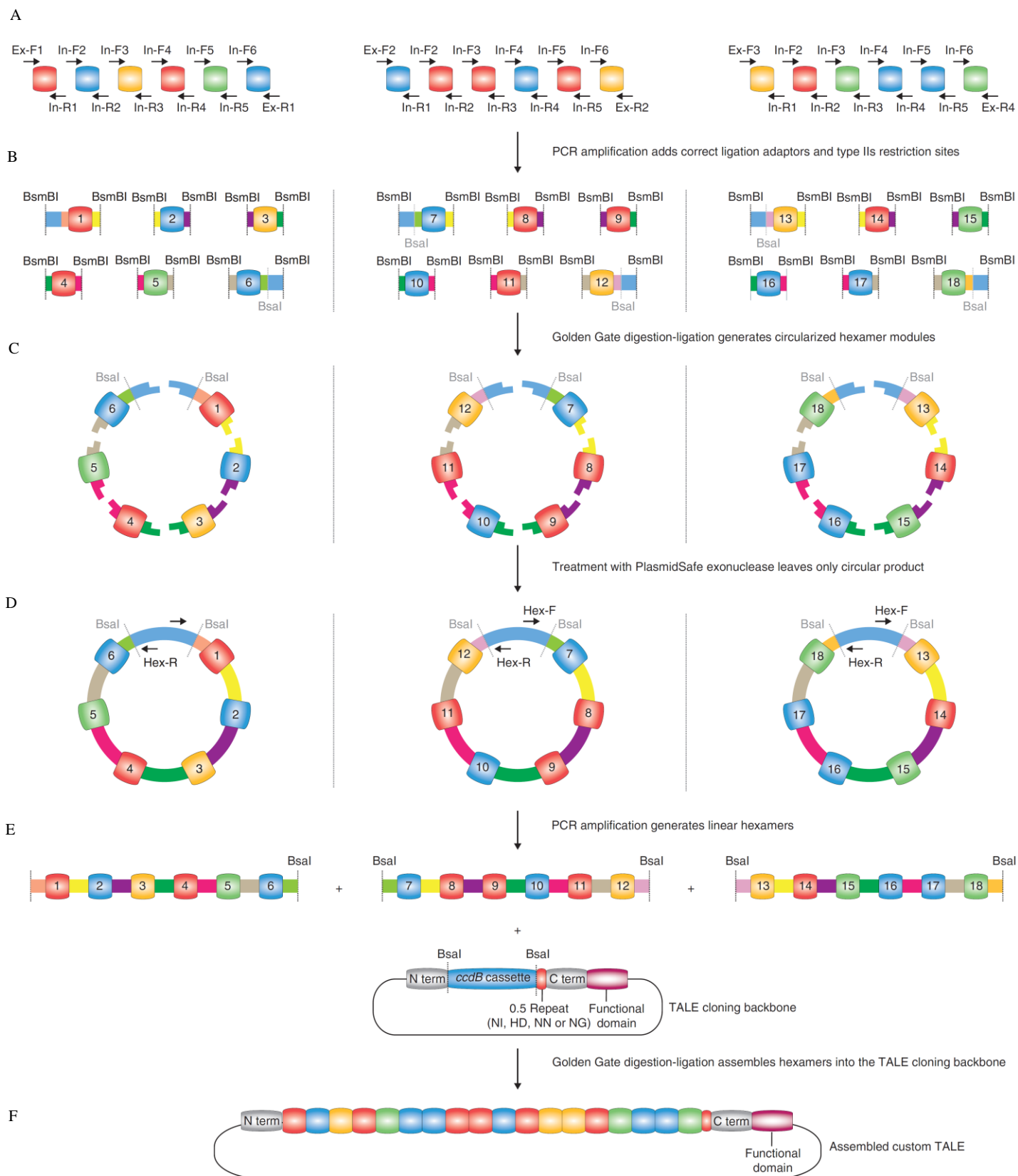
Dit gebeurt bij de zes monomeren en resulteert in een circulair construct aangezien C1 en G6 ook compatibele uiteindes hebben (Figuur 17). Deze reacties worden gedaan voor de drie hexameren afzonderlijk om daarna over te gaan naar de tweede Golden Gate reactie.



Figuur 17: Zes monomeren aan elkaar gekoppeld tot een hexameer met de primers voor de PCR, volgend na de Golden Gate1 reactie, weergegeven als pijltjes.

In de tweede Golden Gate reactie worden de drie hexameren, na PCR amplificatie, samengevoegd. De eerste en laatste monomeer van elke hexameer bevat een herkenningssequentie voor BsaI waardoor, na restrictie, compatibele uiteindes worden gegenereerd met elkaar en met het *backbone* plasmide dat eveneens een herkenningssequentie bevat. Het *backbone* plasmide bevat ook nog de FokI sequentie en de gewenste halve herhaling, overeenstemmend met het laatste herkende nucleotide (Addgene, 32190, 32192, 32189, 32191). Dit zorgt ervoor dat de drie hexameren in de juiste volgorde aan elkaar en in het *backbone* plasmide worden geligeerd. Figuur 18 geeft een samenvatting van de algemene TALEN constructie.

Om praktische redenen werden sommige delen van het protocol anders toegepast dan beschreven door Sanjana et al. . Zo werd de visualisatie van agarosegels na gelelektroforese gedaan met behulp van ethidiumbromide. De concentratie van DNA werd bepaald met een Nanodrop (Thermo scientific, ND-2000) en de kolonie PCR werd uitgevoerd zoals eerder beschreven (2.1.8.2). Voor details wordt verwezen naar het protocol in bijlage 7.5. Er werden ook andere methoden gebruikt om de werking van de TALEN te valideren (2.2.1.3).



Figuur 18: Algemeen principe van TALEN constructie. (A) Monomeren met aanduiding van de primers gebruikt voor de vermenigvuldiging. (B) Monomeren na PCR amplificatie met herkenningssequentie van BsmBI. (C) Golden Gate I reactie met vorming van hexameren. (D) Vermenigvuldiging van hexameren met PCR. (E) Drie hexameren samengevoegd met het plasmide in de tweede Golden Gate reactie. Het functioneel domein is in dit geval een FokI endonuclease. (F) Volledig TALEN plasmide [92].

2.2.1.3 TALEN validatie

Om de sequentie van het TALEN plasmide te controleren werd dit getransformeerd naar *E. coli* (2.1.4). Na opgroeien werd het plasmide geëxtraheerd en opgestuurd voor sequenceren (2.1.5). Om de werking van de TALEN te controleren, werden verschillende methoden geoptimaliseerd, welke hieronder besproken worden.

2.2.1.3.1 T7 endonuclease assay

Een T7 endonuclease kan dubbelstrengige breuken genereren in DNA wanneer er geen perfecte base paring is [124] [125]. Dit endonuclease kan worden gebruikt voor het detecteren van werkende TALEN paren. Hierbij worden de genomische regio's, herkend door de TALEN, van met TALEN behandelde stalen vermenigvuldigd met PCR. Vervolgens worden de DNA strengen gedenuatureerd bij hoge temperatuur en zullen ze terug kunnen binden bij een langzaam dalende temperatuur. Er kan zo dubbelstrengig DNA gevormd worden waarvan de ene streng een mutatie bevat als gevolg van de TALEN en de andere streng geen mutaties bevat omdat sommige cellen niet getransfecteerd werden door TALEN. Er wordt zo een heteroduplex gevormd waar het T7 endonuclease kan knippen. Gegeneerde mutaties kunnen dus worden gevisualiseerd door twee kleinere bandjes wanneer het geknipte DNA wordt onderworpen aan gelelektroforese.

Er werden twee verschillende protocols uitgevoerd van het T7 endonuclease assay. In een eerste protocol werd 20 µl van het PCR product onderworpen aan heteroduplexvorming waarna 10 µl werd samengevoegd met 4 µl NEBuffer 2 (New England Biolabs, B7002S) en 1 µl T7 endonuclease (New England Biolabs, M0302S). Na incubatie van 30 min bij 37 °C werden de resultaten bekeken met gelelektroforese. Het tweede protocol was op analoge wijze maar hierbij werd het PCR product eerst opgezuiverd. 200 ng van dit opgezuiverd product werd na toevoeging van 2 µl NEBuffer 2 (New England Biolabs) en aanlenging tot 19 µl met water onderworpen aan heteroduplexvorming. Hierna werd 1 µl T7 endonuclease toegevoegd en werd 30 min geïncubeerd bij 37 °C. De reactie werd gestopt met 2 µl EDTA (0.25 M) en geanalyseerd met gelelektroforese.

Deze assays werden getest op DNA van cellen met HGPS, die bijgevolg een heterozygote nucleotide substitutie bevatten. Hierbij werd heteroduplex DNA gevormd met de ene streng afkomstig van het niet gemuteerde allel en de andere afkomstig van het gemuteerde allel. Het exon dat deze mutatie bevat is exon 11 en werd vermenigvuldigd door PCR met behulp van primer 13 en 14 (bijlage 7.2.2). Hierna werd heteroduplex vorming gestimuleerd door 5 min te denatureren bij 95 °C gevolgd door graduele afkoeling tot 85 °C aan 2 °C/s en verdere afkoeling tot 25 °C aan 0.1 °C/s waarbij het DNA terug kon binden.

2.2.1.3.2 High resolution melt-analyse

Een tweede methode voor het controleren van de werking van de TALENs is *High Resolution Melt* -analyse (HRM-analyse) die start met vermenigvuldigen van DNA met quantitative PCR (qPCR) waarna een smeltanalyse volgt [126]. Hierbij wordt de temperatuur opnieuw langzaam verhoogd waardoor de vermeerde DNA strengen loskomen van elkaar. De fluorescente kleurstoffen, die enkel binden met dubbelstrengig DNA, worden zo vrijgesteld en het algemene fluorescente signaal zal dalen. De temperatuur waarbij de DNA-strengen loskomen en de kinetiek waarmee ze dit doen wordt bepaald door de basesamenstelling en de lengte van de duplexen. De daling in fluorescentie resulteert dus in een specifiek patroon per sequentie. Door vergelijking van de smeltcurven met deze van controle stalen kunnen zo mutatie geïdentificeerd worden.

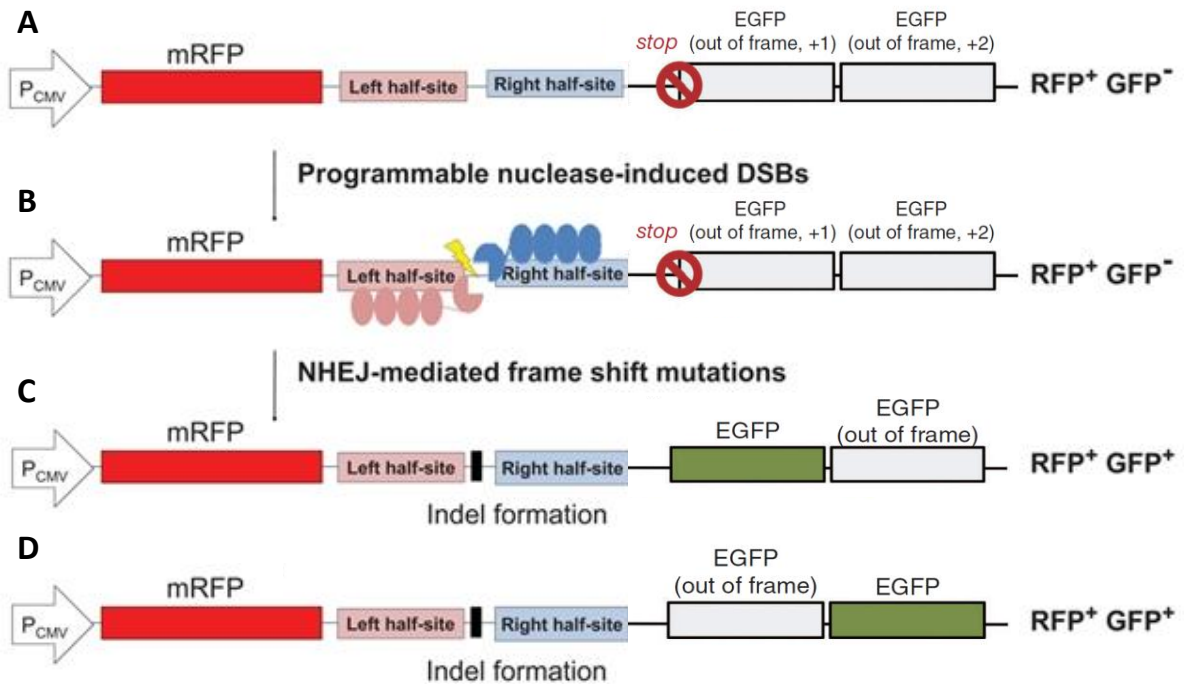
Om de TALENs te controleren werden HEK 293T cellen opgegroeid in een 6-well plaat en getransfecteerd (2.1.2). Na 24 uur incubatie werd het DNA geëxtraheerd met de Quickextract methode (2.1.3) en gebruikt voor de HRM-analyse. Er werd gebruik gemaakt van de Type-it HRM PCR kit (Qiagen, 206542). 12.5 µl 2x HRM PCR mastermix werd toegevoegd aan 1.75 µl primermix (20 µM per primer), 9.75 µl RNase-vrij water en 1 µl DNA (80 ng/µl verdund in RNase-vrij water). De reacties werden uitgevoerd met een Rotor-gene Q (Qiagen, 9001560) en geanalyseerd met bijgeleverde software. Als positieve controle werd ook DNA van HGPS cellen geëxtraheerd en geanalyseerd met behulp van HRM. De primers die werden gebruikt zijn te zien in bijlage 7.2.2 (21-28) en zorgden voor een PCR product van tussen de 100 en 150 bp wat een optimale lengte is voor deze analyse. De cyclus condities zijn weergegeven in Tabel 6.

Tabel 6: Condities van HRM-analyse. Tijdens denaturatie zal het dubbelstrengig DNA loskomen tot alleen enkelstrengig DNA aanwezig is. Tijdens de annealfase zullen primers binden op het enkelstrengig DNA. Tijdens de extensiefase wordt van elke DNA streng de complementaire streng gegenereerd startend van de primer met behulp van het Taq-polymerase en de dNTPs. De HRM fase houdt in dat de temperatuur gradueel zal stijgen van 65 °C naar 95 °C met 0.1 °C elke 2 seconden.

Cyclus nummer	Denaturatie	Annealfase	Extensiefase	HRM
1	5 min 95 °C			
2-41	20 s 95 °C	20 °C 55 °C	20 s 72 °C	
36				65 °C-95 °C, 0.1 °C/2 s

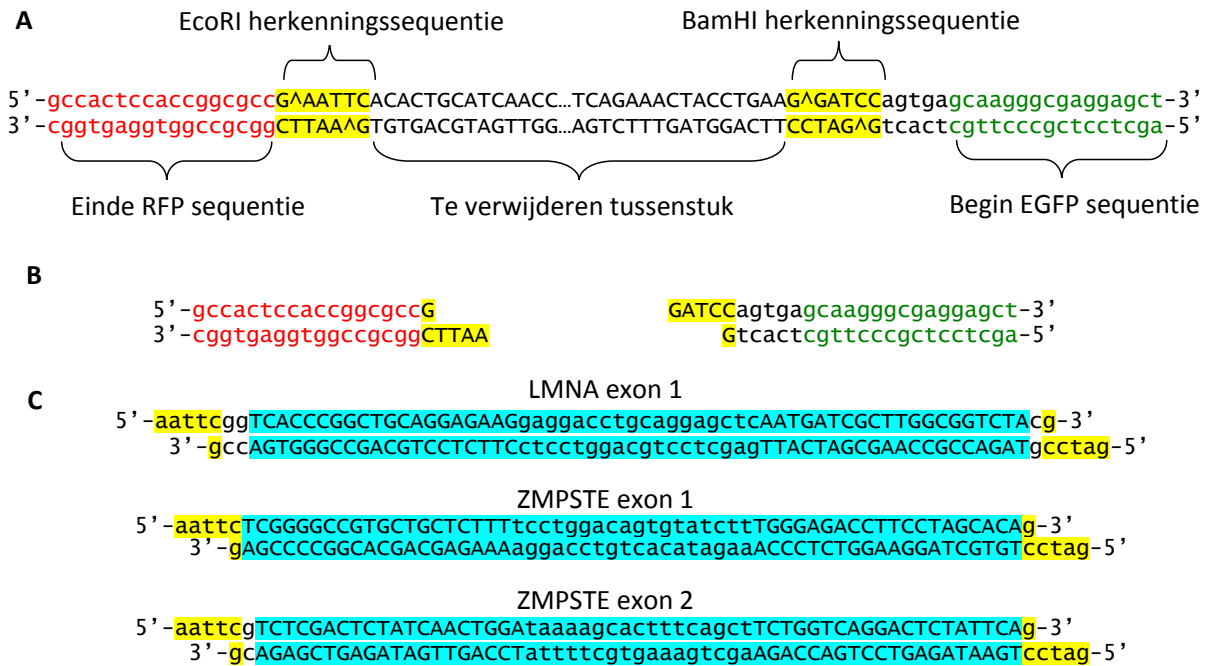
2.2.1.3.3 Surrogaat reporter

Een andere methode voor het testen van de TALENs maakt gebruik van een plasmide (surrogaat reporter Labomics, PRG2S-EV) dat de sequentie bevat voor een monomerisch rood fluorescente proteïne (mRFP), gevolgd door een insertieplaats voor de TALEN herkenningssequentie. Na een stopcodon is ook nog de sequentie aanwezig van twee *enhanced* groene fluorescente proteïnen (eGFP) die elk in een ander reading *frame* zitten dan de mRFP sequentie (Figuur 19) [127]. Wanneer een functioneel TALEN paar wordt ingebracht, kunnen er indels gevormd worden waardoor het stopcodon uit *frame* geraakt en één van beide eGFP sequenties in *frame* komt. Wanneer nu dit plasmide in cellen wordt getransfecteerd samen met het TALEN paar kunnen cellen met een werkend TALEN paar gevisualiseerd worden. Alle cellen die een surrogaat reporter hebben opgenomen, zullen rood fluoresceren ten gevolge van een in *frame* mRFP. Cellen met een werkend TALEN paar zullen zeer waarschijnlijk mutaties ondergaan die leiden tot een *frame shift* waardoor, naast rood, ook groene fluorescentie kan worden waargenomen. Deze surrogaat reporter kan daarnaast ook worden gebruikt om cellen te isoleren die een werkend TALEN paar bevatten met behulp van *fluorescent activated cell sorting* (FACS).



Figuur 19: Mechanisme van de *surrogate reporter*. (A) Een mRFP zit in *frame* gevolgd door de herkenningssequentie van het TALEN paar en een stopcodon. Hierna zitten twee eGFPs die in een ander *frame* gelegen zijn dan het mRFP en elkaar. Cellen zonder functioneel TALEN die de surrgaat reporter bevatten zullen rood fluoresceren (mRFP⁺) en niet groen (eGFP⁻). (B) Een TALEN paar herkent de sequentie en zorgt voor het knippen van het DNA wat na herstelling kan resulteren in een indel. (C) De gevormde indel zorgt dat het stopcodon in een ander *frame* komt en één van beide eGFPs in *frame*, zodat de cellen zowel rood (RFP⁺) al groen (GFP⁺) zullen fluoresceren (D) Analoog als in C maar hierbij komt het andere eGFP in *frame* [127].

In de surrogate reporter werd het gewenste tussenstuk, met de TALEN herkenningssequentie, geligeerd. Bij de ontwikkeling van het tussenstuk werd gelet op het behoud van het juiste *frame*, de aanwezigheid van stopcodons en de constructie van compatibele uiteindes met de vector (EcoRI aan de 5' kant en dat van BamHI aan de 3' kant, Figuur 20c). De tussenstukken werden ontwikkeld voor de TALEN paren tegen exon 1 van LMNA en exon 1 en 2 van ZMPSTE24 en werden besteld als DNA oligo's (Biologio). Om een dubbelstrengig tussenstuk te vormen, werden de bovenste en onderste oligo samengevoegd in equimolaire concentraties. Hierna volgde een incubatie van 2 min bij 95 °C in een hitte blok waarna een langzame afkoeling werd bewerkstelligd door de hitte blok uit te schakelen en deze langzaam vanzelf te laten afkoelen.



Figuur 20: (A) Een deel van de sequentie van de surrogaat reporter. Het rode deel is het einde van de sequentie die codeert voor mRFP. De gele delen zijn herkenningssequenties van respectievelijk EcoRI en BamHI, de knippositie wordt weergegeven met een hoedje (^). Tussen deze twee delen zit een tussenstuk dat moet worden uitgeknipt om het gewenste stuk in te brengen met de TALEN herkenningssequentie. Het groene deel is het begin van de sequentie coderend voor eGFP. (B) Dezelfde sequentie na restrictie met EcoRI en BamHI. (C) De ontwikkelde tussenstukken met de compatibele uiteindes in geel die complementair zijn met de opgeknipte vector uit (B) en de TALEN herkenningssequentie in lichtblauw. De nucleotiden zonder kleur zijn toegevoegd voor het vermijden van stopcodons en het behouden van hetzelfde frame. Er werden tussenstukken ontwikkeld voor LMNA exon 1 en ZMPSTE24 exon 1 en 2.

De tussenstukken werden in de surrogaat vector gebracht met behulp van restrictie en ligatie. Een deel van de sequentie van de surrogaat reporter is te zien in Figuur 20a met een ongewenst tussenstuk dat via restrictie werd verwijderd. Dit werd gedaan op 100 ng vector met 2 µl Tango buffer, 0.5 µl EcoRI (Thermo Scientific, ER0271) en 1 µl BamHI (Thermo Scientific, ER0051) aangevuld met water tot een totaal van 10 µl. De restrictie werd uitgevoerd bij 37 °C voor 1 uur en werd geïnactiveerd voor 20 min bij 80 °C. Hierdoor werd de vector gelineariseerd zodat deze compatibele uiteindes met het gewenste tussenstuk bevat (Figuur 20b). Van dit product werd 5 µl samengevoegd met 1.675 ng van het gewenste tussenstuk (*3-fold molar excess*), 10 µl 2x T7 DNA ligase buffer, 1 µl T7 DNA ligase (New England Biolabs, M0318S) en aangevuld tot 20 µl met water. Na incubatie bij kamertemperatuur gedurende 90 min werden de vectoren getransformeerd in competente *E. coli* cellen (2.1.4). Bij het opgroeien van *E. coli* werd kanamycine (Duchefa, K0126) als antibioticum toegevoegd aangezien hiervoor een resistentiegen aanwezig is in de surrogaat reporter. De kolonie PCR werd uitgevoerd met een *forward* primer voor RFP (7.2.2, nummer 29) en de onderste oligonucleotide, gebruikt voor de constructie van het tussenstuk, als *reverse* primer. Door deze *reverse* primer te gebruiken kon er alleen een DNA fragment worden vermenigvuldigd als het overeenkomstige insert werkelijk aanwezig was in de vector. Correcte ligatie werd gecontroleerd door sequencering met primer RFP2 (7.2.2, nummer 30).

Humane cellen werden getransfecteerd met een TALEN paar en de bijhorende surrogaat reporter (2.1.2). Als negatieve controle werd de transfectie gedaan met de surrogaat reporter en de twee *backbone* plasmiden die gebruikt werden voor het ontwikkelen van het TALEN paar, maar geen herkenningssequentie bevatte. Na 24 u werden de cellen gefixeerd en gevisualiseerd waarbij de signalen voor mRFP, eGFP en DAPI werden gegenereerd en gedetecteerd met de respectievelijke filter kubus TRITC, GFP en DAPI (Tabel 2).

2.2.2 CRISPR/Cas9

Voor de ontwikkeling van de CRISPR/Cas9 systemen werd gebruik gemaakt van het protocol beschreven door Ran et al. [93]. De CRISPR sequenties werden ontworpen met behulp van een CRISPR *design tool* ontwikkeld door het Zhang lab¹⁸. Er werden twee CRISPR/Cas9 systemen ontwikkeld voor het eerste exon van LMNA en voor ZMPSTE24 werd voor het eerste exon één systeem ontwikkeld net als voor het tweede exon. De gekozen sequenties zijn weergegeven in Figuur 21.

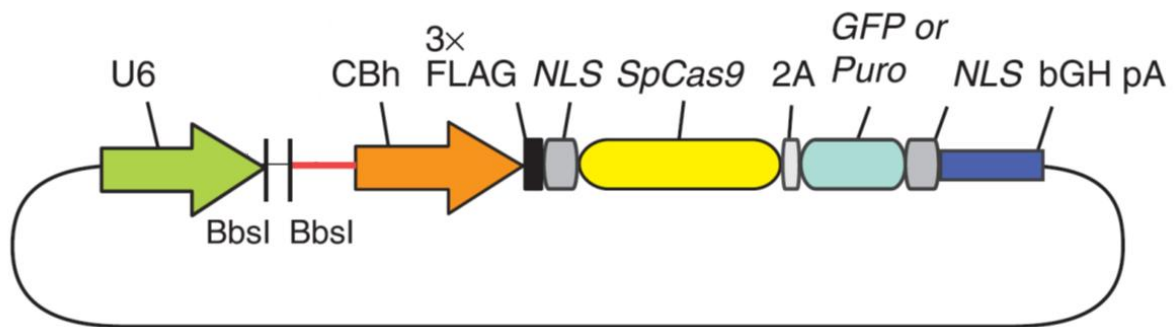
	Sequentie	Positie
LMNA ex1a	5' - CCTTCGCATCACCGAGTCTGAAG - 3' 3' - GGAAGCGTAGTGGCTCAGACTTC - 5'	180-202
LMNA ex1b	5' - CCGGCATCAAGGCCGCCTACGAG - 3' 3' - GGCCGTAGTTCGGCGGATGCTC - 5'	224-246
ZMPSTE ex1	5' - GGCCGAGAAGCGTATCTTCGGGG - 3' 3' - CCGGCTCTTCGCATAGAAGCCCC - 5'	42-64
ZMSPTE ex2	5' - ACTCATGTACCACCGGAGTTAGG - 3' 3' - TGAGTACATGGTGGCCTCAATCC - 5'	145-164

Figuur 21: Sequenties die worden herkend door de ontworpen CRISPR/Cas9 systemen met in het grijs de PAM sequentie, de knippositie als een verticale lijn en hun positie in de coderende sequentie van ZMPSTE24 (bijlage 7.3).

Voor het construeren van de CRISPR/Cas9 systemen moest de DNA sequentie, resulterend in het crRNA, worden geligeerd in de juiste vector. Hiervoor werd een DNA insert, gegenereerd uit twee oligonucleotiden, geligeerd in de gewenste vector. Dit werd uitgevoerd zoals beschreven in het protocol [93] waarbij elke sequentie werd geligeerd in twee verschillende vectoren. Beide vectoren bevatten dezelfde noodzakelijke elementen: een promotor voor het crRNA, een promotor voor het Cas9 eiwit en een NLS voor translocatie tot in de kern. De eerste vector bevatte hiernaast een extra sequentie voor eGFP expressie (Addgene, 48138) en de tweede een puromycine resistentiegen (Addgene, 48139). De expressie van eGFP geeft een visuele indicatie van de transfectie efficiëntie en laat de aanrijking van getransfecteerde cellen toe met behulp van FACS. Het puromycine resistentiegen laat eveneens aanrijking toe door de cellen op te groeien in medium met 3 µg/ml puromycine¹⁹ (Sigma-Aldrich, P9620) waardoor enkel de getransfecteerde cellen overblijven.

¹⁸ <http://crispr.mit.edu/>

¹⁹ Deze concentratie kan verschillen tussen celtypes. 3 µg/µl was de optimale concentratie voor HEK 293T cellen.



Figuur 22: De algemene structuur van een CRISPR/Cas9 plasmide. De U6 promotor staat in voor de expressie van het gids RNA waarvan het specifieke crRNA in de vector kan worden geligeerd na BbsI restrictie. Na de tweede BbsI herkenningsequentie zit de rest van het guide RNA met het tracrRNA. Na een tweede promotor, CBh promotor, zit een *flag* voor expressiecontrole van het Cas9 eiwit met behulp van antilichamen. Een NLS wordt gevolgd door het Cas9 eiwit uit *S. pyogenes* (SpCas9). Een 2A linker zorgt voor de connectie van het Cas9 eiwit met de puromycine resistentie of een GFP eiwit. Hierna is eveneens een NLS aanwezig en een polyadenylatie signaal van het *bovine growth hormone* (bGH).²⁰

Het plasmide, met daarin de gewenste herkenningsequentie, werd getransformeerd in *E. coli* en een kolonie PCR werd uitgevoerd om de aanwezigheid van het plasmide te controleren. Hiervoor werd een *forward* primer voor de U6 promotor (7.2.2 nummer 31) gebruikt en als *reverse* primer de onderste oligonucleotide van het insert (een analoog principe als bij de surrogaat reporter). Juiste ligatie werd verzekerd door sequencing met de U6 primer. De CRISPR/Cas9 systemen werden gecontroleerd met behulp van HRM-analyse (2.2.1.3.2), sequencing (2.1.5) en immunokleuring (2.1.7).

Bij het gebruik van het plasmide met de puromycine resistentie werd 24 u na transfectie van HEK 293T cellen het gewone medium vervangen door medium met 3 µg/ml puromycine. Hierna volgde een incubatie van 72 u waarna, voor HRM-analyse en sequencing, het DNA van de cellen werd geëxtraheerd met behulp van de DNeasy DNA extractie methode. Als negatieve controle werd het plasmide gebruikt waarvan werd vertrokken zonder een toegevoegd insert (Figuur 22). Voor sequencing werd telkens het exon, waarop het CRISPR/Cas9 systeem inwerkt, vermenigvuldigd met PCR en opgestuurd voor sequencing met de forward primer (2.1.5).

Voor de immunokleuring werden twee primaire antilichamen gebruikt. Een eerste voor de herkenning van lamine A en C (Lamin A/C mouse, 1/200, Cell Signaling-4777S) en een tweede specifiek voor prelamine A (Lamin A (C-20) goat, 1/150, Santa Cruz-sc6214). De gebruikte secundaire antilichamen waren Donkey Anti-mouse Fab (Dylight 488 green, 1/300, Jackson-715486150) en Donkey Anti-goat Fab (Dylight 649 deep red, 1/300, Jackson-705496147). Deze werden gevisualiseerd met respectievelijk de instellingen voor GFP en CY5 visualisatie (Tabel 2). Hierbij verwacht men dat bij cellen, behandeld met een CRIPR/Cas9 construct tegen LMNA, geen binding meer kan plaatsvinden van het antilichaam tegen lamine A en C. Bij het gebruik van een construct tegen ZMPSTE24 verwacht men, door de uitschakeling van dit gen, de vorming van prelamine A waartegen het respectievelijke antilichaam kan binden. De immunokleuring werd uitgevoerd op cellen aangerijkt met puromycine, na de behandeling met het tweede construct tegen LMNA en het construct tegen ZMPSTE exon 2.

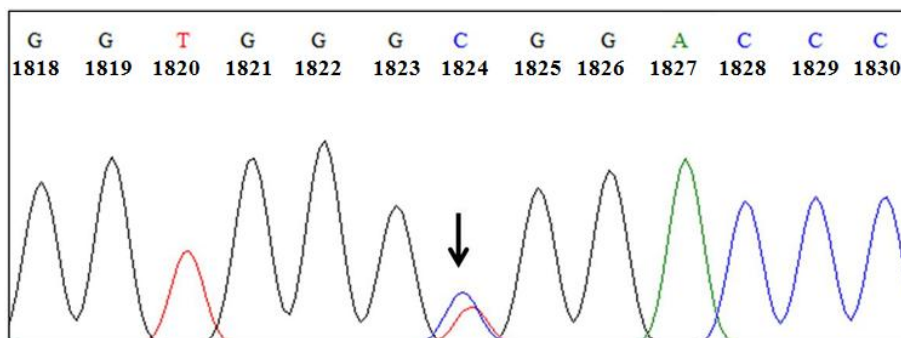
²⁰ De U6 promotor is een RNA polymerase III promotor. De CBh promotor is een CBA (chicken beta actine) hybrid intron promotor [146]. De 2A linker is afkomstig van het *foot-and-mouth disease virus* 2A of een variant van deze sequentie [147].

3 Resultaten

3.1 Genomische sequenties

Om het voorkomen van SNPs in het DNA van de cellen in vergelijking met de referentiesequenties na te gaan werden deze gesequeneerd. De bepaalde sequenties van de eerste exonen voor LMNA en ZMPSTE24 bleken voor beide genen hetzelfde te zijn voor de HEK 293T en NHDF cellen alsook voor de referentie sequenties op NCBI (2.2.1.1). Als voorbeeld zit het alignment van het eerste exon van ZMPSTE24 voor HEK 293T, NHDF en de referentiesequentie in bijlage 7.2.2. Naast de alignmentdata werd ook gekeken naar de ruwe sequentiedata (Figuur 23), om te controleren of eventuele sequenceringsfouten waren opgetreden.

Aangezien HGPS DNA werd gebruikt als controle in het T7 assay en de HRM-analyse werd de omgeving van de mutatiepositie (c.1824C>T) gesequeneerd. In exon 11 van de HGPS cellen was de verwachte heterozygote mutatie te zien wanneer men kijkt naar de sequenceringsdata. Hier zijn twee pieken te zien op de positie waar de heterozygote mutatie zich bevindt, de blauwe piek voor het cytosine op het ongewijzigde allel en de rode piek voor het thymine op het gemuteerde allel.



Figuur 23: Sequenceringsdata van exon 11 uit NHDF cellen met HGPS ter hoogte van de mutatiepositie (c.1824C>T) die te zien is als twee pieken op dezelfde positie. De blauwe piek stelt het signaal voor van de aanwezige cytosine, de rode piek toont de thymine aanwezig bij de mutatie.

3.2 TALEN ontwikkeling

De TALEN vectoren werden ontwikkeld zoals beschreven in Sanjana et al. (2.2.1) [92]. Op verschillende momenten in het protocol waren controles mogelijk met behulp van gelelektroforese. Er werd enkel verder gewerkt met deze constructen die de gewenste resultaten vertoonden. De constructen die het einde van de rit haalden zijn het eerste construct tegen LMNA exon 1, het tweede construct tegen ZMPSTE24 exon 1 en het construct tegen ZMPSTE24 exon 2 (Figuur 14).

3.2.1 Monomeer bibliotheek

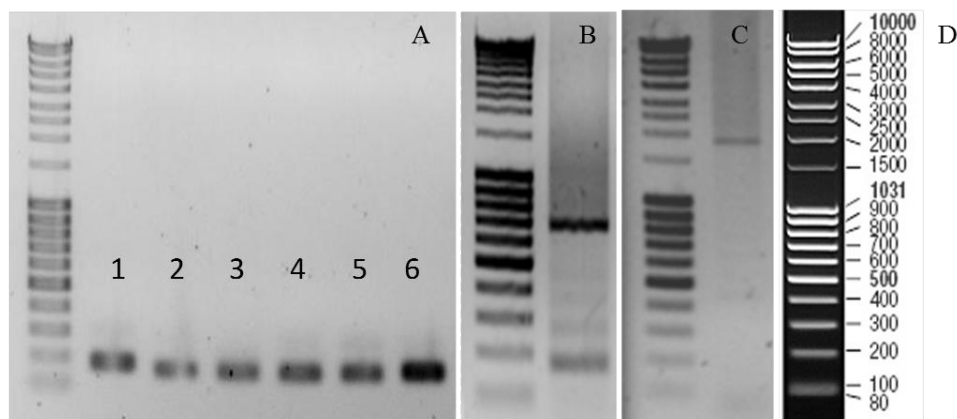
De lengte van de monomeren in de bibliotheek werd gecontroleerd door gelelektroforese. Voor de monomeren met posities 1, 6, 7, 12, 13 en 18 in het uitendelijke TALEN, waren de gewenste bandjes 170 bp in lengte, voor de andere posities was 150 bp de voorspelde lengte. Een voorbeeld van de eerste 6 posities wordt gegeven in Figuur 24a.

3.2.2 Hexameren

Na de eerste Golden Gate reactie werden de gevormde hexameren vermenigvuldigd met PCR en gecontroleerd met behulp van gelelektroforese. Hierbij werden bandjes verwacht van 700 bp (Figuur 24, één monomeer = 34 AZ = 102 bp, één hexameer = 612 + de lengte van de primers). Naast controle is deze gelelektroforese ook een zuiveringstechniek om het DNA fragment met juiste lengte te extraheren.

3.2.3 Kolonie PCR

Nadat het volledig TALEN was gemaakt en getransformeerd naar *E. coli*, werd een kolonie PCR uitgevoerd op de gevormde kolonies. Hierbij werd gecontroleerd of de drie hexameren effectief in het plasmide waren ingebouwd. De gebruikte primers binden net voor de eerste monomeer en net achter de laatste halve monomeer. Na amplificatie moet dit leiden tot een fragment van 2175 bp wat bevestigd werd via gelelektroforese (Figuur 24c).



Figuur 24 : Resultaat na gelelektroforese (A) DNA fragmenten van de monomeer bibliotheek waarbij het eerste en zesde fragment een lengte hebben van 170 bp en de rest een lengte van 150 bp (B) De gevormde hexameren na PCR met een fragment van 700 bp. (C) De kolonie PCR toont een fragment van 2175 bp (D) DNA ladder gebruikt in de eerder vermelde figuurdelen, de aanduidingen geven de lengte van de DNA fragmenten in bp.

3.3 TALEN controle

3.3.1 Sequenceringsresultaten

De kolonies die een DNA fragment met de correcte lengte toonden, werden opgestuurd voor sequenceringsresultaten (2.1.5). De resultaten werden vergeleken met sequenties bekomen via de TALEffector tool²¹, waarbij voor een gegeven nucleotide doelsequentie (20 nucleotiden) de juiste TALEN sequentie (102 nucleotiden per herkende nucleotide) wordt gegeven. De nulpositie van de referentiesequentie kwam overeen met positie 2113 van de vector sequentie op Addgene²².

De sequenceringsresultaten toonden vaak onverwachte SNPs er ontbraken zelfs stukken DNA. Hierdoor moesten meerdere kolonies getest worden vooraleer een correct construct bekomen werd (Tabel 7). Uiteindelijk werden drie TALEN paren bekomen: een volledig foutloos TALEN paar tegen exon 1 van LMNA, een TALEN paar tegen exon 1 van ZMPSTE24 waarvan de *forward* TALEN foutloos is en de *reverse* twee SNPs heeft, en een TALEN paar tegen exon 2 van ZMPSTE24 waarbij

²¹ <http://taleffectors.genome-engineering.org/tools/>

²² <http://www.addgene.org/browse/sequence/37604/>

twee *forward* TALENs met elk één SNP gecombineerd werden met één *reverse* TALEN die twee SNPs bevat. Hoewel de SNPs steeds zorgen voor een AZ verandering, zijn ze niet gelegen in de RVD sequentie die zorgt voor specifieke herkenning van het DNA. In Tabel 7 wordt de positie van de SNPs, weergegeven ten opzichte van de referentie samen met de AZ substitutie die het gevolg was van de mutatie.

Tabel 7: Informatie over de TALEN paren die verder werden getest. Het aantal fouten, indien aanwezig, de positie en de resulterende AZ substitutie worden weergegeven. De laatste kolom vermeldt het aantal kolonies getest tot dit TALEN werd bekomen.

Naam	Aantal fouten	Positie	Gewenste AZ	Aanwezig AZ	Aantal kolonies
LMNA ex1 F	0				10
LMNA ex1 R	0				5
ZMPSTE ex 1 F	0				5
ZMPSTE ex 1 R	2	660	glutamine	histidine	13
		2100	glutamine	lysine	
ZMPSTE ex2 Fa	1	2068	glutamine	glycine	1
ZMPSTE ex2 Fb	1	847	glutamine	lysine	1
ZMPSTE ex2 R	2	1451	threonine	serine	
		1659	glutaminezuur	glycine	2

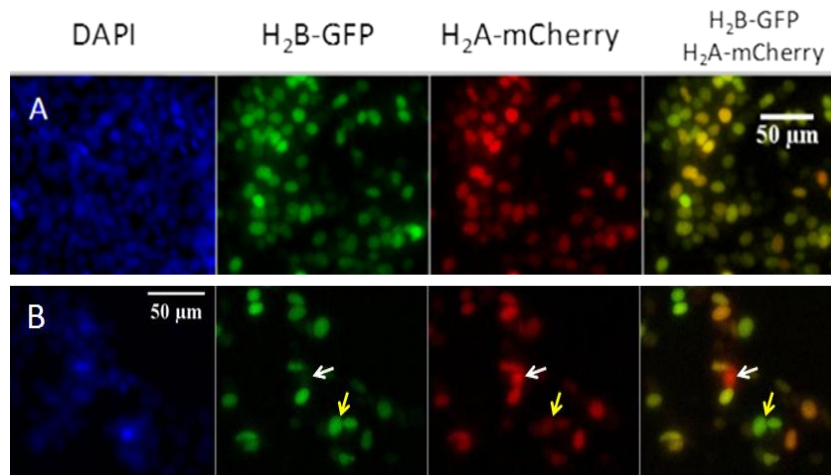
3.3.2 Transfectie efficiëntie

Om de TALEN paren te controleren werden de *forward* en *reverse* TALEN samen in HEK 293T cellen getransfecteerd (cotransfectie). Deze cellen zijn gekend voor een goede transfectie efficiëntie en zijn dus ideaal om de TALEN vectoren te testen [128] [106] [129]. Om de cotransfectie efficiëntie na te gaan werd gebruik gemaakt van twee plasmiden die coderen voor twee verschillende histonproteïnen gekoppeld aan een fluorescent proteïne, H2B-GFP en H2A-mCherry. Om alle cellen te visualiseren werd gebruik gemaakt van een DAPI-kleuring, de fluorescentie van de twee histoneiwitten werden gevisualiseerd met respectievelijk de instellingen voor GFP en TRITC visualisatie (Tabel 2). In

Figuur 25a is te zien dat bijna alle cellen die getransfecteerd werden met H2B-GFP ook getransfecteerd waren met H2A-mCherry. Er waren verschillende cellen die enkel getransfecteerd waren met H2B-GFP en een laag aantal cellen die enkel met H2A-mCherry waren getransfecteerd (

Figuur 25b). De transfectie met de individuele constructen bevestigde dat het hier niet om *bleed-through*²³ van de kanalen ging maar daadwerkelijk om dubbeltransfectanten. Er werden vier herhalingen uitgevoerd waarvan de cellen manueel werden geteld. Hieruit werd een gemiddelde cotransfectie efficiënte bekomen van 34%.

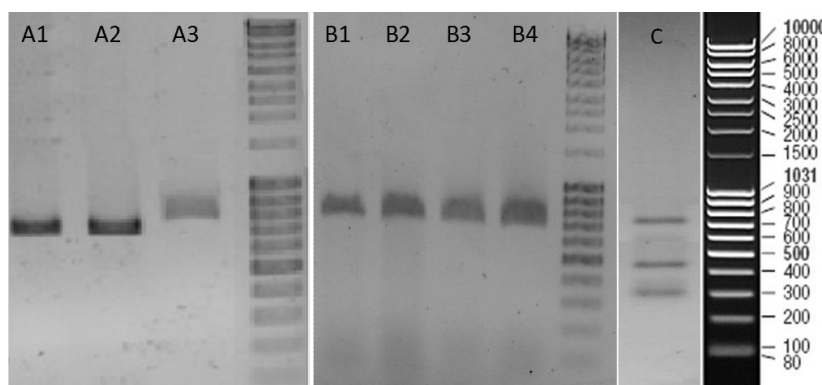
²³ Bij bleed-through ontstaat wanneer het emissiespectrum van de ene fluorofoor overlapt met dit van een tweede fluorofoor en zo ook wordt gedetecteerd in het kanaal specifiek voor de laatste fluorofoor.



Figuur 25: Resultaat van de transfectie efficiëntie test. In blauw wordt de DAPI kleuring weergegeven, in groen de cellen getransfecteerd met H2B-GFP en in rood de cellen getransfecteerd met H2A-mCherry. De laatste kolom geeft het samengevoegde beeld van de twee vorige waarbij gele cellen een cotransfectie hebben ondergaan (A) Een algemeen beeld van de transfectie efficiëntie (B) Weergave van een cel die niet werd getransfecteerd door H2B-GFP maar wel door H2A-mCherry (witte pijl) en andersom (geel).

3.3.3 T7 endonuclease

Om het T7 endonuclease assay te valideren werd DNA van HGPS cellen onderworpen aan twee verschillende protocols (2.2.1.3.1). Geen van beide protocols (Figuur 26a, b) resulteerde echter in de verwachte twee kleinere DNA fragmenten van 304 en 428 bp (Figuur 26c) waardoor niet verder werd gegaan met deze methode.



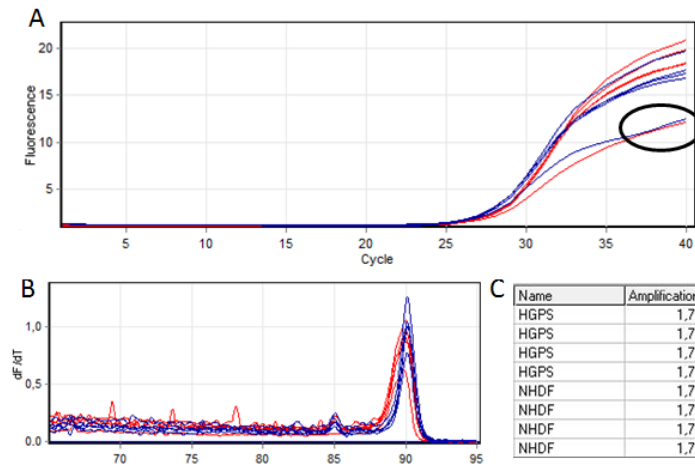
Figuur 26: Resultaten van de T7 endonuclease assay (A) volgens protocol 1 en (B) volgens protocol 2. (A1) PCR product voor heteroduplexvorming (A2) Product na heteroduplex vorming (A3) Product na heteroduplex vorming en T7 endonuclease behandeling. (B1) Product na heteroduplexvorming en T7 endonuclease behandeling vertrekkende van 200 ng PCR product (B2) Analoog maar met 300 ng PCR product (B3) Product (200ng) na heteroduplexvorming (B4) Analoog voor 300 ng PCR product (C) Verwachte resultaat na de T7 behandeling met het oorspronkelijke fragment bij 731 bp en de twee gevormde fragmenten van 428 en 303 bp.

3.3.4 HRM-analyse

DNA van HEK 293T cellen getransfecteerd met de TALEN vectoren werd na 24 u geëxtraheerd en geanalyseerd met behulp van een HRM-analyse. Hierbij werden met TALEN behandelde cellen vergeleken met onbehandelde cellen blootgesteld aan dezelfde condities. Als positieve controle werd exon 11 van NHDF cellen met de HGPS mutatie²⁴ vergeleken met normale NHDF cellen. De analyse werd uitgevoerd zoals beschreven in de handleiding van Rotor gene Q. De belangrijkste stappen

²⁴ In dit exon zit de mutatie van HGPS.

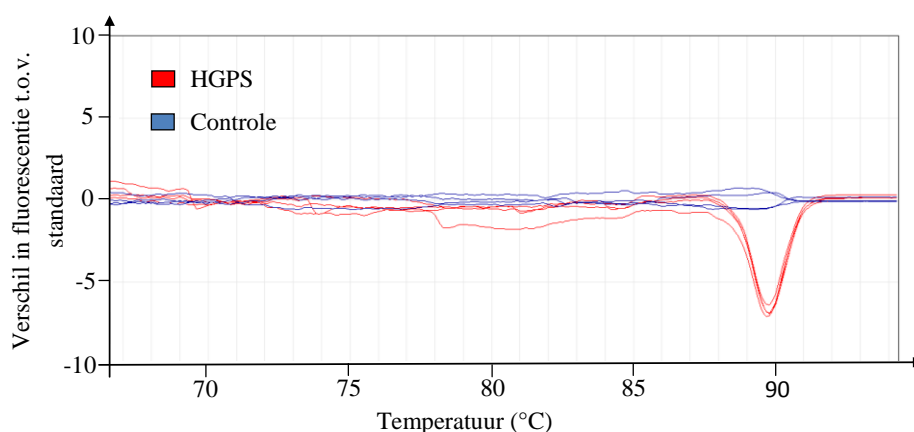
hierbij zijn het controleren of alle stalen werden vermenigvuldigd tot eenzelfde niveau en verwijderen van stalen die niet goed werden geamplificeerd (Figuur 27a). Ook werd gekeken of de smeltcurve maar één piek toonde wat één enkel gevormd product impliceert (Figuur 27b) en of de efficiënte van de amplificatie tussen de stalen boven 1.4 lag (Figuur 27c).



Figuur 27: Een overzicht van de verschillende stappen voor de HRM-analyse toegepast op een sequentie van exon 11 in NHDF (blauw) en HGPS (rood) cellen. (A) Algemeen resultaat na qPCR waarbij het aantal cycli wordt weergegeven op de x-as en het fluorescentie signaal op de y-as. Hierbij werden de twee onderste stalen uit de data verwijderd wegens onvoldoende vermenigvuldiging. (B) De smeltcurve van de verschillende stalen toont één duidelijke piek wat duidt op één PCR product. Op de x-as staat de temperatuur en op de y-as de eerste afgeleide van de fluorescentie naar de temperatuur. (C) De efficiëntie van de reactie wordt weergegeven op een schaal van 0 tot 2 (amplification). Alle waarden boven 1.4 zijn in orde.

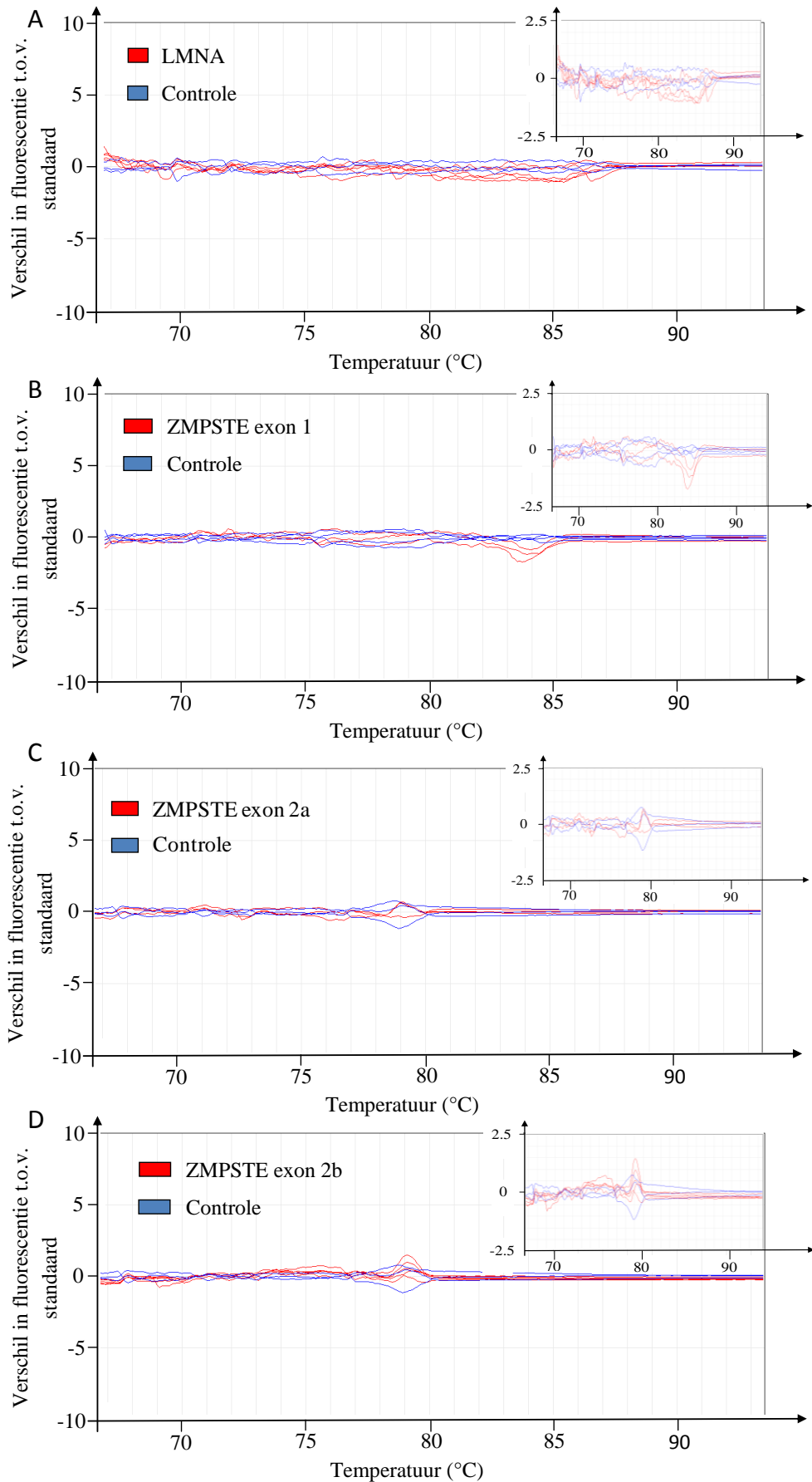
De resultaten worden weergegeven met behulp van een verschilgrafiek (*difference plot*). Deze geeft het verschil in fluorescentie van de behandelde stalen weer ten opzichte van het gemiddelde van de geselecteerde referentiestalen, na normalisatie. De resultaten van de geamplificeerde exon 11 sequentie van HGPS ten opzichte van deze van NHDF cellen zijn weergegeven in

Figuur 28 en deze van de verschillende TALEN paren in Figuur 29.



Figuur 28: HRM-analyse van HGPS (rood) en NHDF (blauw) DNA weergegeven als een verschil grafiek.

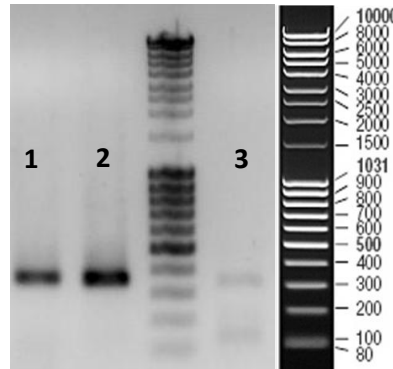
Bij de cellen met HGPS mutatie is een duidelijk verschil te zien in vergelijking met de controle. Bij HRM-analyse van HEK 293T cellen die met TALEN vectoren werden getransfecteerd (Figuur 29) is het verschil met de controle veel minder prominent.



Figuur 29: Resultaten van de HRM-analyse in HEK 293T cellen. Controles worden weergegeven in blauw en behandelde stalen in rood. Verschil grafiek ten opzichte van de controle van (A) LMNA exon 1 (B) ZMPSTE24 exon 1 (C) ZMPSTE24 exon 2 met de eerste *forward* TALEN (D) ZMPSTE24 exon 2 met de tweede *forward* TALEN. In de rechter bovenhoek is steeds een kleinere grafiek met de schaal van de y-as tussen 2.5 en -2.5 te zien.

3.3.5 Surrogaat reporter

De ligatie van het correct insert in de surrogaat reporter werd bevestigd met kolonie PCR (Figuur 30). Als controle werd de surrogaat reporter voor LMNA exon 1 vermenigvuldigd met het *reverse* oligonucleotide van ZMPSTE24 exon 2. Hierbij zou geen DNA fragment te zien mogen zijn aangezien het oligonucleotide specifiek is voor het ZMPSTE24 insert. Het lichte DNA fragment dat te zien is (Figuur 30, nummer 3), kan verklaard worden door de grote lengte van de oligonucleotide, wat niet ideaal is voor een primer en resulteert in aspecificiteit door de hoge smelttemperatuur. Er is echter duidelijk verschil te zien tussen de positieve DNA fragmenten komende van de surrogaat reporter met het ZMPSTE 24 insert en dit van het LMNA insert.



Figuur 30: Resultaat van gelelektroforese na de kolonie PCR voor de surrogaat reporter van ZMPSTE24 exon 2. Fragmenten 1 en 2 tonen de correct geamplificeerde DNA fragmenten. Fragment 3 is PCR product komende van de surrogaat reporter voor LMNA exon 1 maar geamplificeerd met de *reverse* oligonucleotide van ZMPSTE24 exon 2.

Voor het gebruik van de surrogaat reporter werd de correcte ligatie van het tussenstuk gecontroleerd via sequencering. De gesequeneerde vector voor LMNA exon 1 is te zien in Figuur 31 waar de sequentie wordt vergeleken met de referentiesequentie die de gewenste delen bevat. Hieruit bleek de ligatie succesvol te zijn vermits de sequenties overeenkomen. Gelijkaardige resultaten werden bekomen voor de andere twee ontwikkelde vectoren.

```

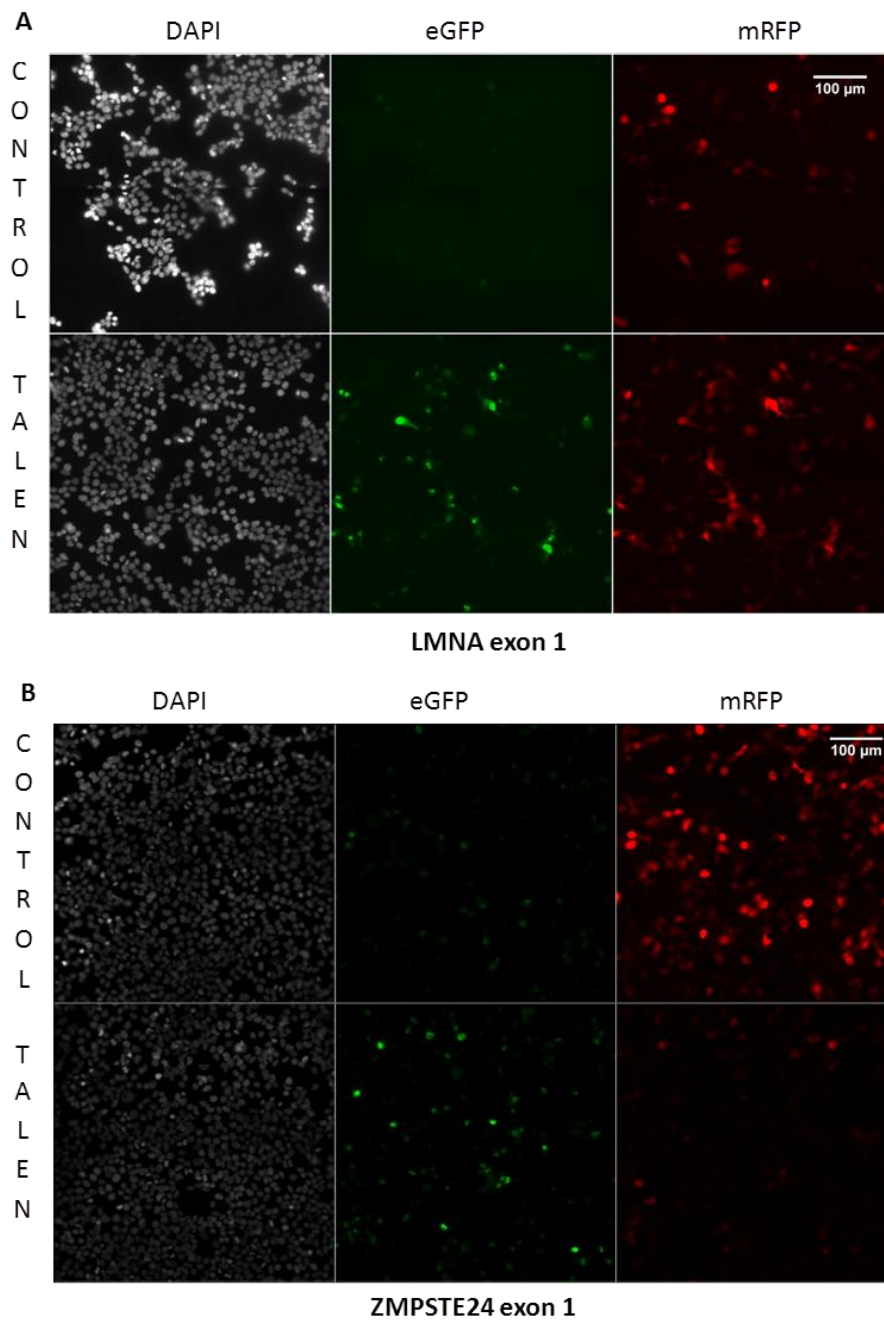
Referentie      5' -ggccgccactccaccggcgccgaattcggTCACCCGGCTGCAGGAGAAGgaggacctgca-3'
LMNA exon1     3' -GGCCGCCACTCCACCGGCGCCGAATTCGGTCACCCGGCTGCAGGAGAAGGAGGACCTGCA-5'
                *****

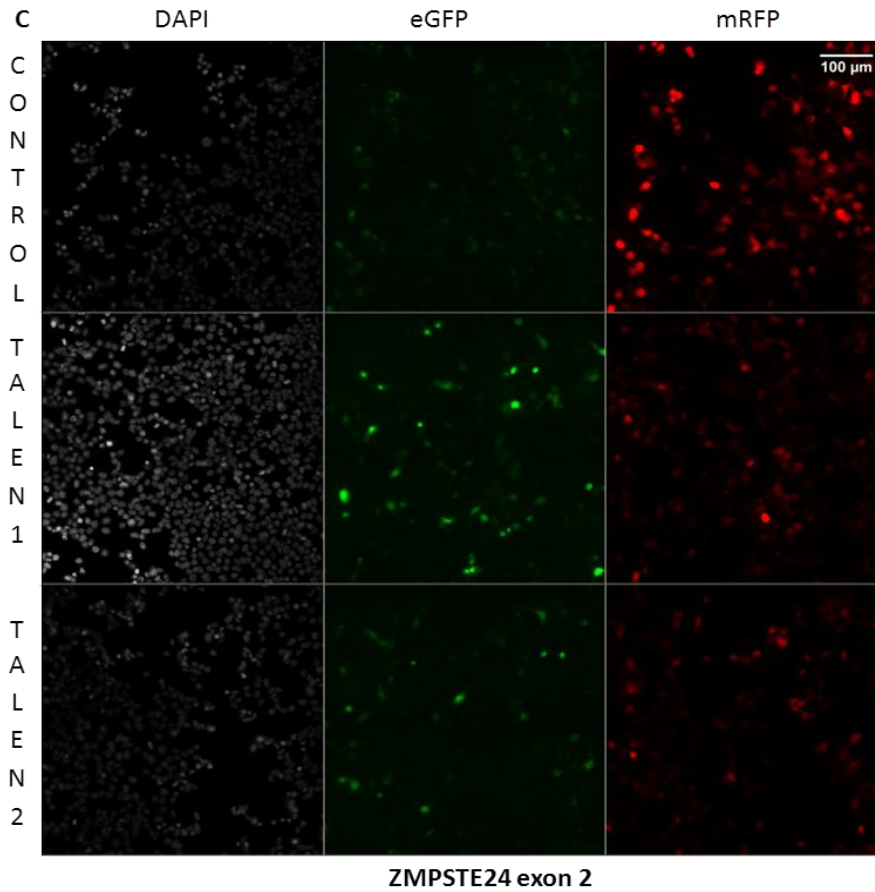
Referentie      5' -ggagctcaATGATCGCTTGGCGGTCTAcggatccagtgagcaagggcgaggagctgttca-3'
LMNA exon 1    3' -GGAGCTCAATGATCGCTTGGCGGTCTACGGATCCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA-5'
                *****
  
```

Figuur 31: Een vergelijking van de referentiesequentie van de surrogaat reporter met de resultaten van de sequencering van de gemaakte surrogaat reporter voor exon 1 van LMNA. In de referentiesequentie is in rood het einde van de RFP sequentie aangeduid, in geel de herkenningssequenties van respectievelijk EcoRI en BamHI, lichtblauw gemarkeerd ziet men de sequentie herkend door het TALEN paar en de groene letters geven het begin aan van de eGFP sequentie. De hoofdletters, in het lichtblauwe deel, zijn de delen herkend door de *forward* en *reverse* TALEN. Het deel tussenin in kleine letters is de *spacer*. Sterretjes duiden op overeenkomende nucleotiden.

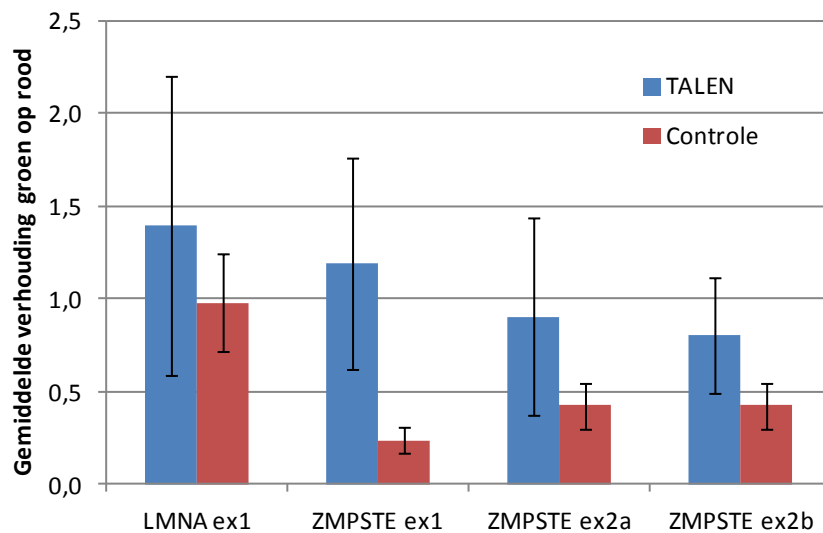
De correcte plasmiden werden gebruikt voor transfectie in HEK 293T cellen samen met het TALEN paar (Figuur 31). Cellen getransfecteerd met de TALEN vectoren vertoonden een duidelijk groen signaal wat duidt op TALEN activiteit. In de negatieve controle is ook een zwak signaal te zien, wat kan verklaard worden door *bleed-through* van de sterke mRFP signalen in het GFP kanaal en autofluorescentie. Dit is echter verwaarloosbaar in vergelijking met het specifieke eGFP signaal.

Van alle getransfecteerde (rode) cellen op deze beelden werd de verhouding van de intensiteit van het groene signaal ten opzichte van de intensiteit in het rode signaal bepaald. Van deze verhoudingen werd per beeld het gemiddelde en de standaardafwijking bepaald (Figuur 33).





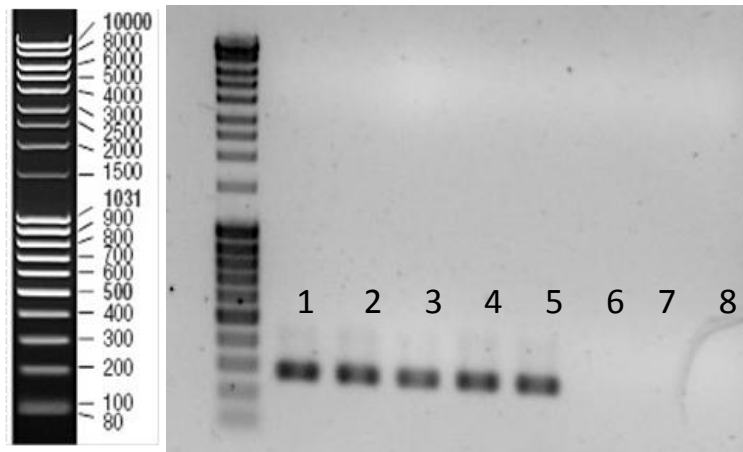
Figuur 32: Resultaat van het experiment met de surrogaat reporter voor de TALEN constructen tegen (A) LMNA exon1 en de controle (B) ZMPSTE24 exon 1 en de controle (C) ZMPSTE24 exon 1 met de eerste *forward*, de tweede *forward* en de controle. De kolommen vertonen respectievelijk DAPI, eGFP en mRFP.



Figuur 33: De gemiddelde verhouding, met standaardafwijking, van het groene op het rode signaal per TALEN paar.

3.4 CRISPR/Cas9 systemen

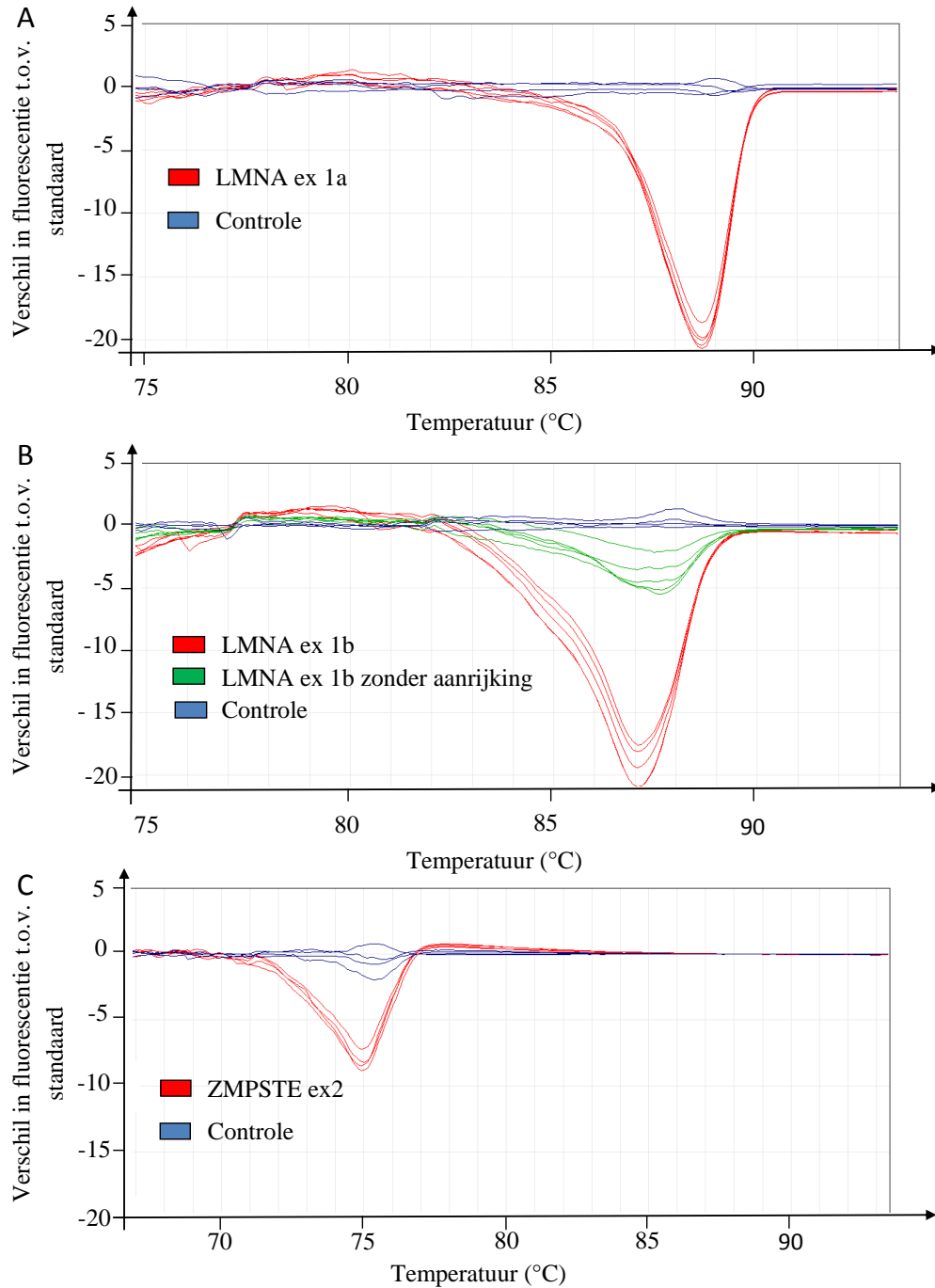
Net als bij de surrogaat reporter werd de ligatie van de herkenningsequentie in het CRISPR/Cas9 plasmide gecontroleerd met kolonie PCR. In Figuur 34 zijn de eerste vijf DNA fragmenten van gemaakte CRISPR/Cas9 plasmiden vermenigvuldigd met de overeenkomstige oligonucleotiden. Reactie 6, 7 en 8 zijn het resultaat van controles waarbij een oligonucleotide werd gebruikt niet overeenkomstig met het ingevoegde insert. De afwezigheid van DNA fragmenten toont aan dat de oligonucleotiden zeer specifiek als primer werken en enkel DNA zullen vermenigvuldigen als het correcte insert aanwezig is.



Figuur 34: Resultaat van de gelelektroforese na kolonie PCR bij de aanmaak van de CRISPR/Cas9 plasmiden. 1 tot en met 5 zijn het resultaat van PCR met de juiste oligonucleotide voor het juiste plasmide. In reactie 6 tot en met 8 werd een oligonucleotide overeenkomstig met een andere CRISPR/Cas9 herkenningsequentie gebruikt als negatieve controle.

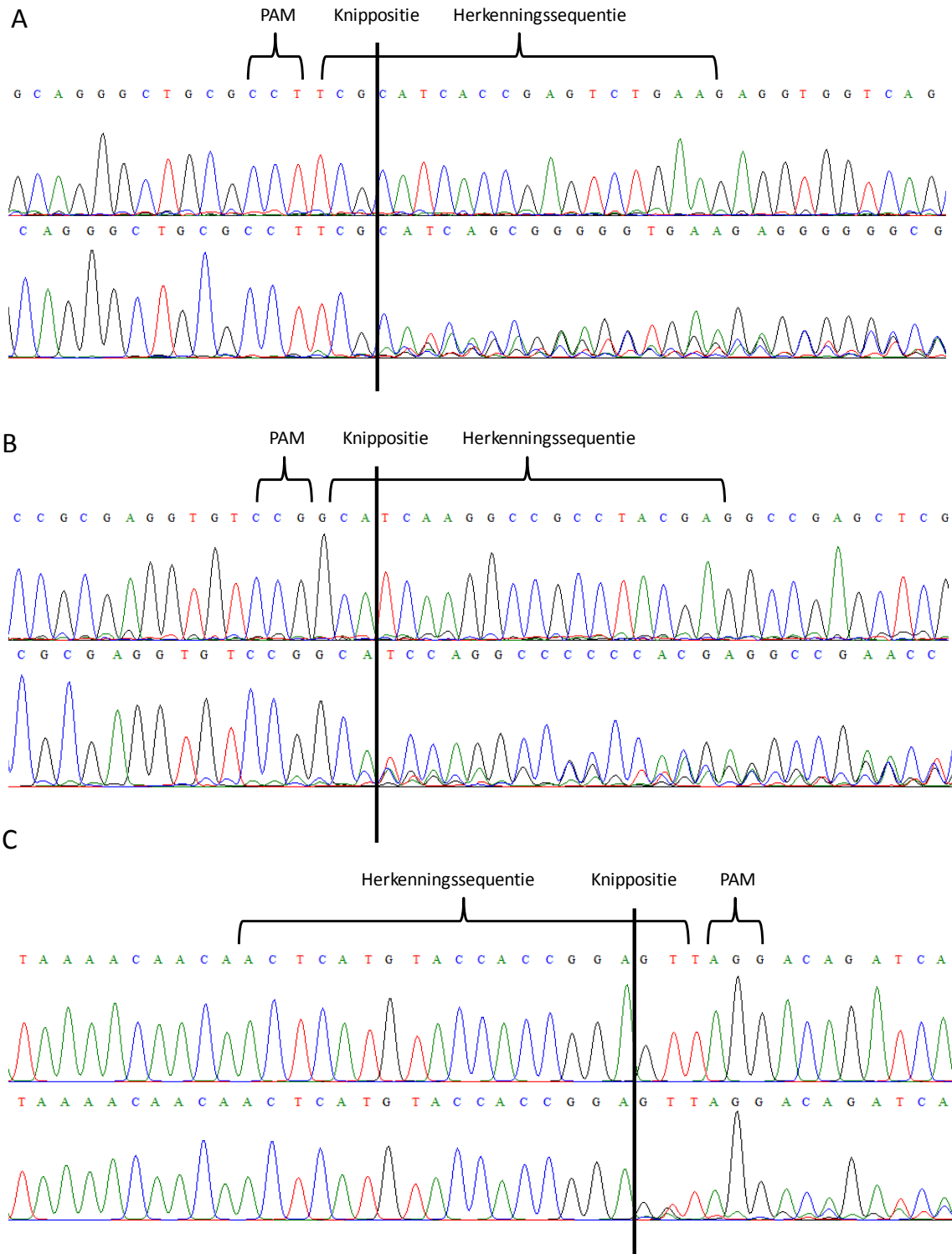
De CRISPR/Cas9 plasmiden die de juiste DNA fragmenten toonden bij de kolonie PCR werden opgestuurd voor sequencerig. Hierbij waren alle opgestuurde producten correct voor zowel de vector met GFP sequentie als de vector met het puromycine resistentiegen. Er moesten dus geen nieuwe kolonies worden nagekeken, wat wel het geval was bij de TALENs.

Om te controleren of de CRISPR/Cas9 systemen werkten werd een HRM-analyse uitgevoerd die op gelijkaardige wijze werd geanalyseerd als bij de TALEN controle (Figuur 35). Hierbij werd echter eerst een aanrijking gedaan van de getransfecteerde HEK 293T cellen met behulp van een puromycine behandeling. Bij alle stalen is een duidelijk verschil te zien ten opzichte van de controle hoewel het voor het construct tegen ZMPSTE24 exon 2 minder uitgesproken is. Er wordt eveneens, voor het tweede construct van LMNA, een niet aangerijkt staal gevisualiseerd. Hierbij is het verschil met de controle veel minder dan bij de cellen die een aanrijking hebben ondergaan.



Figuur 35: Resultaat van de HRM-analyse op HEK 293T cellen voor de CRISPR/Cas9 construct waarbij de controle stalen worden weergegeven in blauw en de behandelde stalen in het rood. (A) Het eerste construct tegen LMNA exon 1 (B) Het tweede construct tegen LMNA exon 1 waarbij het aangerijkte (rood) en niet aangerijkt (groen) staal wordt getoond (C) Het systeem voor exon twee van ZMPSTE24.

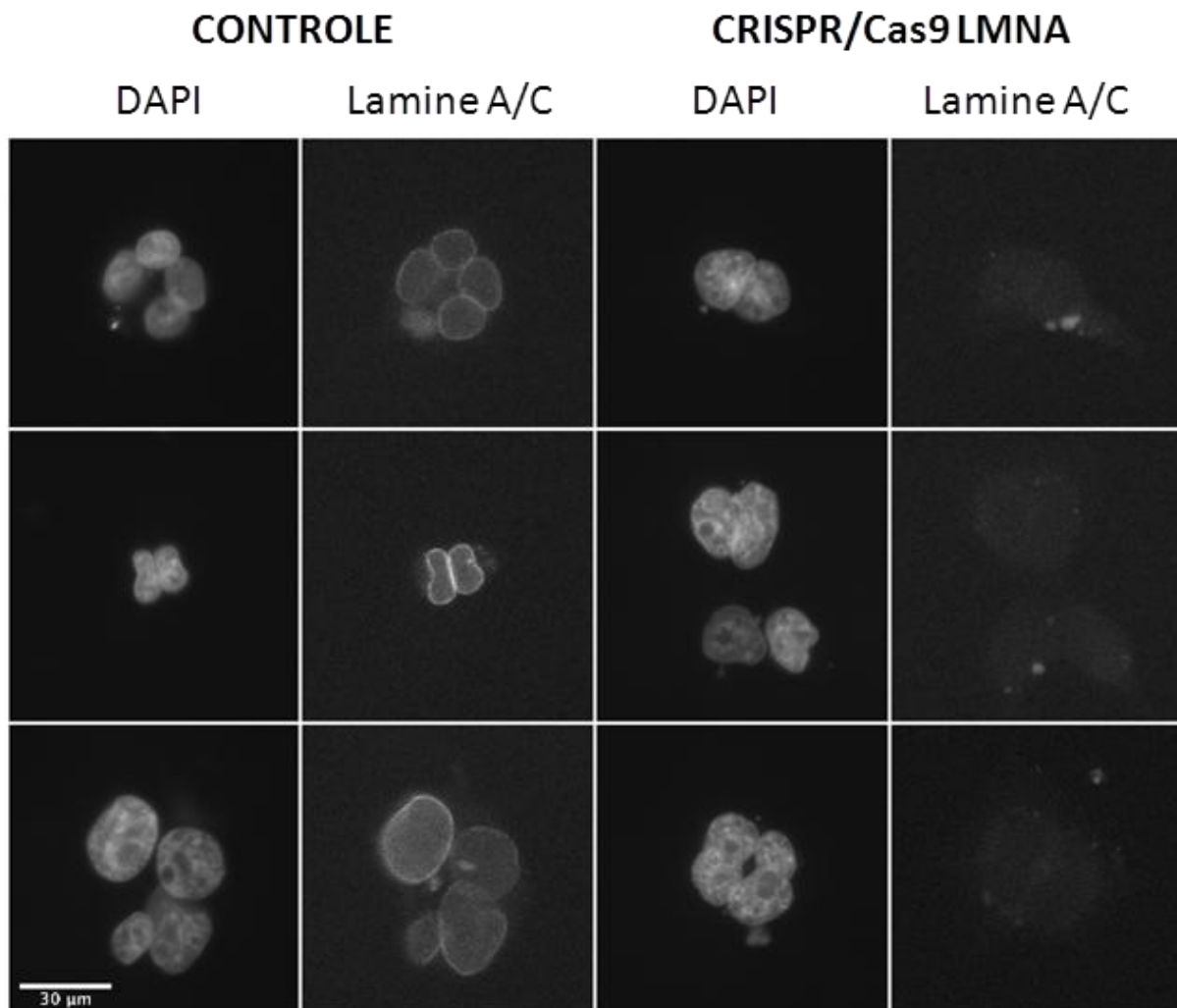
De stalen gebruikt voor HRM-analyse werden ook gebruikt voor sequencerings na het vermenigvuldigen van het gewenste exon met PCR. In de sequenceringsdata (Figuur 36) kan men zien dat na de knippositie het piekenpatroon in de behandelde stalen (onderste grafiek) onduidelijk wordt terwijl dit in de controle (bovenste grafiek) niet zo is.



Figuur 36: Data van gesequeneerde HEK 293T cellen die werden behandeld met CRISPR/Cas9 systemen, weergegeven in Bioedit. De bovenste grafiek toont de controle waarbij het DNA afkomstig is van cellen getransfecteerd met een leeg CRISPR/Cas9 plasmide. De onderste grafiek toont DNA afkomstig van cellen getransfecteerd met een CRISPR/Cas9 systeem (A) LMNA 1 (B) LMNA 2 (C) ZMPSTE24 2. Per CRISPR/Cas9 systeem zijn de herkenningsequentie, knippositie en PAM sequentie weergegeven.

Er werd ook een immunokleuring gedaan van lamine A/C in HEK 293T cellen, getransfecteerd met het tweede CRISPR/Cas9 construct tegen LMNA exon 1 en een tweede immunokleuring voor prelamine A in HEK 293T cellen getransfecteerd met het construct tegen ZMPSTE24 exon 2. Er werd

telkens gebruik gemaakt van het construct met de puromycine resistentiemarker gevolgd door een aanrijking van drie dagen. In de cellen getransfecteerd met het construct tegen ZMPSTE24 exon 2 was geen prelamine A te zien. In alle cellen getransfecteerd met het construct tegen LMNA was het lamine A signaal duidelijk verminderd ten opzichte van controlecellen, getransfecteerd met een leeg CRISPR/Cas9 construct (Figuur 37).



Figuur 37: Resultaat van de immunokleuring tegen lamine A en C. De eerste twee kolommen tonen beelden van de controle met eerst het DAPI signaal en daarna het signaal bij GFP. De twee laatste kolommen geven cellen behandeld met het tweede CRISPR/Cas9 construct weer met eveneens het DAPI en het GFP signaal.

4 Discussie

Aangezien laminopathieën zeldzame ziekten zijn, is patiëntenmateriaal schaars. Hierdoor kan de grote invloed van de genetische variabiliteit tussen de patiënten op de studieresultaten moeilijk gecorrigeerd worden. Om dit probleem op te lossen, kan men gebruik maken van modelsystemen. Hoewel er reeds goede modellen bestaan voor de nabootsing van laminopathieën met behulp van chemische behandelingen [130], genetische behandelingen [131] en dierenmodellen [132], kunnen nog betere modellen ontwikkeld worden voor bepaalde studiedoeleinden. Het ontwikkelen van stabiele modelcellijnen is een waardevolle aanvulling bij de reeds bestaande modellen. Een voorbeeld hiervan is een ontwikkeld isogeen celmodel voor de ziekte van Parkinson dat via ZFN werd geconstrueerd [133] en reeds wordt gebruikt in onderzoek naar deze ziekte [134]. In deze masterproef werd de grondslag gelegd voor het construeren van analoge celmodellen voor de studie van laminopathieën met de nieuwste *genome editing* technieken. Als eerste modelcellen werd een *knock-out* voor de betrokken genen, LMNA en ZMPSTE24 beoogd. Daarom werden *genome editing* constructen ontwikkeld waarvan de herkenningsequentie zich bevond in de eerste exonen van deze genen. Door indel vorming kan er immers een verschuiving van het *reading frame* optreden waarbij de kans op gen *knock-out* het grootste is wanneer deze frameshift in het begin van de sequentie plaatsvindt.

Er werden twee verschillende *genome editing* technieken toegepast, gebaseerd op twee recent ontwikkelde protocols, de ontwikkeling van TALEN: Sanjana et al., januari 2012 [92] en het gebruik van CRISPR/Cas9 systemen: Ran et al. oktober 2013 [93].

4.1 TALEN constructie

Er werden acht verschillende TALEN paren in silico ontworpen waarbij rekening werd gehouden met het voorkomen van SNPs en de richtlijnen van Streubel et al. [122]. Indien mogelijk werd het gebruik van de *backbone* met de NN als RVD in de halve herhaling vermeden aangezien er nog geen backbone beschikbaar is met een RVD voor NH die in de rest van het TALEN wordt gebruikt ter vervanging van NN, wegens hogere specificiteit.

Tijdens het ontwikkelen van een TALEN zijn er verschillende stappen waarbij problemen kunnen optreden. Het maken van de monomeer bibliotheek werd uitgevoerd met PCR waarvan het product moest worden opgezuiverd. Dit leidde tot lage DNA concentraties die niet nauwkeurig bepaald konden worden. Dit is echter wenselijk voor de efficiënte constructie van de TALEN hexameren. Door het gebruik van meer startmateriaal en een groter reactievolume konden betere concentraties bekomen worden. Wanneer een correcte monomeer bibliotheek verkregen was, was de hexameer constructie geen groot probleem. Aangezien evenwel enkel de lengte van de stukken kan worden gecontroleerd, en niet de sequentie, kon niet met zekerheid bepaald worden of de monomeer bibliotheek correct was. Door het voorkomen van specifieke bandjes na de hexameer PCR, is geextractie van het DNA nodig wat opnieuw lage efficiëntie heeft en lage DNA concentraties opleverde. De specifieke DNA fragmenten waren het gevolg van de hoge repetitiviteit van de template. Een hexameer bestaat immers uit zes herhalingen met dezelfde sequentie behalve de zes specifieke nucleotiden die resulteren in de RVD. Deze repetitieve sequentie kan op verschillende plaatsen met zichzelf binden waardoor DNA fragmenten van verschillende lengtes gecreëerd kunnen worden. Ook de mogelijke aanwezigheid van monomeren, dimeren, trimeren, ... in plaats van hexameren kan lagere bandjes geven. Hoewel dit normaal voorkomen wordt door de specifieke primers en een exonuclease behandeling.

Ondanks deze obstakels lukte het om verschillende plasmiden met de juiste lengte te construeren en in *E. coli* te vermenigvuldigen. Bij sequenering bleek dat er vaak SNPs aanwezig waren in de sequentie

of zelfs delen van de sequentie verdwenen waren. Dit kan te wijten zijn aan homologe recombinatie en mutaties in *E. coli* waarbij delen van de sequentie verdwijnen of muteren. Opnieuw speelt de hoge repetitiviteit van de sequentie hier mogelijk een rol. Een andere mogelijkheid is dat, desondanks het gebruik van een polymerase dat specifiek ontworpen werd om fouten te beperken (1/777 000 bp, herculase II fusion DNA polymerase, Aligent genomics), toch fouten ingebouwd werden tijdens de vele PCR stappen. Daardoor bleek het nodig om verschillende bacteriële kolonies te onderzoeken om een juist TALEN construct te bekomen. Er werd gestart met de ontwikkeling van acht TALEN paren waarvan er uiteindelijk drie volledig geconstrueerd en getest werden voor LMNA exon 1, ZMPSTE24 exon 1 en ZMPSTE24 exon 2. Bij dit laatste paar werden twee *forward* TALENs getest, gecombineerd met dezelfde *reverse* TALEN.

4.2 CRISPR/Cas9 constructie

Wegens tegenvallende resultaten en moeilijke constructie van de TALENs werd besloten om over te schakelen op het nieuwer en eenvoudiger CRISPR/Cas9 systeem. In totaal werden er in silico vier CRISPR/Cas9 constructen ontworpen die werden geselecteerd op basis van hun specificiteit [119].

Bij de in vitro aanmaak van deze constructen was geen PCR amplificatie nodig wat de kans op fouten sterk reduceerde. In tegenstelling tot de ingewikkelde TALEN constructie moest hier enkel een restrictie- en ligatiereactie worden uitgevoerd. Na transformatie bleken de gesequeneerde bacteriële kolonies allemaal de juiste sequentie te bezitten en werden geen SNPs waargenomen zoals bij de TALENs. Voor elk CRISPR/Cas9 construct dat werd ontworpen, werden twee varianten gemaakt in twee verschillende vectoren, één met een GFP merker en één met een puromycine resistentiegen. De constructie van de CRISPR/Cas9 systemen was dus eenvoudiger, sneller en minder vatbaar voor fouten dan de TALEN constructie. De aspecificiteit van deze systemen is mogelijk wel hoger [118].

4.3 Controle systemen

Naast het maken van de constructen werd een groot deel van deze masterproef besteed aan het uittesten en optimaliseren van controlesystemen voor de gemaakte constructen. De eerste techniek die werd uitgetest was het T7 endonuclease assay. Er werden geen extra DNA fragmenten waargenomen na T7 behandeling, enkel een tragere migratie van de fragmenten door de invloed van de enzymbuffer. Hierin zitten componenten die kunnen interfereren met het DNA waardoor het trager zal migreren. Hoewel dit in theorie een eenvoudige en nuttige test is, lukte het niet om deze toe te passen en werd er overgegaan naar andere technieken.

Bij de HRM-analyse van het HGPS DNA was een duidelijk verschil met het gewone NHDF DNA te zien. Dit verschil kon niet waargenomen worden bij de HEK 293T cellen, behandeld met de verschillende TALEN constructen, waardoor het lijkt dat de TALEN paren niet werken. Alle HGPS cellen echter hebben de heterozygote HGPS-mutatie waardoor $\pm 50\%$ van het PCR product de mutatie bevat. Bij de cellen die werden behandeld met een TALEN paar is veel minder dan de helft van het product gewijzigd. Eerst en vooral werden niet alle behandelde cellen getransfecteerd en enkel in de cellen, getransfecteerd met zowel *forward* als *reverse* TALEN, werden mogelijk mutaties gegenereerd. Deze mutaties zijn bovendien verschillend want ze worden willekeurig gecreëerd door de herstelenzymen van de cel. Dit zou de afwezigheid van een duidelijk signaal uit de HRM-analyse kunnen verklaren.

Bij de CRISPR/Cas9 systemen kan een duidelijk verschil worden waargenomen tussen de drie geteste, behandelde cellen en de controlecellen. Dit is het gevolg van de aanrijking, uitgevoerd voor de HRM-

analyse, waardoor enkel cellen overblijven die effectief een construct bevatten. Het effect van deze aanrijking is duidelijk te zien wanneer niet aangerijkt DNA wordt onderworpen aan de HRM-analyse. Het CRISRP/Cas9 construct tegen ZMPSTE exon 2 heeft de minst uitgesproken, maar nog steeds duidelijke verandering. Hier moet bij vermeld worden dat de amplificatie voor de HRM-analyse niet optimaal was verlopen. Dit was waarschijnlijk veroorzaakt door de primers aangezien zowel controle als behandelde stalen een slechte vermenigvuldiging vertoonden.

Men kan besluiten dat de HRM-analyse, na aanrijking van getransfecteerde cellen, een nuttige techniek is om op populatie niveau de werking van de constructen te controleren. Zonder deze aanrijking biedt de test geen uitsluitel over het al dan niet werken van de constructen. Immers, door de lage (co)transfectie efficiëntie is minder dan de helft van de cellen, en dus van het onderzochte DNA, beïnvloed door de constructen. Ook de verschillende indels die worden gecreëerd, kunnen verschillende signalen genereren en zo elkaar uitmiddelen. Het is een snelle test die eenvoudig te herhalen valt aangezien maar kleine hoeveelheden DNA nodig zijn.

Het gebruik van de surrogaat reporter vormt een derde techniek die, via fluorescentie, werkende constructen kan identificeren op individueel celniveau. Deze techniek werd enkel toegepast op de TALEN constructen en resulteerde in een groen signaal bij werkende TALEN paren. Hierbij kon men zien dat bij cellen, behandeld met de twee eerste TALEN paren, een duidelijke groene fluorescentie aanwezig was. Bij het derde paar tegen ZMPSTE24 exon 2 is een duidelijk signaal waarneembaar bij het gebruik van de eerste *forward* TALEN. Bij de tweede *forward* is het verschil met de controle minder uitgesproken. Dit kan te wijten zijn aan de sequentie fouten aanwezig in deze TALEN. De SNP voorkomend in de eerste *forward* zullen minder invloed hebben op de werking van het TALEN dan de SNP in de tweede *forward*. Hierbij kan men besluiten dat fouten in de sequentie niet steeds leiden tot een slechte werking van de TALEN maar afhankelijk van hun positie en AZ substitutie een andere invloed kunnen hebben.

Bij de controles van ZMPSTE24, zowel exon 1 als 2, kon men zien dat het mRFP signaal veel sterker was hoewel dezelfde opnamesettings werden gebruikt. Dit kan mogelijk het gevolg zijn van signaalverlies bij de behandelde cellen. Een eerste verklaring is dat de TALEN paren de vector openknippen en dat een deel van de vectoren niet hersteld worden door de enzymen van de cel. Hierdoor wordt de vector onstabiel en kan deze worden afgebroken waardoor geen rood signaal wordt gegenereerd. Een tweede verklaring is dat een deel van de mRFP sequentie verdwijnt door het ontstaan van een deletie. In andere studies werden immers na TALEN behandeling deleties aangetroffen tot 173 bp wat de vorming van het mRFP eiwit zou kunnen verstoren [135] [136]. Een laatste verklaring is dat het TALEN paar kan knippen in de RFP sequentie en zo indels worden gevormd. Er zijn echter geen overeenkomstige delen tussen de TALENs en de sequentie van het mRFP wat deze laatste verklaring weinig waarschijnlijk maakt. Om het effect van het sterker mRFP signaal weg te werken werd per cel de ratio van de gemiddelde groene intensiteit tot de gemiddelde rode intensiteit genomen. Hieruit kan besloten worden dat het TALEN paar tegen ZMPSTE24 exon 1 de beste werking vertoont. De visueel geobserveerde trend wordt hierbij bevestigd, meer herhalingen kunnen hierbij statistisch uitsluitel geven.

Er werd nog een extra controle gedaan door het TALEN paar tegen LMNA in cellen te transfecteren samen met de surrogaat reporter van ZMPSTE24 exon 2 (resultaten niet weergegeven). Hierbij was geen verschil te zien in groene fluorescentie ten opzichte van de controle wat bevestigt dat de duidelijke groene signalen, bij de behandelde stalen, specifiek gegenereerd worden door de TALEN paren.

Met de surrogaat reporter kan echter alleen aangetoond worden dat het construct in staat is plasmide DNA te knippen. Er werd reeds aangetoond dat TALEN paren die werken op de surrogaat reporter soms niet werken op genomisch DNA ten gevolge van methylaties. Bij demethylatie van het DNA werd wel een verandering van het DNA waargenomen [137]. Daarom moet dus nog een andere techniek worden toegepast om het knippen van genomisch DNA te bevestigen. De surrogaat reporter kan wel worden gebuikt als merker voor aanrijking van potentieel gemodificeerde cellen met behulp van FACS, waarbij enkel de groen fluorescente cellen worden geselecteerd. Zo worden de getransfekteerde cellen aangerijkt en kan een HRM-analyse of sequenering uitsluitsel bieden over de werking van de TALEN paren op genomisch DNA. Een ander nadeel van deze methode is dat driedubbele transfectie nodig is voor deze test. Er kunnen dus ook vals negatieve cellen zijn wanneer wel het TALEN paar, maar niet de surrogaat reporter in de cel aanwezig is. Bij de CRISPR/Cas9 constructen is dit probleem minder aan de orde aangezien maar twee plasmiden (de surrogaat reporter en het construct zelf) getransfekteerd moeten worden. Een laatste beperking is dat indels van een veelvoud van drie nucleotiden geen verschuiving van het *frame* geven en dus vals negatieve resultaten zijn. De resolutie van deze techniek is wel hoger dan de HRM-analyse aangezien men erin slaagt het laag aantal positieve cellen te visualiseren.

Voor het valideren van de CRISPR/Cas9 constructen werd ook sequenering uitgevoerd. Dit werd niet toegepast op de TALEN omdat de aanrijking van getransfekteerde cellen hier moeilijker was. Na sequenering van het genomisch DNA van de behandelde cellen ter hoogte van de doelsequentie kon men duidelijk zien dat, na de knippositie van het CRISPR/Cas9 construct, meerdere pieken verschijnen in de sequenceringsdata. Dit mengsel aan signalen wordt veroorzaakt door de vorming van indels die resulteren in een verschuiving van het *reading frame* en dus een combinatie van verschillende signalen produceren. Bij de controle loopt het *reading frame* gewoon door en blijven mooie pieken aanwezig. Dit toont aan dat de drie geteste CRISPR/Cas9 systemen in staat zijn een verandering aan te brengen in het genomisch DNA. Bij het CRISPR/Cas9 systeem van ZMPSTE24 exon 2 lijkt de verandering minder uitgesproken. Dit kan te wijten zijn aan een lagere efficiëntie van dit construct wat ook naar voren kwam uit de HRM-analyse.

Een laatste techniek die werd gebruikt voor de validatie van de CRISPR/Cas9 constructen was immunokleuring. Een verwachte vorming van prelamine A bij het construct tegen ZMPSTE24 exon 2 kon niet worden aangetoond. Uit de HRM-analyse en sequenceringsdata was echter reeds gebleken dat dit construct minder efficiënt was dan deze voor LMNA wat de resultaten kan verklaren. Het tweede construct van LMNA toonde de verwachte verdwijning van lamine A en C. Dit construct is dus in staat om de vorming van lamine A en C tegen te gaan en kan worden gebruikt om een stabiele cellijn te construeren.

5 Algemeen besluit en toekomstperspectieven

In deze masterproef werd beoogd om *genome editing* constructen te maken die in staat zijn een gen *knock-out* te creëren van het LMNA en ZMPSTE24 gen met behulp van TALEN en CRISPR/Cas9 systemen. Van de acht TALEN paren die in silico werden ontworpen werden uiteindelijk drie paren correct gevormd en getest. Uit de surrogaat reporter test kan besloten worden dat alle gevormde TALEN paren ook effectief werken, wat in andere studies ook zo was [137] [138]. Verdere validatie van deze paren is echter nodig om te bevestigen dat ze in staat zijn ook genomische veranderingen aan te brengen. Bij de CRISPR/Cas9 constructen slaagden de drie geteste systemen erin om veranderingen in het genomisch DNA te bewerkstelligen. Er werd reeds inhibitie van lamina A en C vorming in cellen bekomen met behulp van één van de CRISPR/Cas9 systemen.

Tijdens dit onderzoek bleek dat de aanmaak en validatie van de CRISPR/Cas9 constructen eenvoudiger was dan voor de TALEN constructen. Hierbij moet wel de kanttekening gemaakt worden dat het gebruikte CRISPR/Cas9 model slechts één herkenningssequentie gebruikt, wat de specificiteit mogelijks verlaagt. Een meer gesofisticeerd nickase systeem [117] kan dit probleem verhelpen maar is op zijn beurt wellicht minder efficiënt. De optimalisatie vormt zo een evenwichtsoefening tussen efficiëntie en specificiteit.

Om de werking van *genome editing* constructen te verifiëren zijn verschillende complementaire validatie technieken noodzakelijk. HRM-analyse is hierbij een zeer betrouwbare methode, maar vraagt voldoende aanrijking van gemodificeerde cellen. Wanneer een aanrijking niet te bekomen is met antibioticum resistentie biedt de surrogaat reporter deze mogelijkheid.

Nu de methoden voor ontwikkeling en het testen van de constructen gekend en getest zijn, is de volgende stap het creëren van zuivere, isogene modelcellijnen. Hierbij zullen de gewenste cellen worden getransfecteerd met het juiste construct waarbij, na scheiding, individuele cellen kunnen worden opgegroeid tot een cellijn. Het scheiden van deze cellen kan gebeuren met behulp van FACS. Bij TALEN constructen wordt hierbij gebruik gemaakt van de surrogaat reporter waarbij geselecteerd wordt op groene cellen. Voor de CRISPR/Cas9 constructen kan men gebruik maken van het construct met de GFP sequentie om getransfecteerde cellen te selecteren.

Wanneer er genoeg cellen zijn, kan een deel gebruikt worden voor DNA extractie en sequenceren. Zo kunnen cellen die een mutatie bevatten geïdentificeerd worden en deze kunnen worden onderzocht voor de effectieve uitschakeling van de genen met bijvoorbeeld immunokleuringen of qPCR. Hierbij kan best ook nog een specificiteitsanalyse worden uitgevoerd door de delen in de genomische sequentie met de grootste affiniteit voor het construct (naast de doelsequentie) te controleren via sequenceren.

Deze techniek leent zich niet enkel tot het genereren van *knock-out* cellen, maar ook tot het creëren van cellen met ziekteverwekkende mutaties. Zo zal het mogelijk worden cellijnen te ontwikkelen met dezelfde mutatie als deze in HGPS (c.1824C>T). Door het ontwikkelen van een construct tegen exon 11 ter hoogte van de mutatie en het voorzien van een homologe sequentie met de mutatie, wordt homologe recombinatie bevorderd zodat de mutatie kan worden ingebouwd. Dit kan dan na sequentiecontrole leiden tot een cellijn met de specifieke mutatie van HGPS. Deze cellijn kan vervolgens gebruikt worden om de mechanismen van deze ziekte verder te ontrafelen. Er wordt beoogd om zo een cellijn te maken in mesenchymale stamcellen, aangezien deze de voorloper zijn van veel weefsels die beïnvloed worden bij HGPS [139].

De modelcellen kunnen dan worden gebruikt in onder meer genexpressie studies. Hierbij kan met het expressiepatroon vergeleken worden tussen de modelcellen met de ingebrachte mutatie en de cellen gebruikt als basis voor de modelcellen. Zo is men zeker dat gedetecteerde verschillen in genexpressie te wijten zijn aan de mutatie. De genexpressie die zal worden uitgevoerd, beoogt het ontdekken van nieuwe biomerkers of therapeutische doelwitten.

In de verre toekomst kunnen systemen zoals deze mogelijk gebruikt worden als geneesmiddel. Wanneer *genome editing* constructen bekomen kunnen worden die zeer specifiek zijn, kunnen deze mutaties, aanwezig in cellen, terug herstellen. Dit werd reeds toegepast in een cellijn van HGPS geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC) met behulp van adenovirale vectoren [140]. Men kan zo stamcellen geïsoleerd uit een patiënt of iPSC uit het weefsel van de patiënt behandelen met het *genome editing* construct waarbij gerichte puntmutaties gecorrigeerd kunnen worden. Na selectie van gezonde varianten zouden deze genetisch gecorrigeerde pluripotente cellen gebruikt kunnen worden om beschadigde weefsels te vervangen of herstellen.

Er zijn echter nog een hoop moeilijkheden verbonden met deze gecombineerde cel- en genterapie. Eerst en vooral is ontwikkeling van stabiele iPSC en specifieke efficiënte *genome editing* technieken nodig. Een tweede obstakel is de beschikbaarheid van technieken voor celdifferentiatie tot de gewenste weefsels. Een laatste groot probleem is de transplantatie van de cellen in de patiënt waarbij ze zich op de gewenste plaats moeten innestelen [141]. Deze moeilijkheden kunnen overwonnen worden door verder onderzoek. In de toekomst zullen deze technieken zeker en vast een grote invloed hebben op de genezing van een waaier aan genetische aandoeningen.

6 Bibliografie

- [1] B. Lewis, L. Cassimeris, V. Lingappa en G. Plopper, *Cells*, vol. Hoofdstuk 5.7, Jones & Bartlett publishers, 2007, pp. 214-215.
- [2] T. McKenna, J. Baek en M. Eriksson, *Genetic disorders*, vol. hoofdstuk 2, M. Puiu, Red., Intech, 2013, pp. 27-63.
- [3] J. M. Gonzalez en V. Andrés, „Synthesis, transport and incorporation into the nuclear envelope of A-type lamins and inner nuclear membrane proteins,” *Biochemical society transactions*, vol. 39, pp. 1758-1763, 2011.
- [4] J. Bridger, I. Kill, M. Farrel en C. Hutchison, „Internal lamin structures within G1 nuclei of human dermal fibroblasts,” vol. 104, pp. 297-306, 1993.
- [5] J. Broers, C. Hutchison en F. Ramaekers, „Laminopathies,” *Journal of pathology*, vol. 204, pp. 478-488, 2004.
- [6] E. Meshorer en Y. Gruenbaum, „Rejuvenating premature aging,” *Nature medicine*, vol. 14, nr. 7, pp. 713-715, juli 2008.
- [7] J. L. V. Broers, F. C. S. Ramaekers, G. Bonne, R. Ben Yaou en J. C. Hutchinson, „Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing,” *The American physiological society*, pp. 967-1008, 2006.
- [8] J. Conway en D. Parry, „Intermediate Filaments: Structure, Dynamics, Function and Disease,” *Annual Review of Biochemistry*, vol. 63, pp. 345-382, juli 1994.
- [9] E. D. Smith, B. A. Kuclow, R. L. Frock en B. K. Kennedy, „A-type nuclear lamins, progerias and other degenerative disorders,” *Mechanisms of aging and development*, pp. 447-460, 2004.
- [10] S. V. Strelkov, J. Schumacher, P. Burkhard, U. Aebi en H. Herrmann, „Crystal structure of the human lamin A coil 2B dimer: implications for the head-to-tail association of nuclear lamins,” vol. 343, pp. 1067-1080, 2004.
- [11] J. Frangioni en B. Neel, „Use of a general purpose mammalian expression vector for studying intracellular protein targeting: identification of critical residues in the nuclear lamin A/C nuclear localization signal,” *Journal of cell science*, vol. 105, pp. 481-488, 1993.
- [12] T. Dittmer en T. Misteli, „The lamin protein family,” *Genome biology*, pp. 1-14, 2011.
- [13] L. Gerace en G. Blobel, „The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis,” *Cell*, vol. 19, pp. 277-287, 1 januari 1980.
- [14] C. Lehner, R. Stick, E. Nigg en H. Eppenberger, „Differential expression of nuclear lamin proteins during chicken development,” *Journal of cell biology*, vol. 105, pp. 577-587, juli 1987.
- [15] R. Rober, K. Weber en M. Osborn, „Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study,” *Development*, vol. 105, pp. 365-378, 1 februari 1989.
- [16] C. Capanni, E. Mattioli, M. Columbaro, E. Lucarelli, V. Parnaik, G. Novelli, M. Wehnert, V. Cenni, N. Maraldi, S. Squarzoni en G. Lattanzi, „Altered pre-lamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy,” *Human molecular genetics*, vol. 14, pp. 1489-1502, 2005.
- [17] D. Fisher, N. Chaudhary en G. Blobel, „cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins,” *Proceeding of the national academy of science*, vol. 83, pp. 6450-6454, september 1986.
- [18] F. Lin en H. Worman, „Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1,” *Genomics*, 1995 May 20;27(2):230-6., vol. 27, pp. 230-236, 20 mei 1995.
- [19] K. H. Schreiber en B. K. Kennedy, „When lamins go bad: nuclear structure and disease,” *Cell*, vol. 152, pp. 1365-1375, 2013.
- [20] L. Beck, T. Hosick en M. Sinensky, „Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor,” *The journal of cell biology*, vol. 110, pp. 1489-1499, mei 1990.
- [21] A. Quigley, Y. Dong, A. Pike, L. Dong, L. Shrestha, G. Berridge, P. Stansfeld, M. Sansom, A. Edwards, C. Bountra, F. von Delft, A. Bullock, N. Burgess-Brown en E. Carpenter, „The structural basis of ZMPSTE24-dependent laminopathies,” *Science*, vol. 339, nr. 6127, pp. 1604-1607, maart 2013.
- [22] M. Peter, E. Heitlinger, M. Haner, U. Aebi en E. Nigg, „Disassembly of in vitro formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase,” *The EMBO journal*, vol. 10, pp. 1535-1544, juni 1991.
- [23] A. Karabinos, J. Schünemann, M. Meyer, U. Aebi en K. Weber, „The single nuclear lamin of *Caenorhabditis elegans* forms in vitro stable intermediate filaments and paracrystals with a reduced axial periodicity,” *Journal of molecular biology*, vol. 325, pp. 241-247, 10 januari 2003.

- [24] M. Goldberg, I. Huttenlauch, C. Hutchinson en R. Stick, „Filaments made from A- and B-type lamins differ in structure and organization,” *Journal of Cell Science*, nr. 121, pp. 215-225, 2008.
- [25] M. Eriksson, W. Brown, L. Gordon, M. Glynn, J. Singer, L. Scott, M. Erdos, C. Robbins en T. Moses, „Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome,” *Nature*, vol. 423, pp. 293-298, 15 mei 2003.
- [26] J. Liu, T. Ben-Shahar, D. Riemer, M. Treinin, P. Spann, K. Weber, A. Fire en Y. Gruenbaum, „Essential Roles for Caenorhabditis elegans Lamin Gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes,” *Molecular biology of the cell*, vol. 11, pp. 3937-3947, november 2000.
- [27] M. Crisp, Q. Liu, K. Roux, J. Rattner, C. Shanahan, B. Burke, P. Stahl en D. Hadzic, „Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex,” *Journal of cell biology*, vol. 172, pp. 41-53, 2 januari 2006.
- [28] G. Galiová, E. Bártoová, I. Raska, J. Krejčí en S. Kozubek, „Chromatin changes induced by lamin A/C deficiency and the histone deacetylase inhibitor trichostatin A,” *European journal of cell biology*, vol. 87, pp. 291-303, mei 2008.
- [29] H. Taniura, C. Glass en L. Gerace, „A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones,” *Journal of cell biology*, vol. 131, p. 33-44, 1 oktober 1995.
- [30] M. Luderus, J. den Blaauwen, O. de Smit, D. Compton en R. Driel, „Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove,” *Molecular cell biology*, vol. 14, pp. 6297-6305, 1994.
- [31] D. Ellis, H. Jenkins, W. Whitfield en C. Hutchinson, „GST-lamin fusion proteins act as dominant negative mutants in Xenopus egg extract and reveal the function of the lamina in DNA replication,” *Journal of Cell Science*, vol. 110, pp. 2507-2518, 1997.
- [32] T. Spann, R. Moir, A. Goldman, R. Stick en R. Goldman, „Disruption of Nuclear Lamin Organization Alters the Distribution of Replication Factors and Inhibits DNA Synthesis,” *Journal of cell biology*, vol. 136, p. 1201-1212, 24 maart 1997.
- [33] T. Spann, A. Goldman, C. Wang, S. Huang en R. Goldman, „Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II dependent transcription,” *Journal of cell biology*, vol. 165, pp. 603-608, 2002.
- [34] M. Mancini, B. Shan, J. Nickerson, S. Penman en W. Lee, „The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein,” *Proceeding of the national academy of science*, vol. 91, pp. 418-422, 4 januari 1994.
- [35] B. Johnson, R. Nitta, R. Frock, L. Mounkes, D. Barbie, C. Stewart en E. Harlow, „A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, p. 9677-9682, 29 juni 2004.
- [36] S. Güttinger, E. Laurell en U. Kutay, „Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis,” *Nature reviews molecular cell biology*, pp. 178-191, maart 2004.
- [37] S. Georgatos, A. Pyrpasopoulou en P. Theodoropoulos, „Nuclear envelope breakdown in mammalian cells involves stepwise lamina disassembly and microtubule-drive deformation of the nuclear membrane,” *Journal of cell science*, vol. 110, pp. 2129-2140, 1 september 1997.
- [38] S. Lee, J. Chan, M. Clement en S. Pervaiz, „Functional proteomics of resveratrol-induced colon cancer cell apoptosis: caspase-6-mediated cleavage of lamin A is a major signaling loop,” *Proteomics*, vol. 6, pp. 2386-2394, april 2006.
- [39] E. Slee, C. Adrain en S. Martin, „Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis,” *The journal of biological chemistry*, vol. 276, pp. 7320-7326, 9 maart 2001.
- [40] J. Broers, N. Bronnenberg, H. Kuijpers, B. Schutte, C. Hutchison en F. Ramaekers, „Partial cleavage of A-type lamins concurs with their total disintegration from the nuclear lamina during apoptosis,” *European journal of cell biology*, vol. 81, pp. 677-691, december 2002.
- [41] L. Rao, D. Perez en E. White, „Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis,” *Journal of cell biology*, vol. 135, pp. 1441-1451, december 1996.
- [42] B. Liu, D. Jin en Z. Zhou, „From loss to gain: role for SUN1 in laminopathies,” *Cell & Bioscience*, vol. 2, nr. 21, pp. 1-3, 2012.
- [43] P. Scaffidi, L. Gordon en T. Misteli, „The cell nucleus and aging: tantalizing clues and hopeful promises,” *Plos Biology*, pp. 1855-1858, november 2005.
- [44] W. H. De Vos, F. Houben, M. Kamps, A. Malhas, F. Verheyen, J. Cox, E. Manders, V. Verstraeten, M. van Steensel, C. Marcelis, A. van den Wijngaard, D. Vaux, F. Ramaekers en J. Broers, „Repetitive disruptions of the nuclear envelope invoke temporary loss of cellular compartmentalization in laminopathies,” *Human molecular genetics*, pp. 4175-4186, 2011.

- [45] J. Bridger en I. Kill, „Aging of Hutchinson–Gilford progeria syndrome fibroblasts is characterised by hyperproliferation and increased apoptosis,” *Experimental Gerontology*, vol. 39, pp. 717-724, 2004.
- [46] I. Mariappan en V. Parnai, „Sequestration of pRb by cyclin D3 causes intranuclear reorganization of lamin A/C during muscle cell differentiation,” *Molecular biology of the cell*, vol. 16, pp. 1948-1960, 1 april 2005.
- [47] K. Cao, B. Capell, M. Erdos, K. Djabali en F. Collins, „A lamin A protein isoform overexpressed in Hutchinson–Gilford progeria syndrome interferes with mitosis in progeria and normal cells,” *Proceeding of the national academy of science*, vol. 104, pp. 4949-4954, 20 maart 2007.
- [48] J. Toth, S. Yang, X. Qiao, A. Beigneux, M. Gelb, C. Moulson, J. Miner en L. Fong, „Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes,” *Proceeding of the national academy of science*, vol. 102, pp. 12873-12878, 8 juli 2005.
- [49] G. Bonne, M. Di Barletta, H. Bécane, E. Hammouda, L. Merlini, F. Muntoni, C. Greenberg, F. Gary, J. Urtizberea, D. Duboc, M. Fardeau, D. Toniolo en K. Schwartz, „Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy,” *Nature genetics*, vol. 21, pp. 285-288, maart 1999.
- [50] S. Bione, E. Maestrini, S. Rivella, M. Mancini, S. Regis, G. Romeo en D. Toniolo, „Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy,” *Nature genetics*, vol. 8, pp. 323-327, december 1994.
- [51] J. Rankin en S. Ellard, „The laminopathies: a clinical review,” *Clin Genet*, vol. 70, pp. 261-274, 2006.
- [52] A. L. Souza, B. Asselbergh, C. D'ydewalle, K. Moonens, S. Goethals, V. De Winter, A. Azmi en J. Irobi, „Small heat shock protein HSPB1 mutants stabilize microtubules in Charot-Marie-Tooth neuropathy,” *Journal of neuroscience*, vol. 31, pp. 15320-15328, 2011.
- [53] A. De Sandre-Giovannoli, M. Chaouch, S. Kozlov, J. Vallat, M. Tazir, N. Kassouri, P. Szeptowski, T. Hammadouche, A. Vandenberghe, C. Stewart, D. Grid en N. Levy, „Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse,” *The American journal of human genetics*, vol. 70, pp. 726-736, 2002.
- [54] C. Goizet, R. Yaou, L. Demay, P. Richard, S. Bouillot, M. Rouanet, E. Hermosilla, G. Le Masson, A. Lagueny, G. Bonne en X. Ferrer, „A new mutation of the lamin A/C gene leading to autosomal dominant axonal neuropathy, muscular dystrophy, cardiac disease, and leuconychia,” *Journal of medical genetics*, vol. 41, pp. 1-5, 2004.
- [55] J. Hongzhao, P. Weatherall, A.-H. Beverley en G. Abhimanyu, „Increase skeletal muscle volume in women with familial partial lipodystrophy, dunnigan variety,” *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 98, pp. 1410-1413, augustus 2013.
- [56] A. Garg, „Gender Differences in the Prevalence of Metabolic Complications in Familial Partial Lipodystrophy (Dunnigan Variety),” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 85, pp. 1776-1782, 1 mei 2000.
- [57] M. Vrijzen, Ga ik dood als ik twaalf ben, Van Halewyck, 2009.
- [58] L. Franklin en M. DeBusk, „The Hutchinson-Gilford progeria syndrome,” *The journal of pediatrics*, vol. 80, pp. 697-724, april 1972.
- [59] C. Chen, Y. Chi, R. Mutalif, M. Starost, T. Myers, S. Anderson, C. Stewart en K. Jeang, „Accumulation of the inner nuclear envelope protein sun1 is pathogenic in progeric and dystrophic laminopathies,” *Cell*, vol. 149, nr. 3, pp. 565-577, april 2012.
- [60] T. Dechat, A. Kohlmaier, S. Adam, M. Bozovsky, A. Goldman, S. Khuon, F. Collins en R. Goldman, „Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging,” *Proceeding of the national academy of science*, vol. 103, pp. 8703-8708, 6 juni 2006.
- [61] J. Marji, S. O'Donoghue, D. McClintock, V. Satagopam, R. Schneider, D. Ratner, H. Worman, L. Gordon en K. Djabali, „Defective lamin A-Rb signaling in Hutchinson–Gilford progeria syndrome and reversal by farnesyltransferase inhibition,” *PLoS ONE*, pp. 1-14, 15 juni 2010.
- [62] V. Butin-Israeli, S. Adam, A. Goldman en R. Goldman, „Nuclear lamin functions and disease,” *Trends in genetics*, vol. 28, pp. 464-470, 2012.
- [63] T. Sieprath, R. Darwiche en W. De Vos, „Lamins as mediators of oxidative stress,” *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 421, pp. 635-639, 2012.
- [64] C. Navarro, J. Cadiñanos, A. De Sandre-Giovannoli, R. Bernard, S. Courrier, I. Boccaccio, A. Boyer, W. Kleijer, A. Wagner, F. Giuliano, F. Beemer en J. Freije, „Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin A precursors,” *Human molecular genetics*, vol. 14, pp. 1503-1513, 1 juni 2005.
- [65] C. Moulson, G. Go, A. van der Wal, S. Sillevius, J. van Hagen en J. Miner, „Homozygous and compound heterozygous mutations in ZMPSTE24 cause the laminopathy restrictive dermopathy,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 125, nr. 5, pp. 913-919, november 2005.

- [66] Q. Mok, R. Curley, J. Tolmie, R. Marsden, M. Patton en E. Davies, „Restrictive dermatopathy: a report of three cases,” *Journal of medical genetics*, vol. 27, pp. 315-319, 1990.
- [67] M. Thill, T. Nguyen, M. Wehnert, D. Fischer, I. Hausser, S. Braun en C. Jackisch, „Restrictive dermatopathy: a rare laminopathy,” *Archives of gynecology and obstetrics*, vol. 278, pp. 201-208, 2008.
- [68] P. Scaffidi en T. Misteli, „Lamin A-dependent nuclear defects in human aging,” *Science*, vol. 312, pp. 1059-1063, 2006.
- [69] P. Scaffidi en T. Misteli, „Lamin A-dependent nuclear defects in human aging,” *Science*, vol. 312, pp. 1059-1063, 19 mei 2006.
- [70] C. Capo-chichi, K. Cai, F. Simpkins, P. Ganjei-Azar, A. Godwin en X. Xu, „Nuclear envelope structural defects cause chromosomal numerical instability and aneuploidy in ovarian cancer,” *BMC Medicine*, vol. 9, nr. 18, pp. 1-11, 2011.
- [71] Y. Tang, Y. Chen, H. Jiang en D. Nie, „Promotion of tumor development in prostate cancer by progerin,” *Cancer cell interantional*, vol. 10, nr. 47, pp. 1-10, 2010.
- [72] N. Willes, R. Cox en C. Hutchison, „Lamin A/C Is a risk biomarker in colorectal cancer,” *PLoS ONE*, vol. 3, nr. 8, pp. 1-9, 2008.
- [73] D. Riddle, T. Blumenthal en B. Meyer, *C. elegans II*, Cold spring harbor laboratory press, 1997.
- [74] E. Bank, K. Ben-Harush, N. Feinstein, O. Medalia en Y. Gruenbaum, „Structural and physiological phenotypes of disease-linked lamin mutations in *C. elegans*,” *Journal of Structural Biology*, pp. 106-112, 2012.
- [75] J. Seoka, S. Warrenb, A. Cuencac, M. Mindrinosa en H. Bakerc, „Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory disease,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp. 1-6, 2013.
- [76] C. Philippeos, R. Hughes, A. Dhawan en R. Mitry, *Human cell culture protocols*, vol. Introduction to cell culture, R. Mitry en R. Hughes, Red., Humana press, 2012, pp. 1-2.
- [77] S. Bhatio, *Textbook of biotechnology*, vol. Advantages and disadvantages of tissue culture, Darya Ganj, New Delphi, India: Atlantic, 2005, pp. 237-238.
- [78] K. Jaager, S. Islam, P. Zajac, S. Linnarsson en T. Neuman, „RNA-Seq analysis reveals different dynamics of differentiation of human dermis- and adipose-derived stromal stem cells,” *Plos one*, vol. 7, pp. 1-9, 2012.
- [79] D. Goulboure en D. Vaux, „HIV protease inhibitors inhibit FACE1/ZMPSTE24: a mechanism for acquired lipodystrophy in patients on highly active antiretroviral therapy?,” *Biochemical Society Transactions*, vol. 38, pp. 292-296, 2010.
- [80] M. Gerschensona en K. Brinkman, „Mitochondrial dysfunction in AIDS and its treatment,” *Mitochondrion*, vol. 4, nr. 5, pp. 763-777, september 2004.
- [81] T. Gaj, C. Gersbach en C. Barbas, „ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering,” *Trends in biotechnology*, pp. 397-404, 2013.
- [82] J. Morrow, S. Cohen, A. Chang, H. Boyers, H. Goodman en R. Helling, „Replication and Transcription of Eukaryotic DNA in *Escherichia coli*,” *Proceedings of the national academy of science*, vol. 71, nr. 5, pp. 1743-1747, mei 1974.
- [83] H. Le Vine, *Genetic engineering: a reference handbook*, Santa Barbara : ABC-CLIO, 2006.
- [84] R. Jaenisch en B. Mintz, „Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived,” *Proceedings of the national academy of science*, vol. 71, nr. 4, pp. 1250-1254, april 1974.
- [85] F. Sanger, S. Nicklen en A. Coulson, „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors,” *Proceedings of the national academy of science*, vol. 74, nr. 12, pp. 5463-5467, 1977.
- [86] D. Goeddel, D. Kleid, F. Bolivar, H. Heyneker, D. Yansura, R. Crea, T. Hirose, A. Kraszewski, K. Itakura en A. Riggs, „Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin,” *Proceedins of the national academy of science*, vol. 76, nr. 1, pp. 106-110, januari 1979.
- [87] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts en P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, New York: Garland Science, 2002.
- [88] R. Winega, L. Lutze, J. Rufer en W. Morgan, „Spectrum of mutations produced by specific types of restriction enzyme-induced double-strand breaks,” *Mutagenesis*, pp. 439-445, november 1992.
- [89] K. Chen en C. Gao, „TALENs: Customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants,” *Journal of genetics and genomics*, vol. 40, pp. 271-279, 2013.
- [90] D. Carroll, J. Morton, K. Beumer en D. Segal, „Design, construction and in vitro testing of zinc finger nucleases,” *Nature Protocols*, vol. 1, pp. 1329 - 1341, 2006.
- [91] D. Wright, S. Thibodeau-Beganny, J. Sander, F. Winfrey, A. Hirsh, M. Eichtinger, F. Fu, M. Porteus, D. Dobbs, D.

- Voytas en K. Joung, „Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly,” *Nature Protocols*, vol. 1, pp. 1637 - 1652, 2006.
- [92] N. Sanjana, L. Cong, Y. Zhou, M. Cunniff, G. Feng en F. Zhang, „A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering,” *Nature protocols*, vol. 7, pp. 171-192, januari 2012.
- [93] F. Ran, P. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. Scott en F. Zhang, „Genome engineering using the CRISPR/Cas9 system,” *Nature protocols*, vol. 8, nr. 11, pp. 2281-2308, 2013.
- [94] N. Pavletich en C. Pabo, „Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å,” *Science*, 1991.
- [95] A. Klug, „The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation,” *Annual review of biochemistry*, pp. 213-231, 2010.
- [96] Y. Kim en S. Chandrasegaran, „Chimeric restriction endonuclease,” *Proceedings of the national academy of science*, pp. 883-887, 1994.
- [97] J. Bitinaite, D. Wah, A. Aggarwa en I. Schildkraut, „FokI dimerization is required for DNA cleavage,” *Proceedings of the national academy of sciences*, pp. 10570-10575, 1998.
- [98] E. Vanamee, S. Santagata en A. Aggarwal, „FokI requires two specific DNA sites for cleavage,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 309, nr. 1, pp. 69-78, mei 2001.
- [99] D. Carroll, „Genome engineering with zinc-finger nucleases,” *Genetics*, vol. 188, pp. 773-782, augustus 2011.
- [100] J. Boch en U. Bonas, „Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function,” *Annual Review of Phytopathology*, vol. 48, pp. 419-436, September 2010.
- [101] M. Moscou en A. Bogdanove, „A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors,” *Science*, vol. 326, p. 1501, december 2009.
- [102] W. Zhu, B. Yang, J. Chittoor en F. White, „AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus,” *The American Phytopathological Society*, vol. 11, pp. 824-832, april 1998.
- [103] J. Boch, H. Scholze, S. Schornack, A. Landgraf, S. Hahn, S. Kay, T. Lahaye, A. Nickstadt en U. Bonas, „Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors,” *Science*, vol. 326, pp. 1509-1512, december 2009.
- [104] L. Cong, R. Zhou, Y. Kuo, M. Cunniff en F. Zhang, „Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains,” *Nature communication*, pp. 1-6, juni 2012.
- [105] M. Maeder, S. Thibodeau-Beganny, A. Osiaik, D. Wright, R. Anthony, M. Eichinger en T. Jiang, „Rapid “open-source” engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification,” *Molecular Cell*, pp. 294-301, 25 juli 2008.
- [106] C. Mussolino, R. Morbitzer, F. Lütge, N. Dannemann, T. Lahaye en T. Cathom, „A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity,” *Nucleic Acids Research*, pp. 9283-9293, November 2011.
- [107] S. Chen, G. Oikonomou, C. Chiu, B. Niles, D. Lee, J. Liu, A. Daniel, I. Antoshechkin en D. Prober, „A large-scale in vivo analysis reveals that TALENs are significantly more mutagenic than ZFNs generated using context-dependent assembly,” *Nucleic Acids Research*, vol. 41, pp. 2769-2778, 2013.
- [108] K. Pauwels, N. Podevin, D. Breyer, D. Carroll en P. Herman, „Engineering nucleases for gene targeting: safety and regulatory considerations,” *New biotechnology*, Augustus 2013.
- [109] F. Karginov en G. Hannon, „The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea,” *Molecular Cell*, vol. 37, nr. 1, pp. 1-23, 15 januari 2010.
- [110] A. Bolotin, B. Quinquis, A. Sorokin en D. Ehrlich, „Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin,” *Microbiology*, vol. 151, pp. 2551-2561, 2005.
- [111] C. Wei, J. Liu, Z. Yu, B. Zhang, G. Gao en R. Jiao, „TALEN or Cas9 - Rapid, efficient and specific choices for genome modifications,” *Journal of Genetics and Genomics*, vol. 40, pp. 281-289, 2013.
- [112] J. Carte, R. Wang, H. Li, R. Terns en M. Terns, „Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes,” *Genes & Development*, vol. 22, pp. 3489-3496, 2008.
- [113] J. Garneau, M. Dupuis, M. Villon, D. Romero, R. Barrangou, P. Boyaval, C. Fremaux, P. Horvath en A. Magadan, „The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA,” *Nature*, vol. 468, pp. 67-72, 4 november 2010.
- [114] P. Mali, L. Yang, K. Elsvelt, J. Aach, M. Guell, J. DiCarlo, J. Norville en G. Church, „RNA-guided human genome engineering via Cas9,” *Science*, vol. 339, nr. 6121, pp. 823-826, februari 2013.
- [115] L. Cong, F. Ran, D. Cos, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. Marraffini en F. Zhang, „Multiplex

- genome engineering using CRISPR/Cas systems," *Science*, vol. 339, nr. 6121, pp. 819-823, 15 februari 2013.
- [116] E. Deltcheva, K. Chylinski, C. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. Pirzada, M. Eckert, J. Vogel en E. Charpentier, „CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III," *Nature*, vol. 471, nr. 3740, p. 602–607, 31 maart 2011.
- [117] F. Ran, P. Hsu, C. Lin, J. Gootenberg, S. Konermann, A. Trevino, D. Scott, A. Inoue, S. Matoba, Y. Zhang en F. Zhang, „Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity," *Cell*, vol. 154, pp. 1380-1389, 12 september 2013.
- [118] Y. Fu, J. Foden, C. Khayter, M. Maeder, D. Reyon, K. Joung en J. Sander, „High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells," *Nature Biotechnology*, vol. 31, nr. 9, pp. 822-826, september 2013.
- [119] P. Hsu, D. Scott, J. Weinstein, Z. Ran, S. Konermann, V. Agarwala, Y. Li, E. Fine, X. Wu, O. Shalem, T. Cradick, L. Marraffini, G. Bao en F. Zhang, „DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases," *Nature Biotechnology*, vol. 31, nr. 9, pp. 827-832, september 2013.
- [120] T. Sullivan, D. Escalante-Alcalde, H. Bhatt, M. Anver, N. Bhat, K. Nagashima, C. Stewart en B. Burke, „Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy," *Journal of cell biology*, vol. 147, nr. 5, pp. 913-920, 1999.
- [121] T. Cermak, E. Doyle, M. Christion, L. Wang, Y. Zhang, C. Schmidt, J. Baller, N. Somia, A. Bogdanove en D. Voytas, „Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting," *Nucleic acid research*, vol. 39, nr. 12, pp. 1-11, 2011.
- [122] J. Streubel, C. Blücher, A. Landgraf en J. Boch, „TAL effector RVD specificities and efficiencies," *Nature America*, vol. 30, nr. 7, pp. 593-595, 2012.
- [123] C. Engler, R. Gruetzner, R. Kandzia en S. Marillonnet, „Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method," *Plos one*, vol. 4, nr. 5, pp. 1-9, mei 2009.
- [124] M. Parkinsona en D. Lilley, „The junction-resolving enzyme T7 endonuclease I: quaternary structure and interaction with DNA," *Journal of Molecular Biology*, vol. 270, nr. 2, pp. 169-178, 11 juli 1997.
- [125] J. Babon, M. McKenzie en R. Cotton, „The use of resolvases T4 endonuclease VII and T7 endonuclease I in mutation detection," *Methods in Molecular Biology*, vol. 152, pp. 187-199, 2000 .
- [126] C. Pasay, L. Arlian, M. Morgan, D. Vyszynski-Moher, A. Rose, S. Walton en J. McCarthy, „High-resolution melt analysis for the detection of a mutation associated with permethrin resistance in a population of scabies mites," *Medical and Veterinary Entomology*, vol. 22, nr. 1, pp. 82-88, Maart 2008.
- [127] H. Kim, E. Um, S. Cho, C. Jung, H. Kim en J. Kim, „Surrogate reporters for enrichment of cells with nuclease-induced mutations," *Nature methods*, vol. 8, nr. 11, pp. 941-944, november 2011.
- [128] D. Stroud, L. Formosa, X. Wijeyerathne, T. Nguyen en M. Ryan, „Gene knockout using transcription activator-like effector nucleases (TALENs) reveals that human NDUFA9 protein is essential for stabilizing the junction between membrane and matrix arms of complex I," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, pp. 1685-1690, 18 januari 2013.
- [129] J. Schmid-Burgk, T. Schmidt, V. Kaiser, K. Höning en V. Hornung, „A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator–like effector genes," *Nature biotechnology*, vol. 31, pp. 76-81, 2013.
- [130] S. Dominici, V. Fiori, M. Magnani, E. Schena, C. Capanni, D. Camozzi, M. D'Apice, C. Le Dour, M. Auclair, M. Caron, G. Novelli, C. Vigouroux, N. Maraldi en G. Lattanzi, „Different prelamin A forms accumulate in human fibroblasts: a study in experimental models and progeria," *European Journal of Histochemistry*, vol. 53, nr. 1, pp. 43-52, 2009.
- [131] J. Gruber, T. Lampe, M. Osborn en K. Weber, „RNAi of FACE1 protease results in growth inhibition of human cells expressing lamin A: implications for Hutchinson-Gilford progeria syndrome," *Journal of Cell Science*, vol. 118, pp. 689-696, november 2004.
- [132] G. Beard, J. Dridger, I. Kill en D. Tree, „Towards a Drosophila model of Hutchinson–Gilford progeria syndrome," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 36, pp. 1389-1392, 2008.
- [133] J. Laganière, A. Cheng, D. Hockemeyer, Q. Gao, R. Alagappan, V. Khurana, L. Golbe, R. Myers, S. Lindquist, L. Zhang, P. Gregory, H. Zhang en R. Jaenish, „Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations," *Cell*, vol. 146, pp. 318-331, 2011.
- [134] S. Ryan, N. Dolatabadi, S. Chan, X. Zhang, M. Akhtar, J. Parker, F. Soldner, C. Sunico, S. Nagar, M. Talantova, B. Lee, K. Lopez, A. Nutter, B. Shan, E. Molokanova, Y. Zhang, X. Han, T. Nakamura, E. Masliah, J. Yates, N.

- Nakanishi, A. Andeyev, S. Okamoto, R. Jaenisch, R. Ambasudhan en S. Lipton, „Isogenic human iPSC Parkinson’s model shows nitrosative stress-induced dysfunction in MEF2-PGC1a transcription,” *Cell*, vol. 155, nr. 6, pp. 1351-1364, 2013.
- [135] Z. Qiu, M. Liu, Z. Chen, Y. Shao, H. Pan, G. Wei, C. Yu, L. Zhang, X. Li, P. Wang, H. Fan, B. Du, B. Liu, M. Lui en D. Li, „High-efficiency and heritable gene targeting in mouse by transcription activator-like effector nucleases,” *Nucleic acids research*, vol. 41, nr. 11, pp. 1-12, juni 2013.
- [136] S. Chen, G. Oikonomou, C. Chiu, B. Niles, J. Liu, D. Lee, I. Antoshechkin en D. Prober, „A large-scale in vivo analysis reveals that TALENs are significantly more mutagenic than ZFNs generated using context-dependent assembly,” *Nucleic acids research*, vol. 41, nr. 4, p. 2769–2778, 2013.
- [137] Y. Kim, J. Kweon, A. Kim, J. Chon, J. Yoo, H. Kim, S. Kim, C. Lee, E. Jeong, E. Chung, D. Kim, M. Lee, E. Go, H. Song, H. Kim, N. Cho en D. Bang, „A library of TAL effector nucleases spanning the human genome,” *Nature biotechnology*, vol. 31, nr. 3, pp. 251-259, maart 2013.
- [138] C. Mussolino, J. Alzubi, E. Fine, R. Morbitzer, T. Cradick, T. Lahaye, G. Bao en T. Cathomen, „TALENs facilitate targeted genome editing in human cells with high specificity and low cytotoxicity,” *Nucleic Acids Research*, pp. 1-12, 2014.
- [139] J. Zhang, Q. Lian, G. Zhu, F. Zhou, L. Sui, C. Tan, R. Mutalif, R. Navasankari, Y. Zhang, H. Tse, C. Stewart en A. Colman, „A human iPSC model of hutchinson gilford progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects,” *Cell stem cell*, vol. 8, nr. 1, pp. 31-45, 7 januari 2011.
- [140] G. Liu, K. Suzuki, J. Qu, I. Sancho-Martinez, F. Yi, M. Li, S. Kumar, E. Nivet, J. Kim, R. Soligalla, I. Dubova, A. Goebel, N. Plongthongkum, H. Fung, K. Zhang, J. Loring, L. Laurent en I. Belmonte, „Targeted gene correction of laminopathy-associated LMNA mutations in patient-specific iPSCs,” *Cell stem cell*, vol. 8, nr. 6, pp. 688-694, 3 juni 2011.
- [141] P. Simara, J. Motl en D. Kaufman, „Pluripotent stem cells and gene therapy,” *Translational research*, vol. 161, nr. 4, pp. 284-291, 2013.
- [142] G. Galiova, E. Bartova, I. Raskab, J. Krejci en S. Kozubek, „Chromatin changes induced by lamin A/C deficiency and the histone deacetylase inhibitor trichostatin A,” *European journal of cell biology*, vol. 87, p. 291–303, 2008.
- [143] J. Miller, M. Holmes, J. Wang, D. Guschin, Y. Lee, I. Rupniewski, C. Beausejour, A. Waite, N. Wang, K. Kim, P. Gregory, C. Pabo en E. Rebar, „An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing,” *Nature biotechnology*, vol. 25, nr. 7, pp. 778-785, juli 2007.
- [144] T. Misteli en P. Scaffidi, „Genome instability in progeria: when repair gets old,” *Nature Medicine*, vol. 11, pp. 718 - 719, 2005.
- [145] E. Pennisi, „The CRISPR Craze,” *Science*, vol. 341, nr. 6148, pp. 833-836, augustus 2013.
- [146] S. Gray, S. Foti, J. Schwartz, L. Bachaboina, B. Taylor-Blake, J. Coleman, M. Ehlers, M. Zylka, T. McCown en J. Samulski, „Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors,” *Human gene therapy*, vol. 22, pp. 1143-1153, 2011.
- [147] E. Minskaia en M. Ryan, „Protein coexpression using FMDV 2A: effect of ‘linker’ residues,” *BioMed Research International*, vol. 2013, pp. 1-12, 2013.

7 Bijlagen

7.1 Media voor Micro-organismen

7.1.1 SOC-medium

- 2.00 g Trypton (Duchefa biochemie, T1332.0500)
- 0.5 g gistextract (Lab M, MC 1)
- Oplossen in 97 ml ddH₂O
- 1 ml NaCl 1 M (0.59 g NaCl in 10 ml ddH₂O)
- 0.25 ml KCl 1 M (0.75 g KCl in 10 ml ddH₂O)
- Autoclaveren en laten afkoelen tot kamertemperatuur
- 1 ml gefiltersteriliseerde Mg²⁺-stockoplossing (20.33 g MgCl₂.6H₂O + 24.65 MgSO₄.7H₂O+ 100 ml ddH₂O, filtersteriliseren, kamertemperatuur) toevoegen in de flow
- 1 ml gefiltersteriliseerde glucose-stockoplossing 2 M (36.0g glucose + 100 ml ddH₂O, filtersteriliseren) toevoegen in de flow
- Aanlengen tot 100 ml met ddH₂O
- Filtersteriliseren (0.2 µm filter)
- pH = 7 controleren
- bewaren bij 4 °C

7.1.2 LB-medium

Voor 500 mL LB medium:

- 12.5 g voorgemengd LB-poeder (Duchefa biochemie, L1705.0500)
- ddH₂O tot 500 mL
- autoclaveren (15 min – 121°C)
- opslaan bij kamertemperatuur
- Juiste antibioticum toevoegen net voor gebruik.

7.1.3 LB-agar platen

Voor 500 mL LB agar:

- 12.5 g voorgemengd LB-poeder (Duchefa biochemie, L1705.0500)
- 7.5 g agar poeder (Alfa Aesar, A10752)
- ddH₂O tot 500 mL
- autoclaveren (15 min – 121°C)
- Afkoelen tot 55°C
- Juiste antibioticum toevoegen en platen gieten

7.2 PCR

7.2.1 TAE-buffer

50x TAE-buffer:

- 242g Tris base
- 57.1 ml azijnzuur
- 100 ml EDTA 0.5 M
- Aanvullen met ddH₂O tot 1l
- pH aanpassen tot 8.5 met KOH

Verdunnen in ddH₂O voor 0.5x TAE-buffer

7.2.2 Primers

Nummer	Naam	Sequentie (5'-3')	Smelttemperatuur (°C)	Productlengte (bp)
1	GAPDH_F	TGCACCACCAACTGCTTAGC	60	87
2	GAPDH_R	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	60	87
3	FOKI_F	GGGCATTTCAAAGGCAACTA	60.1	108
4	FOKI_R	CATTTCTCCACCAATGAGCA	59.6	108
5	LMNA_ex1_F	CTACACCAGCCAACCCAGAT	60	524
6	LMNA_ex1_R	AACTCCTCACGCACTTTGCT	60	524
7	LMNA_ex2_F	GGGAAAGAATGGGAGGAGAG	60	548
8	LMNA_ex2_R	GGGAGGGCCTAGGTAGAAGA	60.3	548
9	LMNA_ex3_F	CCATCATGCCTGGCTACTTT	60.1	516
10	LMNA_ex3_R	TAACCTGGGAGCTGAGTGCT	60.1	516
11	LMNA_ex4+5_F	AGCACTCAGCTCCCAGGTTA	64	687
12	LMNA_ex4+5_R	ACTCTAGGCCCTGGAGAGA	64.1	687
13	LMNA_ex11_F	CTACAAGCTTGCTCCCGTTC	60	731
14	LMNA_ex11_R	GGTGGGCTGTCTAGGACTCA	60.3	731
15	ZMP_ex1_F	TGTTGATGCAACACAGCTCA	60	653
16	ZMP_ex1_R	GATTGGGTCCCATGATAACG	60	653
17	ZMP_ex2_F	TTCCTGCATCAGTCGTTTCA	60.4	786
18	ZMP_ex2_R	GATCATTGCGCCTAGGAAG	59.8	786
19	ZMP_ex3+4_F	TGTCCTTTCTTTCTTTATAACCATGC	59.9	897
20	ZMP_ex3+4_R	CAGGACAAAAGCACAGAAGTTTT	59.8	897
21	LHRM_ex1_F	CAGCTCCACTCCGCTGTC	60.13	102
22	LHRM_ex1_R	CGCACACGGTCGATGTAG	58.32	102
23	LHRM_ex11_F	GACCCCGCTGAGTACAACC	60.5	138
24	LHRM_ex11_R	GACACTGGAGGCAGAAGAGC	60.1	138
25	ZHRM_ex1_F	TGGACGCTTTGTGGGAGAT	58.93	100
26	ZHRM_ex1_R	CGCTGTGCTAGGAAGGTCTC	60.18	100
27	ZHRM_ex2_F	ACCACCGGAGTTAGGACAGA	59.6	124
28	ZHRM_ex2_R	ACTCACAGTGCCTTCAGTCTC	57.1	124
29	RFP1	CCCCGTAATGCAGAAGAAGA	60.2	350
30	RFP2	CTGGACATCACCTCCCACAAC	62.8	
31	U6_F	TTCCCATGATTCTTCATATTTGC	63.2	261

7.3 Coderende sequenties

> Coderende sequentie voor LMNA

```
ATGGAGACCCCGTCCCAGCGGGCGGCCACCCGCAGCGGGGCGCAGGCCAGCTCCACTCCGCTGTC
GCCACCCGCATCACCCGGCTGCAGGAGAAGGAGGACCTGCAGGAGCTCAATGATCGCTTGGCGG
TCTACATCGACCGTGTGCGCTCGCTGGAAACGGAGAACGCAGGGCTGCGCCTTCGCATCACCGAGT
CTGAAGAGGTGGTCAGCCGCGAGGTGTCCGGCATCAAGGCCGCCTACGAGGCCGAGCTCGGGGAT
GCCCCAAGACCCTTGACTCAGTAGCCAAGGAGCGCGCCCCGCCTGCAGCTGGAGCTGAGCAAAGT
GCGTGAGGAGTTTAAGGAGCTGAAAGCGCGCAATACCAAGAAGGAGGGTGACCTGATAGCTGCTC
AGGCTCGGCTGAAGGACCTGGAGGCTCTGCTGAACTCCAAGGAGGCCGCACTGAGCACTGCTCTCA
GTGAGAAGCGCACGCTGGAGGGCGAGCTGCATGATCTGCGGGGCCAGGTGGCCAAGCTTGAGGCA
GCCCTAGGTGAGGCCAAGAAGCAACTTCAGGATGAGATGCTGCGGGCGGGTGGATGCTGAGAACAG
GCTGCAGACCATGAAGGAGGAACTGGACTTCCAGAAGAACATCTACAGTGAGGAGCTGCGTGAGA
CCAAGCGCCGTCATGAGACCCGACTGGTGGAGATTGACAATGGGAAGCAGCGTGAGTTTGAGAGC
CGGCTGGCGGATGCGCTGCAGGAACTGCGGGCCCAGCATGAGGACCAGGTGGAGCAGTATAAGAA
GGAGCTGGAGAAGACTTATTCTGCCAAGCTGGACAATGCCAGGCAGTCTGCTGAGAGGAACAGCA
ACCTGGTGGGGGCTGCCACGAGGAGCTGCAGCAGTCGCGCATCCGCATCGACAGCCTCTTGCCC
AGCTCAGCCAGCTCCAGAAGCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCCAAGCTTCGAGACCTGGAGGACTCA
CTGGCCCCTGAGCGGGACACCAGCCGGCGGCTGCTGGCGGAAAAGGAGCGGGAGATGGCCGAGAT
GCGGGCAAGGATGCAGCAGCAGCTGGACGAGTACCAGGAGCTTCTGGACATCAAGCTGGCCCTGG
ACATGGAGATCCACGCCTACCGCAAGCTCTTGGAGGGCGAGGAGGAGAGGCTACGCCTGTCCCCC
AGCCCTACCTCGCAGCGCAGCCGTGGCCGTGCTTCTCTACTCATCCCAGACACAGGGTGGGGGC
AGCGTCAACAAAAGCGCAAACTGGAGTCCACTGAGAGCCGCAGCAGCTTCTCACAGCACGCACG
CACTAGCGGGCGCGTGGCCGTGGAGGAGGTGGATGAGGAGGGCAAGTTTGTCCGGCTGCGCAACA
AGTCCAATGAGGACCAGTCCATGGGCAATTGGCAGATCAAGCGCCAGAATGGAGATGATCCCTTG
CTGACTTACCGGTTCCCAACAAAGTTCACCCTGAAGGCTGGGCAGGTGGTGACGATCTGGGCTGCA
GGAGCTGGGGCCACCCACAGCCCCCTACCGACCTGGTGTGGAAGGCACAGAACACCTGGGGCTG
CGGGAACAGCCTGCGTACGGCTCTCATCAACTCCACTGGGGAAGAAGTGGCCATGCGCAAGCTGG
TGCGCTCAGTGACTGTGGTTGAGGACGACGAGGATGAGGATGGAGATGACCTGCTCCATCACCACC
ACGGCTCCCCTGCAGCAGCTCGGGGGACCCCGCTGAGTACAACCTGCGCTCGCGCACCGTGTGTGT
GCGGGACCTGCGGGCAGCCTGCCGACAAGGCATCTGCCAGCGGCTCAGGAGCCCAGGTGGGGCGGA
CCCATCTCTCTGGCTCTTCTGCCTCCAGTGTACCGGTCACTCGCAGCTACCGCAGTGTGGGGGGCA
GTGGGGGTGGCAGCTTCGGGGACAATCTGGTCAACCGCTCCTACCTCCTGGGCAACTCCAGCCCC
GAACCCAGAGCCCCCAGAAGTGCAGCATCATGTAA
```

> Coderende sequentie voor ZMPSTE 24

```
ATGGGGATGTGGGCATCGCTGGACGCTTTGTGGGAGATGCCGGCCGAGAAGCGTATCTTCGGGGCC
GTGCTGCTCTTTTCTGGACAGTGTATCTTTGGGAGACCTTCTAGCACAGCGGCAGAGAAGGATA
TATAAAACAACAACACTCATGTACCACCGAGTTAGGACAGATCATGGATTCTGAAACATTTGAGAAA
TCTCGACTCTATCAACTGGATAAAAGCACTTTCAGCTTCTGGTCAGGACTCTATTCAGAGACTGAA
GGCACTCTTATTCTTCTTTGGAGGAATACCTTATCTCTGGAGACTTCTGGACGGTTCTGTGGTTA
TGCTGGCTTTGGACCAGAATATGAGATCACTCAGTCCCTGGTGTCTGCTGTTGGCTACACTTTTC
AGTGCATTGACTGGTTTGCCATGGAGTCTTTATAATACTTTTGTGATAGAAGAAAAACATGGCTTCA
ATCAACAGACTTTGGGGTTCTTCATGAAAGATGCAATCAAGAAATTTGTTGTGACTCAGTGTATTTT
GTTGCCGTGTCTTCACTTCTACTTTACATTATTAATAATTGGGGGTGACTATTTTTTTATTTATGCCT
GGCTGTTACATTAGTTGTGTCTCTGGTTCTTGTGACAATCTATGCTGATTATATTGCCCTTTATTT
GACAAATTCACACCTCTGCCTGAGGGAAAGCTTAAAGAAGAAATTGAAGTAATGGCAAAGAGTAT
TGACTTTCCTTTGACGAAGGTGTATGTTGTGGAAG
```

7.4 Alingment ZMPSTE24 exon 1

HEK_ex1_Z	-----CGCCCTCTTT	10
NHDF_ex1_Z	-----CCGCCCTCTTT	11
Referentie	TGTTGATGCAACACAGCTCAGCCGGGCCCGAACTCGGCGTTTGGGTCCCCGCCCTCTTT	60

HEK_ex1_Z	GGGCCGGAAGTGAGGAAGGTGGGGCTGGGGCTTTTCTGTAGAACTAGGAGGGACTAGG	70
NHDF_ex1_Z	GGGCCGGAAGTGAGGAAGGTGGGGCTGGGGCTTTTCTGTAGAACTAGGAGGGACTAGG	71
Referentie	GGGCCGGAAGTGAGGAAGGTGGGGCTGGGGCTTTTCTGTAGAACTAGGAGGGACTAGG	120

HEK_ex1_Z	GAGAGTCTGCAAGGGGAAGAGTGTGTCTGTGACACTGCCAGCAGCGCGCAGAGGGAGGGA	130
NHDF_ex1_Z	GAGAGTCTGCAAGGGGAAGAGTGTGTCTGTGACACTGCCAGCAGCGCGCAGAGGGAGGGA	131
Referentie	GAGAGTCTGCAAGGGGAAGAGTGTGTCTGTGACACTGCCAGCAGCGCGCAGAGGGAGGGA	180

HEK_ex1_Z	TGGGGCGGGTATCGGCGTAGGGGCCCTCGGAAAGAACGGATATTGCTGTGACACCGCGG	190
NHDF_ex1_Z	TGGGGCGGGTATCGGCGTAGGGGCCCTCGGAAAGAACGGATATTGCTGTGACACCGCGG	191
Referentie	TGGGGCGGGTATCGGCGTAGGGGCCCTCGGAAAGAACGGATATTGCTGTGACACCGCGG	240

HEK_ex1_Z	GGACGCTCTGAAGGGACGAGTGTGCGTGTGGCACCGGTGCACGCTGAAGGAGCCGGCGGA	250
NHDF_ex1_Z	GGACGCTCTGAAGGGACGAGTGTGCGTGTGGCACCGGTGCACGCTGAAGGAGCCGGCGGA	251
Referentie	GGACGCTCTGAAGGGACGAGTGTGCGTGTGGCACCGGTGCACGCTGAAGGAGCCGGCGGA	300

HEK_ex1_Z	ACCGGGTGGCCATGGGGATGTGGGCATCGCTGGACGCTTTGTGGGAGATGCCGGCCGAGA	310
NHDF_ex1_Z	ACCGGGTGGCCATGGGGATGTGGGCATCGCTGGACGCTTTGTGGGAGATGCCGGCCGAGA	311
Referentie	ACCGGGTGGCCATGGGGATGTGGGCATCGCTGGACGCTTTGTGGGAGATGCCGGCCGAGA	360

HEK_ex1_Z	AGCGTATCTTCGGGGCCGTGCTGCTCTTTTCTGGACAGTGTATCTTTGGGAGACCTTCC	370
NHDF_ex1_Z	AGCGTATCTTCGGGGCCGTGCTGCTCTTTTCTGGACAGTGTATCTTTGGGAGACCTTCC	371
Referentie	AGCGTATCTTCGGGGCCGTGCTGCTCTTTTCTGGACAGTGTATCTTTGGGAGACCTTCC	420

HEK_ex1_Z	TAGCACAGCGGCAGGTGAGCCTAGACAGGGTCCAACCTGACCCCATACCCGGCCAGCCC	430
NHDF_ex1_Z	TAGCACAGCGGCAGGTGAGCCTAGACAGGGTCCAACCTGACCCCATACCCGGCCAGCCC	431
Referentie	TAGCACAGCGGCAGGTGAGCCTAGACAGGGTCCAACCTGACCCCATACCCGGCCAGCCC	480

HEK_ex1_Z	TGGAGTAGCCTTGCTTCGACCCTGAGACTCTTGATTGCTTCGGTCCCCGCGCCAGTCTC	490
NHDF_ex1_Z	TGGAGTAGCCTTGCTTCGACCCTGAGACTCTTGATTGCTTCGGTCCCCGCGCCAGTCTC	491
Referentie	TGGAGTAGCCTTGCTTCGACCCTGAGACTCTTGATTGCTTCGGTCCCCGCGCCAGTCTC	540

HEK_ex1_Z	GTCTTTGTGGTCCCTGCTGAGTCTCGTAACTTGGCCCGATGGCGGACTGTGGCTTTGAGG	550
NHDF_ex1_Z	GTCTTTGTGGTCCCTGCTGAGTCTCGTAACTTGGCCCGATGGCGGACTGTGGCTTTGAGG	551
Referentie	GTCTTTGTGGTCCCTGCTGAGTCTCGTAACTTGGCCCGATGGCGGACTGTGGCTTTGAGG	600

HEK_ex1_Z	AGGGTCTTGGTGCGTCAAGGAAGTTTTCTGTAACGTTATC-----	590
NHDF_ex1_Z	AGGGTCTTGGTGCGTCAAGGAAGTTTTCTGTAACGT-----	587
Referentie	AGGGTCTTGGTGCGTCAAGGAAGTTTTCTGTAACGTTATCATGGGACCCAATC	653

7.5 TALEN ontwikkelingsprotocol [92]

7.5.1 Monomeer bibliotheek amplificatie en normalisatie

1. Primers maken: 10 μ M

Ex F1,F2,F3,R1,R2,R4

Ln F2,F3,F4,F5,F6

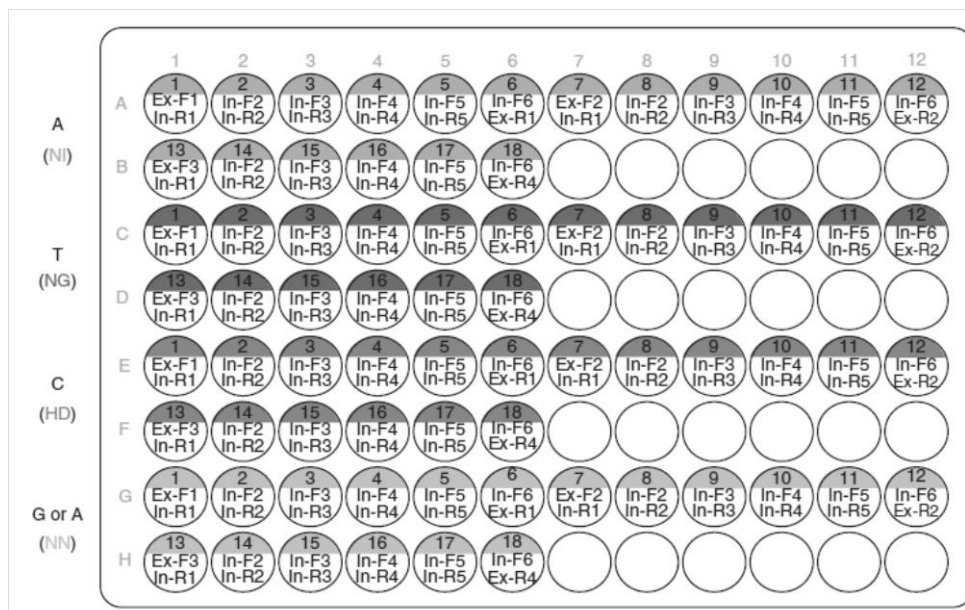
Ln R1,R2,R3,R4,R5

2. Aanmaken monomeer bibliotheek:

- A1-B6: monomeer template pNI_v2
- C1-D6: monomeer template pNG_v2
- E1-F6: monomeer template pHD_v2
- G1-H6: monomeer template pNN_v2

Voor 1 reacties:

- 1 μ l dNTP 100 mM (25 mM elk)
- 20 μ l Herculase II PCR buffer 5x
- 1 μ l μ l Herculase II fusion polymerase
- 75 μ l Bidest
- 1 μ l monomeer template plasmide (5 ng/ μ l) (elk afzonderlijk toevoegen 1 μ l)
- 2 μ l primermix (1 μ l per primer 10 μ M)



Figuur 38: Voorstelling van plaat met alle monomeren. De primers die moeten worden toegevoegd worden weergegeven.

3. PCR reactie

Cycle number	Denature	Anneal	Extend
1	95 °C, 2 min		
2–31	95 °C, 20 s	60 °C, 20 s	72 °C, 10 s
32			72 °C, 3 min

4. Gel elektroforese

- 4 µl van 18 wells van 1 monomeer + 1^e van andere monomeren op gel zetten om amplificatie te controleren.
- 2% (wt/vol) agarosegel in 1xTAE elektroforese buffer, 135 V voor 25 min

5. Reacties zuiveren

- Zuiveren met QIAquick PCR purification kit
- 30 min laten drogen bij 37 °C
- 50 µl Buffer EB toevoegen aan elke well

6. Concentraties bepalen met Nanodrop

9. Buffer EB toevoegen tot alle monomeren zelfde concentratie hebben

- Monomeren 1, 6, 7, 12, 13, 18 tot 25 ng/µl rest tot 20 ng/µl

Pauzepunt: monomeren op -20 °C verschillende maanden houdbaar

7.5.2 TALEN hiërarchische ligatie

10. Select target sequenties. Opdelen in hexameren

11. Hexameren maken: Golden Gate digestion-ligation

- 1 epje per hexameer: 1 µl monomeer dus in totaal 6 µl (6 basen per hexameer)

12. Juiste monomeren toevoegen voor vorming hexameer.

13. Reagentia toevoegen aan elke hexameer tube (maken voor 26 reacties, enzymen als laatste toevoegen)

- 0.75 µl Esp3I (BsmBI) 10 U/µl
- 1 µl Tango buffer 10x
- 1 µl DTT 10 mM (gevoelig aan lucht!: vers maken of uit -70 °C)
- 0.25 µl T7 ligase 3,000 U/µl
- 1 µl ATP 10 mM

14. Elke hexameer tube in thermocycler voor ongeveer 3 uur

Cycle number	Digest	Ligate
1-15 Hold at 4 °C	37 °C, 5 min	20 °C, 5 min

Pauzepunt: kan overnacht laten lopen

15. Gel elektroforese

- Vorming van elke hexameer controleren met gel elektroforese :
- 3 µl per hexameer
- 1 µl ladder
- 2% agarosegel in 1x TBE buffer, 2x SYBR Safe dye, 15 V cm⁻¹, tot 650 bp ladder
- band gescheiden is van de rest.

16. Exonuclease behandeling: toevoegen aan elke hexameer

- 1 µl PlasmidSafe DNase, 10 U/ µl
- 1 µl PlasmidSafe reaction buffer, 10x
- 1 µl ATP, 10mM
- 7 µl hexameer van stap 14

17. Inubeer hexameren 30 min bij 37 °C vervolgens inactiveren voor 30 min bij 70 °C

Pauzepunt: Circulair DNA 1 week in diepvries stabiel

18. Hexameer PCR mengsel (50 µl) (Maken voor 24,5 reacties)

- 0.5 µl dNTP, 100mM
- 10 µl Herculase II reactie buffer, 5x
- 1 µl Hex-F, Hex-R primers (Verdunnen van 100 µM naar 10 µM)
- 0.5 µl Herculase II fusion DNA polymerase
- 37 µl Bidest
- 1 µl hexameer van stap 17

19. PCR

Cycle number	Denature	Anneal	Extend
1	95 °C, 2 min		
2-36	95 °C, 20 s	60 °C, 20 s	72 °C, 30 s
37			72 °C, 3 min

20. Gel zuivering van geamplificeerde hexameren (700 bp)

- 40-50 µl van elk product laden op gel
- 2% agarosegel in 1x TBE buffer, 1x SYBR Safe dye, 15V cm⁻¹, tot 650 bp ladder band gescheiden is van de rest. (30min 135V)
- 1µg van 1-kb ladder
- Bandjes uitsnijden uit gel (Met scalpel onder UV)
Persoonlijke bescherming dragen (gezichtsmasker)

21. Gel bandjes zuiveren met MinElute gel extraction kit: voor en na wegen!

- 20 µl buffer EB voorverwarmd op 55 °C

22. Nanodrop

25. Pas concentratie van elke hexameer aan tot 20 ng/ µl met Buffer EB

26. Golden Gate assembly of hexamers into TALE backbones

- Hexameren samenvoegen in juiste TALE backbone (nuclease)
- 1 µl TALE backbone vector (100ng/ µl)
- 0.75 µl BsaI-HF
- 1 µl NEBuffer 4, 10x
- 1 µl BSA, 10x
- 1 µl ATP, 10mM
- 0.25 µl T7 ligase
- 2 µl Bidest
- 3 µl hexameer (1 µl elk)

Controle:

- Alles hetzelfde maar
- 5 µl Bideest
- Geen hexameren

27. Thermocycler voor ongeveer 4 uur

Cycle number	Digest	Ligate	Inactivate
1-20	37 °C, 5 min	20 °C, 5 min	
21			80 °C, 20 min

Pauzepunt: op -20 °C minstens een maand te bewaren

28. Eventueel: gel elektroforese

- 5 µl ligatieproduct uit stap 27
- 1 µg 1-kb plus DNA ladder
- 2% agarosegel in 1x TBE buffer, 2x SYBR Safe dye, 15V cm⁻¹, tot scheiding van 1650 en 2000 van ladder.

7.5.3 TALEN transformatie en sequentie verificatie

29. Transformatie van ligatieproduct in competente *E. coli* DH5α

- LB-platen gieten met juiste antibioticum (carbenicilline)
- Vloeibaar LB medium maken
- Cellen uit -80 °C: 1 epje = 100 µl. Op ijs en na ontdooien 50 µl overbrengen naar proper epje (ook al op ijs)
- 5 µl plasmide toevoegen per epje (in -20 °C)
- 5min incuberen op ijs
- 45s incuberen op 42 °C (in waterbad)
- 5min incuberen op ijs
- Toevoegen aan 800 µl SOC medium (in tubjes)
- 1u incuberen bij 37 °C (in shaker)
- 180 µl uitplaten op LB-plaat (druppel op plaat, driehoek in ethanol en flamberen, afkoelen en uitsmeren)
- Platen inpakken in parafilm en ondersteboven bij 37 °C zetten

30. Controle bacteriële groei: plaat bekijken.

31.8 kolonies per plaat afschrappen met gele tip, op andere gelabelde plaat streep zetten en rest in pcr epje met 100 µl water. Deze plaat (met strepen) inpakken en ondersteboven in warme kamer zetten.

32. Denatureren van bacteriën in 100 µl water door 10min bij 94 °C in PCR machine te zetten.

32. Kolonie PCR mengsel

- 1 µl kolonie suspensie van stap 31
- 0.25 µl dNTP 100mM
- 2.5 µl Taq-B polymerase buffer, 10x
- 0.25 µl TALE-Seq-F1 en R1
- 0.1 µl Taq-B polymerase
- 20.9 µl Bidest

33. Kolonie PCR

Cycle number	Denature	Anneal	Extend
1	94 °C, 3 min		
2-31	94 °C, 30 s	60 °C, 30 s	68 °C, 2 min
32			68 °C, 5 min

34. Gel elektroforese

- 2% gel
- 10 µl PCR product
- 4 µl ladder
- 30min 135volt
- Lengte bandje 2175 bp

35. Gel Imagen

36. Kolonie met juiste bandgrootte inoculeren in 3ml vloeibaar LB medium met 100 µg/l ampicilline (Carbenicelline). Overnacht laten groeien.

35. Glycerol stock maken: 750 µl glycerol 50% + 750 µl bacterie oplossing. Opslaan bij -80 °C in bakje met glycerol stock

37. Plasmide isoleren uit kolonies met QIAprep Spin miniprep kit.

38. Tandem repeat regio's sequencen met sequencing primers