

Erprobung einer CRISPR/Cas9-basierten knock-out-Strategie für humane DNA-Ligasen
und Analyse des Effektes auf die DNA-Reparatur

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Möschl, Vincent
aus Salzgitter

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann

Tag der Disputation: 17. November 2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau der menschlichen Retina	1
1.2	Erbliche Netzhautdystrophien	2
1.2.1	X-chromosomale Retinitis pigmentosa	2
1.3	Gentherapie und Genome editing	3
1.3.1	Das CRISPR/Cas-System	5
1.4	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen im Kontext des Genome editing	7
1.4.1	Gemeinsamer Beginn der Reparaturmechanismen	7
1.4.2	Nonhomologous end joining (NHEJ)	9
1.4.3	Homology-directed repair (HDR)	10
1.4.4	Microhomology-mediated end joining (MMEJ)	12
1.5	DNA-Ligasen	14
1.5.1	DNA-Ligase 1	14
1.5.2	DNA-Ligase 3	15
1.5.3	DNA-Ligase 4	15
1.6	Besonderheiten des Genome editing im Bereich der Retina	15
1.7	Beeinflussung der Ergebnisse des Genome editing durch Manipulation der DNA-Ligase-Aktivität	16
1.8	Zielsetzung	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Geräteliste	21
2.1.2	Verbrauchsmaterial	23
2.1.3	Chemikalien	24
2.1.4	Vektoren und Plasmide	25
2.1.5	Antikörper	27
2.1.6	Protein-Größenmarker	28
2.1.7	Stammlösungen.....	29
2.1.8	Medien	30
2.1.8.1	Medien für die Bakterienkultur.....	30

2.1.8.2 Medien für die Zellkultur.....	30
2.1.9 Bakterien	30
2.1.10 Zelllinien	31
2.1.11 Reagenziensysteme und Kits	31
2.1.12 Software	31
2.1.13 Ausgangsmaterial	32
2.2 Methoden	32
2.2.1 Bakterienkultur	32
2.2.2 Maxi-Präparation	32
2.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration im Photometer	33
2.2.4 Kultivierung von HEK293T- und HEK293T ^{mORF15} -Zellen	33
2.2.5 Aussaat einer definierten Anzahl von Zellen.....	34
2.2.6 Transfektion mit Polyethylenimin (PEI).....	35
2.2.7 Fluoreszenzmikroskopie	36
2.2.8 Proteinisolation aus Säugetierzellen	36
2.2.9 Coomassie Plus (Bradford)-Assay	37
2.2.10 Transfektion von Zellen für die Quantifikation von DNA-Ligase-Protein	37
2.2.11 Anreicherung von Zellen mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS).....	38
2.2.12 SDS-PAGE	39
2.2.13 Western Blot	40
2.2.14 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	43
2.2.15 MMEJ-Assay	44
2.2.16 BRET-Reporter-Assay	47
2.2.17 MTT-Assay	50
2.2.18 Statistische Auswertung	51
3 Ergebnisse	53
3.1 Expressionsanalyse der DNA-Ligasen.....	53
3.2 MMEJ-Assay.....	65
3.3 BRET-Reporter-Assay.....	69
3.4 MTT-Assay	72

4	Diskussion	75
4.1	Auswirkungen der CRISPR/Cas9-vermittelten DNA-Ligase-KO-Strategie auf die Integration einer Luziferasesequenz in den murinen RPGR-ORF15-Locus	75
4.2	Auswirkungen der CRISPR/Cas9-vermittelten DNA-Ligase-KO-Strategie auf die NHEJ-Aktivität in HEK 293T-Zellen	80
4.3	Veränderungen des DNA-Ligase-Protein-Gehalts von HEK 293T-Zellen nach Anwendung der CRISPR/Cas9-vermittelten KO-Strategie	83
4.4	Auswirkungen der CRISPR/Cas9-vermittelten DNA-Ligase-KO-Strategie auf die Viabilität von HEK 293T-Zellen	85
4.5	Schlussfolgerungen und Ausblick	90
5	Zusammenfassung	92
6	Summary	94
7	Abkürzungsverzeichnis	96
8	Abbildungsverzeichnis	100
9	Tabellenverzeichnis	102
10	Literaturverzeichnis	103
11	Publikationsverzeichnis	119
12	Ehrenwörtliche Erklärung	120
13	Danksagung	121

1 Einleitung

1.1 Aufbau der menschlichen Retina

Die Wand des menschlichen Auges weist eine Dreischichtung auf, wobei eine äußere Augenhaut (Tunica fibrosa) mit Sclera und Cornea, eine mittlere Augenhaut (Tunica vasculosa, Uvea) mit Iris, Corpus ciliare und Choroidea sowie eine innere Augenhaut, die von der Retina repräsentiert wird, zu unterscheiden sind (Drenckhahn et al., 2004).

Die Retina lässt sich in eine „blinde“ Pars caeca im Bereich von Iris und Corpus ciliare sowie eine photorezeptive Pars optica im Bereich der Rück- und Seitenwände des Auges gliedern, die an der Ora serrata ineinander übergehen. Während die Pars caeca histologisch ein zweischichtiges Epithel darstellt, ist im Bereich der Pars optica eine Unterteilung in zehn Schichten möglich. Von außen nach innen sind dies: Das Pigmentepithel, die Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren, die äußere Grenzschiicht, die äußere Körnerschicht, die äußere plexiforme Schicht, die innere Körnerschicht, die innere plexiforme Schicht, die Ganglienzellschicht, die Nervenfaserschicht sowie die innere Grenzschiicht. Abweichungen von diesem Schema finden sich im Bereich der Sehnervenpapille, die nur Nervenfasern enthält, sowie im Bereich der Fovea centralis, die ausschließlich Zapfen enthält und in der alle weiter innen liegenden Retinaschichten an den Rand gedrängt sind (Drenckhahn et al., 2004).

In Bezug auf die Photorezeptoren lassen sich diese in Stäbchen und Zapfen unterscheiden. Die im Verhältnis 25 : 1 häufigeren Stäbchen dienen dem Sehen bei Dämmerung (skotopisch), während die Zapfen dem Sehen am Tage sowie dem Farbsehen dienen (photopisch). Die Häufigkeit der einzelnen Rezeptortypen variiert je nach Netzhautareal. Die Photorezeptoren erstrecken sich über drei Schichten: Die Schicht der Außen- und Innensegmente, die äußere Grenzschiicht sowie die äußere Körnerschicht, in welcher ihre Perikaryen zu liegen kommen. Das lichtempfindliche Außensegment sowie das Innensegment sind über ein kurzes Cilium verbunden (Drenckhahn et al., 2004).

Die innere Körnerzellschicht beherbergt die Zellkörper der Bipolar-, Horizontal-, Amakrin-, Müller- sowie interplexiforme Zellen. In den plexiformen Schichten finden sich die synaptischen Kontakte zwischen den Zellen (Drenckhahn et al., 2004).

Hinsichtlich des Informationsflusses stellen die Photorezeptoren das erste Neuron der Sehbahn dar und werden auf das zweite Neuron, die Bipolarzelle, verschaltet. Diese wiederum bilden Synapsen mit dem dritten Neuron, der Ganglienzelle. Die Axone der Ganglienzelle verlaufen in der Nervenfaserschicht und projizieren über den Sehnerven schließlich in das Corpus geniculatum laterale des Zwischenhirns. Querverschaltungen

innerhalb der Retina erfolgen über die Horizontal-, Amakrin- und interplexiformen Zellen (Drenckhahn et al., 2004).

1.2 Erbliche Netzhautdystrophien

Erbliche Netzhautdystrophien sind eine große Gruppe von Netzhauterkrankungen mit neurodegenerativem Charakter, die zu einer Verschlechterung des Sehvermögens bis hin zur Blindheit führen. Es besteht eine starke Heterogenität der zugrundeliegenden genetischen Ursachen mit bekannten ursächlichen Mutationen in über 280 Genen. Mögliche Modi der Vererbung sind hierbei je nach Krankheitsentität autosomal-dominant oder -rezessiv, X-chromosomal sowie mitochondrial (Benati et al., 2020; Ziccardi et al., 2019). Eine starke Heterogenität besteht auch im Hinblick auf die klinische Präsentation mit Unterschieden unter anderem in Bezug auf die Schwere und Progressionsgeschwindigkeit der Erkrankungen sowie das Lebensalter, in welchem die ersten Symptome auftreten. Diese Variabilität besteht hierbei nicht nur zwischen den einzelnen erblichen Netzhautdystrophien, sondern auch zwischen Patienten, die an der gleichen Dystrophie leiden (Ziccardi et al., 2019).

Mögliche Klassifikationsschemata beziehen sich unter anderem auf den in erster Linie betroffenen Zelltyp wie zum Beispiel Stäbchen, Zapfen, das retinale Pigmentepithel oder Zellen der inneren Netzhautschichten. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Unterscheidung von Makulo- und Retinopathien in Abhängigkeit davon, ob zentrale oder periphere Netzhautanteile betroffen sind. Vertreter der erblichen Netzhautdystrophien sind unter anderem die Leber'sche kongenitale Amaurose, die Choroideremie, das Usher-Syndrom, der Morbus Stargardt, die Achromatopsie, die X-chromosomale Retinoschisis sowie die Retinitis pigmentosa (Ziccardi et al., 2019).

1.2.1 X-chromosomale Retinitis pigmentosa

Die häufigste zur Erblindung führende erbliche Netzhautdystrophie ist die Retinitis pigmentosa (RP) mit einer geschätzten globalen Prävalenz von 1 : 4000. Typischerweise kommt es initial zu einer Affektion der Stäbchen mit späterer Beteiligung der Zapfen. Die Patienten präsentieren sich klinisch mit Nachtblindheit, zunehmender Einengung des Blickfeldes und einer allmählich auftretenden Reduktion der Sehschärfe. Typische Befunde in der Fundoskopie sind „knochenkörperchen“-artige bis teppichartige Pigmentierungen, wächserne Blässe des Sehnervenkopfes sowie eine Engstellung der retinalen Arterien (Zhang, 2016).

Die Vererbung kann autosomal-rezessiv oder -dominant, X-chromosomal, oligogen oder mitochondrial erfolgen. Die X-chromosomale RP betrifft vor allem männliche Personen, zeigt einen besonders schweren Verlauf und liegt in 10-20 % aller RP-Fälle vor (Cehajic Kapetanovic et al., 2019). Ursächlich sind in mehr als 70 % der Fälle Mutationen des Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-Gens. Seltener finden sich Mutationen im retinitis pigmentosa 2 (RP2)- und retinitis pigmentosa 23 (RP23)-Gen (Cehajic Kapetanovic et al., 2019).

Bedingt durch alternatives Spleißen existieren verschiedene RPGR-Isoformen, von denen RPGR-Ex 1-19 und RPGR-ORF15 in der Retina nachgewiesen werden konnten (Cehajic Kapetanovic et al., 2019; Zhang et al., 2019). Insbesondere RPGR-ORF15 scheint für das Überleben und die Funktion von Photorezeptoren bedeutsam zu sein (Cehajic Kapetanovic et al., 2019). Das RPGR-Protein ist in der Retina im Bereich des Ziliums lokalisiert, welches Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren verbindet und wurde funktionell mit der Organisation von Mikrotubuli, der Regulation des Transports in primären Zilien und der Stabilität von Aktin in Verbindung gebracht (Zhang et al., 2019). So konnten Mutationen von RPGR-ORF15 mit Anomalien des Proteintransports im Bereich des verbindenden Ziliums in Zusammenhang gebracht werden, die schlussendlich den Untergang von Photorezeptoren bedingen können (Cehajic Kapetanovic et al., 2019). Der Großteil der RPGR-ORF15-Mutationen konnte im terminalen ORF15-Exon lokalisiert werden, welches einen Hotspot für Mutationen darstellt (Vervoort et al., 2000; Vervoort & Wright, 2002)

Es existieren zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine zugelassenen Therapieoptionen zur kausalen Behandlung von durch Mutationen im RPGR-Gen bedingten RP-Formen (Cehajic Kapetanovic et al., 2019).

1.3 Gentherapie und Genome editing

Auf Gentherapie und Genome editing basierende Therapiestrategien stellen Ansätze zur Behandlung von erblichen Netzhautdystrophien sowie weiterer monogener Erkrankungen dar (Yanik et al., 2016; Ziccardi et al., 2019). So werden beispielsweise bereits seit März 2017 klinische Studien durchgeführt, welche die Sicherheit und den Erfolg einer Gensatztherapie zur Behandlung von X-chromosomaler Retinitis pigmentosa ausgelöst durch RPGR-ORF15-Mutationen evaluieren sollen (Cehajic Kapetanovic et al., 2019).

Je nach zugrundeliegender Mutation sind im Rahmen der „klassischen“ Gentherapie

unterschiedliche Ansätze zu wählen: Bei Vorliegen einer Loss of function-Mutation sind beispielsweise Strategien basierend auf der Gensatztherapie erfolversprechend. Hierbei wird eine korrekte Kopie des betroffenen Gens in die Zielzellen über zum Beispiel virale Vektoren eingebracht, sodass es zu einer Expression des korrekten Proteins kommt (Mühlfriedel et al., 2017; Ziccardi et al., 2019). Als Beispiel sei hierbei Voretigen-Neparvovec genannt, welches zur Therapie der durch RPE65-Mangel ausgelösten Leber'schen kongenitalen Amaurose dient und als erstes gentherapeutisches Agens erfolgreich in einer randomisierten Phase III-Studie getestet wurde (Russell et al., 2017). Unter dem Handelsnamen Luxturna erfolgte eine Zulassung im Dezember 2017 durch die FDA und im November 2018 durch die Europäische Kommission (Keeler & Flotte, 2019). Gain of function-Mutationen könnten demgegenüber unter anderem durch Methoden des Gene Silencing therapiert werden. Hierbei wird beispielsweise versucht, die Expression des mutierten Proteins mit seinen toxischen Wirkungen durch „knock-down“ der entsprechenden mRNA mittels RNA-Interferenz zu erreichen (Cox et al., 2015; Ziccardi et al., 2019). Ein weiterer Ansatz ist die Verhinderung von fehlerhaftem Spleißen durch den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden (Ziccardi et al., 2019).

Eine andere Strategie wird im Rahmen des Genome editing mit der Korrektur pathogener Mutationen im Genom verfolgt. Es wird also der Versuch unternommen, eine tatsächliche Heilung erblicher Erkrankungen in den Zielzellen herbeizuführen (Benati et al., 2020). Sowohl Loss of function- als auch Gain of function-Mutationen könnten mit Hilfe Genome editing-basierter Ansätze therapiert werden (Ziccardi et al., 2019). Ein Vorteil des Genome editing gegenüber den oben vorgestellten Ansätzen der „klassischen“ Gentherapie ist unter anderem die Möglichkeit einer permanenten Korrektur der krankheitsverursachenden Mutation. Im Gegensatz dazu ist die Expression des korrekten Proteins im Rahmen der Gensatztherapie zeitlich limitiert. Ein weiterer Vorteil ist die Tatsache, dass das durch Genome editing korrigierte Gen im Genom der Zelle unter der Kontrolle der zelleigenen regulatorischen Sequenzen, also Promotoren und Polyadenylierungssignale, steht. Der Zelle wird dadurch die Möglichkeit gegeben, die Expression des korrigierten Gens bedarfsgerecht zu regulieren und so die für ihr Funktionieren optimale Menge des korrekten Proteins zu produzieren. Die regulatorischen Sequenzen der künstlich geschaffenen Expressionssysteme, die im Rahmen der Gensatztherapie die Expression des zu ersetzenden Gens steuern, sind hierzu eher nicht in der Lage. Ein zusätzlicher Aspekt ist die Möglichkeit einer negativen Beeinflussung der Funktion und Produktion des im Rahmen der Gensatztherapie

exprimierten korrekten Proteins durch ein missense-mutiertes Protein, welches ohne eine Korrektur des mutierten Gens im Genom durch Genome editing, weiterhin exprimiert wird (Yanik et al., 2016; Ziccardi et al., 2019) Im Hinblick auf Gain of function-Mutationen ist ein „knock-down“ von Proteinen mittels RNA-Interferenz nicht immer vollständig möglich. Ein weiteres Problem ist die mögliche geringe Spezifität der RNA-Interferenz, welche in Bezug auf Sicherheitsaspekte und Effektivität von Therapiestrategien nachteilig sein kann. Eine spezifische Inaktivierung oder Korrektur des mutierten Gens auf genomischer Ebene mittels Genome editing-basierter Ansätze bietet hier eine mögliche Alternative (Cox et al., 2015).

Eine häufig angewendete Strategie zur Durchführung des Genome editings beruht auf der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) an den zu editierenden genomischen Loci mittels programmierbarer und somit sequenzspezifischer Endonukleasen. Als Beispiele sind hierbei Meganukleasen, Zinkfinger-Nukleasen, Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) sowie das CRISPR/Cas-System zu nennen. Das eigentliche Editieren des Genoms erfolgt dann durch die daraufhin stattfindenden zelleigenen Prozesse zur DSB-Reparatur wie Nonhomologous end joining (NHEJ), Homology-directed repair (HDR) und Microhomology-mediated end joining (MMEJ) (Yanik et al., 2016).

1.3.1 Das CRISPR/Cas-System

Die Anwendung des Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated genes (CRISPR/Cas)-Systems stellt eine effiziente und vielseitig anwendbare Möglichkeit zur Erzeugung von DSBs zum Zwecke des Genome editing dar (Benati et al., 2020). Bei herkömmlichen im Rahmen des Genome editing verwendeten Endonukleasen wie Zinkfinger-Nukleasen und TALENs erfolgt die Erkennung der DNA-Zielsequenz durch Protein-DNA-Interaktionen, sodass für die Editierung verschiedener Loci unterschiedlich designte Endonukleaseproteine notwendig sind. Cas9, eine im Rahmen des Genome editing mit dem CRISPR/Cas-System eingesetzte Endonuklease, wird demgegenüber durch RNA-DNA-Hybridisierung mittels einer guide RNA (gRNA) zu ihrer Zielsequenz dirigiert. Dadurch ist die Editierung unterschiedlicher Loci durch simple Verwendung verschiedener gRNAs möglich. Eine weitere Voraussetzung ist hierbei, dass downstream der von der gRNA erkannten Sequenz ein kurzes sogenanntes protospacer adjacent motif (PAM) vorhanden sein muss, welches vom Cas-Protein selbst via Protein-DNA-Wechselwirkung erkannt wird (Barman et al., 2020; Wilkinson et al., 2019).

Natürlicherweise stellt das CRISPR/Cas-System einen adaptiven Abwehrmechanismus von Prokaryoten gegen eindringende Fremd-DNA beispielsweise durch Bakteriophagen dar. Es lassen sich hierbei zwei Klassen von CRISPR/Cas-Systemen mit sechs Typen und 27 Subtypen unterscheiden. Die Endonuklease Cas9 gehört hierbei dem in Bakterien vorkommenden Typ II CRISPR/Cas-System an. Die adaptive Immunität der Prokaryoten gegen die Fremd-DNA wird im Rahmen des CRISPR/Cas9-Systems durch mehrere Schritte erreicht: Zunächst werden die als Fremd-DNA identifizierten und als Protospacer bezeichneten Abschnitte der Fremd-DNA als sogenannter Spacer zwischen repetitiven Sequenzen im CRISPR-Locus des Bakteriums eingebaut. Diese Spacer sind die Grundlage des bakteriellen immunologischen Gedächtnisses. Der CRISPR-Locus kann dann transkribiert werden, wobei precursor CRISPR-RNA (pre-crRNA) entsteht. Diese kann nach weiterer Prozessierung als reife crRNA unter Vermittlung einer weiteren RNA-Form, der trans-activating crRNA (tracrRNA), einen Komplex mit dem Cas9-Protein bilden. Bei einer erneuten Bedrohung durch eindringende Fremd-DNA erkennt das Cas9-Protein zunächst das in den Fremdsequenzen vorhandene PAM. Wenn im Anschluss daran die mit dem Cas9-Protein assoziierte crRNA den etwa 20 Nukleotide (nt) langen, upstream des PAM gelegenen Protospacer erkennt, wird ein DSB mit glatten Enden 3 nt upstream des PAM induziert (siehe Abbildung 1.1) (Barman et al., 2020; Wilkinson et al., 2019). Jinek et. al konnten zeigen, dass auch ein einzelnes Transkript, genannt single guide RNA (sgRNA), bestehend aus der zusammengefassten crRNA und tracrRNA hinreichend ist, um mittels Cas9 sequenzspezifische DSBs zu erzeugen und vereinfachen so die Nutzung des CRISPR/Cas9-Systems als vielseitiges und einfach anzuwendendes Werkzeug im Rahmen des Genome editing (Jinek et al., 2012; Wilkinson et al., 2019). Wird in der vorliegenden Arbeit die Bezeichnung guide RNA (gRNA) verwendet, so ist hiermit eine solche zusammengefasste sgRNA gemeint. Die für die DSB-Induktion notwendige Sequenz des PAM variiert zwischen den Cas9-Proteinen aus verschiedenen Bakterienspezies (Fonfara et al., 2014). Des Weiteren existieren Ansätze, die PAM-Spezifität durch Veränderung der Struktur der Cas9-Proteine zu modulieren (Ribeiro et al., 2018; Wilkinson et al., 2019).

Eine weitere bedeutsame Charakteristik des CRISPR/Cas9-Systems ist die Möglichkeit des multiplexed Genome editing, bei welchem durch gleichzeitige Verwendung von mehreren verschiedenen gRNAs DSBs an unterschiedlichen Stellen des Genoms einer Zelle induziert und diese somit editiert werden können (Le Cong et al., 2013).

Ein problematischer Aspekt des Genome editing mit dem CRISPR/Cas9-System ist das

mögliche Auftreten einer sogenannten off target-Aktivität, also der unspezifischen Induktion von DSBs an Stellen des Genoms, an welchen dies nicht intendiert ist. Ursächlich hierfür ist die Existenz einer gewissen Toleranz des Cas9-Proteins für Fehlpaarungen zwischen der gRNA und der genomischen DNA. Zur Lösung dieses Problems existieren verschiedene Ansätze zur Erhöhung der Cas9-Spezifität und somit zur Reduktion der off target-Aktivität (Barman et al., 2020; Ribeiro et al., 2018).

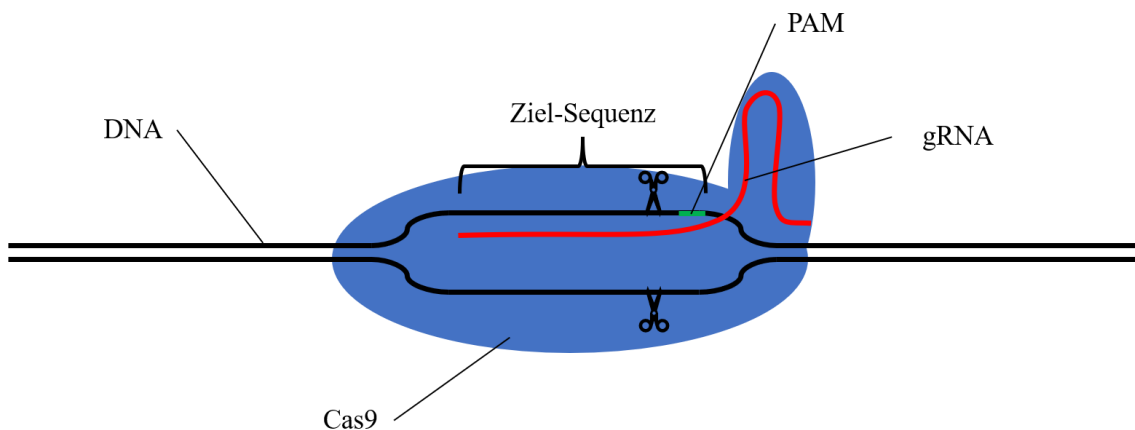


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der DSB-Induktion durch Cas9

1.4 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen im Kontext des Genome editing

Aufgrund der Bedeutsamkeit der zelleigenen DSB-Reparatur-Mechanismen im Rahmen des Genome editing (Yanik et al., 2016) soll im Folgenden kurz auf die drei Reparaturmechanismen NHEJ, HDR und MMEJ eingegangen werden.

1.4.1 Gemeinsamer Beginn der Reparaturmechanismen

Nach Entstehung eines DSB kommt es zur Rekrutierung des Ku70-Ku80-Heterodimers sowie des MRN-Komplexes bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1 zu den DNA-Enden (siehe Abbildung 1.2 A) (Ma et al., 2020; Tisi et al., 2020). Darauf folgt eine Aktivierung der Proteinkinasen DNA-PKc durch das Ku-Heterodimer und ATM durch den MRN-Komplex. Die Proteinkinase ATR/ATRIP wird zu RPA-bedeckter einzelsträngiger DNA rekrutiert und aktiviert. Diese Kinasen können dann durch Phosphorylierung weiterer Proteine die Reparatur des DSB stimulieren und weitere Reaktionen der Zelle auf den DNA-Schaden wie beispielsweise einen Zellzyklusarrest oder die Apoptose auslösen (Blackford & Jackson, 2017; Ma et al., 2020). Unter anderem werden im Zuge der Reaktionsfolge im Rahmen der DSB-Reparatur, welche auch die Phosphorylierung und

Ubiquitinierung von Histonproteinen beinhaltet, die Proteine BRCA1 und 53BP1 an die Stelle des DSB rekrutiert und aktiviert. Während BRCA1 eine HDR-vermittelte Reparatur des DSB fördert, wird die Reparatur via NHEJ durch 53BP1 stimuliert. BRCA1 und 53BP1 stehen hierbei in Konkurrenz zueinander (Blackford & Jackson, 2017; Scully et al., 2019).

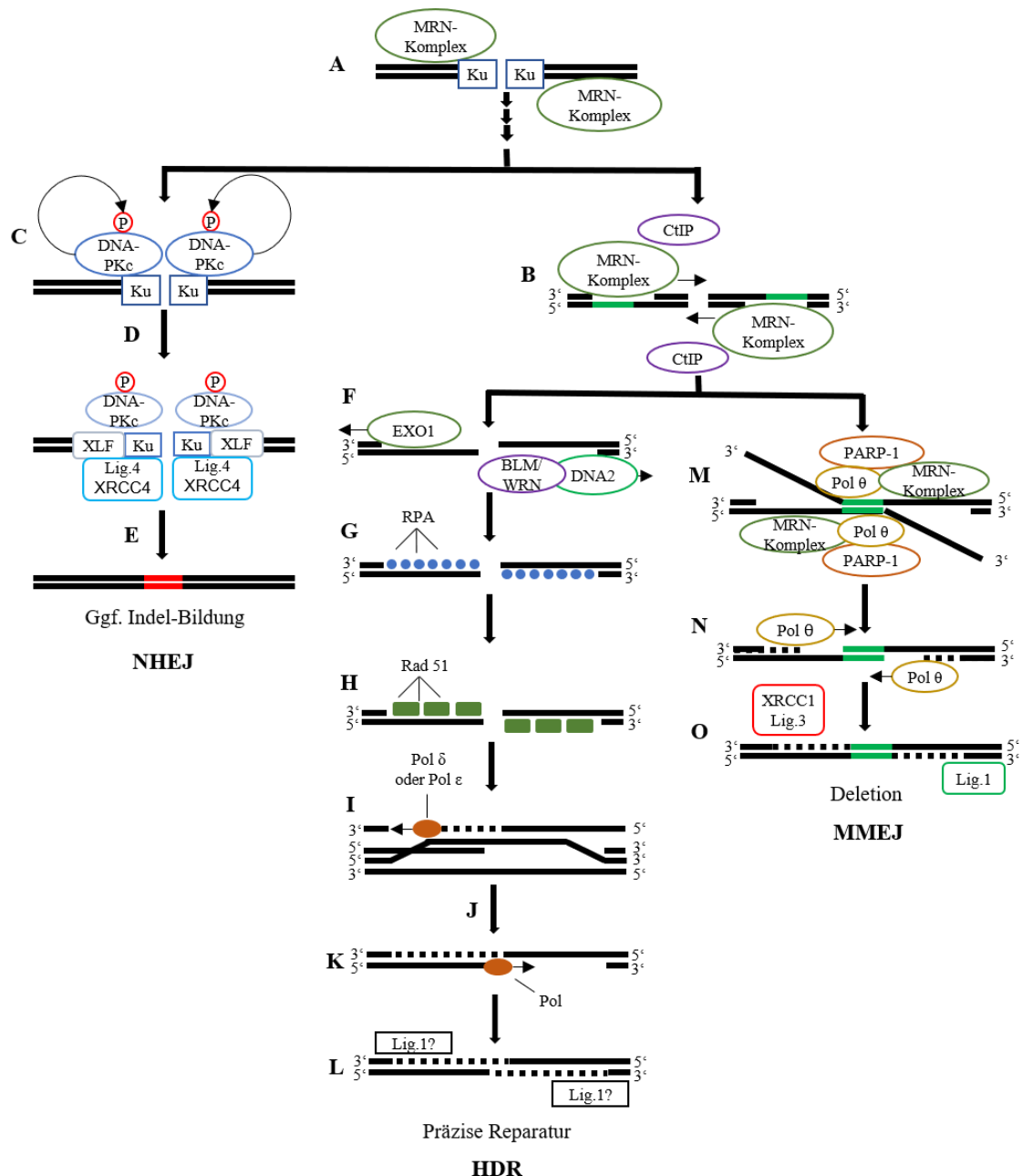


Abbildung 1.2: Ablauf der DSB-Reparatur. Zur Erläuterung siehe Text. BLM: Bloom-Syndrom-Protein (RecQ2), CtiP: CtBP(C-terminal binding protein 1)-interacting protein, DNA-PKc: DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, DNA2: DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2, EXO1: Exonuclease 1, Ku: Heterodimeres

Protein aus Ku70 und Ku80 (beteiligt an NHEJ), Lig.1: DNA-Ligase 1, Lig.3: DNA-Ligase 3, Lig.4: DNA-Ligase 4, MRN-Komplex: Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex (beteiligt an DNA-Resektion im Rahmen von HDR und MMEJ), P: Phosphatrest, PARP-1: Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1, Pol: DNA-Polymerase, Pol δ : DNA-Polymerase delta, Pol ϵ : DNA-Polymerase epsilon, Pol θ : DNA-Polymerase theta, Rad51: Rad51-Rekombinase, RPA: Replication Protein A, WRN: Werner syndrome ATP-dependent helicase, XLF: XRCC4-like factor (Non-homologous end-joining factor 1), XRCC1: X-ray repair cross-complementing protein 1, XRCC4: X-ray repair cross-complementing protein 4

Wie bereits oben angedeutet, konkurrieren die einzelnen Reparaturmechanismen um die zu reparierenden DSBs (Bischoff et al., 2020; Scully et al., 2019). Die Entscheidung, welcher Mechanismus letztlich zur Reparatur verwendet wird, ist unter anderem von Faktoren wie der Zellzyklusphase, der Struktur der DSB-Enden und der Chromatin-Struktur in der Umgebung des DSB abhängig (Scully et al., 2019). Ein wesentlicher Schritt im Rahmen der Regulation ist hierbei das zellzyklusphasenabhängige Auftreten nukleolytischer Resektionsprozesse im Bereich des DSB an denen unter anderem der MRN-Komplex mit der Unterstützung von CtIP beteiligt ist (siehe Abbildung 1.2 B). Hierbei kommt es neben der Verdrängung des für NHEJ notwendigen Ku-Heterodimers von den DSB-Enden zur Ausbildung von 3'-Einzelstrang-Überhängen als Voraussetzung für HDR und MMEJ (Bischoff et al., 2020; Scully et al., 2019).

1.4.2 Nonhomologous end joining (NHEJ)

Im Zuge der NHEJ-vermittelten DSB-Reparatur bildet das Ku-Heterodimer zusammen mit den DNA-PKcs an den DNA-Enden das DNA-PK-Holoenzym. Es kommt zur Autophosphorylierung des DNA-PK-Holoenzym (siehe Abbildung 1.2 C) und infolge dessen zu einer Rekrutierung und Aktivierung weiterer NHEJ-Faktoren wie XRCC4, XLF und der DNA-Ligase 4 (Lig.4) (siehe Abbildung 1.2 D) (Chaplin & Blundell, 2020). DNA-Enden, die sich für eine direkte Ligation nicht eignen, werden durch Faktoren wie die Nuklease Artemis oder Polymerasen wie Pol μ und Pol λ prozessiert (Nick McElhinny et al., 2005). Die endgültige Ligation der DSB-Enden erfolgt durch Lig.4 im Komplex mit XRCC4 (siehe Abbildung 1.2 E) (Chaplin & Blundell, 2020).

NHEJ ist der vorherrschende DSB-Reparaturprozess in Säugetierzellen (Scully et al., 2019), welcher in allen Phasen des Zellzyklus mit Bevorzugung der G1- und G2-Phase

stattfindet und zu einer schnellen Wiedervereinigung der DSB-Enden führt (Chaplin & Blundell, 2020). Die Reparatur mittels NHEJ wird dabei als eher fehleranfälliger Prozess angesehen, da es an der Stelle der Wiedervereinigung zu Insertionen und Deletionen (Indels) sowie Substitutionen kommen kann (Benati et al., 2020; Yanik et al., 2016). Anzumerken ist hierbei, dass einige Autoren wie Bétermier und Kollegen gegen eine intrinsische Fehlerhaftigkeit des NHEJ-Mechanismus argumentieren. Die zustande kommenden Fehler seien im Wesentlichen durch die Struktur der zu vereinenden DSB-Enden vorgegeben (Bétermier et al., 2014). Interessanterweise scheinen jedoch gerade durch CRISPR/Cas9-induzierte DSBs häufig fehlerhaft unter Ausbildung von Indels repariert zu werden (Brinkman et al., 2018). Auf die Induktion eines DSB folgendes NHEJ kann zum „knock-out“ (KO) von Genen verwendet werden (siehe Abbildung 1.3), da die Indel-Bildung zu einer Frameshift-Mutation des codierenden Genbereiches führen kann (Danner et al., 2017). Nutzbar gemacht werden kann dies beispielsweise zur Therapie dominanter Gain of function-Mutationen mit nachfolgendem Ersatz des Wildtyp-Gens durch Genersatztherapie (Benati et al., 2020). Des Weiteren können auch größere Abschnitte des Genoms deletiert werden, indem simultan zwei DSBs im Genom erzeugt werden und die dazwischenliegende Sequenz verloren geht (Canver et al., 2017). Es existieren jedoch auch Ansätze wie homology-independent targeted integration (HITI) (Suzuki et al., 2016), CRISPR-assisted insertion tagging (CRISPaint) (Schmid-Burgk et al., 2016) oder versatile NHEJ-based knock-in module for genome editing (VIKING) (Sawatsubashi et al., 2018), die auf eine NHEJ-vermittelte Integration von exogenen DNA-Sequenzen in das Genom abzielen.

1.4.3 Homology-directed repair (HDR)

Zur Erzeugung der für die HDR-vermittelte DSB-Reparatur notwendigen 3'-Einzelstrang-Überhänge induziert der MRN-Komplex unter Mithilfe von CtIP zunächst einen Einzelstrangbruch in dem DNA-Strang, welcher am DSB ein freies 5'-Ende aufweist. Ausgehend von diesem Einzelstrangbruch wird dann durch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität von Mre11 der Einzelstrang in Richtung des DSBs abgebaut, wodurch zunächst ein kurzer 3'-Einzelstrang-Überhang entsteht. Eine weitere Verlängerung des 3'-Einzelstrang-Überhangs wird durch den weiteren Abbau des 5'-Einzelstrangs in 5'-3'-Richtung, also vom DSB weg, durch die Nukleasen EXO1 oder DNA2 zusammen mit den Helikasen BLM oder WRN erreicht (siehe Abbildung 1.2 F) (Ranjha et al., 2018). Die entstehenden 3'-Einzelstrang-Überhänge werden zunächst

durch RPA gebunden (siehe Abbildung 1.2 G), welches im weiteren Verlauf durch die Wirkung von Rekombinations-Mediatoren wie BRCA2 gegen die Rekombinase Rad51 ausgetauscht wird (siehe Abbildung 1.2 H). Unter Vermittlung von Rad51 kommt es zur Basenpaarung des 3'-Einzelstrang-Überhangs mit homologen Sequenzen, welche als Template für die Verlängerung des 3'-Einzelstrangs durch DNA-Polymerasen wie Pol δ oder Pol ϵ dienen (siehe Abbildung 1.2 I) (Ranjha et al., 2018; Scully et al., 2019). In einer als synthesis-dependend strand annealing (SDSA) bezeichneten Unterform von HDR kommt es zu einer Lösung des auf diese Weise verlängerten 3'-Einzelstrangs vom Template und dessen Anlagerung an den 3'-Überhang auf der anderen Seite des DSB (siehe Abbildung 1.2 J). Das Schließen der noch vorhandenen Lücken in den Einzelsträngen durch weitere DNA-Synthese (siehe Abbildung 1.2 K) und die Ligation der noch vorhandenen Einzelstrangbrüche (siehe Abbildung 1.2 L) vollenden den Reparaturprozess (Ranjha et al., 2018). Die für diesen Ligationsprozess verantwortliche Ligase konnte noch nicht eindeutig identifiziert werden (Sallmyr et al., 2020). Eine 2005 von Goetz und Kollegen publizierte Arbeit lässt allerdings die DNA-Ligase 1 (Lig.1) als wahrscheinlichen Kandidaten erscheinen (Goetz et al., 2005).

HDR ist im Wesentlichen während der S- und G2-Phase des Zellzyklus aktiv und ein präziser DSB-Reparaturprozess, da er zur Umgebung des DSB homologe Sequenzen als Template für die Reparatur verwendet. Nach dem Durchlaufen der S-Phase dient dabei natürlicherweise das Schwesterchromatid als korrektes Template (Bischoff et al., 2020). Dieses Template kann jedoch auch eine exogene homologe Doppel- oder Einzelstrang-DNA-Sequenz sein, die im Rahmen des Genome editing in die Zelle eingebracht wird (siehe Abbildung 1.3), und dann beispielsweise zu einer HDR-vermittelten Wiederherstellung der Wildtypsequenz eines Gens führt (Benati et al., 2020). Gegenwärtig werden HDR-basierte Ansätze am häufigsten zum gezielten „knock-in“ exogener Sequenzen eingesetzt. In den meisten eukaryotischen Zellen ist hierbei jedoch die geringe HDR-Effizienz ein limitierender Faktor (Bischoff et al., 2020). Die Effizienz von HDR-vermitteltem Genome editing ist des Weiteren abhängig von der Stelle im Genom, welche editiert werden soll, der Art des Templates (zirkulär vs. linear, einzel- vs. doppelsträngig), der Größe der zu editierenden Sequenz sowie der Länge der angrenzenden homologen Sequenzen. So wird für große Sequenzveränderungen >100 bp bei Verwendung eines Plasmid-Templates eine Gesamtlänge der angrenzenden homologen Sequenzen von mindestens 1000 – 2000 bp empfohlen (Yanik et al., 2016). Paix et al. konnten zeigen, dass ein effizientes HDR- bzw. SDSA-vermitteltes Genome

editing in Säugetierzellen unter Verwendung linearer Templates auch mit relativ kurzen homologen Sequenzen von nur 35 bp Länge möglich ist. Es gelang in diesem Zusammenhang der effiziente „knock-in“ von Sequenzen bis zu 1000 bp Länge (Paix et al., 2017).

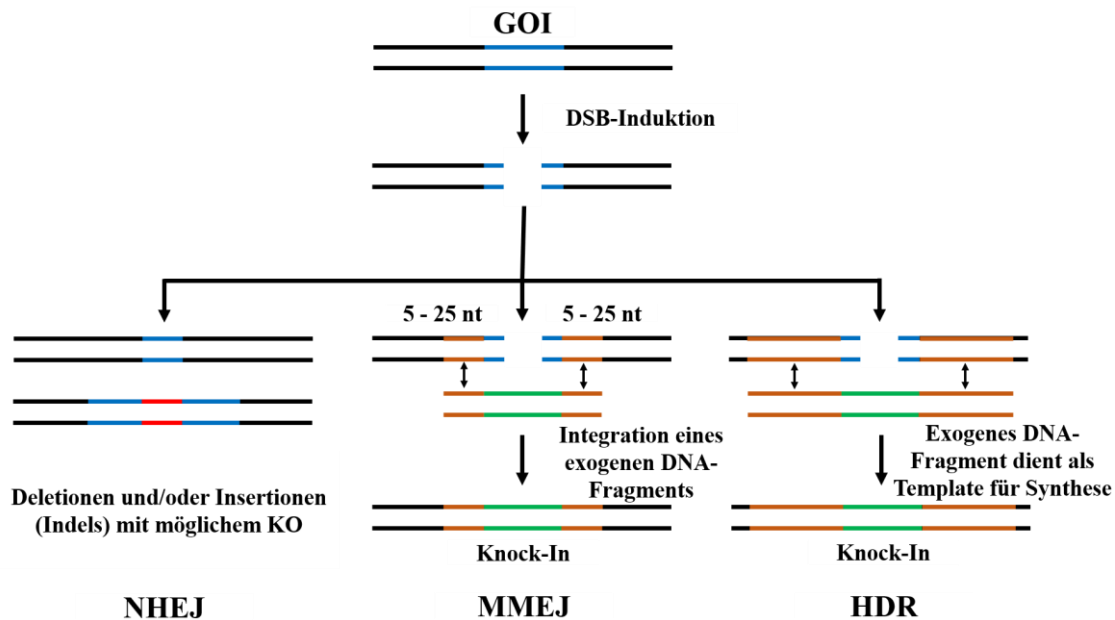


Abbildung 1.3: Übersicht über die Nutzung der verschiedenen DSB-Reparaturmechanismen im Rahmen des Genome editing. Die Länge der verwendeten, zueinander homologen Sequenzen (orange) beträgt bei Verwendung von MMEJ 5 - 25 bp. Die für HDR-vermitteltes Genome editing notwendigen homologen Sequenzen sind generell länger, wobei die Länge u.a. von der Ausdehnung der zu editierenden Sequenz und der Art des verwendeten Templates abhängt. GOI: Gene of interest, rot: zufällige Insertionen, grün: zu integrierende Sequenz.

1.4.4 Microhomology-mediated end joining (MMEJ)

MMEJ gehört zur Gruppe der alternative end joining (a-EJ)-Mechanismen (Seol et al., 2018). Ebenso wie HDR ist auch MMEJ von dem Vorliegen von 3'-Einzelstrangüberhängen abhängig. Die Vereinigung der DSB-Enden wird durch das Aneinanderlagern von auf den 3'-Überhängen befindlichen und zueinander homologen Sequenzen (grüne Balken in Abbildung 1.2) auf beiden Seiten des DSB erreicht. Die Länge dieser, als Mikrohomologien (MHs) bezeichneten, homologen Sequenzen wird für MMEJ häufig mit 5 – 25 nt angegeben. Teilweise werden jedoch auch MH-Längen von 2 -20 nt genannt (Sallmyr & Tomkinson, 2018; Yanik et al., 2016). Für homologe

Sequenzen mit einer Länge von > 25 nt wird demgegenüber die Beteiligung an einem von MMEJ verschiedenen, Rad52-abhängigen Reparaturmechanismus namens single-strand annealing (SSA) angenommen (Sallmyr & Tomkinson, 2018). Unterstützt wird das Aneinanderlagern der homologen Sequenzen im Rahmen von MMEJ unter anderem durch PARP-1 (Audebert et al., 2004), den MRN-Komplex und die DNA-Polymerase Pol θ (siehe Abbildung 1.2 M) (Sallmyr & Tomkinson, 2018). Im Anschluss daran findet die Entfernung der beim Aneinanderlagern der homologen Sequenzen entstandenen 3'-Überhänge und ein Auffüllen der entstandenen Lücken durch Pol θ statt (siehe Abbildung 1.2 N) (Sallmyr & Tomkinson, 2018). Zum Abschluss der MMEJ-vermittelten DSB-Reparatur erfolgt die Ligation der DNA-Enden (siehe Abbildung 1.2 O), welche im Wesentlichen durch die DNA-Ligase 3 (Lig.3) im Komplex mit XRCC1 katalysiert wird. XRCC1 scheint jedoch für die a-EJ-vermittelte Reparatur chromosomaler DSBs verzichtbar zu sein (Boboila et al., 2012). Für die Lig.1 wurde dabei teilweise eine Backup-Funktion bei Ausfall der Lig.3 zumindest bei der Bildung chromosomaler Translokationen angenommen (Liang et al., 2008; Simsek, Brunet et al., 2011). Liang et al. und Lu et al. konnten zudem eine Abhängigkeit des relativen Anteils von Lig.1 und Lig.3 an der Ligation von der Länge der für die Vereinigung der DSB-Enden verwendeten MHs beobachten (Liang et al., 2008; Lu et al., 2016). Dementsprechend wurde auch eine Beteiligung von Lig.1 und Lig.3 an unterschiedlichen Unterformen des MMEJ-Mechanismus vorgeschlagen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Unterschiedlichkeit der Proteine mit denen Lig.1 und Lig.3 interagieren (Liang et al., 2008). Auf Grundlage ihrer Beobachtung, dass bei der Bildung chromosomaler Translokationen die Beteiligung der Lig.3 bei der Existenz vorbestehenden MHs und die Beteiligung der Lig.1 beim Fehlen vorbestehender MHs zu dominieren scheint, schlagen auch Simsek et al. die Beteiligung von Lig.1 und Lig.3 an unterschiedlichen Mechanismen vor (Simsek, Brunet et al., 2011). Paul und Kollegen argumentieren des Weiteren für eine Spezies-abhängige Beteiligung von Lig.1 und Lig.3 an der a-EJ-vermittelten DSB-Reparatur (Paul et al., 2013).

MMEJ ist ebenso wie HDR in der S- und G2-Phase des Zellzyklus aktiv (Sallmyr & Tomkinson, 2018), kann jedoch auch in der G1-Phase auftreten (Xiong et al., 2015). Die zwischen den MHs liegenden DNA-Abschnitte gehen bei der MMEJ-vermittelten Reparatur verloren. Zudem können Insertionen und chromosomale Translokationen durch MMEJ auftreten. MMEJ gilt daher als ein mutagener DSB-Reparaturmechanismus (Sallmyr & Tomkinson, 2018; Seol et al., 2018). MMEJ-bedingte Deletionen können auch

einen Anteil am KO von Genen nach DSB-Induktion haben (Sakuma et al., 2016). Gleichwohl existieren auch Strategien für eine MMEJ-vermittelte Integration exogener Sequenzen in das Genom (siehe Abbildung 1.3) wie zum Beispiel das Precise Integration into Target Chromosome (PITCh)-System. Die zu integrierende Sequenz wird hierbei von kurzen Sequenzen flankiert, welche homolog zu Sequenzen in der direkten Umgebung des im Genom der Zelle induzierten DSB sind, was einen MMEJ-vermittelten „knock-in“ ermöglicht (Nakade et al., 2014; Sakuma et al., 2016). Ebenso wurde in der AG Stieger ein Assay entwickelt, welches auf der MMEJ-vermittelten Integration einer Luziferasesequenz in den murinen RPGR-ORF15-Locus basiert (Yanik et al., 2018).

1.5 DNA-Ligasen

Wie bereits oben beschrieben katalysieren die drei in Säugetieren beschriebenen DNA-Ligasen 1, 3 und 4 unter anderem die Ligation der DNA-Enden als den letzten Schritt der DSB-Reparatur. Sie katalysieren jedoch auch weitere Reaktionen im Nucleinsäurestoffwechsel. Es besteht eine vermutlich spezies- und zelltypabhängige funktionelle Redundanz der einzelnen Ligasen (Tomkinson et al., 2013; Tomkinson et al., 2020).

Die Ligationsreaktion beginnt dabei mit der Übertragung von AMP auf einen Lysinrest der DNA-Ligase mit ATP als Donor. Der AMP-Rest wird dann auf die 5'-Phosphatgruppe des DNA-Endes übertragen. Zuletzt katalysiert die nun nicht mehr adenylierte DNA-Ligase den nukleophilen Angriff der 3'-OH-Gruppe des gegenüberliegenden DNA-Endes auf die adenylierte 5'-OH-Gruppe unter Ausbildung einer kovalenten Verbindung der beiden Stränge und Freisetzung des AMP-Rests (Ellenberger & Tomkinson, 2008).

1.5.1 DNA-Ligase 1

Die humane Lig.1 ist ein 102 kDa-Protein, welches sich aufgrund einer durch seinen Prolinreichtum bedingten anomalen Mobilität in der SDS-PAGE mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 125 kDa darstellt (Barnes et al., 1990). Lig.1 hat einen Anteil an Ligationsprozessen im Zellkern wie bei der Vereinigung der Okazaki-Fragmente im Rahmen der DNA-Replikation, der long patch-Basenexzisionsreparatur (Tomkinson et al., 2013), der Nucleotidexzisionsreparatur in proliferierenden Zellen (Moser et al., 2007), der Reparatur von Einzelstrangbrüchen (Katyal & McKinnon, 2011) sowie wie bereits oben beschrieben HDR und a-EJ bzw. MMEJ zur DSB-Reparatur (Goetz et al.,

2005; Tomkinson et al., 2013). Die Rekrutierung von Lig.1 hin zu Replikationsfoci erfolgt über die Interaktion mit PCNA (Tomkinson et al., 2020).

1.5.2 DNA-Ligase 3

Es existieren zwei Formen der Lig.3: Die ubiquitär exprimierte und mit XRCC1 Komplexe bildende Lig.3- α mit einem Molekulargewicht von 103 kDa sowie die nur in männlichen Keimzellen durch einen alternativen Splicingmechanismus exprimierte Lig.3- β , welche nicht mit XRCC1 interagiert und ein Molekulargewicht von 96 kDa aufweist (Mackey et al., 1997). In der vorliegenden Dissertation bezieht sich die Bezeichnung Lig.3 ausschließlich auf die Lig.3- α -Variante. Das Lig.3-Gen codiert des Weiteren neben einer nukleären Lig.3- α -Variante auch für eine mitochondriale Lig.3- α -Variante, welche die einzige DNA-Ligase des Mitochondriums darstellt, unabhängig von XRCC1 agiert und notwendig für die Reparatur und Replikation des mitochondrialen Genoms ist (Tomkinson et al., 2013). Im Zellkern übt die Lig.3 ihre Funktionen im Komplex mit XRCC1 aus. Hierzu zählen die Reparatur von Einzelstrangbrüchen, die oben beschriebene Beteiligung an a-EJ bzw. MMEJ (Tomkinson et al., 2013), eine Backup-Funktion bei Ligationsvorgängen im Rahmen der DNA-Replikation (Le Chalony et al., 2012), die Beteiligung an der short patch-Basenexzisionsreparatur (Tomkinson et al., 2013) sowie der Nukleotidexzisionsreparatur in sich teilenden und ruhenden Zellen (Moser et al., 2007). Es existieren allerdings auch Studien, welche die unbedingte Notwendigkeit einer Interaktion von Lig.3 und XRCC1 für DNA-Reparaturprozesse im Nukleus, unter anderem auch a-EJ bzw. MMEJ, in Zweifel ziehen (Boboila et al., 2012; Gao et al., 2011; Simsek, Brunet et al., 2011; Simsek, Furda et al., 2011).

1.5.3 DNA-Ligase 4

Lig.4 hat ein Molekulargewicht von 96 kDa (Wei et al., 1995) und agiert im Komplex mit XRCC4 (Tomkinson et al., 2013). Sie katalysiert, wie bereits oben beschrieben, den finalen Ligationschritt der NHEJ-vermittelten DSB-Reparatur (Chaplin & Blundell, 2020).

1.6 Besonderheiten des Genome editing im Bereich der Retina

Die Retina weist als Zielgewebe für Therapieansätze, welche auf „klassischer“ Gentherapie oder Genome editing basieren, im Vergleich zu anderen Geweben und Organen einige Besonderheiten auf. Vorteilhaft sind unter anderem die leichte

Zugänglichkeit des Auges im Hinblick auf diagnostische und therapeutische Maßnahmen, die Tatsache, dass nur geringe Mengen an Therapeutika, wie zum Beispiel Lösungen viraler Vektoren, aufgrund der geringen Größe der Retina verabreicht werden müssen, der besondere immunologische Status des Auges, welcher die Toleranz gegenüber Gentherapien verbessert, die Möglichkeit ein Auge zu therapieren und das andere als Kontrolle bei der Erprobung von Therapieansätzen zu nutzen (Ziccardi et al., 2019) sowie eine große Anzahl an verfügbaren Tiermodellen (Slijkerman et al., 2015; Ziccardi et al., 2019).

Ein wesentliches Problem im Hinblick auf Genome editing-Ansätze zur Therapie erblicher Netzhautdystrophien ist die Tatsache, dass es sich bei den meisten Zellen der Retina, wie beispielsweise den Photorezeptoren und dem Pigmentepithel, um postmitotische Zellen handelt. HDR, auf welchem zahlreiche Strategien zur gezielten Integration exogener Sequenzen und somit auch zur präzisen Korrektur krankheitsauslösender Mutationen beruhen, ist jedoch vor allem in proliferierenden Zellen aktiv. Ein HDR-vermittelter Ansatz zur Korrektur pathogener Mutationen in den postmitotischen Zellen der Retina in vivo ist daher aufgrund der geringen HDR-Effizienz wenig erfolgversprechend (Benati et al., 2020; Ziccardi et al., 2019). In Übereinstimmung hiermit konnten Pasquini et al. in einer Analyse des Transkriptoms postmitotischer Neurone aus adulten Retinae verschiedener Säugetierspezies sowie aus humanen Retina-Organoiden eine Herunterregulation der Expression HDR-assoziiierter Gene nachweisen. Die Expression HDR-assoziiierter Gene war hierbei eng mit dem Durchlaufen des Zellzyklus verbunden. NHEJ- und MMEJ-assoziierte Gene zeigten demgegenüber eine höhere Expression in postmitotischen Neuronen (Pasquini et al., 2020).

1.7 Beeinflussung der Ergebnisse des Genome editing durch Manipulation der DNA-Ligase-Aktivität

Aufgrund der oben geschilderten geringen HDR-Effizienz in den postmitotischen Zielzellen der Retina (Benati et al., 2020) sind für Optimierung der Genome editing-Ergebnisse zur Korrektur krankheitsauslösender Mutationen in retinalen Zellen in vivo ein besseres Verständnis der neuronalen DNA-Reparatur sowie alternative Genome editing-Strategien notwendig. Diese Notwendigkeit zur Steigerung der HDR-Effizienz ist jedoch nicht nur auf die Zellen der Retina beschränkt, sondern bezieht sich allgemein auf Gewebe mit nicht-teilungsfähigen Zellen (Cox et al., 2015; Yanik et al., 2016). Beispielhaft für ein Gelingen der Steigerung der geringen HDR-Effizienz in

postmitotischen Zellen *in vivo* sei die Verwendung der bakteriellen Rekombinase RecA in Kombination mit CRISPR/Cas9-vermitteltem Genome editing zur Korrektur einer RP-*verursachenden Mutation* in Mäusephotorezeptorzellen genannt (Cai et al., 2019). Weitere Beispiele für alternative Genome editing-Strategien basieren auf der Nutzbarmachung alternativer Reparaturmechanismen wie MMEJ und NHEJ für das Genome editing retinaler Zellen (Nishiguchi et al., 2020; Suzuki et al., 2016). Eine weitere Möglichkeit ist die Anwendung sogenannter *ex vivo*-Strategien. Hierbei werden im Gegensatz zu *in vivo*-Ansätzen die pathogenen Mutationen nicht in den betroffenen Zellen *in situ* korrigiert. Stattdessen werden aus einer Hautbiopsie gewonnene Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen *de-differenziert*, deren Genom dann editiert und die krankmachende Mutation somit beseitigt wird. Danach erfolgt die *Re-Differenzierung* in den gewünschten Zelltyp, wie beispielsweise Photorezeptoren, und die Implantation der Zellen. Vorteilhaft ist hierbei unter anderem der Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus sowie die Möglichkeit zu Screening und Selektion erfolgreich editierter Zellen (Yanik et al., 2016).

Aufgrund der Konkurrenz der verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen um die Reparatur von einzelnen DSBs ist jedoch auch eine Beeinflussung der Genome editing-Ergebnisse hin zu gewünschten Resultaten durch Manipulation der Aktivität von Proteinen, welche in die Reparaturmechanismen eingeschaltet sind, möglich. Hierbei kann sowohl eine Aktivitätssteigerung der Proteine des für die Reparatur gewünschten Mechanismus, beispielsweise durch Überexpression, als auch eine Suppression der Aktivität von Proteinen, die in unerwünschte Reparaturmechanismen involviert sind, angestrebt werden (Bischoff et al., 2020).

Mögliche Ziele sind hierbei unter anderem die DNA-Ligasen, welche die finalen Ligationsreaktionen der DSB-Reparatur katalysieren (Bischoff et al., 2020). So kann eine verringerte Aktivität von Lig.4 als Komponente der NHEJ-vermittelten DSB-Reparatur eine erhöhte Effizienz des HDR-vermittelten Gen-„knock-in“ im Rahmen des Genome editing bedingen. Beumer et al. konnten beispielsweise eine erhöhte Rate HDR-vermittelten Gen-„knock-ins“ in Lig.4-defizienten *Drosophila melanogaster*-Stämmen im Vergleich zu Wildtyp-Stämmen beobachten (Beumer et al., 2008; Beumer et al., 2013). Auch pharmakologische Ansätze zur Manipulation der DNA-Ligase-Aktivität stehen zur Verfügung. So existiert zum Beispiel mit SCR7 ein Inhibitor der Lig.4 und in geringerem Maße auch der Lig.3, welcher zunächst als mögliches Therapeutikum für maligne Tumore entwickelt und in zahlreichen Genome editing-Experimenten erprobt wurde (Srivastava

et al., 2012; Vartak et al., 2018). Studien, welche die Anwendung von SCR7 zur Steigerung der HDR-vermittelten Gen-„knock-in“-Effizienz untersuchten, erbrachten variable Ergebnisse: Eine Steigerung Effizienz HDR-vermittelter „knock-ins“ durch die Behandlung mit SCR7 konnte beispielsweise in verschiedenen HEK 293-Zell-Typen (Lin et al., 2016; Pinder et al., 2015; Robert et al., 2015; Shao et al., 2017; van Chu et al., 2015), verschiedenen humanen Tumorzelllinien (Hu et al., 2018; Maruyama et al., 2015) sowie Zebrafischembryonen (Zhang et al., 2018) gezeigt werden. In anderen Studien unter anderem an humanen pluripotenten Stammzellen (Yang et al., 2016; Zhang et al., 2017) und porcinen fetalen Fibroblasten (Gerlach et al., 2018) konnte demgegenüber keine Steigerung der HDR-vermittelten Gen-„knock-in“-Effizienz bei Behandlung mit SCR7 beobachtet werden. Eine Steigerung der HDR-Effizienz durch SCR7 kann dementsprechend nicht für alle experimentellen Settings angenommen werden und muss in Bezug auf die einzelne „knock-in“-Strategie erprobt werden (Gerlach et al., 2018). Zur gezielten pharmakologischen Inhibition der DNA-Ligasen stehen des Weiteren Substanzen wie L82 zur spezifischen Inhibition der Lig.1, L67 zur Inhibition von Lig.1 und Lig.3 sowie L189 zur Inhibition aller drei humanen DNA-Ligasen zur Verfügung (Chen et al., 2008).

Andere Ansätze zur Beeinflussung der DNA-Ligase-Aktivität zur Steigerung der Rate präziser „knock-ins“ basieren auf der Verwendung von RNA-Interferenz für den „knock-down“ der Lig.4 (Robert et al., 2015; van Chu et al., 2015; Yan et al., 2016) Eine weitere angewandte Strategie ist die Ausnutzung der adenoviralen Proteine E1B55K und E4orf6. Diese führen zu einer Ubiquitynylierung der Lig.4 und damit zu deren proteasomaler Degradation und konnten in einigen Studien die HDR-Effizienz erhöhen (Robert et al., 2015; van Chu et al., 2015). In einer anderen Studie an humanen pluripotenten Stammzellen konnte allerdings bei Verwendung dieses Ansatzes eine Senkung der HDR-Effizienz beobachtet werden (Zhang et al., 2017).

Auch wurden CRIPSR/Cas-basierte Methoden zur Modulation der DNA-Ligase-Expression bereits zur Steigerung der Effizienz HDR-vermittelter „knock-ins“ sowie zur Aufklärung verschiedener DNA-Reparaturmechanismen verwendet. In einer Studie wurde hierbei eine besondere Form des CRISPR interference (CRISPRi)-Ansatzes angewandt. Unter Verwendung auf 14-15 nt gekürzter sog. catalytically dead gRNAs wurde ein katalytisch aktives Cas9-Molekül dabei an die Stelle des Lig.4-Locus und anderer NHEJ-assoziiierter Gene gelotst, ohne dass dabei ein DSB induziert wurde. Stattdessen erfolgte hierdurch eine Suppression der Aktivität des entsprechenden Gens

unter Zuhilfenahme eines Konstrukts mit einer Krüppel associated box-Domäne (Ye et al., 2018). Zudem existieren Ansätze zur Degradation der Lig.4-mRNA unter Ausnutzung von CasRx, einer guide-Sequenz-abhängigen Ribonuklease, zur Erhöhung der HDR-Effizienz (Pan et al., 2019). Eine weitere Möglichkeit ist der KO von DNA-Ligase-Genen durch eine CRISPR/Cas9-vermittelte DSB-Induktion mit nachfolgender NHEJ-vermittelter DSB-Reparatur, welche durch Indel-Bildung und dadurch bedingte Frameshiftmutation oder durch die Ausbildung von größeren Deletionen zu einer Stilllegung des Gens führt (Canver et al., 2017; Danner et al., 2017). Diese Strategie wurde bisher zur Generierung von DNA-Ligase-defizienten Zelllinien angewendet, welche Verwendung im Rahmen von Studien zur nukleären DNA-Reparatur (Balmus et al., 2019; Hwang et al., 2020; Lu et al., 2016; Maffucci et al., 2018; Schmid-Burgk et al., 2016), zum mitochondrialen DNA-Stoffwechsel (Spadafora et al., 2016) sowie virologischen Studien (Long et al., 2017; Luteijn et al., 2018) fanden. So erzeugten Lu et al. ausgehend von Lig.4-defizienten CH12F3-Zellen mittels CRISPR/Cas9-vermitteltem KO Zelllinien, die zusätzlich defizient für entweder Lig.1 oder nukleäre Lig.3 waren. Diese wurden dann verwendet, um die Beteiligung von Lig.1 und Lig.3 an a-EJ im Rahmen von Antikörper-Klassenwechsel, Deletionen sowie chromosomalen Translokationen aufzuklären (Lu et al., 2016). Schmid-Burgk und Kollegen nutzten unter anderem eine mittels CRISPR/Cas9-vermitteltem KO erzeugte Lig.4-defiziente HEK-Zelllinie zum Nachweis der NHEJ-Beteiligung an CRISPR (Schmid-Burgk et al., 2016).

1.8 Zielsetzung

Ein mögliches Instrument zur Beeinflussung der DNA-Reparatur hin zu gewünschten Ergebnissen im Rahmen des Genome editing ist, wie in Kapitel 1.7 dargestellt, die Manipulation der Aktivität von DNA-Ligasen, welche den letzten Schritt der DSB-Reparatur katalysieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Erprobung von in der AG Stieger generierten Plasmiden zum CRISPR/Cas9-vermittelten KO der humanen DNA-Ligasen 1, 3 und 4 zur Beeinflussung der DNA-Reparatur in Zellen im Rahmen des Genome editing. Mittels Western Blot und ELISA mit zuvor durchgeführter durchflusszytometrischer Anreicherung erfolgreich transfizierter Zellen wurde der Versuch unternommen, den verringerten DNA-Ligase-Proteingehalt der Zellen nach erfolgtem KO darzustellen. Die Effekte unserer DNA-Ligase-KO-Plasmide auf die DNA-Reparatur wurden mittels zweier Assays evaluiert: Das verwendete MMEJ-Assay

quantifizierte die „knock-in“-Effizienz einer Luziferase-Sequenz in das murine RPGR-ORF15-Exon, welches stabil in das Genom von HEK293-Zellen integriert ist (Yanik et al., 2018). Das BRET-Reporter-Assay ermöglichte den Vergleich der NHEJ-Aktivität in Zellen nach unterschiedlichen Interventionen. Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz war hierbei insofern besonders, als dass eine gleichzeitige Transfektion der für die Assays benötigten Komponenten mit den DNA-Ligase-KO-Plasmiden im Sinne von multiplexed Genome editing erfolgte. Des Weiteren wurde die Auswirkung der DNA-Ligase-KOs auf die Viabilität von HEK293T-Zellen mittels MTT-Assay untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräteliste

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

Gerät	Modell/Serie	Hersteller, Ort
-196 °C-Tonne für Cryokonservierung	Thermolyne Locator 6 Plus	Fisher Scientific, Schwerte
-20 °C-Gefrierschrank	Liebherr Premium	Liebherr, Ochsenhausen
-80 °C-Gefrierschrank	HERAfreeze HFU 586 Top	Fisher Scientific, Schwerte
Autoklav	DX-65	Systec, Linden
Blotting-Geräte	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
	Blotelutor B35	Biometra, Göttingen
Bunsenbrenner	Fireboy	Integra Biosciences, Biebertal
Eismaschine	AF 80	Scotsman, Ipswich (UK)
Fluoreszenzmikroskop	Biozero	Keyence, Neu-Isenburg
Fluss-Sortierer	FACSAria III	BD Biosciences, Heidelberg
Gelelektrophoresekammer	Minigel-Twin	Biometra, Göttingen
Gerät zum temperierten Mischen von Proben	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Glaspipetten	5 ml	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
	10 ml	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
	20 ml	Isolab Laborgeräte, Eschau
Inkubationshaube für Orbitalschüttler	CERTOMAT H	Sartorius, Göttingen
Inkubator für Zellkultur	C 150	Binder, Tuttlingen
Kühlschrank (4 °C)	KT 3L 17	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
	TP 1760 Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Laborspüler	Miele Professional G7883 CD	Miele, Gütersloh
Magnetrührer	RCT classic	IKA, Staufen
Mehrfachdispenser	HandyStep	Brand, Wertheim
Mikroskop	IT400	VWR International, Darmstadt
Orbitalschüttler	CERTOMAT MO II	Sartorius, Göttingen
pH-Messgerät	SevenEasy	Mettler Toledo, Gießen

Gerät	Modell/Serie	Hersteller, Ort
Pipetten	Transferpette S 0,1-1 µl	Brand, Wertheim
	Transferpette S 0,5-10 µl	Brand, Wertheim
	Transferpette S 10-100 µl	Brand, Wertheim
	Transferpette S 100-1000 µl	Brand, Wertheim
	Transferpette S 0,5-5 ml	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe	Pipetboy acu 2	Integra Biosciences, Biebertal
Platereader	Infinite M1000 pro	Tecan, Grödig (AT)
Stromquelle für Elektrophoresen	PS305T	Biometra, Göttingen
Quarzküvette	105.210-QS	Hellma Analytics, Müllheim
Reinluftwerkbank	MSC-Advantage	Fisher Scientific, Schwerte
Reinstwassersystem	arium 611DI	Sartorius, Göttingen
Röntgenkassetten		bezogen von A.Hartenstein GmbH, Würzburg
Scanner	MFC-4760DN	Brother International GmbH, Bad Vilbel
Taumelschüttler	WT17	Biometra, Göttingen
	PS-3D	Grant Instruments, Cambridge (UK)
Thermoblock	TB2	Biometra, Göttingen
Trockenschrank	Avantgarde.Line	Binder, Tuttlingen
UV-VIS-Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Vortex	uniTEXER 1	LLG Labware, Meckenheim
	Vortex-Schüttler	VWR International, Darmstadt
	Signature Digital Vortex Mixer	VWR International, Darmstadt
Waage	Acculab ALC-110.4	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	TW12	Julabo, Seelbach
Zählkammer	Neubauer improved, Linien dunkel, 0,1 mm	Paul Marienfeld GmbH, Lauda Königshofen
Zentrifuge	1-15PK	Sigma, Osterode am Harz
	4K15	Sigma, Osterode am Harz

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Typ	Bestellnummer	Hersteller, Ort
10 cm-Petrischale	Cellstar	664160	Greiner Bio-One, Frickenhausen
24 Well-Platte	Cellstar	662160	Greiner Bio-One, Frickenhausen
6 Well-Platte	Cellstar	657160	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einfrierröhrchen	Cryopure 2,0 ml Röhren mit Innengewinde und Silikondichtring	72.380	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalküvetten	Semi- Mikroküvetten aus Polystyrol	759015	Brand, Wertheim
Filteraufsatz	"rapid"-Filtermax	99155	TPP, Trasadingen (CH)
Multipettenspitze	Dispensertips 12,5 ml	07-052-0100	nerbe plus, Winsen/Luhe
Nitrocellulosemembran	BioTrace NT	66485	Pall, Dreieich
Papier für Western Blot	Whatman cellulose chromatography papers, Grade 3MM Chr	3030-917	Cytiva Europe, Freiburg
	Whatman gel blotting papers, Grade GB005	10426994	Cytiva Europe, Freiburg
Pipettenspitzen	10 µl	720031	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
	200 µl	70.760.012	Sarstedt, Nümbrecht
	1000 µl	70.762.010	Sarstedt, Nümbrecht
	5000 µl	702600	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen mit Filter	10 µl	06-613-5300	nerbe plus, Winsen/Luhe
	100 µl	06-642-5300	nerbe plus, Winsen/Luhe
	200 µl	07-662-8300	nerbe plus, Winsen/Luhe
	1250 µl	06-695-5300	nerbe plus, Winsen/Luhe

Material	Typ	Bestellnummer	Hersteller, Ort
Platte für Lumineszenzmessungen	96-well Solid White Flat Bottom Polystyrene TC-treated Microplates	3917	Corning, Kaiserslautern
Reaktionsgefäße	1,5 ml	72.690.001	Sarstedt, Nümbrecht
	2 ml	72.695.500	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen für Durchflusszytometrie mit Zellenfilterkappe	Corning Falcon Röhrchen mit Zellenfilterkappe	352235	Corning, Kaiserslautern
Röntgenfilm	Amersham Hyperfilm ECL	28906837	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Spritzenfilter		EQ1180	phygenera, Hannover
Zellschaber	Zellschaber 16 cm	83.1832	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen	Cellstar 15 ml	188271	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	Cellstar 50 ml	227261	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bestellnummer	Hersteller, Ort
100x L-Glutamin (200 mM)	AC-AS-0001	anprotec, Bruckberg
100x Penicillin/Streptomycin	AC-AB-0024	anprotec, Bruckberg
Accutase	00-4555	eBioscience, Frankfurt a. M.
Acrylamid/Bisacrylamid 30%-Lösung (37,5:1)	3029.1	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	001201-0500	Merck, Darmstadt
Ampicillin	K029.1	Roth, Karlsruhe
Coelenterazin 400a	340-1	Nanolight, Pinetop (AZ, USA)
Coelenterazin h	301-1	Nanolight, Pinetop (AZ, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	8.02912.1000	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat (Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O)	X987.2	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), High Glucose w/o L-Glutamine w/ Sodium Pyruvate	AC-LM-0015	anprotec, Bruckberg
Entwicklerbad für Röntgenfilme	EfBAK	AGFA, Düsseldorf
Essigsäure	1.00063.2511	Merck, Darmstadt
Ethanol	9065.2	Roth, Karlsruhe

Chemikalie	Bestellnummer	Hersteller, Ort
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	8043.2	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	AC-SM-0027	anprotec, Bruckberg
Fixierbad für Röntgenfilme	2828Q	AGFA, Düsseldorf
Geneticin-Lösung (50 mg/ml)	10131-027	Thermo Fisher Scientific Life Technologies, Darmstadt
Glycerin	3783.1	Roth, Karlsruhe
Glycin	3908.2	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	33539-2,5L-M	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	6781.1	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	1.04873-1000	Merck, Darmstadt
Luria Broth Base (LB)	12795027	Thermo Fisher, Darmstadt
Methanol	4627.2	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	42590.02	Serva, Heidelberg
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin (TEMED)	2367.1	Roth, Karlsruhe
<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure (HEPES)	9105.4	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	1.06404.5000	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	2326.1	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	6771.1	Roth, Karlsruhe
Polyethylenimin (PEI)	23966-2	Polysciences Europe, Hirschberg an der Bergstrasse
Ponceau S (0,2%)	33427.01	Serva, Heidelberg
Renilla Luciferase Assay Lysis Buffer 5x	E291A	Promega, Walldorf
Salzsäure 37 %	1.00317.2500	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	4855.3	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	3051.3	Roth, Karlsruhe
Tween 20	9127.1	Roth, Karlsruhe

2.1.4 Vektoren und Plasmide

Tabelle 2.4: Verwendete Vektoren und Plasmide

Plasmid/Vektor	Anmerkungen
10 bp-MH-Luc	Diese Plasmide basieren auf einem pSQT1313-Vektor (Tsai et al., 2014), der zusätzlich eine Luziferase-Sequenz ohne Promotor enthält. Diese wird von 10, 15 oder 30 Basenpaaren langen Sequenzen flankiert, welche homolog zu den Sequenzen beidseits der RPGR-mORF15-Sequenz der HEK293 ^{mORF15} -Zelllinie sind (Yanik et al., 2018).
15 bp-MH-Luc	
30 bp-MH-Luc	

Plasmid/Vektor	Anmerkungen
Cas9-BFP	Das Plasmid basiert auf dem px459-Vektor (Ran et al., 2013), bei welchem das Puromycin-Resistenzgen gegen die Sequenz eines blau-fluoreszierenden Proteins (BFP) ausgetauscht wurde.
gRNA h1-1	Das Plasmid basiert auf dem pSQT1313-Vektor (Tsai et al., 2014) und enthält unter Kontrolle eines U6-Promotors die Sequenzen für 2 gRNAs, welche zur Induktion von DSBs beidseits der RPGR-mORF15-Sequenz in der HEK293 ^{mORF15} -Zelllinie führen (Yanik et al., 2018).
Lig.1-KO	Diese Plasmide basieren auf dem pSQT1313-Vektor (Tsai et al., 2014) und enthalten unter Kontrolle eines U6-Promotors Sequenzen für zwei gRNAs (Lig.1-KO und Lig.3-KO) oder eine gRNA (Lig.4-KO), die zur DSB-Induktion im humanen DNA-Ligase 1-, -3- oder -4-Gen führen. Die entsprechenden gRNA-Sequenzen sind in Tabelle 2.5 angegeben.
Lig.3-KO	
Lig.4-KO	
px 459-T7	Das Plasmid basiert auf dem px459-Vektor (Ran et al., 2013) und enthält unter Kontrolle eines U6-Promotors zusätzlich Sequenzen für 2 gRNAs, die zur DSB-Induktion beidseits der Luziferasesequenz auf den XX bp-MH-Luc-Plasmiden führen (Yanik et al., 2018).
RLuc8	Das Plasmid basiert auf einem pcDNA3.1(+)-Vektor (Invitrogen V79020 (Thermo Fisher)), der die Sequenz einer durch Mutation optimierten Luziferase aus <i>Renilla reniformis</i> (RLuc8) (Loening et al., 2006) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors enthält.
T11	Das Plasmid basiert auf einem pcDNA3.1(+)-Vektor (Invitrogen V79020 (Thermo Fisher)) und enthält unter der Kontrolle eines CMV-Promotors ein Konstrukt aus einer RLuc8- (Loening et al., 2006) und einer GFP2-Sequenz, die von einer Targetsequenz separiert werden (Wimmer et al., 2021).
T3-3	Das Plasmid basiert auf dem px459-Vektor (Ran et al., 2013) und enthält unter der Kontrolle eines U6-Promotors zusätzlich die Sequenz für eine gRNA, welche einen DSB in der Targetsequenz des T11-Plasmids (s.o.) induziert (Wimmer et al., 2021).

Plasmid/Vektor	Anmerkungen
TOPO-VEGF	Dieses Plasmid basiert auf einem TOPO-TA-Vektor (Invitrogen 450641 (Thermo Fisher)). Es enthält keinen eukaryotischen Promotor und wurde als "Füllvektor" verwendet um die DNA-Menge zwischen den einzelnen Transfektionsansätzen des MMEJ-Assays konstant zu halten.

Der px459-Vektor enthält unter anderem die Sequenz für ein mit Kernlokalisierungssignalen versehenes Streptococcus pyogenes-Cas9-Protein (SpCas9) unter der Kontrolle eines CBh-Promotors, der nach Transfektion die konstitutive Expression des SpCas9-Proteins ermöglicht (Ran et al., 2013). Zur DSB-Induktion ist bei Verwendung von SpCas9 als PAM die Sequenz NGG notwendig, die sich unmittelbar downstream an die von der gRNA erkannte Sequenz anschließt (Jinek et al., 2012).

Tabelle 2.5: gRNA-Sequenzen der DNA-Ligase-KO-Plasmide.

KO-Plasmid	gRNA-Sequenz
Lig.1-KO	5'-ACGTCTGCGCGCGAATGCCG-3' 5'-CATCGTTCGGCCCCGTCATG-3'
Lig.3-KO	5'-CAACCGTCGTGGGCTGCCCG-3' 5'-TGTGAGTGAGTATGTACATG-3'
Lig.4-KO	5'-TAAGTTGTTCTAGGTCGTCC-3'

2.1.5 Antikörper

Tabelle 2.6: Verwendete Antikörper

	Antikörper	Bestellnummer	Hersteller, Ort
Primäre Antikörper	anti-DNA Ligase 1 (rabbit, polyclonal)	18051-1-AP	Proteintech Europe, Manchester (UK)
	anti-DNA Ligase 3 (rabbit, polyclonal)	NBP1-87720	Novus Biologicals, Abingdon (UK)
	anti-DNA Ligase 4 (mouse, monoclonal)	sc-271299	Santa Cruz, Dallas (TX, USA)
	anti-DNA Ligase 4 (rabbit, polyclonal)	ABIN2778272	antibodies-online, Aachen

	Antikörper	Bestellnummer	Hersteller, Ort
Primäre Antikörper	anti-GAPDH (rabbit, monoclonal)	2118L	Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M.
	anti-Aktin (mouse, monoclonal)	MA1-744	Pierce Biotechnology, Rockford (IL, USA)
Sekundäre Antikörper	anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate (goat, polyclonal)	A0545	Sigma-Aldrich, Saint Louis (MO, USA)
	anti-mouse IgG-peroxidase conjugate (rabbit, polyclonal)	A9044	

2.1.6 Protein-Größenmarker

Bei der Durchführung von SDS-PAGE und Western Blot wurde der Größenmarker "Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder" (siehe Abbildung 2.1) von Thermo Scientific (Schwerte) verwendet (Bestellnummer: 26634).

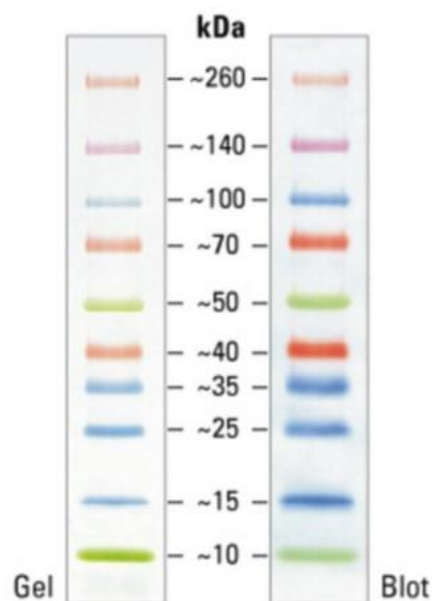


Abbildung 2.1: Darstellung des in SDS-PAGE und Western Blot verwendeten Protein-Größenmarkers. (Abbildung entnommen aus dem Benutzerhandbuch des "Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder" mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific.)

2.1.7 Stammlösungen

Tabelle 2.7: Verwendete Stammlösungen

Stammlösung	Zusammensetzung und Herstellung
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	30,3 g Tris ad 500 ml ddH ₂ O, pH auf 6,8 einstellen
1 M Tris/HCl, pH 6,8	12,1 g Tris ad 100 ml ddH ₂ O, pH auf 6,8 einstellen
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	90,8 g Tris ad 500 ml ddH ₂ O, pH auf 8,8 einstellen
10x PBS (phosphate-buffered saline)	80 g NaCl 2 g KCl 27,2 g Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml ddH ₂ O, pH auf 7,4 einstellen
10x SDS-PAGE-Laufpuffer	30,3 g Tris 144 g Glycin 50 ml 20 % SDS ad 1000 ml ddH ₂ O
10x TBS (Tris-buffered saline)	88 g NaCl 2 g KCl 30 g Tris ad 1000 ml ddH ₂ O, pH auf 7,4 einstellen
10x Western Blot-Transfer-Puffer	30,3 g Tris 144 g Glycin 50 ml 20 % SDS ad 1000 ml ddH ₂ O
150 mM NaCl-Lösung	8,77 g NaCl ad 1000 ml ddH ₂ O
20 % SDS-Lösung (w/v)	50 g SDS ad 250 ml ddH ₂ O
5 % Essigsäure-Ponceau S-Lösung	0,1 % Ponceau S (w/v) in 5 % Essigsäure
5x Lämmli (SDS-PAGE-Probenpuffer), nicht reduzierend	1 g SDS 5 ml Glycerin 3 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8 0,05 g Bromphenolblau 2 ml ddH ₂ O
Ampicillin-Lösung	1 g Ampicillin ad 10 ml ddH ₂ O
Aria-Puffer	0,6 g HEPES 0,3 g EDTA ad 100 ml 1x PBS, pH auf 7,4 einstellen
Luziferasesubstrat	1 mg Coelenterazin h oder Coelenterazin 400a in 1 ml Ethanol
PEI-Lösung	0,1 g PEI ad 1000 ml 150 mM NaCl-Lösung 18 h bei 80 °C, pH auf 7 einstellen

10x Lösungen wurden vor Verwendung mit ddH₂O 1:10 auf 1x Lösungen verdünnt.

2.1.8 Medien

2.1.8.1 Medien für die Bakterienkultur

Für die Kultur von Bakterien wurde im Rahmen dieser Arbeit LB-Medium verwendet. Hierzu wurden 25 g LB (siehe Tabelle 2.3) in 1000 ml ddH₂O gelöst. Das Medium wurde anschließend nach Herstellerangabe autoklaviert.

2.1.8.2 Medien für die Zellkultur

Tabelle 2.8: Verwendete Medien für die Zellkultur

Medium	Zusammensetzung und Herstellung
DMEM +++	435 ml DMEM (siehe Tabelle 2.3) 50 ml FKS 10 ml 100x Glutamin-Lösung (mit 200 mM) 5 ml 100x Penicillin/Streptomycin-Lösung (mit 10.000 U/ml Penicillin G und 10 mg/ml Streptomycin)
DMEM +++ mit 1 % Geneticin-Lösung	99 ml DMEM +++ 1 ml Geneticin-Lösung (mit 50 mg/ml)
Einfriermedium	10 % DMSO 90 % FKS

2.1.9 Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide waren zuvor zur einfachen Vervielfältigung in *Escherichia coli*-Bakterienzellen transformiert worden. Die verwendeten *E. coli*-Stämme sind in Tabelle 2.9 angegeben.

Tabelle 2.9: Verwendete Bakterienstämme

Typ	verwendet für Plasmid	Genetische Eigenschaften	Hersteller, Ort
Stellar	px459-T7	F ⁻ , endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ (lacZYA – argF) U169, Δ (mrr – hsdRMS – mcrBC), ΔmcrA, λ ⁻	Takara Clontech, Saint-Germain-en-Laye (FR)
XL1-blue	gRNAh1-1, Lig.1-KO, Lig.3-KO, Lig.4-KO, TOPO-VEGF, XX-bp-MH-Luc, Cas9-BFP, Rluc8, T11, T3-3	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene, Heidelberg

2.1.10 Zelllinien

Tabelle 2.10: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Anmerkungen
HEK 293T (ATCC CRL-3216)	Bezogen von LGC Standards, Wesel.
HEK 293 (ATCC CRL-1573)	Bezogen von LGC Standards, Wesel.
HEK293 ^{mORF15}	Basiert auf der HEK 293-Zelllinie, die stabil das murine RPGR-ORF15-Exon unter der Kontrolle eines CMV-Promotors im Genom integriert hat. Zur Selektion der stabil transfizierten Zellen wird dem Medium Geneticin zugegeben (Yanik et al., 2018).

2.1.11 Reagenziensysteme und Kits

Tabelle 2.11: Verwendete Reagenziensysteme und Kits

Reagenziensystem/Kit	Bestellnummer	Hersteller, Ort
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent	RPN2209	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Human DNA ligase 1 ELISA Kit	MBS2883984	MyBioSource, San Diego (CA, USA)
Human DNA ligase 4 ELISA Kit	MBS2800038	MyBioSource, San Diego (CA, USA)
LIG 3 ELISA Kit (Human)	OKEH02437	Aviva Systems Biology, San Diego (CA, USA)
MTT Cell Proliferation Assay Kit	10009365	Cayman Chemical, Ann Arbor (MI, USA)
Pierce Coomassie Plus (Bradford) Protein-Assay	23238	Fisher Scientific, Schwerte
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	12163	Qiagen, Hilden

2.1.12 Software

Tabelle 2.12: Verwendete Software

Software	Hersteller, Ort
BZ-8100 Observation Application v.1.10	Keyence, Neu-Isenburg
i-control v.1.11	Tecan, Grödig (AT)
Microsoft Office Professional Plus 2019	Microsoft Corporation, Redmond (WA, USA)
SigmaPlot v.12.0	Systat, Erkrath

2.1.13 Ausgangsmaterial

Die in Tabelle 2.4 aufgeführten Vektoren und Plasmide sowie die Zelllinie HEK293^{mORF15} lagen vor Beginn der experimentellen Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation als Ausgangsmaterial vor.

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienkultur

Die Kultur der Plasmid-tragenden *E. coli*-Stämme erfolgte im Rahmen dieser Arbeit zur späteren Durchführung einer Plasmidisolierung mittels Maxi-Präparation.

Die jeweiligen *E. coli*-Stämme wurden als Glycerolstocks bei -80 °C gelagert. Die Glycerolstocks wurden zur Durchführung der Kultur ebenso wie die Ampicillin-Lösung langsam auf Eis aufgetaut. Unter sterilen Bedingungen wurden 100 ml LB-Medium (siehe 2.1.8.1) in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Hinzugegeben wurden des Weiteren 100 µl Ampicillin-Lösung zur Selektion (Endkonzentration: 100 µg/ml) sowie 100 µl des jeweiligen Glycerolstocks. Die so hergestellten Ansätze wurden für 16-18 h auf einem Orbitalschüttler bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

2.2.2 Maxi-Präparation

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* zur Gewinnung hochreiner Plasmide für spätere Transfektionsexperimente wurde mittels Maxipräparations-Kit von Qiagen (siehe Tabelle 2.11) nach modifiziertem Protokoll durchgeführt.

Hierzu wurden 100 ml der am Vortag vorbereiteten Bakterienkultur (siehe 2.2.1) auf zwei 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und bei 4 °C und 6000 x g für 15 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Bakterienpellets in jeweils 5 ml Puffer P1 resuspendiert und anschließend Suspensionen von Bakterien, die das gleiche Plasmid enthielten, zusammengeführt, sodass sich ein Gesamtvolumen der Bakteriensuspension in Puffer P1 von 10 ml ergab. Der Bakteriensuspension wurden 10 ml Puffer P2 hinzugegeben und eine Durchmischung durch mehrmaliges Invertieren erreicht, bevor für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Im Anschluss wurden umgehend 10 ml Puffer P3 hinzugefügt und durch mehrfaches Invertieren gemischt. Es schloss sich ein 20 Min. dauernder Inkubationsschritt auf Eis an, bevor für 45 Min. bei 4 °C und 11627 x g zentrifugiert wurde. Der Plasmid-DNA-haltige Überstand wurde im Anschluss in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und erneut für 15 Min. bei 4 °C und 11627 x g zentrifugiert. Der hierbei erhaltene Plasmid-DNA-haltige Überstand lief im Anschluss

durch einen QIAGEN-tip 500. Zuvor war dieser durch den Durchlauf von 10 ml Puffer QBT equilibriert worden. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift bei dem jeweils 30 ml des Waschpuffers QC durch QIAGEN-tip 500 liefen. Die Plasmid-DNA konnte daraufhin mit 15 ml Puffer QF aus dem QIAGEN-tip 500 eluiert werden. Zu dem Eluat wurden zur Fällung der DNA im Anschluss 10,5 ml raumtemperiertes Isopropanol gegeben und mittels Invertierens gründlich durchmischt, bevor bei 4 °C und 11627 x g für 45 Min. zentrifugiert wurde. Nach Entfernung des Überstandes wurde das so erhaltene DNA-Pellet mit 70 % Ethanol in ddH₂O gewaschen und für 15 Min. bei 4 °C und 11627 x g zentrifugiert. Nach erneuter Entfernung des Überstandes wurde das DNA-Pellet für 10 Min. an der Luft getrocknet um das Ethanol zu entfernen. Das Pellet wurde anschließend in ddH₂O gelöst.

Es schloss sich eine Bestimmung der DNA-Konzentration an.

2.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration im Photometer

Die Konzentration von doppelsträngiger DNA in Lösungen lässt sich mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes aus der gemessenen Absorption bei 260 nm berechnen. Anhand einer zusätzlichen Messung bei 320 nm erfolgt eine Korrektur im Hinblick auf Lichtstreuung sowie andere UV-absorbierende Inhaltsstoffe der Probe. Verunreinigungen durch Proteine, Phenole, Nukleotide, RNA und einzelsträngige DNA können die Konzentrationsbestimmung beeinflussen (Bhat et al., 2010).

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Photometer wurde zunächst die Absorption von 10 µl reinem ddH₂O, welches als Lösungsmittel diente, in einer Quarzküvette als Leerwert gemessen. 1 µl der Plasmid-DNA-Lösung, deren Konzentration bestimmt werden sollte, wurde mit 49 µl ddH₂O verdünnt. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption von 10 µl der verdünnten DNA-Lösung in einer Quarzküvette. Der Verdünnungsfaktor wurde automatisch durch das Photometer korrigiert.

2.2.4 Kultivierung von HEK293T- und HEK293T^{mORF15}-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien waren HEK293T sowie die in der AG Stieger generierte Zelllinie HEK293^{mORF15} (Yanik et al., 2018) (siehe Tabelle 2.10).

Als Medium für die HEK293T-Zellen diente DMEM +++ (siehe Tabelle 2.8). Für die Kultur der HEK293^{mORF15}-Zellen wurde DMEM +++ verwendet, welches zur Selektion zusätzlich mit 1 % Geneticin-Lösung supplementiert war (siehe Tabelle 2.8).

Die Zellen wuchsen in beschichteten Petrischalen im Brutschrank bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂.

Standardmäßig wurde eine 1:10-Aufteilung der Zellen alle 3 bis 4 Tage durchgeführt, sodass ein Erreichen vollständiger Konfluenz verhindert wurde. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen mit 10 ml sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Accutase auf die Zellen gegeben und ca. 5-10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vollständiger Ablösung der Zellen wurde die Reaktion der Accutase mit 9 ml des jeweiligen Zellkulturmediums abgestoppt und die Zellsuspension wurde durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. 1 ml der so erhaltenen Zellsuspension wurde auf frische Petrischalen aufgeteilt und es wurde mit 10 ml des jeweiligen Zellkulturmediums aufgefüllt. Die Passagenzahl erhöhte sich durch diesen Vorgang um 1. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden nur Zellen verwendet die eine maximale Passagenzahl von 25 aufwiesen.

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen in Einfriermedium (siehe Tabelle 2.8) resuspendiert und in Einfrierröhrchen zunächst für 2 Tage bei -80 °C in Isopropanol aufbewahrt. Im Anschluss wurden die Einfrierröhrchen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Alle Arbeiten an Zellen wurden unter einer Reinluftwerkbank durchgeführt.

2.2.5 Aussaat einer definierten Anzahl von Zellen

Die Aussaat einer definierten Anzahl von Zellen erfolgte unter Zuhilfenahme einer Neubauer improved-Zählkammer (siehe Tabelle 2.1). Hierzu wurde die durch Ablösen der Zellen gewonnene und gründlich homogenisierte Zellsuspension 1 : 1 mit dem entsprechenden Zellkulturmedium verdünnt, durchmischt und unter das Deckglas der Zählkammer pipettiert. Das Deckglas war zuvor nach Anhauchen aufgesetzt und auf Newtonsche Ringe geprüft worden, um einen korrekten Abstand zur Zählkammer sicherzustellen. Im Anschluss erfolgte das Auszählen der Zellen in den 4 Eckquadraten. Zellen, welche die obere und untere mittlere Begrenzungslinie berührten, wurden dabei noch mitgezählt. Es wurde dann das arithmetische Mittel der bestimmten Zellzahlen gebildet und aufgrund der 1:1-Verdünnung mit 2 multipliziert. Eine Multiplikation mit 10000 ergab dann die Zellzahl pro ml Zellsuspension. Die Zellsuspension wurde dann entsprechend der gewünschten Zellzahl in die Wells einer Zellkulturplatte gegeben. Im Anschluss wurde mit dem entsprechenden Medium auf das gewünschte Volumen im Well aufgefüllt.

2.2.6 Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten transienten Transfektionen zur Einbringung von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen wurde Polyethylenimin (PEI) verwendet (Boussif et al., 1995). PEI ist ein aufgrund von zahlreichen Aminogruppen kationisches Polymer, welches in der Lage ist, mit anionischen Nukleinsäuren, wie zum Beispiel Plasmid-DNA, PEI/DNA-Komplexe zu bilden. Diese können verwendet werden, um hochreine Plasmid-DNA in Zellen einzubringen. Des Weiteren bewirken die PEI/DNA-Komplexe einen Schutz der DNA vor lysosomaler Degradation. Die Transfektionseffizienz ist hierbei von vielen verschiedenen Faktoren wie zum Beispiel der DNA-Konzentration, dem PEI/DNA-Verhältnis und den Bedingungen bei der Bildung der PEI/DNA-Komplexe abhängig (Yang et al., 2017).

Ungefähr 0,5 bis 1 h vor der eigentlichen Transfektion wurde das Zellkulturmedium gewechselt, wobei das Volumen auf 300 µl für 24 Well-Platten und 1,5 ml für 6 Well-Platten reduziert wurde. Zur Durchführung der Transfektionen wurden zunächst die jeweiligen Plasmidlösungen in 150 mM NaCl-Lösung verdünnt. Die Volumina der Plasmidlösungen wurden dabei anhand ihrer zuvor photometrisch bestimmten DNA-Konzentrationen so gewählt, dass jeweils die gewünschte DNA-Menge pro Transfektionsansatz erreicht wurde. Die Volumina der NaCl- sowie der später hinzugegebenen PEI-Lösung wurden durch die Größe der Wells, in denen die zu transfizierenden Zellen wuchsen, bestimmt (siehe Tabelle 2.13). Nach Zugabe aller für den Versuch notwendigen Plasmide wurde PEI-Lösung zum Ansatz hinzugefügt. Die Ansätze wurden daraufhin kurz gevortext und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, sodass sich die PEI/DNA-Komplexe formieren konnten. Die fertigen Transfektionsansätze wurden daraufhin tröpfchenweise über die Wells verteilt, um bereits initial eine möglichst gute Verteilung im Well zu erreichen. Eine weitere Durchmischung wurde durch vorsichtiges Schwenken der Wells erreicht. Ca. 4 h nach der Transfektion wurde ein Medienwechsel, bei dem das Volumen wieder auf 700 µl für 24 Well-Platten und 2 ml für 6 Well-Platten erhöht wurde, durchgeführt.

Tabelle 2.13: Reagenzienvolumina für Transfektionsexperimente

Well-Format	Volumen NaCl-Lösung	Volumen PEI-Lösung
6 Well-Platte	100 µl	200 µl
24 Well-Platte	30 µl	40 µl

2.2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Abschätzung der Transfektionseffizienz verwendet. Zellen, die eine blaue Fluoreszenz zeigten, wurden nach Transfektion des Cas9-BFP-Plasmides (siehe Tabelle 2.4) im Rahmen von Versuchen zur DNA-Ligase-Protein-Quantifikation und des MTT-Assays als erfolgreich transfiziert betrachtet. Die Expositionszeit der Zellen gegenüber dem anregenden Licht wurde möglichst kurz gehalten.

2.2.8 Proteinisolation aus Säugetierzellen

Die Herstellung von Gesamtproteinisolaten aus Säugetierzellen wurde mittels der „Freeze-Thaw-Methode“ durchgeführt. Dazu wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen. Die Zellen wurden daraufhin mit kaltem PBS gewaschen. Je nach weiterer Verwendung der Proteine wurde entweder PBS, wenn die Proteine für umgehende Messungen verwendet wurden, oder 1:5 mit ddH₂O verdünnter 5x Renilla Luciferase Assay Lysis Buffer (siehe Tabelle 2.3), wenn die Proteinisolate zunächst bei -20 °C eingefroren werden sollten, zur Lyse auf die Zellen gegeben. Die Volumina pro Well wurden an die Größen der Wells angepasst (siehe Tabelle 2.14).

Die Zellen wurden daraufhin durch Kratzen mit dem Zellschaber im Falle von 6 Well-Platten oder durch Auf- und Abpipettieren im Falle von 24 Well-Platten resuspendiert. Weiteres Auf- und Abpipettieren diente zur Homogenisierung der Zellsuspension. Die Zellsuspension wurde daraufhin in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und gevortext. Es schloss sich ein weiterer Zyklus mit zügigem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei Raumtemperatur an. Zur Entfernung der Zelltrümmer aus der Proteinlösung wurden die Zellen bei 5 °C und 17968 x g für 5 Min. zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde im Anschluss in ein frisches Mikroreaktionsgefäß überführt.

Alle Reagenzien sowie die Zellsuspensionen und Proteinisolate wurden permanent auf Eis aufbewahrt.

Tabelle 2.14: Reagenzienvolumina für die Proteinisolation aus Säugetierzellen

Well-Format	Volumen PBS (Waschen)	Volumen PBS/Lysepuffer (Lyse)
6 Well-Platte	1 ml	750 µl
24 Well-Platte	0,5 ml	200 µl

2.2.9 Coomassie Plus (Bradford)-Assay

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen wurde mittels Bradford-Assay durchgeführt (Bradford, 1976). Hierzu wurde das Pierce Coomassie Plus (Bradford) Protein-Assay-Kit verwendet (siehe Tabelle 2.11).

Zunächst wurden 1 µl der Protein-Lösung mit 49 µl PBS verdünnt. Als Leerwert dienten 50 µl reines PBS. Die Proben wurden mit jeweils 1,5 ml Coomassie-Lösung aufgefüllt, gevortext und 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben in Einmalküvetten überführt. Die Messung der Extinktion erfolgte mittels Photometer, wobei zunächst eine Messung des Leerwertes zur Kalibrierung erfolgte. Die Berechnung der Konzentration der Ausgangslösungen erfolgte nach Angabe der Probenverdünnung automatisch durch das Photometer.

2.2.10 Transfektion von Zellen für die Quantifikation von DNA-Ligase-Protein

Zum Nachweis einer verringerten Expression der DNA-Ligasen und damit verringertem DNA-Ligase-Proteingehalt nach CRISPR/Cas9 und NHEJ-vermitteltem KO wurden zunächst HEK293T-Zellen unausgezählt auf eine 6 Well-Platte ausgesät, wobei 0,5 ml Zellsuspension und 1,5 ml DMEM+++ in die Wells gegeben wurden. Die Zellen wuchsen daraufhin ca. 24 h im Brutschrank bis zu einer Konfluenz von ca. 60-70 %. Im Anschluss erfolgte eine Transfektion gemäß Protokoll (siehe 2.2.6) nach dem in Tabelle 2.15 angegebenen Schema.

Tabelle 2.15: Transfektionsschema für die Quantifikation von DNA-Ligase-Protein nach CRISPR/Cas9-vermitteltem DNA-Ligase-KO. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Menge an transfizierter Plasmid-DNA in ng.

	1	2	3	4
Cas9-BFP	5000	5000	5000	5000
Lig.1-KO		5000		
Lig.3-KO			5000	
Lig.4-KO				5000

Die Zellen wuchsen im Anschluss bis zu einer Konfluenz von >90 %. Danach erfolgte entweder die direkte Isolation des Gesamtproteins aus den Zellen (siehe 2.2.8) oder zunächst eine Anreicherung BFP-positiver Zellen mittels FACS (siehe 2.2.11).

In einigen Versuchen wurde die Transfektion der Zellen bis zum Erreichen der

entsprechenden Konfluenz mehrfach wiederholt, um so den Anteil an transfizierten Zellen zu steigern.

2.2.11 Anreicherung von Zellen mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) (Bonner et al., 1972; Hulett et al., 1969) wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Anreicherung erfolgreich transfizierter Zellen vor dem Verfahren zur Quantifikation der DNA-Ligase-Proteinmenge in den Zellen eingesetzt. Dies war möglich, da das verwendete Cas9-BFP-Plasmid neben der Cas9-Sequenz zusätzlich eine Sequenz trug, welche für ein blau-fluoreszierendes Protein (BFP) codierte. Die erfolgreich transfizierten Zellen, die angereichert werden sollten, waren daher BFP-positiv.

Als Vorbereitung auf das eigentliche FACS wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und es wurde 0,5 ml Accutase auf die Zellen gegeben. Nachdem sich die Zellen ausreichend abgelöst hatten, erfolgte das Abstoppen mit 1,5 ml DMEM+++ und eine Homogenisierung der Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren. Die Zellsuspension wurde daraufhin in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C und 280 x g für 10 Min. zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden 10 ml PBS auf die Zellen gegeben, die Zellen resuspendiert und erneut bei 4 °C und 280 x g für 10 Min. zentrifugiert. Der vorangehende Schritt wurde noch einmal mit einem Volumen von 5 ml PBS wiederholt. Im Anschluss wurden die Zellen in 500 µl kaltem, sterilem ARIA-Puffer (siehe Tabelle 2.7) resuspendiert und auf Eis aufbewahrt.

Kurz vor der FACS-Anreicherung wurde die so erhaltene Zellsuspension durch einen 35 µm-Filter pipettiert, um für das FACS-Gerät zu große Partikel zu entfernen. Die eigentliche FACS-Anreicherung wurde dann in der FACS Core Facility des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin im ForMed durchgeführt. Das Sorting erfolgte in PBS. Das 15 ml-Zentrifugenröhrchen wurde zuvor invertiert, um die Wände mit PBS zu benetzen und so eine Zerstörung der Zellen bei Auftreffen auf die Röhrchenwand zu verhindern.

Nach dem Sorting wurden die als BFP-positiv angereicherten Zellen bei 4 °C und 500 x g für 10 Min. zentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes in 100 µl von zuvor 1:5 mit ddH₂O verdünntem Renilla Luciferase Assay Lysis Buffer 5x resuspendiert. Es schloss sich eine Isolation des Gesamtproteins aus den Zellen an (siehe 2.2.8).

2.2.12 SDS-PAGE

Die denaturierende diskontinuierliche Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit zusammen mit dem nachfolgenden Western Blot mit dem Ziel des Nachweises eines verringerten DNA-Ligase-Proteingehalts der Zellen nach erfolgtem DNA-Ligase-KO verwendet. Die Durchführung erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen.

Als Vorbereitung wurden die Polyacrylamid-Gele für die SDS-PAGE hergestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Trenngele hatten einen Polyacrylamid-Anteil von 10 %. Hierzu wurden zunächst die für das Gießen der Gele notwendigen Glasscheiben mit 70 % Ethanol in ddH₂O gereinigt und unter Einbau einer Dichtung zusammengesetzt. Das Trenngel setzte sich wie in Tabelle 2.16 angegeben zusammen. Nach dem Starten der Polymerisationsreaktion mit APS und TEMED wurde das Trenngel zügig durchmischt, luftblasenfrei zwischen die zusammengesetzten Glasscheiben gegossen und mit 100 % Ethanol überschichtet. Es polymerisierte danach für 45 Min. bei Raumtemperatur aus. Im Anschluss wurde das Ethanol vollständig abgekippt und etwaige Reste mit Tüchern entfernt.

Es folgte die Herstellung des 4%-Sammelgels gemäß Tabelle 2.17. Nach dem Starten der Polymerisationsreaktion durch Zugabe von APS und TEMED wurde das Sammelgel zügig durchmischt und über das Trenngel gegossen. Es wurde ein Kamm in das Sammelgel gesteckt. Dem Sammelgel wurden dann 45 Min. zum Auspolymerisieren gegeben.

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden die Gele nach Entfernung der Dichtungen in die Laufkammer eingespannt und die Laufkammer mit SDS-PAGE-Laufpuffer luftblasenfrei befüllt. Anschließend wurde der Kamm entfernt, sodass die vorbereiteten Proteinproben in die so entstandenen Taschen gegeben werden konnten. Zur Vorbereitung der aus den Zellen isolierten Proteinproben (siehe 2.2.8) wurden diese mit PBS verdünnt, wobei das Volumen der Proteinprobe so gewählt wurde, dass die jeweils gewünschte Gesamtproteinmenge pro Tasche im Gel erreicht wurde. Bei Durchführung von SDS-PAGE und Western Blot zum Nachweis eines verringerten DNA-Ligase-Proteingehalts der Zellen nach KO wurde die Gesamtproteinmenge in den einzelnen Taschen eines Gels konstant gehalten. Die aufgetragenen Gesamtproteinmengen waren durch vorherige Verdünnungsreihen optimiert worden. Das PBS-Volumen wurde so gewählt, dass sich ein Gesamtvolumen der vorbereiteten Proteinprobe von 20 µl ergab. Anschließend wurden

noch 5 µl SDS-PAGE-Proben-Puffer (5x Lämmli) hinzugegeben und die Proben für 15 Min. bei 98 °C im Heizblock erhitzt.

Nach Auftragen der Proteinproben und Größenmarker auf das Gel lief die SDS-PAGE für 60 Min. bei 100 V.

Tabelle 2.16: Zusammensetzung des 10 %-Trenngels für die SDS-PAGE

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	6,25 ml
20 % SDS	125 µl
30 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	9 ml
ddH ₂ O	9,75 ml
10 % APS	200 µl
TEMED	20 µl

Tabelle 2.17: Zusammensetzung des 4 %-Sammelgels für die SDS-PAGE

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	5,0 ml
20 % SDS	50 µl
30 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	2,2 ml
ddH ₂ O	2,8 ml
10 % APS	100 µl
TEMED	15 µl

2.2.13 Western Blot

Die Durchführung des Western Blots schloss sich direkt an die Durchführung der diskontinuierlichen SDS-PAGE an und wurde als Semi Dry-Blot (Kyhse-Andersen, 1984) durchgeführt.

Zunächst wurde das Gel nach abgelaufener SDS-PAGE zugeschnitten, wobei das Sammelgel sowie Anteile des Trenngels, die kein Protein oder Marker enthielten, entfernt wurden. Anschließend wurde eine Nitrocellulosemembran (siehe Tabelle 2.2) sowie zwei dicke (Whatman gel blotting papers, Grade GB005) (siehe Tabelle 2.2) und vier dünne (Whatman cellulose chromatography papers, Grade 3MM Chr) Western Blot-Papiere (siehe Tabelle 2.2) in der Größe des so verkleinerten SDS-PAGE-Gels zugeschnitten. Für die Durchführung des Western Blots wurde ein Blot-Transfer-Puffer eingesetzt, der sich wie in Tabelle 2.18 beschrieben, zusammensetzte.

Das Gel sowie die Nitrocellulosemembran und Western Blot-Papiere wurden mit dem so

hergestellten Blot-Transfer-Puffer getränkt. Im Anschluss wurde die Anordnung für den Western Blot wie folgt aufgebaut: Auf die Anode des Blotting-Geräts wurde eine Lage dickes Western Blot-Papier gelegt, welches wiederum mit zwei Lagen dünnem Western Blot-Papier bedeckt wurde. Nun wurde die Nitrocellulose-Membran aufgelegt, auf welcher das SDS-PAGE-Gel platziert wurde. Dieses wurde zunächst mit zwei Lagen dünnem Western Blot-Papier bedeckt, auf welche zuletzt eine Lage dickes Western Blot-Papier gelegt wurde. Zwischen dem Auflegen der einzelnen Schichten wurde vorsichtig mit einem Reagenzglas über die zuletzt aufgelegte Schicht gerollt, um etwaige Luftbläschen zu entfernen. Zum Schluss wurde die Kathode auf die Anordnung gesetzt. Im Anschluss wurde für 75 Min. geblottet, wobei für den Blotelutor B35 eine Stromdichte von 1,2 mA pro cm² Gel verwendet wurde. Bei Verwendung des Trans-Blot Turbo wurde für 57 Min. mit 200 mA geblottet.

Nach Abschluss des Western Blots wurde die Semi Dry Blot-Anordnung abgebaut und die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran durch Einlegen der Membran in 5 % Essigsäure-Ponceau S-Lösung überprüft, durch welche die Proteinbanden durch eine Rotfärbung visualisiert werden konnten. Die 5 % Essigsäure-Ponceau S-Lösung wurde im Anschluss mit ddH₂O abgewaschen.

Die Nitrocellulosemembran wurde daraufhin über Nacht bei 4 °C und 10 rpm auf einem Taumelschüttler in TBS + 3 % Milchpulver (w/v) (siehe Tabelle 2.7) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Nitrocellulosemembran einmalig in TBS mit je nach verwendetem Antikörper unterschiedlichem Detergenzzusatz (siehe Tabelle 2.19) für 15 Min. gewaschen. Es schlossen sich zwei 15 Min. dauernde Waschschrte in TBS an, zwischen denen das TBS gewechselt wurde. Diese sowie alle folgenden Waschschrte wurden auf dem Taumelschüttler bei Raumtemperatur und 10 rpm durchgeführt.

Nachfolgend wurde die Nitrocellulosemembran auf Höhe der 50 kDa-Bande in zwei Teile geteilt. Der Teil, auf welchem sich die Proteine mit den höheren Molekulargewichten und damit auch die DNA-Ligase-Banden befanden, wurde mit einem Primärantikörper gegen die jeweilige DNA-Ligase inkubiert. Derjenige Teil, auf welchem sich die Proteine mit den niedrigeren Molekulargewichten und damit auch die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Aktin befanden, wurde mit einem gegen die GAPDH bzw. Aktin gerichteten Primärantikörper inkubiert. Die Verdünnung der Antikörperlösungen sowie die Inkubations- und Waschbedingungen variierten je nach verwendetem Antikörper und sind Tabelle 2.19 zu entnehmen. Die Nitrocellulosemembranen wurden mit der jeweiligen so erhaltenen Primärantikörperlösung auf dem Taumelschüttler bei

Raumtemperatur und 10 rpm für 2 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Primärantikörperlösung entfernt und die Nitrocellulosemembranen nach dem oben beschriebenen Schema zunächst einmal mit Detergenzlösung (siehe Tabelle 2.19) und danach zweimal mit TBS gemäß oben beschriebenem Schema gewaschen.

Anschließend wurde die Sekundärantikörperlösung (siehe Tabelle 2.19) auf die Nitrocellulosemembranen gegeben. An die Sekundärantikörper war das Enzym Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase; HRP) gekoppelt, welches zur späteren Visualisierung der Proteinbanden diente. Die Nitrocellulosemembranen wurden entweder über Nacht bei 4 °C oder für 1,5 h bei Raumtemperatur mit der verdünnten Sekundärantikörperlösung inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde erneut ein Waschschrift mit Detergenzlösung (siehe Tabelle 2.19) sowie danach zwei Waschschriffe mit TBS gemäß des oben beschriebenen Schemas durchgeführt.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Nitrocellulosemembranen abgetropft. Ein vollständiges Austrocknen der Nitrocellulosemembranen wurde zu allen Zeitpunkten verhindert. Unmittelbar danach wurde ein zuvor vorbereitetes Detektionsreagenz aus dem Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent auf die Membran aufgetropft. Nach einer Inkubationszeit von 3 Min. bei Raumtemperatur wurde überschüssiges Detektionsreagenz abgetropft und die Membranteile dem Zustand vor der Zerteilung der Membran (s.o.) entsprechend auf einer Kunststofffolie angeordnet und luftblasenfrie mit einer zweiten transparenten Kunststofffolie bedeckt. Nach Auflegen eines Röntgenfilms auf die zweite transparente Kunststofffolie unter Lichtschutz wurde die Nitrocellulosemembran mit dem Röntgenfilm in einer Röntgenkassette inkubiert. Die Inkubationszeit wurde so gewählt, dass möglichst deutlich sichtbare Banden bei geringem Hintergrund erzeugt wurden. Im Anschluss wurden die Röntgenfilme mittels Scanner digitalisiert. Die Intensität der Röntgenfilmschwärzung erlaubte einen Rückschluss auf die Menge des interessierenden Proteins. GAPDH und Aktin dienten als Ladekontrolle, um die Auftragung gleicher Gesamtproteinmengen in die einzelnen Taschen des Gels zu überprüfen.

Tabelle 2.18: Zusammensetzung des Western Blot-Transfer-Puffers

10x Western Blot-Transfer-Puffer (siehe Tabelle 2.7)	10 ml
Methanol	10 ml
ddH ₂ O	80 ml

Die Bedingungen unter denen der Western Blot und die nachfolgende Proteindetektion durchgeführt wurden, wurden im Rahmen der Entstehung dieser Arbeit zur Optimierung mehrfach variiert. Das in Tabelle 2.19 angegebene Vorgehen entspricht dem letzten durchgeführten Protokoll.

Tabelle 2.19: Durchführung der Proteindetektion auf der Nitrocellulosemembran

anti-DNA Ligase 1 (rabbit, polyclonal)	Verwendung des Blotelutor B35. Primärantikörper 1 : 500 in 1x TBS verdünnt. 1. Waschschrift jeweils mit 1x TBS + 0,05 % Tween 20 (v/v). Sekundärantikörper 1 : 10000 in 1x TBS + 3 % (w/v) Milchpulver.
anti-DNA Ligase 3 (rabbit, polyclonal)	Verwendung des Blotelutor B35. Primärantikörper 1 : 500 verdünnt in 1x TBS. 1. Waschschrift jeweils mit 1x TBS + 0,05 % Tween 20 (v/v) + 0,2 % Triton x 100 (v/v). Sekundärantikörper 1 : 10000 verdünnt in 1x TBS + 3 % (w/v) Milchpulver.
anti-DNA Ligase 4 (mouse, monoclonal)	Verwendung des Trans-Blot Turbo. Primärantikörper 1 : 100 verdünnt in 1x TBS. 1. Waschschrift jeweils mit 1x TBS + 0,05 % Tween 20 (v/v). Sekundärantikörper 1 : 10000 verdünnt in 1x TBS + 1 % (w/v) Milchpulver.
anti-DNA Ligase 4 (rabbit, polyclonal)	Verwendung des Blotelutor B35. Primärantikörper 1 : 250 verdünnt in 1x TBS. 1. Waschschrift jeweils mit 1x TBS + 0,05 % Tween 20 (v/v). Sekundärantikörper 1 : 10000 verdünnt in 1x TBS + 1 % (w/v) Milchpulver.
anti-GAPDH (rabbit, monoclonal)	1 : 2500-Verdünnung in gleicher Lösung wie jeweiliger Ligase-Antikörper. Auch Waschschrte und Sekundärantikörperlösung entsprechend.
anti-Aktin (mouse, monoclonal)	1 : 2000-Verdünnung in gleicher Lösung wie jeweiliger Ligase-Antikörper. Auch Waschschrte und Sekundärantikörperlösung entsprechend.

2.2.14 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Durchführung des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Engvall & Perlmann, 1971; van Weemen & Schuurs, 1971) erfolgte im Rahmen dieser Arbeit zur Darstellung eines verringerten DNA-Ligase-Proteingehalts in den Zellen nach KO. Die

ELISAs wurden mittels kommerziell erhältlicher Kits (siehe Tabelle 2.11) nach den jeweiligen Herstellervorgaben durchgeführt.

Die ELISAs wurden mit Proteinisolaten (siehe 2.2.8) aus zuvor mittels FACS (siehe 2.2.11) angereicherten HEK293T-Zellen durchgeführt, welche BFP exprimierten und daher als erfolgreich transfiziert betrachtet wurden. Die Gesamtproteinkonzentration wurde dabei im Falle des Lig.1- und Lig.4-ELISA auf 60 µg/ml verdünnt. Im Falle des Lig.3-ELISA wurde auf eine Gesamtproteinkonzentration von 100 µg/ml verdünnt. Es wurden jeweils die gleichen Gesamtproteinkonzentrationen von Proben mit Transfektion des DNA-Ligase-KO-Plasmids und Vergleichsproben mit alleiniger Transfektion des Cas9-BFP-Plasmids ohne Transfektion des DNA-Ligase-KO-Plasmids verwendet, um eine Vergleichbarkeit zu erreichen. Die Quantifikation der DNA-Ligase-Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Standardgeraden, die anhand einer Verdünnungsreihe eines DNA-Ligase-Protein-Standards für jede einzelne Durchführung des ELISA neu generiert wurde

Die ELISAs wurden zum KO-Nachweis jeweils einmalig durchgeführt, sodass die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen anhand der dreifachen Messung eines Versuches errechnet wurden.

2.2.15 MMEJ-Assay

Das in der AG Stieger entwickelte MMEJ-Assay dient der Evaluation der Effizienz des „knock-in“ großer DNA-Sequenzen in den murinen RPGR-ORF15-Lokus im Rahmen des MMEJ-Reparaturmechanismus. Es basiert auf der HEK293^{mORF15}-Zelllinie, welche das murine RPGR-ORF15-Exon unter Kontrolle eines CMV-Promotors stabil im Genom integriert hat. Zur Durchführung des Assays werden die Plasmide px459-T7, gRNAh1-1 sowie ein Donorplasmid XX bp-MH-Luc in die Zellen transfiziert. Das XX bp-MH-Luc-Plasmid enthält eine Sequenz, die für eine Luziferase codiert, jedoch nicht unter der Kontrolle eines Promotors steht. Die Luziferasesequenz wird von je nach experimentellem Aufbau unterschiedlich langen DNA-Abschnitten flankiert (sog. Mikrohomologiearme bzw. MH-Arme), die homolog zu den DNA-Sequenzen an den Enden des RPGR-ORF15-Exons sind. Das px459-T7-Plasmid enthält die Sequenz für ein Cas9-Protein sowie für zwei gRNAs, die zusammen zur Induktion von DSBs an den Rändern der MH-Arme führen. Hierbei ist eine PAMin-Variante, bei der an den MH-Armen ein Überhang von 6 bp entsteht, von einer PAMout-Variante mit 17 bp-Überhang zu unterscheiden. Das gRNA h1-1-Plasmid enthält die Sequenz für zwei gRNAs, die zu

einer DSB-Induktion beidseits im Bereich des genomisch integrierten RPGR-ORF15-Exon führen. Nach Induktion der DSBs kommt es, wie in Abbildung 2.2 dargestellt, unter Vermittlung der MH-Arme im Rahmen des MMEJ-Reparaturmechanismus zu einer Integration der Luziferasesequenz in das Genom an Stelle des RPGR-ORF15-Exons. Die Luziferasesequenz gelangt dadurch unter die Kontrolle des CMV-Promotors und wird exprimiert. Eine höhere Effizienz der korrekten Integration der Luziferase-Sequenz in das Genom bedingt eine höhere Luziferaseaktivität in Proteinisolaten aus den Zellen. Die spätere Quantifikation der Luziferaseaktivität erlaubt daher einen Rückschluss darauf, wie effizient die Luziferasesequenz korrekt integriert wurde (Yanik et al., 2018).

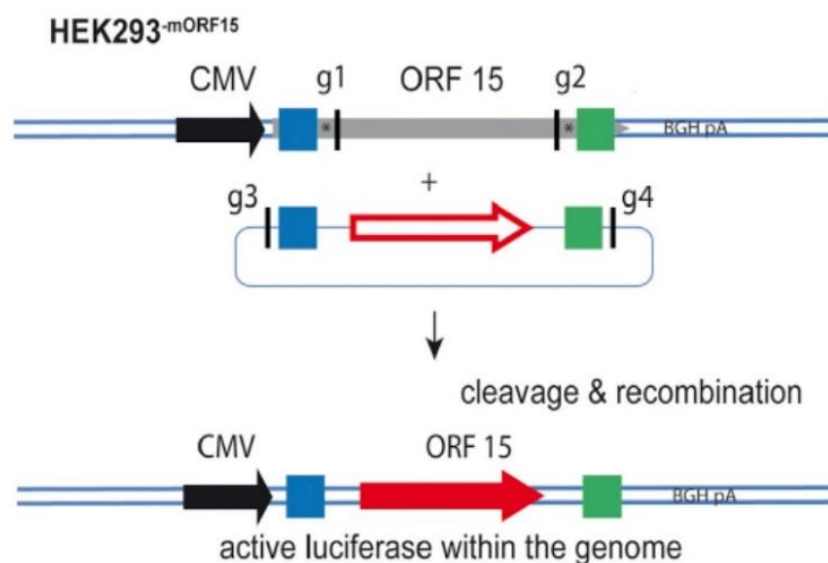


Abbildung 2.2: Prinzip des MMEJ-Assay. grüne und blaue Kästen: Mikrohomologiearme, roter Pfeil: Luziferasesequenz (leer: inaktiv, gefüllt: aktiv), CMV: CMV-Promotor, g1 und g2: Targetsequenzen für gRNAs des gRNA h1-1-Plasmids, g3 und g4: Targetsequenzen für gRNAs des px459-T7-Plasmids, ORF15: murines RPGR-ORF15-Exon. Abbildung verändert nach (Yanik et al., 2018) mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Dr. K. Stieger.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das MMEJ-Assay (Yanik et al., 2018) verwendet, um den Einfluss der verwendeten DNA-Ligase-KO-Strategie auf die MMEJ-vermittelte Integration der Luziferasesequenz in den murinen RPGR-ORF15-Lokus zu eruieren. Es wurde die PAMout-Variante der Donorplasmide genutzt. Verwendet wurden im Rahmen dieser Arbeit MH-Arme mit einer Länge von 10, 15 und 30 bp. Für jede dieser MH-Armlängen wurde eine Kotransfektion des Lig.1-, Lig.3- oder Lig.4-KO-Plasmides

durchgeführt. Die DNA-Ligasen wurden hierbei einzeln ausgeknockt. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte in relative luminescence units (RLU).

Zur Durchführung wurden HEK293^{mORF15}-Zellen auf eine 24 Well-Platte mit 150.000 Zellen pro Well ausgesät. Das Volumen an Medium betrug 700 µl pro Well.

Die Zellen wuchsen daraufhin für ca. 24 h im Brutschrank bis zu einer Konfluenz von ca. 50-70 % bevor die Transfektion gemäß Protokoll (siehe 2.2.6) nach dem in Tabelle 2.20 angegebenen Schema durchgeführt wurde.

Well 1 diente hierbei als Negativkontrolle, in welcher das gRNA h1-1-Plasmid nicht kotransfiziert wurde, sodass es zu keiner Doppelstrangbruchinduktion im Genom der Zelle und keiner Integration der Luziferasesequenz kommen sollte. Dementsprechend sollte es auch in diesem Well zu keiner Luziferaseexpression und somit zu keiner messbaren Luziferaseaktivität kommen. Well 14 stellte demgegenüber eine Positivkontrolle mit konstitutiver Luziferaseexpression durch Transfektion des RLuc8-Plasmides dar. Das RLuc8-Plasmid wurde nicht nach DNA-Menge, sondern nach Volumen der Plasmidlösung dosiert. Das TOPO-VEGF-Plasmid enthält keinen eukaryotischen Promotor und diente als „Füllvektor“. Seine Zugabe diente dazu, die DNA-Mengen zwischen den einzelnen Transfektionsansätzen konstant zu halten, um eine Beeinflussung der Transfektionseffizienz und somit auch der Luziferaseaktivität durch unterschiedliche DNA-Mengen auszuschließen.

Die Zellen wuchsen daraufhin ca. 72 h im Brutschrank, wobei täglich ein Medienwechsel durchgeführt wurde.

Nach Ablauf der 72 h-Periode wurden Gesamtproteinisolate der Zellen nach Protokoll (siehe 2.2.8) hergestellt.

Jeweils 60 µl des so erhaltenen proteinhaltigen Überstandes wurden umgehend in die Wells einer Platte für Lumineszenzmessungen pipettiert, sodass pro Well auf der 24 Well-Platte zwei Messungen durchgeführt werden konnten. Zuvor wurde Luziferasesubstrat mit Emissionsmaximum bei ca. 480 nm (Coelenterazin h) (siehe Tabelle 2.3) mit PBS 1:100 verdünnt und nach gründlicher Durchmischung mit dem Vortex für ca. 20 Min. bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert.

Die Quantifikation der Luziferaseaktivität in den Proteinisolaten erfolgte schließlich mittels eines Plateraders. Automatisiert wurden in jedes Well der Platte für Lumineszenzmessungen 100 µl des zuvor verdünnten Luziferasesubstrates injiziert. Die daraufhin durch die Luziferasetätigkeit emittierten Photonen wurden quantifiziert. Die Messungen wurden als Duplikate durchgeführt. Der Versuch wurde insgesamt viermal wiederholt.

Tabelle 2.20: Transfektionsschema für das MMEJ-Assay. Die Zahlen beziehen sich auf die Menge der zugegebenen Plasmid-DNA in ng. Für das RLuc8-Plasmid wurde demgegenüber das verwendete Volumen an Plasmidlösung in μl angegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
gRNA h1-1		1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
px 459-T7	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	
10 bp-MH-Luc	1000	1000	1000	1000	1000									
15 bp-MH-Luc						1000	1000	1000	1000					
30 bp-MH-Luc										1000	1000	1000	1000	
TOPO-VEGF	2000	1000				1000				1000				
Lig.1-KO			1000				1000				1000			
Lig.3-KO				1000				1000				1000		
Lig.4-KO					1000				1000				1000	
RLuc8														1

2.2.16 BRET-Reporter-Assay

Das in der AG Stieger entwickelte BRET-Reporter-Assay dient der Quantifikation der NHEJ-Aktivität in Zellen. Es können hierbei relative Veränderungen der NHEJ-Aktivität nach unterschiedlichen Behandlungen von Zellen, zum Beispiel wie im Rahmen dieser Arbeit geschehen, nach KO von DNA-Reparaturproteinen nachgewiesen werden (Wimmer et al., 2021). Das Assay beruht auf Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). BRET bezeichnet den strahlungslosen Energieübergang von einem lichtemittierenden Biomolekül (Donor) auf einen Akzeptor. Dieser wird dadurch angeregt und emittiert Licht einer größeren Wellenlänge. Die Effizienz dieses Energieübergangs ist u.a. abhängig von dem Grad der Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit der Anregungswellenlänge des Akzeptors (siehe Abbildung 2.3 A) sowie dem Abstand und der räumlichen Orientierung von Donor und Akzeptor (Xia & Rao, 2009; Wimmer et al., 2016). Im Falle des verwendeten BRET-Reporter-Assays handelt es sich bei dem Donor um eine Luziferase (RLuc8) (Loening et al., 2006) und bei dem Akzeptor um ein grün-fluoreszierendes Protein (GFP2). Die auf dem T11-Plasmid befindlichen und für die

RLuc8 und das GFP2 codierenden Sequenzen werden von einer Targetsequenz separiert (siehe Abbildung 2.3 B) und stehen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Dementsprechend wird ein Fusionsprotein aus RLuc8 und GFP2 exprimiert. Ein Energieübergang im Sinne von BRET ist dementsprechend möglich, sodass die Emission von Photonen mit Wellenlängen charakteristisch für die Luziferase und das GFP2 gemessen werden kann. Das Plasmid T3-3 trägt die Sequenz für Cas9 sowie eine gRNA, welche zusammen zu einer DSB-Induktion im Bereich der Targetsequenz des T11-Plasmids führen. Kommt es zu einer Reparatur der Targetsequenz durch NHEJ, so besteht die Möglichkeit einer Frameshiftmutation in der GFP2-Sequenz durch die Bildung von Indels. Diese führt zu einem Verlust der GFP2-Emission und damit zu einem Abfall des Quotienten aus GFP2- und RLuc8-Emission (BRET-Ratio). Eine niedrige BRET-Ratio entspricht dementsprechend einer hohen NHEJ-Aktivität, während eine hohe BRET-Ratio einer niedrigen NHEJ-Aktivität entspricht (Wimmer et al., 2021).

RLuc8 emittiert teilweise Photonen im Wellenlängenbereich der gemessenen GFP2-Emission von 510 bis 540 nm (siehe Abbildung 2.3 C) (Wimmer et al., 2016). Es wurde daher eine Kontrolle mit ausschließlicher Expression von RLuc8 mitgeführt, um eine Hintergrund-BRET-Ratio messen zu können. Im Falle eines erfolgreichen Energieübergangs von RLuc8 auf GFP2 sollte die BRET-Ratio von Zellen, die das T11-Plasmid erhalten hatten und somit zur Expression des Fusionsproteins aus RLuc8 und GFP2 fähig waren, signifikant höher liegen als die Hintergrund-BRET-Ratio der ausschließlich RLuc8-exprimierenden Zellen (Wimmer et al., 2021).

Das BRET-Reporter-Assay diene im Rahmen dieser Arbeit der Evaluation des Einflusses unserer DNA-Ligase-KO-Strategie auf die NHEJ-Aktivität in HEK 293T-Zellen.

Zur Durchführung des BRET-Reporter-Assays wurden HEK293T-Zellen ungezählt auf eine 6 Well-Platte ausgesät. Es wurden hierbei pro Well 0,5 ml Zellsuspension und 1,5 ml DMEM +++ verwendet.

Die Zellen wuchsen daraufhin für ca. 24 h im Brutschrank bevor die Transfektion gemäß Protokoll (siehe 2.2.6) durchgeführt wurde. Die DNA-Mengen wurden wie in Tabelle 2.21 angegeben gewählt. Die Menge der RLuc8-Plasmidlösung wurde anhand des Volumens dosiert.

Nach erfolgter Transfektion wuchsen die Zellen für ca. 24 h, bevor eine Proteinisolation (siehe 2.2.8) durchgeführt wurde. Jeweils 20 µl des so erhaltenen Proteinisolats wurden umgehend in die Wells einer Platte für Lumineszenzmessungen pipettiert. Im Platerreader wurden automatisiert jeweils 100 µl eines 20 Min. zuvor 1:100 mit PBS verdünnten und

im daraufhin im Dunklen inkubierten Luziferasesubstrats mit Emissionsmaximum bei ca. 400 nm (Coelenterazin 400a) (siehe Tabelle 2.3) in die Wells injiziert und die Lichtemission im Wellenlängenbereich 370 bis 450 nm und 610 bis 700 nm für die von der Luziferase emittierten Photonen und 510 bis 540 nm für die vom GFP2 emittierten Photonen gemessen.

Die BRET-Ratio wurde gemäß folgender Formel berechnet, wobei die Angabe der einheitenlosen BRET-Ratio in milli BRET Units (mBU) erfolgt:

$$\text{BRET Ratio} = \frac{\text{Emission}_{510 - 540 \text{ nm}}}{\text{Emission}_{370 - 450 \text{ nm und } 610 - 700 \text{ nm}}}$$

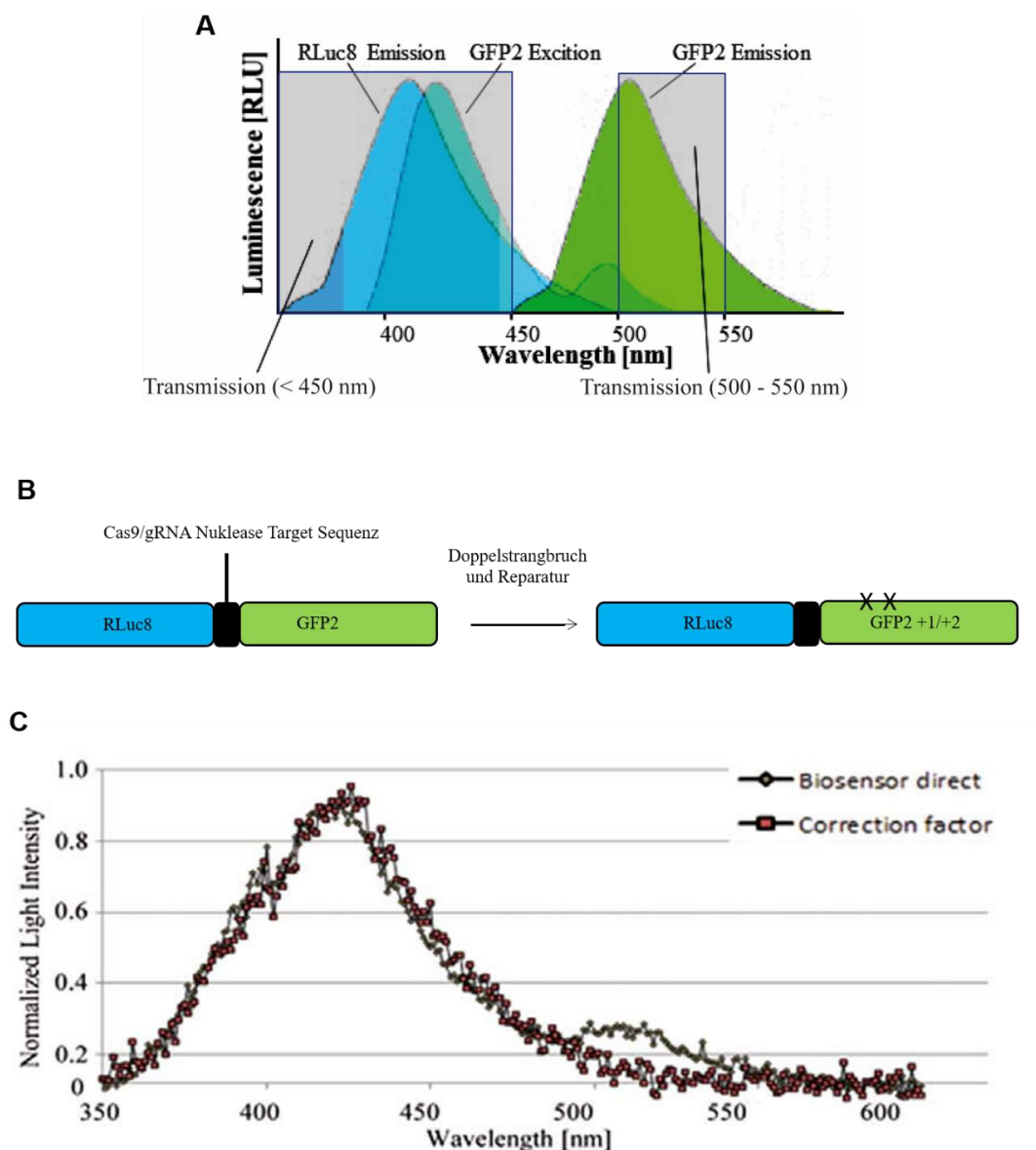


Abbildung 2.3: Prinzip des BRET-Reporter-Assay. A: Spektrale Verteilung der RLuc8- und GFP2-Emission. Gut sichtbar ist die Überlappung des RLuc8-Emissionsspektrums

mit dem GFP2-Exzitationsspektrum. Abbildung verändert nach (Wimmer et al., 2016) mit freundlicher Genehmigung von Elsevier. B: Aufbau des Konstruktes aus RLuc8- und GFP2-Sequenz auf dem T11-Plasmid. Nach DSB-Induktion im Bereich der Target-Sequenz (schwarz) ist eine Reparatur via NHEJ mit Indelbildung und Frameshiftmutation möglich. Die schwarzen Kreuze symbolisieren neuentstandene Stopp-Codons nach Frameshiftmutation. Abbildung bereitgestellt durch Dr. T. Wimmer. C: Spektraler Scan einer auf BRET basierenden VEGF-Sensor-Variante (grüne Quadrate) mit RLuc8 und GFP2 im Vergleich zum dazugehörigen „Correction factor“ (rote Rechtecke), in welchem die GFP2-Sequenz deletiert wurde. Es zeigt sich eine geringe Lichtemission von RLuc8 im Wellenlängenbereich der gemessenen GFP2-Emission von 510 bis 540 nm, welche für die Berechnung einer Hintergrund-BRET-Ratio von RLuc8 verwendet werden konnte. Abbildung entnommen aus (Wimmer et al., 2016) mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Tabelle 2.21: Transfektionsschema für das BRET-Reporter-Assay. Die Zahlen beziehen sich auf die Menge der zugegebenen Plasmid-DNA in ng. Für das RLuc8-Plasmid wurde demgegenüber das verwendete Volumen an Plasmidlösung in µl angegeben.

	1	2	3	4	5	6
T11	2500	2500	2500	2500	2500	
T3-3		5000	5000	5000	5000	
Lig.1-KO			5000			
Lig.3-KO				5000		
Lig.4-KO					5000	
RLuc8						1

2.2.17 MTT-Assay

Um mögliche negative Effekte der CRISPR-Cas9-vermittelten DNA-Ligase-KOs auf die Viabilität von HEK293T-Zellen festzustellen, wurde ein MTT-Assay (Mosmann, 1983) durchgeführt. Das MTT-Assay ist ein oft verwendetes Zellviabilitäts-Assay und basiert auf der Reduktion des wasserlöslichen, gelben Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu violetter Formazan durch die Tätigkeit verschiedener Enzyme des Zellstoffwechsels (Stepanenko & Dmitrenko, 2015). Es wurde ein MTT-Assay-Kit von Cayman Chemical gemäß modifiziertem Herstellerprotokoll verwendet, wobei die Volumina der MTT-Lösung und der Lysereagenz an das 24 Well-Format angepasst wurden.

Zunächst wurden HEK293T-Zellen auf eine 24 Well-Platte mit 150.000 Zellen pro Well ausgesät. Das Volumen an Medium betrug dabei 700 µl pro Well. Die Zellen wuchsen daraufhin für ca. 24 h im Brutschrank bis zu einer Konfluenz von ca. 50-70 %. Die Transfektion wurde nach Protokoll durchgeführt (siehe 2.2.6). Jeweils Dreiergruppen von Wells der 24 Well-Platte erhielten die gleiche Behandlung gemäß des in Tabelle 2.22 angegebenen Schemas.

In die Wells D4-D6 wurden keine Zellen ausgesät. Sie dienten als Mediumkontrolle.

Ca. 24 h nach der Behandlung der Zellen wurde das MTT-Assay eingeleitet indem dem Medium 46 µl einer zuvor gemäß Herstellerangaben hergestellten MTT-Lösung zugegeben wurden. Die Zellen wurden daraufhin für 4 h im Brutschrank inkubiert, sodass das MTT durch den Stoffwechsel der Zellen zu Formazan umgesetzt werden konnte. Im Anschluss wurde die Lyse der Zellen durch Zugabe von 460 µl Lyse-Reagenz aus dem MTT-Assay-Kit für ca. 18 h im Brutschrank durchgeführt. Die 24 Well-Platte wurde bei allen Schritten nach Zugabe der MTT-Lösung vor Licht geschützt.

Nach Lyse der Zellen wurde mittels Platerreader die dimensionslose optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 570 nm an jeweils 24 gleichmäßig über die Wells verteilt liegenden Stellen als Maß für die Konzentration des durch die Stoffwechselaktivität der Zellen aus MTT gebildeten Formazan gemessen. Das arithmetische Mittel aus den 24 Messungen pro Well wurde berechnet.

Tabelle 2.22: Behandlung der Wells für das MTT-Assay. Für die 150 mM NaCl-Lösung, die PEI-Lösung und das Ethanol sind die verwendeten Volumina in µl angegeben. Für die transfizierten Plasmide sind die Mengen an Plasmid-DNA in ng angegeben.

	A1-A3	A4-A6	B1-B3	B4-B6	C1-C3	C4-C6	D1-D3
150 mM NaCl-Lösung		30	30	30	30	30	
PEI-Lösung		40	40	40	40	40	
Cas9-BFP			1000	1000	1000	1000	
Lig.1-KO				1000			
Lig.3-KO					1000		
Lig.4-KO						1000	
Ethanol							60

2.2.18 Statistische Auswertung

Die Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, in Triplikaten gemessen. Falls nicht anders angegeben beruhte die Ermittlung der Mittelwerte und Standard-

abweichungen auf 3 unabhängigen Experimenten. Als Software für die statistische Analyse wurde SigmaPlot verwendet. Die statistische Analyse erfolgte beim Vergleich von 2 unabhängigen Gruppen mittels t-Test. Der Vergleich von mehr als 2 Gruppen wurde mittels ANOVA durchgeführt. War von einer Verbundenheit der Stichproben innerhalb der einzelnen Versuchsdurchführungen mit Einfluss auf die abhängige Variable auszugehen, wie dies für das MMEJ-Assay und den MTT-Test anzunehmen war, so erfolgte die statistische Analyse wie von Lew vorgeschlagen mittels Randomized Block- bzw. Repeated Measures-ANOVA (Lew, 2007). Konnte von keiner Verbundenheit der Stichproben innerhalb der einzelnen Versuchsdurchführung mit Einfluss auf die abhängige Variable ausgegangen werden, wie dies für das BRET-Reporter-Assay anzunehmen war, so wurde die statistische Auswertung mittels One Way-ANOVA durchgeführt. Als Post hoc-Test wurde im Anschluss bei Vergleich mehrerer Behandlungsgruppen mit einer Kontrollgruppe die Dunnett-Methode verwendet. Der Vergleich aller Gruppen miteinander erfolgte mittels Student-Newman-Keuls-Test. Sowohl t-Test als auch ANOVA waren sowohl der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung der Residuen als auch ein Test auf Gleichheit der Varianzen vorangestellt. Musste die Normalverteilungshypothese abgelehnt werden, so wurden nicht-parametrische Tests angewandt. Als statistisch signifikant galten p-Werte $< 0,05$.

3 Ergebnisse

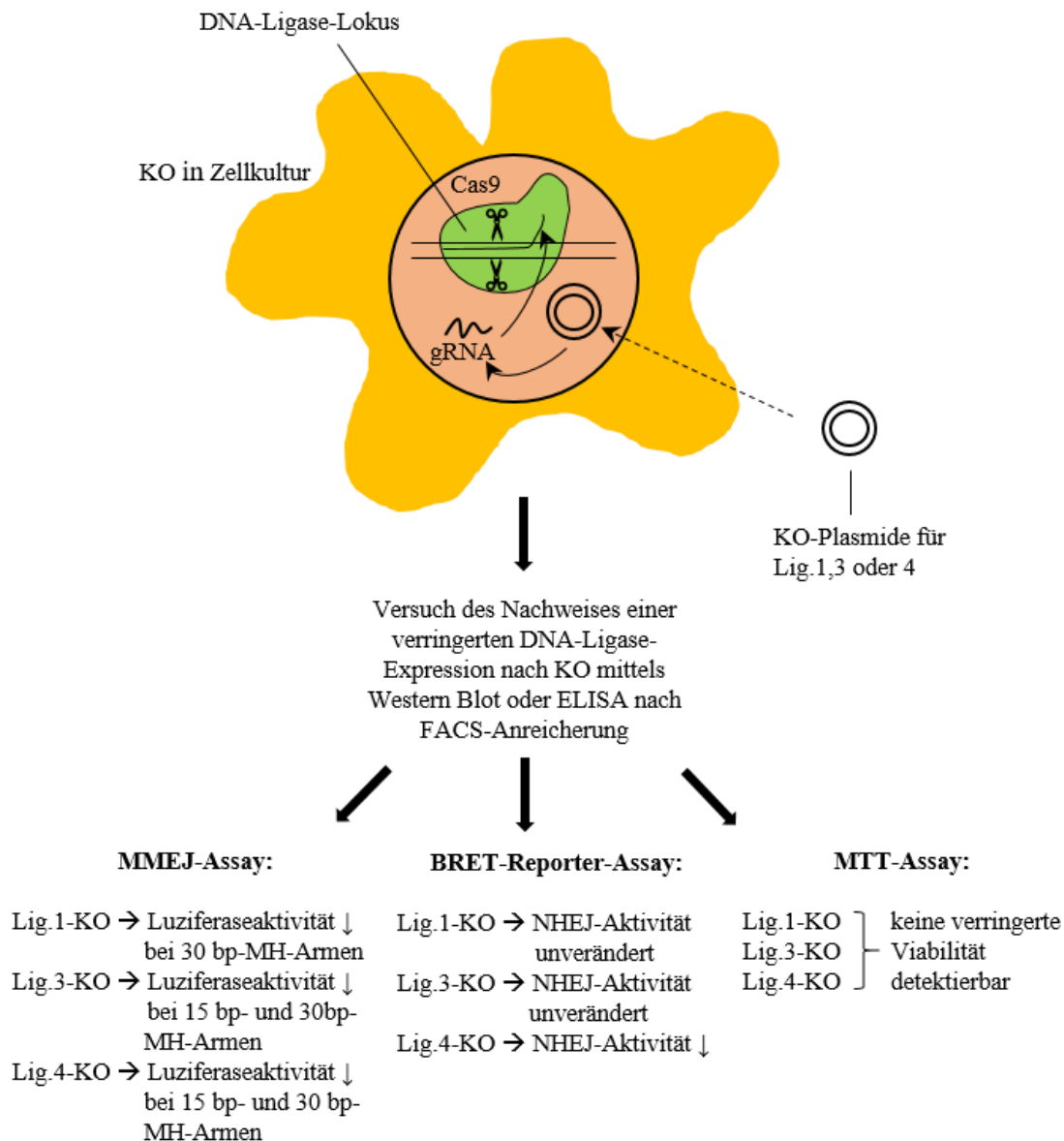


Abbildung 3.1: Graphische Zusammenfassung der in dieser Arbeit durchgeführten Arbeitsschritte mit Ergebnissen

3.1 Expressionsanalyse der DNA-Ligasen

Zunächst wurden Western Blots mit dem Ziel durchgeführt, einen verringerten Gehalt an DNA-Ligase-Protein in HEK 293T-Zellen nach Kotransfektion des Cas9-BFP- und eines DNA-Ligase-KO-Plasmides im Vergleich zur alleinigen Transfektion des Cas9-BFP-Plasmides nachzuweisen. Hierdurch sollte eine verringerte Expression an DNA-Ligase-Protein nach durchgeführtem KO nachgewiesen werden. Exemplarisch sind in Abbildung 3.2 HEK 293T-Zellen mit und ohne Transfektion des Cas9-BFP-Plasmids

dargestellt. Mit dem Cas9-BFP-Plasmid transfizierte Zellen wiesen in der Fluoreszenzmikroskopie 24 h nach Transfektion ein blaues Leuchten auf. Zellen, welche kein Cas9-BFP-Plasmid erhalten hatten, leuchteten nicht. Es kann dementsprechend von einem Funktionieren der hier verwendeten PEI-basierten Transfektionsstrategie ausgegangen werden, wobei die Transfektionseffizienz als eher niedrig einzuschätzen war.

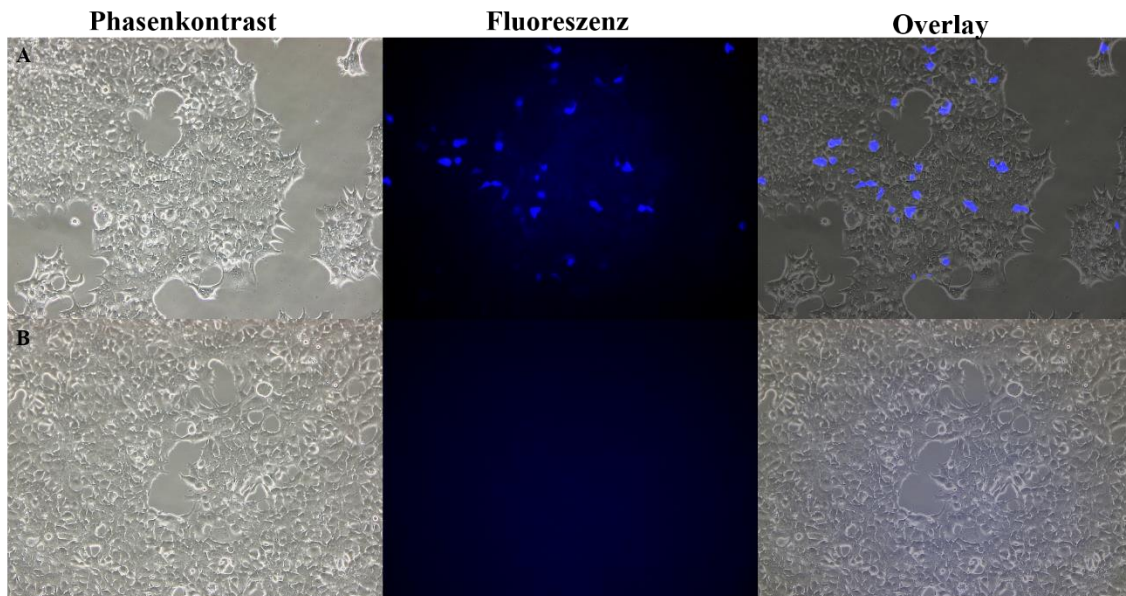


Abbildung 3.2: Fluoreszenzmikroskopie. (A) Cas-BFP-Plasmid transfizierte Zellen. (B) Negativkontrolle, in welcher die HEK 293T-Zellen nicht mit dem Cas9-BFP-Plasmid transfiziert wurden.

Vor der Durchführung der Western Blots zum Nachweis der verringerten DNA-Ligase-Protein-Expression nach KO, wurden Verdünnungsreihen mit Gesamtproteinisolaten aus nicht-transfigierten HEK 293T-Zellen durchgeführt. Dies diente der Optimierung der Western Blot-Bedingungen. Im Speziellen sollten hiermit aufzutragende Proteinmengen bestimmt werden, welche unterhalb der Sättigungsbereiche der verwendeten Antikörper lagen, was die Detektion von Veränderungen im DNA-Ligase-Protein-Gehalt nach durchgeführtem KO ermöglichen sollte.

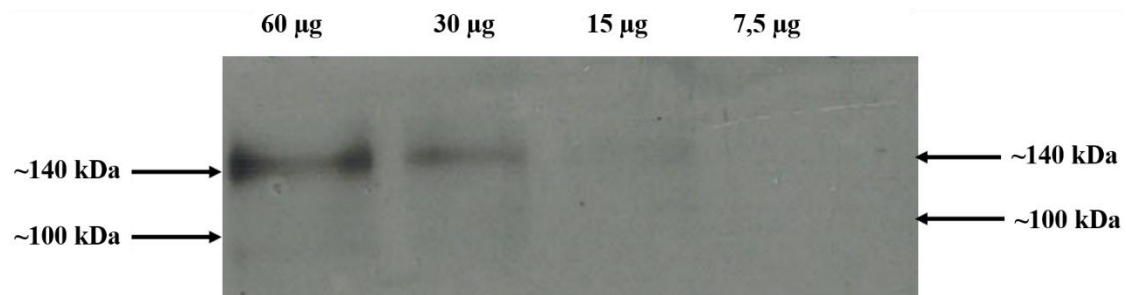


Abbildung 3.3: Verdünnungsreihe mit Gesamtproteinisolat aus nicht-transfizierten HEK 293T-Zellen. Es wurde ein anti-Lig.1-Antikörper verwendet. Die Zahlen in der oberen Reihe geben die in der vorangegangenen SDS-PAGE auf die einzelnen Taschen aufgetragenen Mengen an Gesamtproteinisolat an.

Die Ergebnisse der für die Optimierung des Lig.1-Western Blots durchgeführten Verdünnungsreihen sind in der Abbildung 3.3 dargestellt. Es konnte bei Verwendung eines anti-Lig.1-Antikörpers eine Proteinbande bei ca. 140 kDa dargestellt werden, welche somit in der Nähe eines erwarteten, scheinbaren Molekulargewichtes von 125 kDa (Barnes et al., 1990) lag. Eine gut sichtbare Abnahme der Intensität der Banden war bei Vergleich der Auftragung von 60 µg gegenüber 30 µg Gesamtproteinisolat zu erkennen, sodass unter den hier verwendeten Western Blot-Bedingungen und Antikörperkonzentrationen zwischen 60 µg und 30 µg Gesamtproteinmenge von einem Unterschreiten des Sättigungsbereiches des anti-Lig.1-Antikörpers ausgegangen werden konnte.

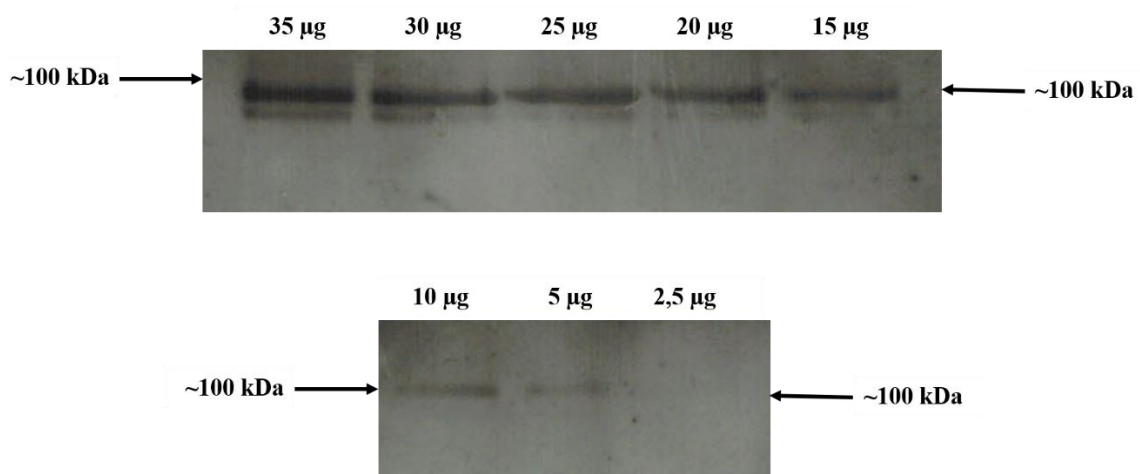


Abbildung 3.4: Verdünnungsreihe mit Gesamtproteinisolat aus nicht-transfizierten HEK 293T-Zellen. Es wurde ein anti-Lig.3-Antikörper verwendet. Die Zahlen über den Fotos der Western Blots geben die in der vorangegangenen SDS-PAGE auf die einzelnen Taschen aufgetragenen Mengen an Gesamtproteinisolat an.

Zwei Verdünnungsreihen zur Optimierung des Lig.3-Western Blots sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Bei Verwendung des anti-Lig.3-Antikörpers konnte für Gesamtproteinmengen zwischen 35 μ g und 15 μ g eine Doppelbande visualisiert werden, deren oberer Teil im Bereich von ca. 100 kDa lag. Unterhalb von 10 μ g Gesamtprotein war nur noch eine einzelne Bande im Bereich von ca. 100 kDa sichtbar. Das zu erwartende Molekulargewicht der ubiquitär exprimierten Lig.3- α liegt bei 103 kDa, dasjenige der in männlichen Keimzellen exprimierten Lig.3- β bei 96 kDa (Mackey et al., 1997). Das hier beobachtete Molekulargewicht ist daher mit der Lig.3- α -Variante vereinbar. Unterhalb von 35 μ g aufgetragener Gesamtproteinmenge trat eine Reduktion der Proteinbandenintensität bei weiterer Verdünnung auf, die unterhalb von 15 μ g Gesamtproteinmenge besonders deutlich wurde, sodass hier von einer Unterschreitung des Sättigungsbereiches des anti-Lig.3-Antikörpers auszugehen war.

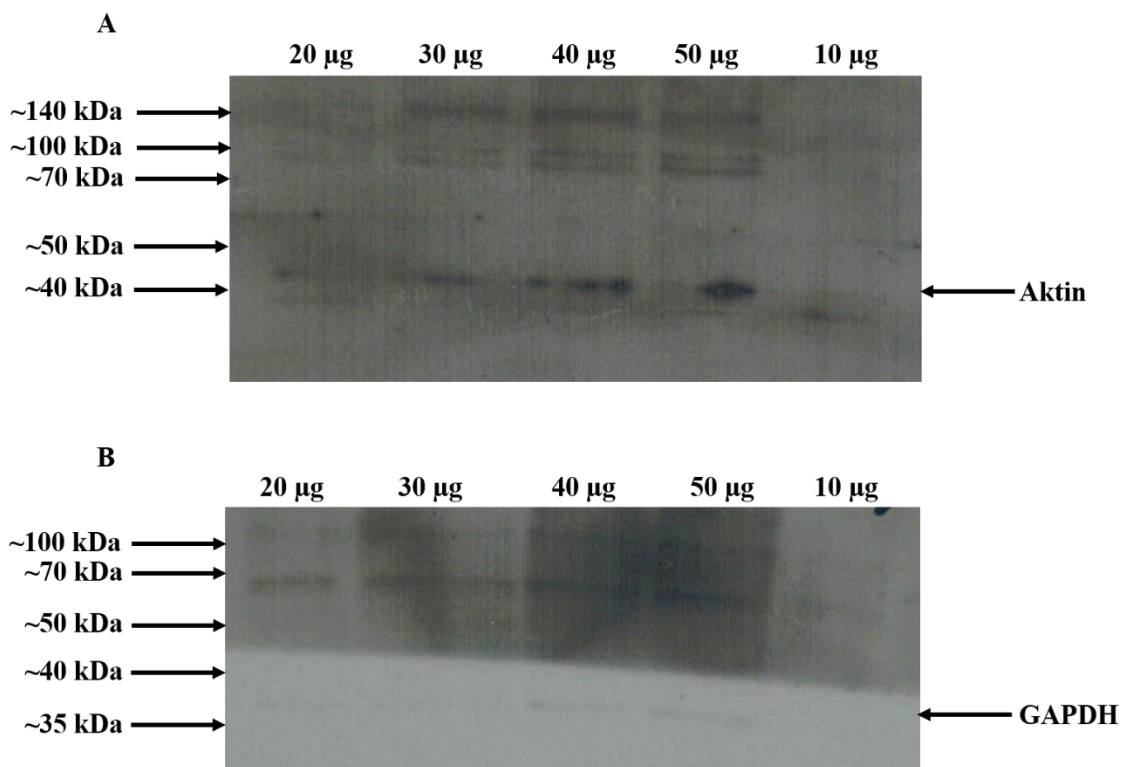


Abbildung 3.5: Verdünnungsreihe mit Gesamtproteinisolat aus nicht-transfizierten HEK 293T-Zellen unter Verwendung von anti-Lig.4-Antikörpern. (A) Es wurde ein mouse, monoclonal anti-Lig.4-Antikörper verwendet. Die Ladekontrolle Aktin wurde mit einem anti-Aktin-Antikörper detektiert. (B) Es wurde ein rabbit, polyclonal anti-Lig.4-Antikörper verwendet. Die Ladekontrolle GAPDH wurde mit einem anti-GAPDH-Antikörper detektiert.

Für den Lig.4-Western Blot konnten trotz der Erprobung von zwei verschiedenen gegen die Lig.4 gerichteten Antikörper und der systematischen Variation der Western Blot-Bedingungen keine eindeutigen, im zu erwartenden Bereich von ca. 96 kDa (Wei et al., 1995) gelegenen Proteinbanden identifiziert werden. In Abbildung 3.5 sind zwei Verdünnungsreihen mit Gesamtproteinisolaten unter Verwendung der zwei Lig.4-Antikörper dargestellt, die als Versuch einer Optimierung des Lig.4-Western Blots angefertigt worden waren. Die Durchführung der Ladekontrolle erfolgte einmal mit einem mouse- und einmal mit einem rabbit-Antikörper, um die Bindungsfähigkeit der sekundären Antikörper überprüfen zu können.

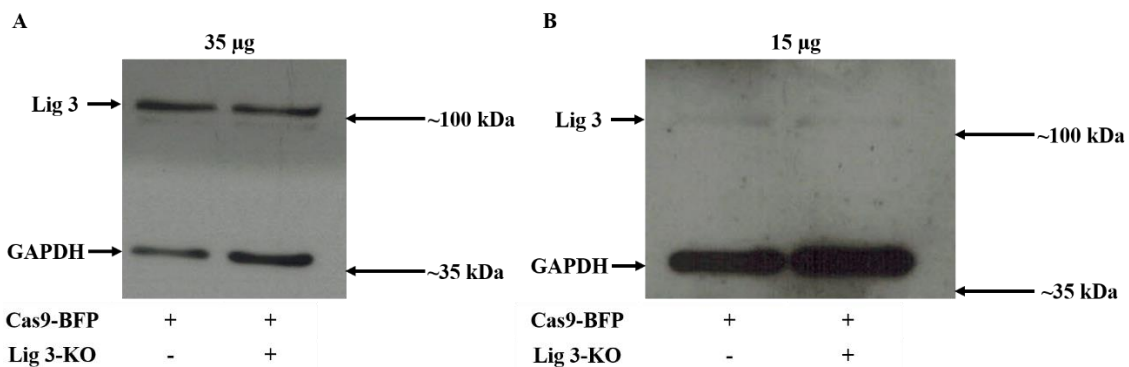


Abbildung 3.6: Zwei exemplarisch dargestellte Western Blots zum Nachweis von Veränderungen des Lig.3-Proteingehalts in HEK 293T-Zellen. Die Zahlen über den Fotos der Western Blots geben die aufgetragenen Mengen an Gesamtprotein an. (A) Western Blot mit Protein aus einmalig transfizierten Zellen. (B) Western Blot mit Protein aus Zellen, die jeweils einmal pro Tag an drei aufeinander folgenden Tagen transfiziert worden waren. Unterhalb der Fotos sind die Plasmide angegeben, die transfiziert wurden: Ein „+“ bedeutet dabei die Zugabe und ein „-“ das Weglassen des entsprechenden Plasmides im Transfektionsansatz. „Cas9-BFP“ und „Lig.3-KO“ bezeichnen das entsprechende Cas9-BFP- und Lig.3-KO-Plasmid. Lig.3: Bande des Lig.3-Proteins, GAPDH: Bande der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

Im Laufe der experimentellen Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation konnte der Lig.3-Western Blot soweit optimiert werden, dass der Versuch des Nachweises einer verringerten Lig.3-Protein-Expression nach Anwendung der Lig.3-KO-Strategie unternommen wurde. Verglichen wurden dabei Gesamtproteinisolate aus HEK 293T-Zellen, die ausschließlich mit dem Cas9-BFP-Plasmid transfiziert und solchen, die

zusätzlich mit dem Lig.3-KO-Plasmid kotransfiziert worden waren. Der Nachweis gleicher aufgetragener Gesamtproteinmengen wurde mittels der Visualisierung der GAPDH-Bande als Ladekontrolle erbracht. In Abbildung 3.6 sind exemplarisch zwei der so erstellten Lig.3-Western Blots dargestellt. Das Gesamtproteinisolat für den in Abbildung 3.6 A dargestellten Western Blot stammte aus Zellen, die nur einmal transfiziert worden waren. Das Gesamtproteinisolat für den in Abbildung 3.6 B gezeigten Western Blot stammte aus Zellen, die jeweils an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt transfiziert worden waren, mit dem Ziel die Transfektionseffizienz zu steigern. Ein verringerter Lig.3-Proteingehalt der Zellen nach KO konnte in den beiden dargestellten Versuchen nicht gezeigt werden. Insgesamt konnte der Nachweis eines verringerten Lig.3-Proteingehalts nach KO in dieser Arbeit durch Western Blots nicht eindeutig und über die Gesamtheit der Versuche konsistent erbracht werden.

Aufgrund der oben beschriebenen Probleme beim Nachweis von Veränderungen der DNA-Ligase-Proteinmenge im Western Blot wurde eine alternative Strategie mit Quantifikation der DNA-Ligase-Protein-Menge mittels ELISA nach vorangehender FACS-Anreicherung von BFP-exprimierenden und somit als erfolgreich transfiziert betrachteten Zellen gewählt.

Die FACS-Anreicherung und das ELISA wurden nur einmalig durchgeführt, sodass sowohl die angegebenen Standardabweichungen als auch die Durchführung des t-Tests auf der Messung eines einzelnen Versuches als Triplikat beruhen.

Zu beachten ist, dass es sich lediglich um eine FACS-Anreicherung von BFP-positiven Zellen handelte, die primär der Gewinnung von Zellen für die spätere Proteinisolation mit nachfolgendem ELISA diente. Die hier angegebenen Anteile an Zellen, die als BFP-positiv und daher als erfolgreich transfiziert angesehen wurden, stammen aus der Vormessung einer Stichprobe von Zellen.

Die für das Sorting verwendeten Gates wurden für alle gesorteten Proben gleich gewählt. Die verwendeten Gates für die FACS-Anreicherung von Zellen, die ausschließlich mit dem Cas9-BFP-Plasmid transfiziert worden waren sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Als BFP-positiv und somit erfolgreich transfiziert betrachtet wurde in der betrachteten Stichprobe von $3,7 \times 10^4$ HEK 293T-Zellen ein Anteil von 7 %. Die Gesamtzahl der als BFP-positiv und somit erfolgreich transfiziert angereicherten Zellen betrug nach Beendigung der Anreicherung $5,0 \times 10^5$. Aus diesen BFP-angereicherten Zellen wurde ein Proteinisolat mit einer Proteinkonzentration von 233 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt.

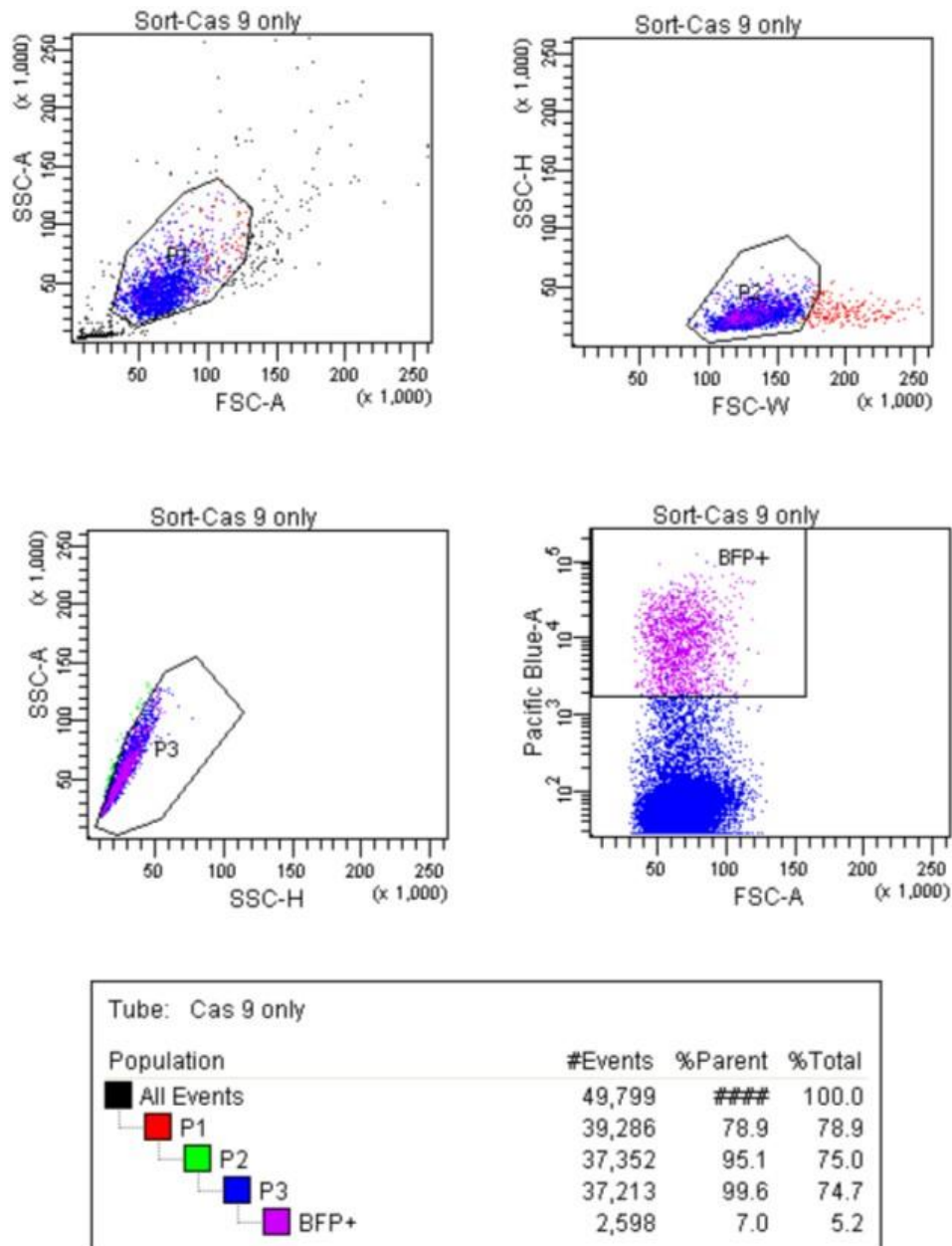


Abbildung 3.7: Darstellung der verwendeten Gates für die FACS-Anreicherung von Zellen, die nur mit dem Cas9-BFP-Plasmid transfiziert worden waren.

Abbildung 3.8 stellt die verwendeten Gates und die Ergebnisse der stichprobenartigen FACS-Analyse von $3,9 \times 10^4$ HEK 293T-Zellen dar, die mit dem Cas9-BFP- und dem Lig.1-KO-Plasmid kotransfiziert worden waren. Der Anteil an Zellen in dieser Stichprobe, die als BFP-positiv angesehen wurden und somit für die Anreicherung vorgesehen waren, betrug 1,4 %. Nach Beendigung der FACS-Anreicherung von mit dem Cas9-BFP- und Lig.1-KO-Plasmid transfizierten Zellen betrug die Gesamtzahl der angereicherten Zellen $1,4 \times 10^5$. Die Proteinkonzentration in dem aus diesen BFP-angereicherten Zellen hergestellten Proteinisolat betrug 217 $\mu\text{g/ml}$.

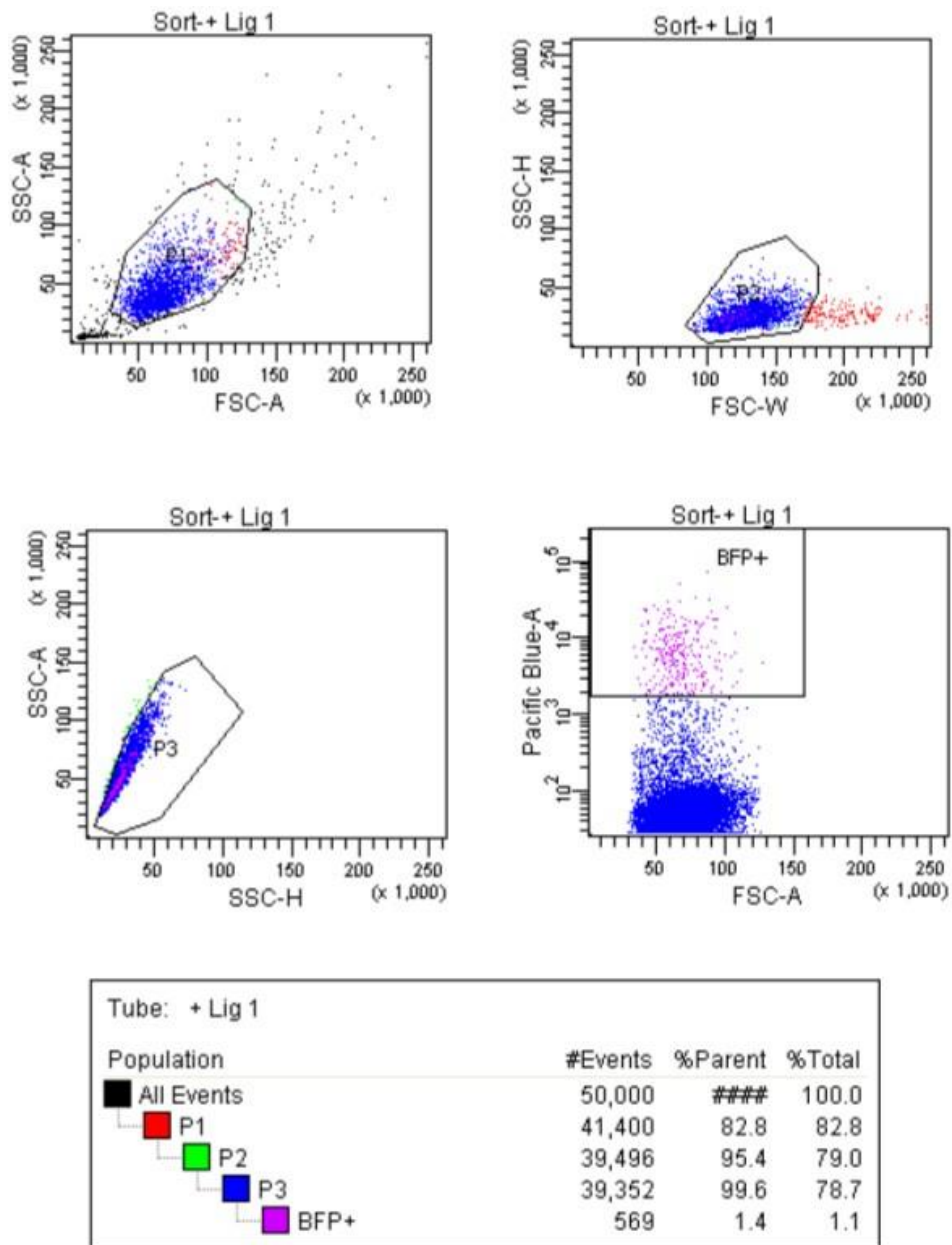


Abbildung 3.8: Darstellung der verwendeten Gates für die FACS-Anreicherung von Zellen, die mit dem Cas9-BFP- und dem Lig.1-KO-Plasmid kotransfiziert worden waren.

In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse der FACS-Analyse einer Stichprobe von $3,9 \times 10^4$ HEK 293 T-Zellen dargestellt, die mit dem Cas9-BFP- und zusätzlich mit dem Lig.3-KO-Plasmid transfiziert worden waren. 3 % der Zellen wurden hierbei als BFP-positiv und damit erfolgreich transfiziert eingeordnet. Nach Abschluss der FACS-Anreicherung waren in dieser Gruppe $2,1 \times 10^5$ HEK 293T-Zellen angereichert worden. In dem aus diesen BFP-angereicherten Zellen hergestellten Proteinisolat wurde eine Proteinkonzentration von 224 $\mu\text{g/ml}$ gemessen.

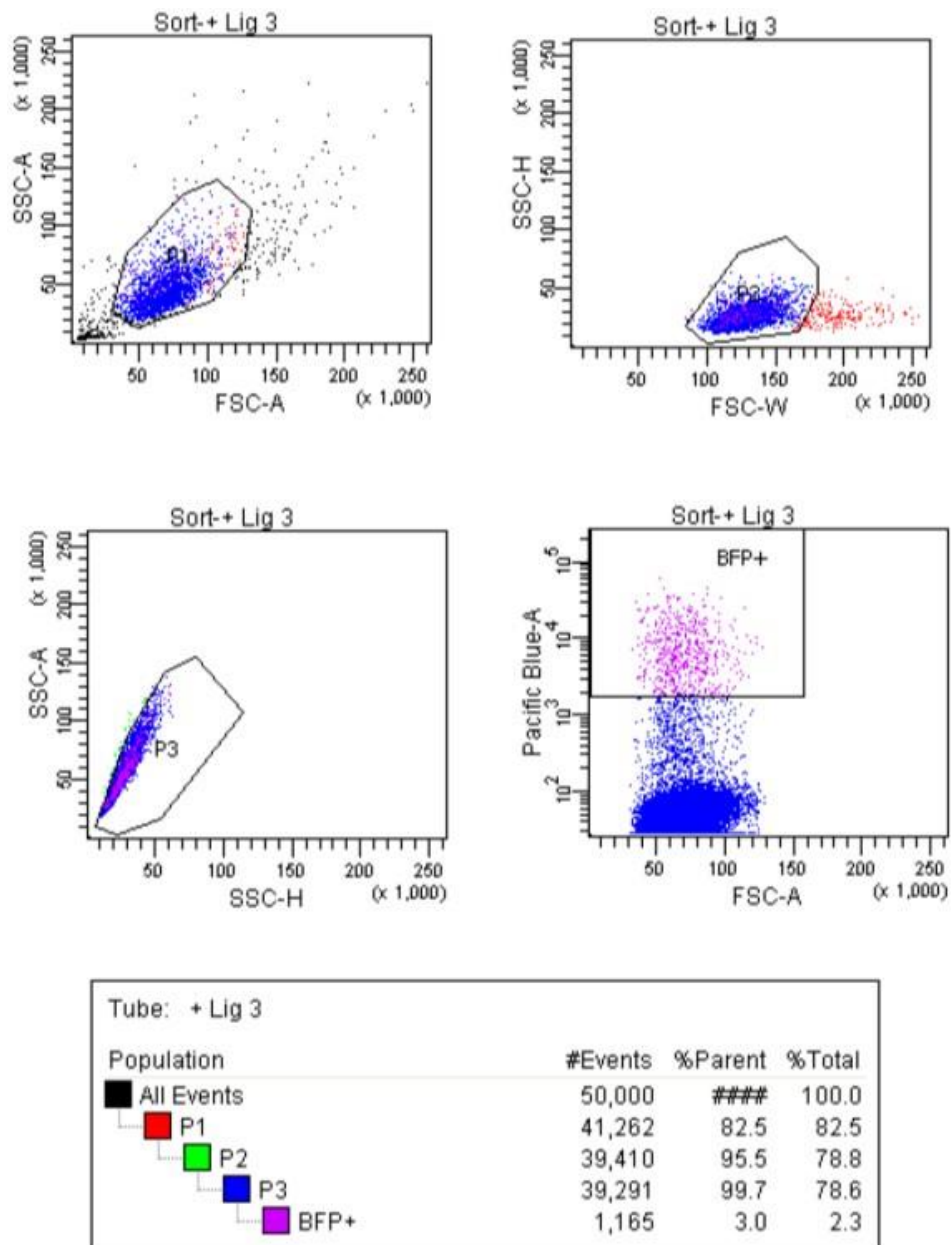


Abbildung 3.9: Darstellung der verwendeten Gates für die FACS-Anreicherung von Zellen, die mit dem Cas9-BFP- und dem Lig.3-KO-Plasmid kotransfiziert worden waren.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse einer Stichprobe von $4,0 \times 10^4$ HEK 293T-Zellen, die mit dem Cas9-BFP- und dem Lig.4-KO-Plasmid kotransfiziert worden waren, sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Der Anteil an Zellen, die als BFP-positiv und damit erfolgreich transfiziert eingestuft wurden, lag hier bei 3,3 %. Am Ende der FACS-Anreicherung waren $2,1 \times 10^5$ Zellen in dieser Gruppe angereichert worden. Das aus diesen BFP-angereicherten Zellen gewonnene Proteinisolat wies eine Proteinkonzentration von 205 $\mu\text{g/ml}$ auf.

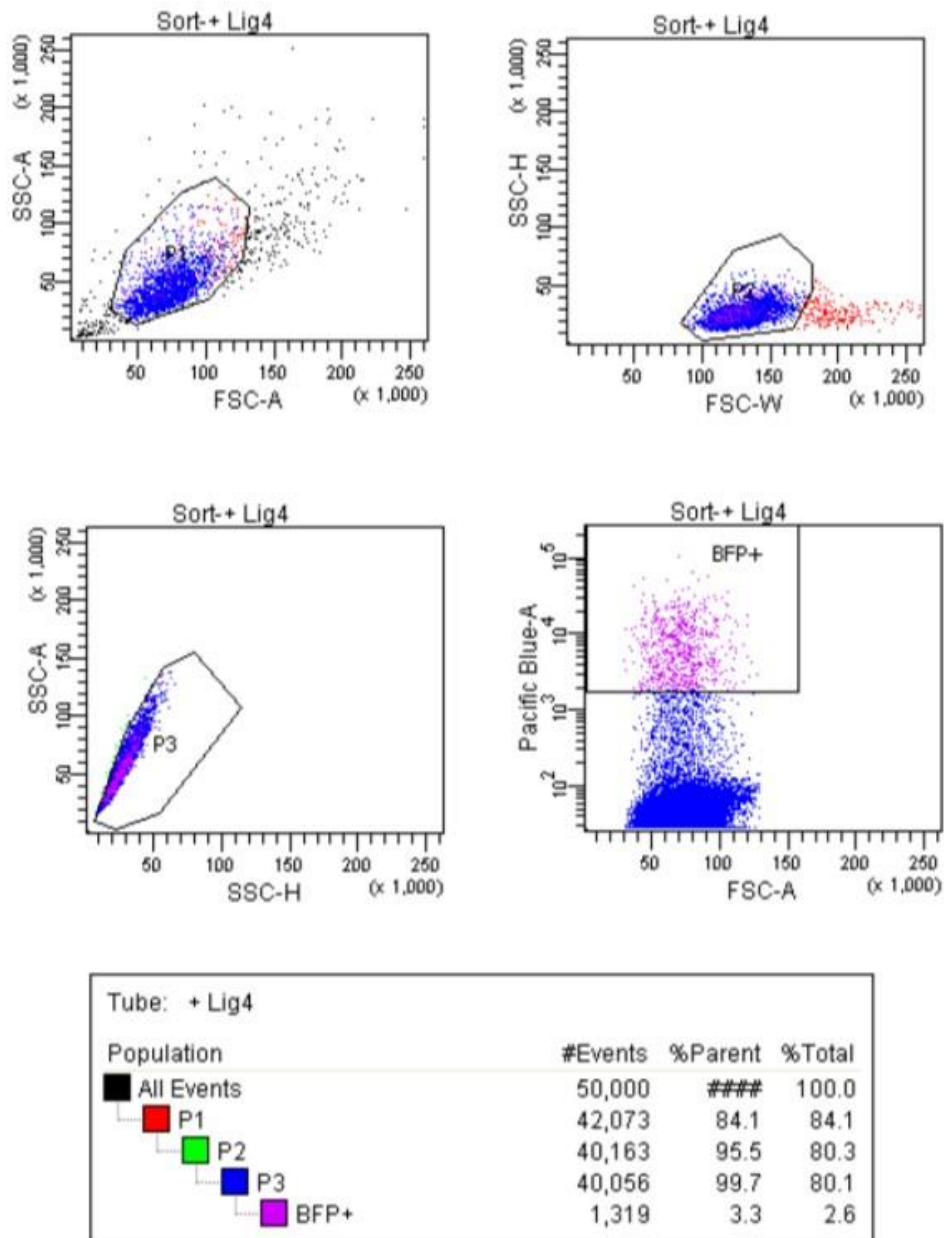


Abbildung 3.10: Darstellung der verwendeten Gates für die FACS-Anreicherung von Zellen, die mit dem Cas9-BFP- und dem Lig.4-KO -Plasmid kotransfiziert worden waren.

Das nachfolgende ELISA wurde mit den so gewonnenen und auf vergleichbare Gesamtproteinkonzentrationen verdünnten Proteinisolaten durchgeführt, sodass die Gesamtproteinkonzentration in den Wells der ELISA-Platte für Proteinisolate aus BFP-angereicherten Zellen, die nur mit dem Cas9-BFP-Plasmid transfiziert worden waren, und BFP-angereicherten Zellen, die zusätzlich ein DNA-Ligase-KO-Plasmid erhalten hatten, gleich war.

Abbildung 3.11 stellt die Ergebnisse des Lig.1-ELISA dar. Die Lig.1-Proteinkonzentration in Proteinisolaten aus BFP-angereicherten Zellen, die

ausschließlich mit dem Cas9-BFP-Plasmid transfiziert worden waren, betrug 13,3 ng/ml ($\pm 0,9$ ng/ml). Proteinisolate aus BFP-angereicherten Zellen, die mit dem Cas9-BFP- und dem Lig.1-KO-Plasmid kotransfiziert worden waren, wiesen eine Lig.1-Proteinkonzentration von 1,7 ng/ml ($\pm 0,7$ ng/ml) auf. Die Abnahme der Lig.1-Proteinkonzentration war statistisch signifikant mit $p = 3,8 \times 10^{-5}$. Zu beachten ist, dass sich die hier errechneten statistischen Kennwerte sowie die Durchführung des t-Tests auf die Messung eines einzelnen Versuches als Triplikat beziehen.

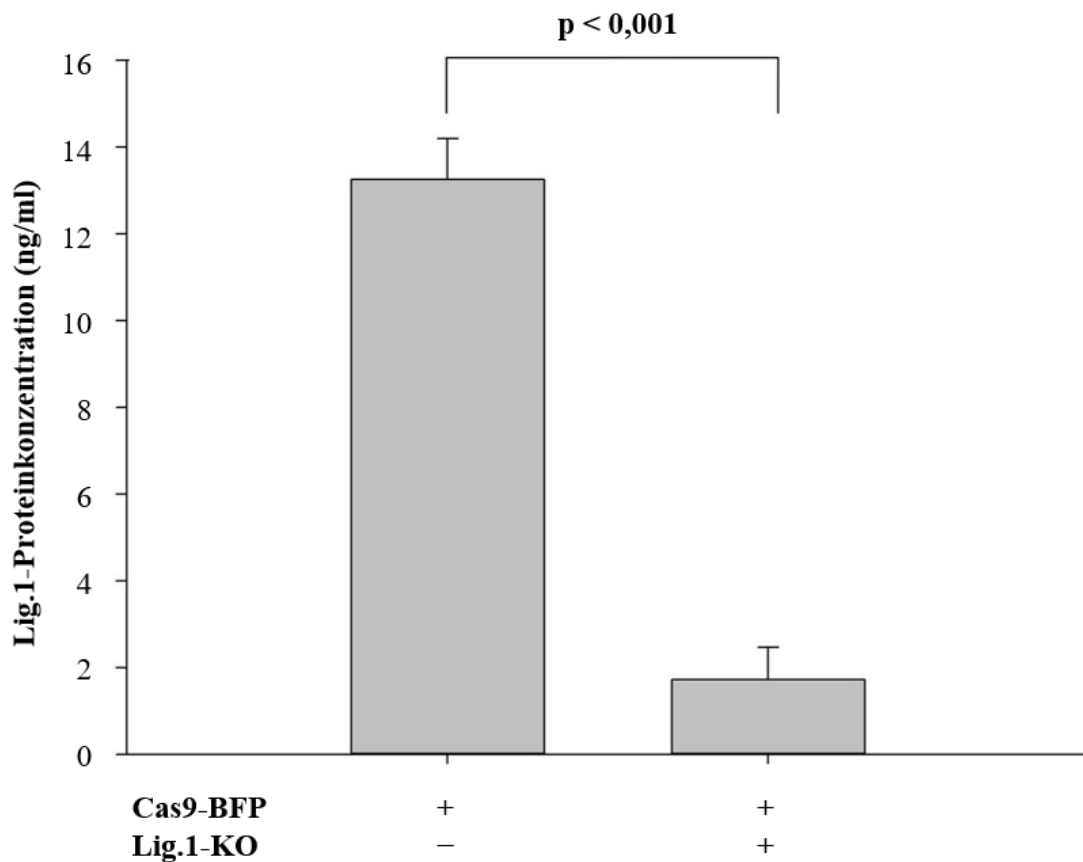


Abbildung 3.11: Ergebnisse des Lig.1-ELISA zum Vergleich der Lig.1-Proteinkonzentration in Proteinisolaten aus BFP-angereicherten HEK 293T-Zellen, die ausschließlich mit dem Cas9-BFP-Plasmid transfiziert worden waren, und Zellen, die zusätzlich mit dem Lig.1-KO-Plasmid kontransfiziert worden waren. Der Graph repräsentiert ein Experiment mit Dreifachbestimmung. Es wurde der t-Test angewendet.

Die Ergebnisse des Lig.3-ELISA sind in Abbildung 3.12 einzusehen. Proteinisolate aus nur mit dem Cas9-BFP-Plasmid transfizierten und BFP-angereicherten Zellen wiesen eine Lig.3-Proteinkonzentration von 6,6 ng/ml ($\pm 0,6$ ng/ml) auf. Bei zusätzlicher Transfektion des Lig.3-KO-Plasmides verringerte sich die Lig.3-Proteinkonzentration im

Proteinisolat aus den BFP-angereicherten Zellen auf 5,1 ng/ml (\pm 1,0 ng/ml). Die Reduktion der Lig.3-Proteinkonzentration war statistisch signifikant mit $p = 0,04$. Wie auch schon bei dem Lig.1-ELISA beziehen sich die statistischen Kenngrößen und der t-Test auf die Messung eines einzelnen Versuches als Triplikat.

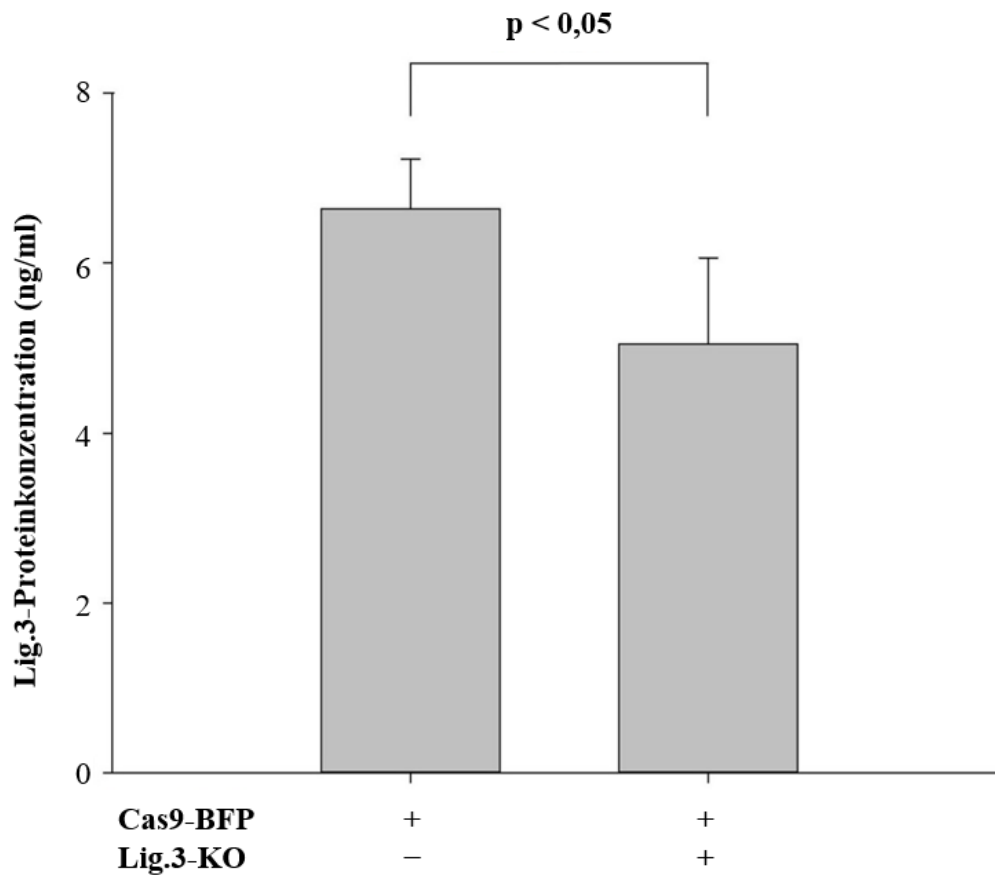


Abbildung 3.12: Ergebnisse des Lig.3-ELISA zur Detektion von Veränderungen der Lig.3-Proteinkonzentration in Proteinisolaten aus BFP-angereicherten Zellen, die entweder nur mit dem Cas9-BFP-Plasmid transfiziert worden waren oder eine zusätzliche Kotransfektion des Lig.3-KO-Plasmides erhielten. Der Graph repräsentiert ein Experiment mit Dreifachbestimmung. Es wurde der t-Test angewendet.

In dem Lig.4-ELISA wurden negative Werte für die Proteinkonzentration gemessen. Es ist dementsprechend von einem Unterschreiten der Nachweisgrenze des Lig.4-ELISA-Kits auszugehen, sodass kein Vergleich der Lig.4-Proteinkonzentrationen in Proteinisolaten aus BFP-angereicherten HEK 293T-Zellen, die ausschließlich mit dem Cas9-BFP-Plasmid transfiziert worden waren, und mit dem Cas9-BFP- und Lig.4- KO-Plasmid kotransfizierten, BFP-angereicherten Zellen möglich war.

3.2 MMEJ-Assay

Mithilfe des MMEJ-Assays (Yanik et al., 2018) wurde die Auswirkung eines DNA-Ligase-KOs, vermittelt durch die Kotransfektion der in der AG Stieger generierten DNA-Ligase-KO-Plasmide, auf die MMEJ-Aktivität am Modell der Integration eines Luziferase-Reporters in den murinen RPGR-ORF15 Locus in HEK293^{mORF15}-Zellen getestet (siehe Abbildung 3.13).

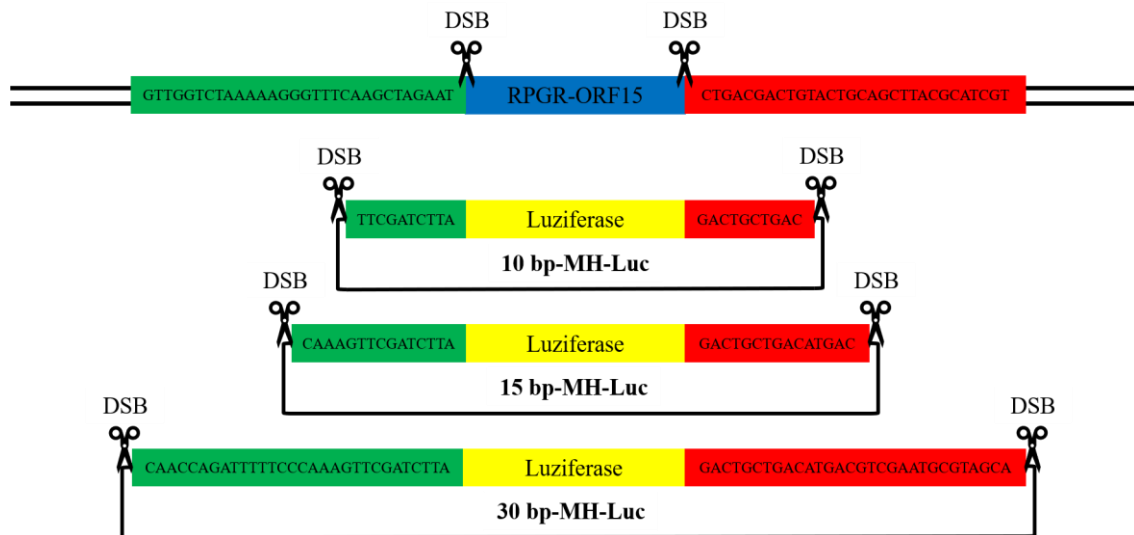


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Donorplasmide für das MMEJ-Assay mit unterschiedlichen MH-Armlängen von 10, 15 und 30 bp. Angelehnt an (Yanik et al., 2018).

Im MMEJ-Assay konnte generell eine große Variation der Luziferaseaktivität gemessenen in RLU zwischen den einzelnen Versuchstagen beobachtet werden. Die erhaltenen Standardabweichungen waren hierbei so groß, dass die zweifache Standardabweichung für fast alle Gruppen den Mittelwert der jeweiligen Gruppe überstieg. Bei Merkmalen, welche nur positive Werte annehmen können, sollte der Mittelwert mindestens zweimal so groß wie die dazugehörige Standardabweichung sein, um von einer Normalverteilung der Werte ausgehen zu können (Gaus & Muche, 2017). Die Luziferaseaktivität gemessenen in RLU ist ein solches Merkmal, welches nur positive Werte annehmen kann, sodass dementsprechend von keiner Normalverteilung der Daten ausgegangen werden konnte. Es wurde daher ein nicht-parametrisches Testverfahren angewendet. Um gleichzeitig den Einfluss von vom experimentellen Durchlauf abhängigen Störeinflüssen zu eliminieren, wurden die einzelnen Experimentalgruppen als abhängige Stichproben betrachtet (Lew, 2007) und die statistische Auswertung

dementsprechend mittels eines Friedman-Tests mit nachfolgendem rangbasiertem Post hoc-Test nach Dunnett durchgeführt. Die Gruppen, welche ein DNA-Ligase-KO-Plasmid erhalten hatten, wurden hierbei jeweils mit der Kontrollgruppe verglichen, die statt mit einem DNA-Ligase-KO-Plasmid mit einem Kontrollplasmid kotransfiziert worden war. In der Negativkontrolle ergab sich eine mittlere Luziferaseaktivität von 1640 RLU (± 446 RLU). In der Positivkontrolle konnte eine mittlere Luziferaseaktivität von $7,7 \times 10^7$ RLU ($\pm 3 \times 10^7$ RLU) gemessen werden.

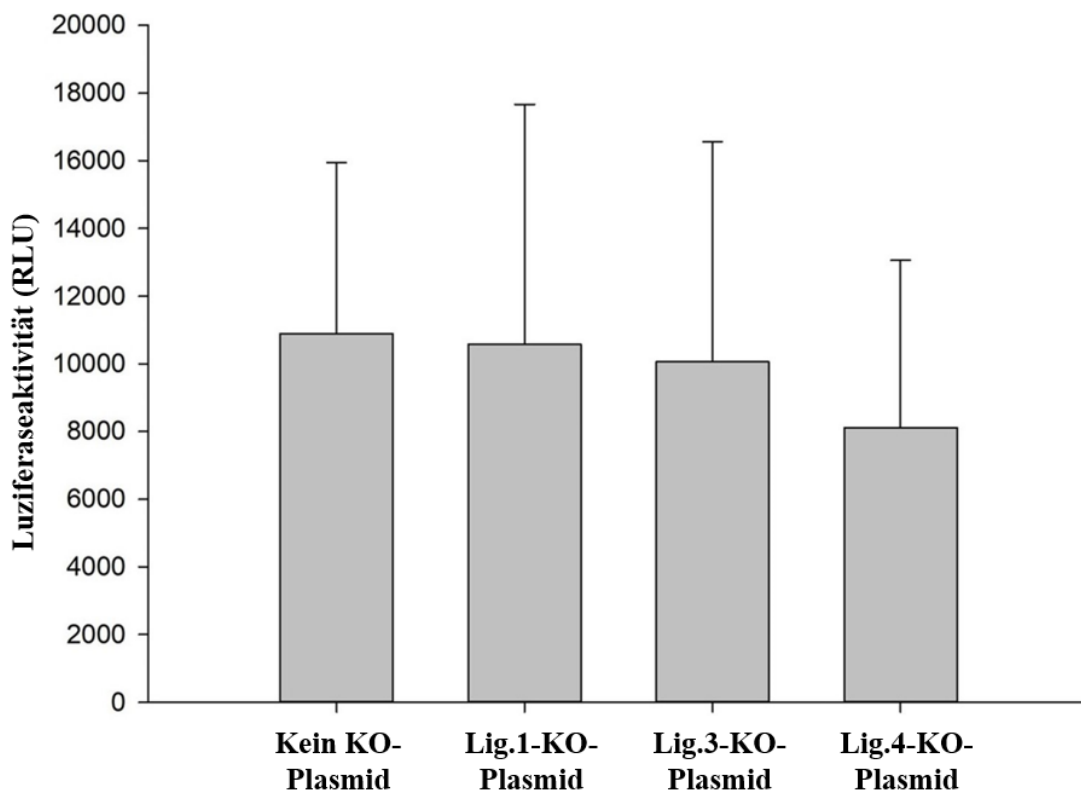


Abbildung 3.14: Luziferaseaktivität im MMEJ-Assay bei Verwendung von Donorplasmiden mit einer Mikrohomologiearmlänge von 10 bp. Der Graph repräsentiert vier unabhängige Experimente mit Zweifachbestimmung. Die statistische Analyse erfolgte mittels Friedman-Test.

Die Ergebnisse für Donorplasmide mit einer MH-Armlänge von 10 bp (10 bp-MH-Luc) sind in Abbildung 3.14 dargestellt. Hierbei betrug die mittlere Luziferaseaktivität ohne DNA-Ligase-KO-Plasmid $1,1 \times 10^4$ RLU ($\pm 5,0 \times 10^3$ RLU). Bei Zugabe des Lig.1-KO-Plasmides konnte eine mittlere Luziferaseaktivität von $1,1 \times 10^4$ RLU ($\pm 7,1 \times 10^3$ RLU) gemessen werden. Nach Zugabe des Lig.3-KO-Plasmides konnte eine Abnahme der mittleren Luziferaseaktivität auf $1,0 \times 10^4$ RLU ($\pm 6,5 \times 10^3$ RLU) beobachtet werden.

Bei Zugabe des Lig.4-KO-Plasmides war eine Senkung der mittleren Luziferaseaktivität auf $8,1 \times 10^3$ RLU ($\pm 4,9 \times 10^3$ RLU) zu beobachten. Im Friedman-Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen bei Verwendung von Donorplasmiden mit einer Mikrohomologiearmlänge von 10 bp detektiert werden ($p = 0,094$), sodass die Durchführung eines Post hoc-Tests unterblieb.

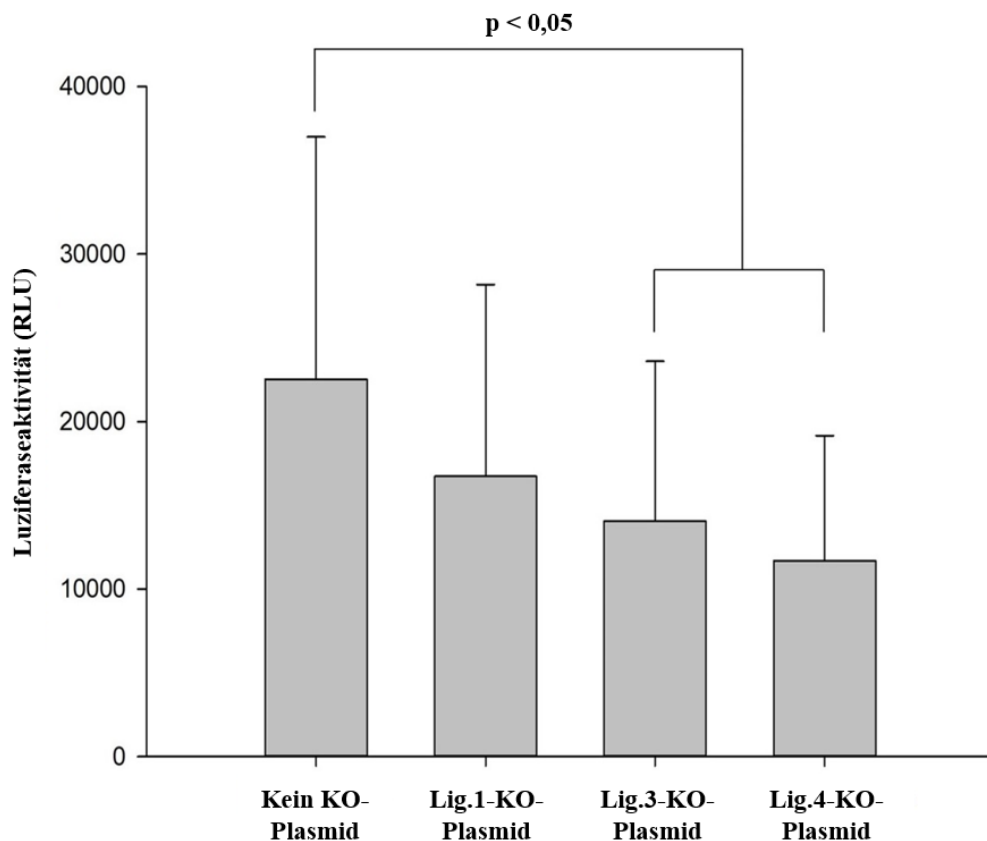


Abbildung 3.15: Luziferaseaktivität im MMEJ-Assay bei Verwendung von Donorplasmiden mit einer Mikrohomologiearmlänge von 15 bp. Der Graph repräsentiert vier unabhängige Experimente mit Zweifachbestimmung. Die statistische Analyse erfolgte mittels Friedman-Test mit nachfolgendem Post hoc-Test nach Dunnett (rangbasiert).

Abbildung 3.15 zeigt die Ergebnisse, welche bei Verwendung von Donorplasmiden mit einer MH-Arm länge von 15 bp (15 bp-MH-Luc) erhalten wurden. Proteinisolate aus Zellen ohne zusätzliches DNA-Ligase-KO-Plasmid wiesen hierbei eine mittlere Luziferaseaktivität von $2,3 \times 10^4$ RLU ($\pm 1,4 \times 10^4$ RLU) auf. Bei zusätzlicher Verwendung des Lig.1-KO-Plasmides wurde die mittlere Luziferaseaktivität auf $1,7 \times 10^4$ RLU ($\pm 1,1 \times 10^4$ RLU) abgesenkt. Die Zugabe des Lig.3-KO-Plasmides führte zu einer Reduktion der mittleren Luziferaseaktivität auf $1,4 \times 10^4$ RLU ($\pm 9,5 \times 10^3$ RLU).

Bei Zugabe des Lig.4-KO-Plasmides konnte eine Abnahme der mittleren Luziferaseaktivität auf $1,2 \times 10^4$ RLU ($\pm 7,5 \times 10^3$ RLU) beobachtet werden. Die bei Verwendung des 15 bp-MH-Donorplasmides beobachtete Reduktion der Luziferaseaktivität bei zusätzlicher Transfektion des Lig.1-KO-Plasmides im Vergleich zu Zellen, welche kein DNA-Ligase-KO-Plasmid erhalten hatten, war nicht statistisch signifikant. Die bei zusätzlicher Transfektion des Lig.3- sowie Lig.4-KO-Plasmides beobachtete Abnahme der Luziferaseaktivität gegenüber den Zellen, welche kein DNA-Ligase-KO-Plasmid erhalten hatten, war statistisch signifikant mit $p < 0,05$.

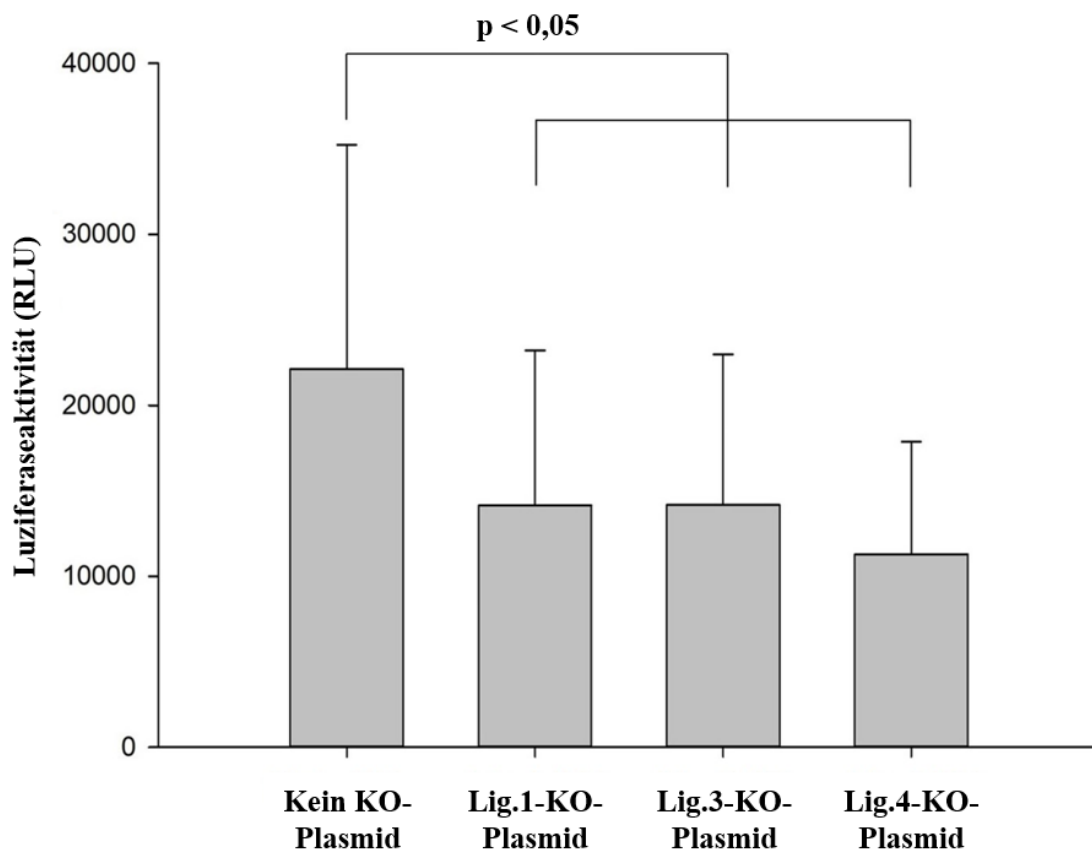


Abbildung 3.16: Luziferaseaktivität im MMEJ-Assay bei Verwendung von Donorplasmiden mit einer Mikrohomologiearmlänge von 30 bp. Der Graph repräsentiert vier unabhängige Experimente mit Zweifachbestimmung. Die statistische Analyse erfolgte mittels Friedman-Test mit nachfolgendem Post hoc-Test nach Dunnett (rangbasiert).

Die bei Verwendung von Donorplasmiden mit MH-Armlängen von 30 bp (30 bp-MH-Luc) gemessenen Luziferaseaktivitäten sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Die mittlere

Luziferaseaktivität, welche hierbei ohne DNA-Ligase-KO-Plasmid gemessen werden konnte, betrug $2,2 \times 10^4$ RLU ($\pm 1,3 \times 10^4$ RLU). Bei zusätzlicher Transfektion des Lig.1-KO-Plasmides nahm die mittlere Luziferaseaktivität auf $1,4 \times 10^4$ RLU ($\pm 9,1 \times 10^3$ RLU) ab. Wurde demgegenüber das Lig.3-KO-Plasmid zugegeben, konnte eine Reduktion der mittleren Luziferaseaktivität auf $1,4 \times 10^4$ RLU ($\pm 8,8 \times 10^3$ RLU) beobachtet werden. Nach Zugabe des Lig.4-KO-Plasmides war eine Abnahme der mittleren Luziferaseaktivität auf $1,1 \times 10^4$ RLU ($\pm 6,6 \times 10^3$ RLU) zu beobachten. Die bei Kotransfektion aller drei DNA-Ligase-KO-Plasmide aufgetretenen Reduktionen der Luziferaseaktivität gegenüber Zellen, die kein DNA-Ligase-KO-Plasmid erhalten hatten, waren statistisch signifikant mit $p < 0,05$.

3.3 BRET-Reporter-Assay

Das BRET-Reporter-Assay (siehe Abbildung 3.17) (Wimmer et al., 2021) diente dazu, Veränderungen der NHEJ-Aktivität in HEK 293T-Zellen nach Transfektion der DNA-Ligase-KO-Plasmide nachzuweisen.

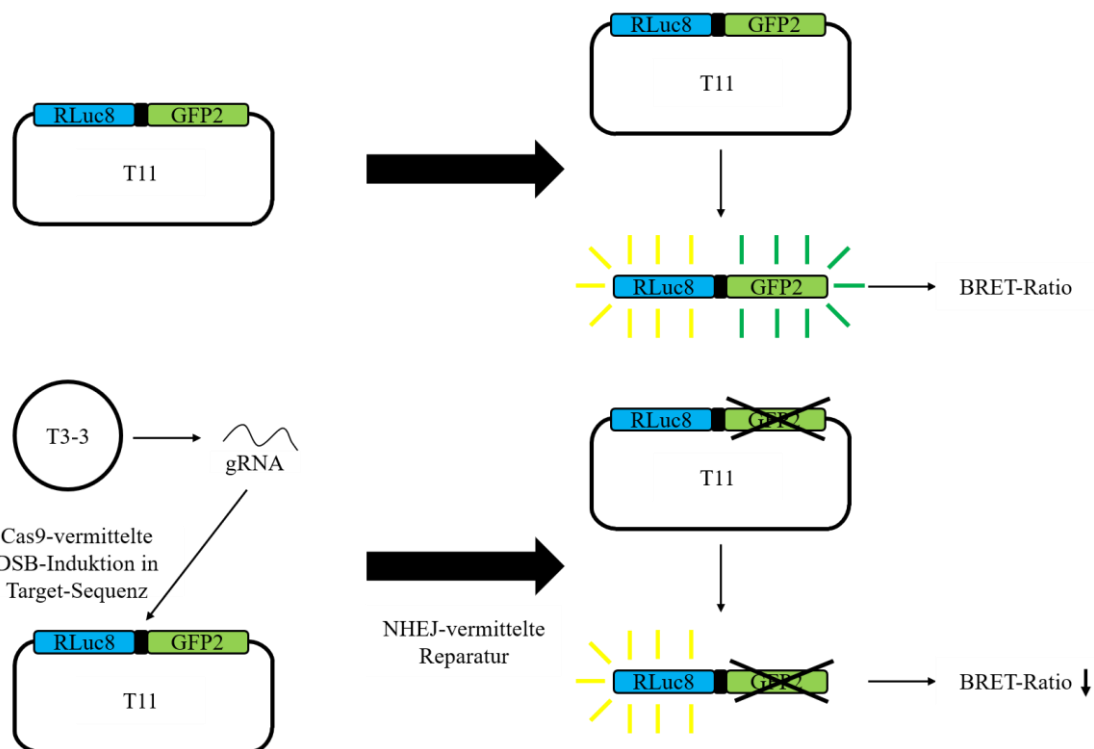


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung des BRET-Reporter-Assay

Die statistische Auswertung des BRET-Reporter-Assay erfolgte als rangbasierte One Way-ANOVA nach Kruskal-Wallis mit paarweisem Vergleich aller Gruppen nach

rangbasierter Student-Newman-Keuls-Methode. Ein nicht-parametrischer Test wurde gewählt, da der vorgeschaltete Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung mit $p < 0,05$ signifikant ausfiel, sodass die Annahme einer Normalverteilung der Residuen abgelehnt werden musste.

Die Ergebnisse des BRET-Reporter-Assay mit Zugabe der einzelnen DNA-Ligase-KO-Plasmide sind in Abbildung 3.18 dargestellt.

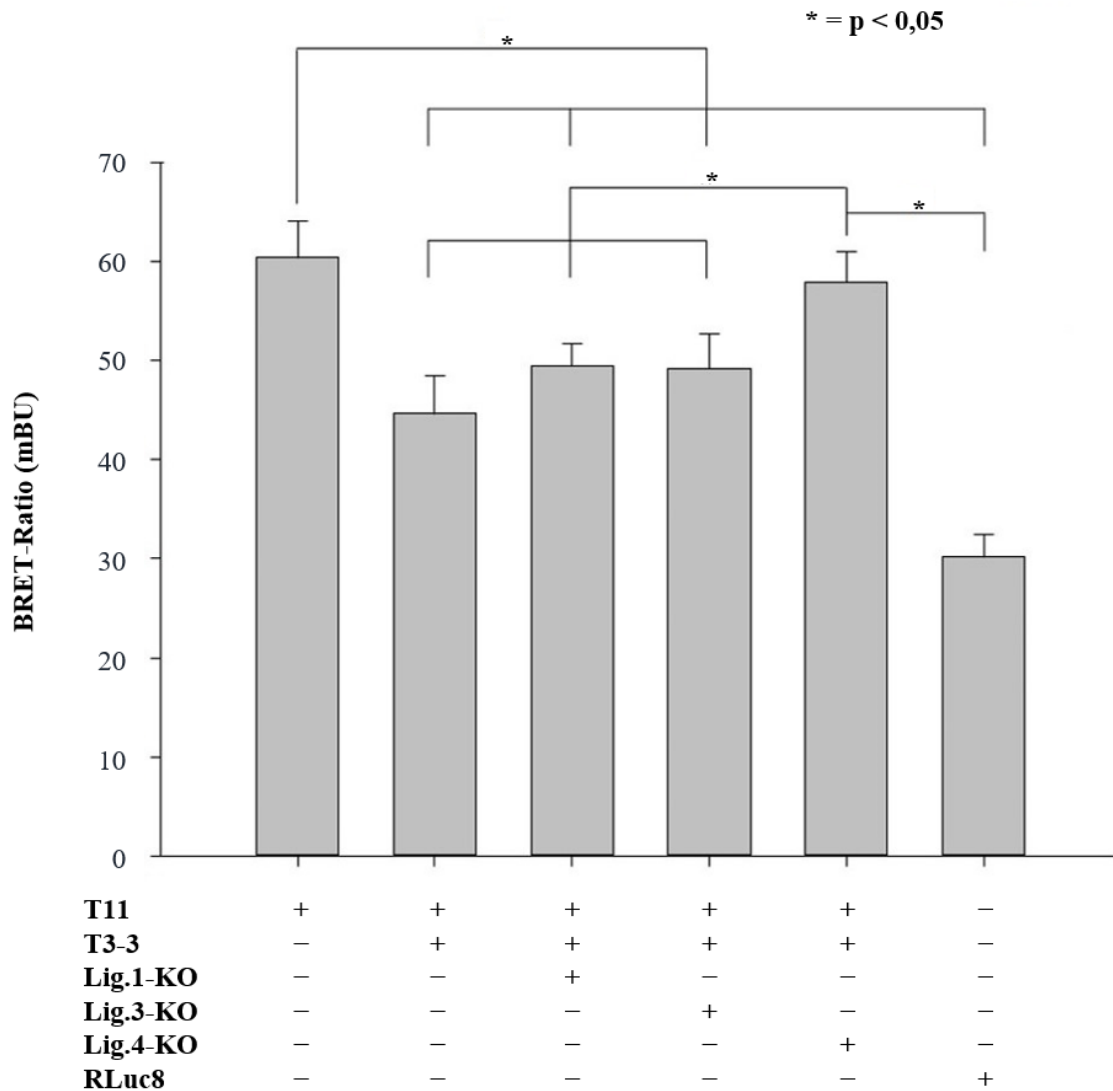


Abbildung 3.18: Ergebnisse des BRET-Reporter-Assay. Der Graph repräsentiert drei unabhängige Experimente mit Vierfachbestimmung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels rangbasierter One Way-ANOVA nach Kruskal-Wallis mit paarweisem Vergleich aller Gruppen nach Student-Newman-Keuls-Methode (rangbasiert) als Post hoc-Test.

Die mittlere BRET-Ratio in Proteinisolaten aus Zellen, die lediglich das T11-Plasmid

erhalten hatten, betrug 60,4 mBU ($\pm 3,7$ mBU). Da in diesen Zellen das T3-3-Plasmid fehlte, wurde kein DSB in der Targetsequenz des T11-Plasmides induziert und es konnte folglich auch keine Frameshift-Mutation der GFP-Sequenz auftreten. Die für die alleinige Transfektion des T11-Plasmides berechneten Werte der BRET-Ratio entsprechen daher dem vollständigen Fehlen einer NHEJ-bedingten Zerstörung des GFP-Leserahmens in den Zellen.

Bei gleichzeitiger Transfektion des T11- und des T3-3-Plasmides kam es zu einer Senkung der BRET-Ratio auf 44,6 mBU ($\pm 3,8$ mBU). Durch die Kotransfektion des T11- und des T3-3-Plasmides ist eine DSB-Induktion in der Targetsequenz des T11-Plasmides mit nachfolgender NHEJ-bedingter Zerstörung des GFP-Leserahmens möglich. Die für die Kotransfektion des T11- und T3-3-Plasmides berechneten Werte der BRET-Ratio entsprechen daher der basalen NHEJ-Aktivität in HEK 293T-Zellen.

Bei der Kotransfektion des T11-, T3-3- und Lig.1-KO-Plasmides konnte ein Anstieg der mittleren BRET-Ratio gegenüber der alleinigen Kotransfektion des T11- und T3-3-Plasmides auf 49,4 mBU ($\pm 2,2$ mBU) beobachtet werden.

Die Kotransfektion des T11-, T3-3- und Lig.3-KO-Plasmides bedingte einen Anstieg der mittleren BRET-Ratio gegenüber der ausschließlichen Transfektion des T11- und T3-3-Plasmides auf 49,2 mBU ($\pm 3,5$ mBU).

Wurden das T11-, T3-3- und Lig.4-KO-Plasmid gleichzeitig transfiziert, war ein Anstieg der mittleren BRET-Ratio gegenüber der alleinigen Kotransfektion des T11- und T3-3-Plasmides auf 57,9 mBU ($\pm 3,1$ mBU) zu beobachten.

Bei alleiniger Transfektion des RLuc8-Plasmides wurde eine mittlere BRET-Ratio von 30,2 mBU ($\pm 2,3$ mBU) beobachtet. Da es in diesen Zellen zu keiner GFP-Expression kam, sind die hierbei berechneten Werte für die BRET-Ratio äquivalent zu einem vollständigen NHEJ-bedingten Verlust der GFP-Expression. Die hier berechnete BRET-Ratio ist somit gleichsam als Hintergrund zu betrachten und sie wurde mit der mittleren BRET-Ratio in Proteinisolaten aus Zellen, die lediglich das T11-Plasmid erhalten hatten verglichen, um einen Übergang von Energie vom Donor RLuc8 zum Akzeptor GFP2 zu demonstrieren. Die BRET-Ratio in Proteinisolaten aus Zellen, die lediglich das T11-Plasmid erhalten hatten, sollte im Falle eines solchen Energieübergangs signifikant höher sein als die bei alleiniger Transfektion des RLuc8-Plasmides gemessene Hintergrund-BRET-Ratio (Wimmer et al., 2021).

Statistisch signifikant mit $p < 0,05$ waren die BRET-Ratio-Werte der Zellen, die lediglich das T11-Plasmid erhalten hatten, gegenüber Zellen, die zusätzlich das T3-3-Plasmid

erhielten, sowie gegenüber Zellen, die zusätzlich mit dem Lig.1- oder Lig.3-KO-Plasmid transfiziert wurden. Zudem bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der alleinigen Transfektion des T11-Plasmides und der Transfektion des RLuc8-Plasmides. Weitere statistisch signifikante Unterschiede bestanden zwischen der BRET-Ratio der Zellen, die mit dem T11-, T3-3- und Lig.4-KO-Plasmid transfiziert wurden, gegenüber Zellen, die das T11- und T3-3-Plasmid erhalten hatten, sowie Zellen, die zusätzlich das Lig.1- oder Lig.3-KO-Plasmid erhalten hatten. Des Weiteren bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kotransfektion des T11-, T3-3- und Lig.4-KO-Plasmides gegenüber Zellen, die mit dem RLuc8-Plasmid transfiziert wurden.

Nicht statistisch signifikant waren unter anderem die Unterschiede der BRET-Ratio von Zellen, die ausschließlich mit dem T11-Plasmid transfiziert wurden und Zellen, die eine Kotransfektion des T11-, T3-3- und Lig.4-KO-Plasmides erhielten. Zudem bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede der BRET-Ratio von Zellen, die mit dem T11- und T3-3-Plasmid kotransfiziert wurden, gegenüber Zellen, die zusätzlich das Lig.1- oder Lig.3-KO-Plasmid erhielten.

3.4 MTT-Assay

Das MTT-Assay diente der Evaluation möglicher Auswirkungen der verwendeten DNA-Ligase-KO-Strategie auf die Viabilität von HEK 293T-Zellen.

Es wurde die dimensionslose optische Dichte (OD) bei 570 nm gemessen. Die Ergebnisse des MTT-Assay sind in Abbildung 3.19 dargestellt.

Wells mit unbehandelten Zellen wiesen eine mittlere OD von $1,21 (\pm 0,13)$ auf.

Bei Behandlung der Zellen mit ausschließlich NaCl-Lösung und PEI-Lösung ohne Plasmid-DNA konnte eine Senkung der mittleren optischen Dichte der Wells auf $1,12 (\pm 0,12)$ beobachtet werden.

Bei Transfektion des Cas9-BFP-Plasmids senkte sich die mittlere OD der Wells weiter auf $1,04 (\pm 0,12)$.

Wurden das Cas9-BFP- und das Lig.1-KO-Plasmid in die Zellen kotransfiziert, ergab sich eine mittlere OD von $1,05 (\pm 0,14)$.

Bei Kotransfektion des Cas9-BFP- und des Lig.3-KO-Plasmids konnte eine mittlere OD von $0,97 (\pm 0,12)$ beobachtet werden.

Nach gleichzeitiger Transfektion des Cas9-BFP- und des Lig.4-KO-Plasmids ergab sich eine mittlere OD von $1,00 (\pm 0,11)$.

In Kontrollwells, in welchen die HEK 293T-Zellen sicher und vollständig mit Ethanol

abgetötet werden sollten, kam es zu einer starken Abnahme der mittleren optischen Dichte auf $0,38 (\pm 0,01)$.

Des Weiteren wurde noch eine Mediumkontrolle in den Versuchen implementiert. Hierzu wurden Wells ohne Aussaat von HEK 293T-Zellen mit 700 μ l DMEM +++ befüllt. Die mittlere OD in solchen Wells betrug $0,36 (\pm 0,01)$.

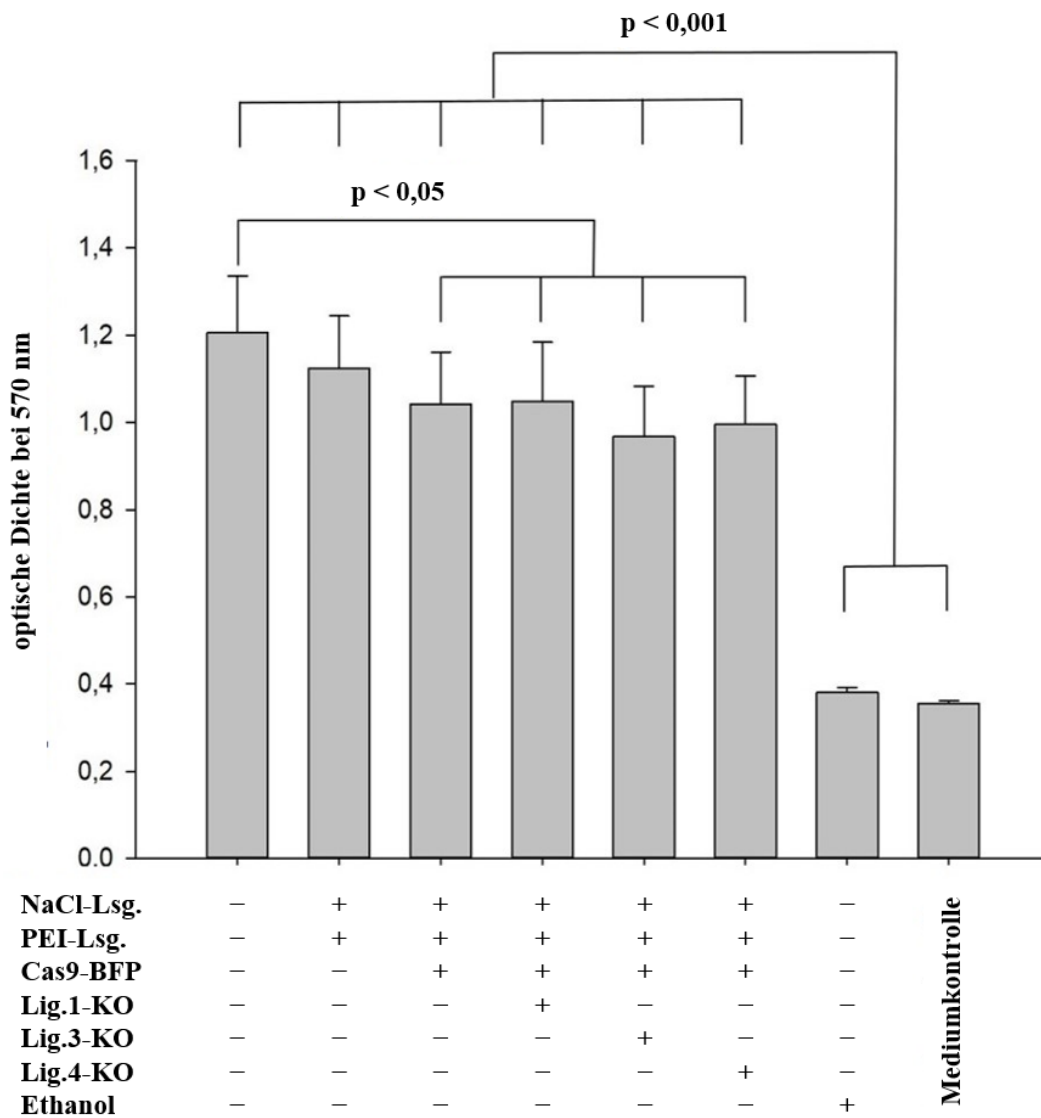


Abbildung 3.19: Ergebnisse des MTT-Assay zum Nachweis möglicher Effekte der in der AG Stieger generierten DNA-Ligase-KO-Plasmide auf die Viabilität von HEK 293T-Zellen. Der Graph repräsentiert drei unabhängige Experimente mit Dreifachbestimmung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Randomized Block- bzw. One way-Repeated Measures-ANOVA mit nachfolgendem Post hoc-Test nach Student-Newman-Keuls.

Die OD war statistisch signifikant unterschiedlich zwischen der Mediumkontrolle und

Wells mit Zellen, die mit 60 μ l Ethanol behandelt wurden einerseits und Wells mit unbehandelten Zellen bzw. auch allen anders behandelten Zellen andererseits mit $p < 0,001$. Des Weiteren bestand ein statistisch signifikanter Unterschied der optischen Dichte zwischen Wells mit unbehandelten Zellen sowie Wells mit Zellen, die mit Cas9-BFP alleine oder in Kombination mit dem Lig.1-KO-Plasmid, dem Lig.3-KO-Plasmid oder dem Lig.4-KO-Plasmid transfiziert worden waren ($p = 0,034$, $p = 0,024$, $p = 0,005$ bzw. $p = 0,009$). Kein statistisch signifikanter Unterschied bestand unter anderem zwischen Wells mit Zellen, die ausschließlich mit dem Cas9-BFP-Plasmid transfiziert wurden, und solchen, die zusätzlich das Lig.1-, Lig.3- oder Lig.4-KO-Plasmid erhalten hatten.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten Auswirkungen einer Kotransfektion der verwendeten DNA-Ligase-KO-Plasmide auf die Integration einer großen Sequenz in das Genom von humanen Zellen am Modell der genomischen Integration einer Luziferase-Sequenz im Rahmen des MMEJ-Assay gezeigt werden. Des Weiteren ließ sich eine reduzierte NHEJ-Aktivität bei Verwendung des Lig.4-KO-Plasmides im Rahmen des BRET-Reporter-Assay detektieren. Eine Abnahme der Viabilität humaner Zellen bei Verwendung der DNA-Ligase-KO-Strategie konnte im angewandten MTT-Assay innerhalb eines Zeitraumes von 24 h nicht beobachtet werden.

4.1 Auswirkungen der CRISPR/Cas9-vermittelten DNA-Ligase-KO-Strategie auf die Integration einer Luziferasesequenz in den murinen RPGR-ORF15-Locus

Das in der AG Stieger generierte MMEJ-Assay wurde mit dem Ziel entworfen, die Quantifikation der Integrationsrate einer großen (Luziferase-)Sequenz in den murinen RPGR-ORF15-Locus zu ermöglichen. Diese erfolgt dabei unter Vermittlung kurzer Sequenzen (Mikrohomologiearmen), welche die Luziferasesequenz flankieren und homolog zu Sequenzen an den Rändern des RPGR-ORF15-Exons sind. Das Assay stellt dabei einen Schritt zur Entwicklung Genome editing- und MMEJ-basierter Therapieansätze zur Behandlung von X-chromosomaler Retinitis pigmentosa dar (Yanik et al., 2018). Das RPGR-ORF15-Exon stellt bei dieser Erkrankung einen häufig von Mutationen betroffenen „Hotspot“ dar (Vervoort et al., 2000; Vervoort & Wright, 2002). Bei Kotransfektion der für das Assay benötigten Komponenten gemeinsam mit den in der AG Stieger entwickelten DNA-Ligase-KO-Plasmiden konnte eine verringerte resultierende Luziferaseaktivität im Vergleich zur Kotransfektion der MMEJ-Assay-Komponenten mit einem Füllvektor beobachtet werden. Statistisch signifikant war die Reduktion der Luziferaseaktivität jedoch nur bei Verwendung von Donorplasmiden mit 15 bp-MH-Armen für den Lig.3- und Lig.4-KO und bei Verwendung von Donorplasmiden mit 30 bp-MH-Armen für den KO aller drei DNA-Ligasen, sodass für die beschriebenen Kombinationen die Alternativhypothese einer Beeinflussung der Luziferaseaktivität in den murinen RPGR-ORF15-Locus durch die in unserer Arbeitsgruppe generierten DNA-Ligase-KO-Plasmide angenommen wurde. Bei Verwendung von Donorplasmiden mit 10 bp-MH-Armen ergab die Analyse der Daten mittels Friedman-Test einen p-Wert von 0,094, sodass der kritische p-Wert von 0,05 knapp verfehlt wurde und aus den gewonnenen Daten nicht auf einen Effekt der DNA-Ligase-

KO-Plasmide bei Verwendung des Donorplasmides mit 10 bp-MH-Armen geschlossen werden konnte. Generell konnte eine starke Variabilität der gemessenen Luziferaseaktivität über die Kontrollgruppe und alle Gruppen mit DNA-Ligase-KO in Abhängigkeit vom individuellen Versuch beobachtet werden. Mutmaßliche Einflussfaktoren waren dabei die Anzahl an initial ausgesäten Zellen, die Transfektionseffizienz, die Temperatur bei der Messung der Luziferaseaktivität sowie weitere Faktoren, die von Versuchstag zu Versuchstag variierten und geeignet waren, die schlussendlich gemessene Aktivität der Luziferase über alle Experimentalgruppen hinweg zu beeinflussen. Die einzelnen Experimentalgruppen konnten daher nicht als unabhängig angesehen werden und es wurde eine Auswertung entsprechend einer Randomized Block- bzw. Repeated Measures-ANOVA mit den einzelnen Versuchen als Blöcke, wie von Lew empfohlen, durchgeführt (Lew, 2007). Gleichzeitig konnte keine Normalverteilung der gemessenen Luziferaseaktivität angenommen werden, sodass schließlich der Friedmann-Test gewählt wurde. Dieser stellt eine nicht-parametrische Option zur Durchführung einer Randomized Block- bzw. Repeated Measures-ANOVA dar (Pereira et al., 2015).

Aufgrund der Tatsache, dass ein eindeutiger Nachweis des DNA-Ligase-KOs auf Proteinebene in der vorliegenden Arbeit nicht mit abschließender Sicherheit gelang (siehe Kapitel 4.3), müssen die im MMEJ-Assay gewonnenen Ergebnisse im Hinblick auf eine kausale Rolle der Aktivität der einzelnen DNA-Ligasen vorsichtig interpretiert werden.

Aus der Tatsache, dass es zu einer Integration der Luziferase-Sequenz in das Genom der HEK293^{mORF15}-Zellen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors kommt (Yanik et al., 2018), ergibt sich ein weiterer Sachverhalt, den es zu bedenken gilt: Die Luziferase-Sequenz sollte aufgrund ihrer Integration in das Genom im Falle einer Mitose an die Tochterzellen weitervererbt werden, die dementsprechend auch zur Expression der Luziferase befähigt werden. Eine Beeinflussung der Proliferations- oder Überlebensrate der Zellen, bei welchen es zu einer Integration der Luziferase-Sequenz gekommen ist, hätte dementsprechend auch einen Einfluss auf die am Ende des Versuches gemessene Luziferase-Aktivität. Veränderungen der gemessenen Luziferase-Aktivität nach Kotransfektion eines der DNA-Ligase-KO-Plasmide könnten also auch auf eine Veränderung der Proliferations- bzw. Überlebensrate der Zellen zurückgehen, was berücksichtigt werden muss.

In verschiedenen Studien konnte sowohl für die Lig.1 als auch die Lig.3 eine Beteiligung an a-EJ- bzw. MMEJ-vermittelten Prozessen gezeigt werden. Es wurden dabei unterschiedliche Beobachtungen bezüglich des Ausmaßes der Beteiligung von Lig.1 und

Lig.3 an a-EJ bzw. MMEJ gemacht. So konnten Liang et al. in nukleären Extrakten aus humanen HTD114-Zellen eine differentielle Beteiligung von Lig.1 und Lig.3 bei unterschiedlichen MH-Längen darstellen (Liang et al., 2008). Simsek und Kollegen konnten in einer Studie zur a-EJ-vermittelten Bildung chromosomaler Translokationen in Mäusezellen eine präferentielle Beteiligung der Lig.3 bei der Existenz vorbestehender MHs und eine präferentielle Beteiligung der Lig.1 bei Fehlen vorbestehender MHs feststellen. Im Falle des Fehlens vorbestehender MHs sei dabei nicht auszuschließen, dass für die Vereinigung notwendige MHs durch die Aktivität von Polymerasen neu erzeugt würden (Simsek, Brunet et al., 2011). Lu et al. konnten in einer Studie an murinen B-Zellen (CH12F3) aufzeigen, dass sich Lig.1 und Lig.3 in der Bildung von a-EJ-vermittelten intrachromosomalen Deletionen und a-EJ-vermittelter Class Switch Recombination gegenseitig ersetzen können. Bei der a-EJ-vermittelten Bildung interchromosomaler Translokationen konnte demgegenüber eine präferentielle Beteiligung von Lig.1 bei Vorliegen langer MHs und von Lig.3 beim Fehlen von MHs beobachtet werden (Lu et al., 2016). Auch wurde die Beteiligung von Lig.1 und Lig.3 an unterschiedlichen a-EJ- bzw. MMEJ-Unterformen (Liang et al., 2008; Oh et al., 2014; Simsek, Brunet et al., 2011) sowie auch eine Abhängigkeit der Lig.1- und Lig.3-Beteiligung von der untersuchten Spezies (Paul et al., 2013) vorgeschlagen. Es konnte eine signifikante Abnahme der Luziferaseaktivität bei Kotransfektion des Lig.3-KO-Plasmides bei Verwendung von Donorplasmiden mit 15 bp- und 30 bp-MH-Armen beobachtet werden. Unter der Annahme, dass die Kotransfektion des Lig.3-KO-Plasmides tatsächlich einen KO der Lig.3 herbeiführt, könnte dies darauf hindeuten, dass im betrachteten MMEJ-Assay die Integration der Luziferase-Sequenz vermittelt durch diese MH-Längen unter Beteiligung eines Lig.3-abhängigen a-EJ- bzw. MMEJ-Mechanismus abläuft. Die signifikante Abnahme der gemessenen Luziferase-Aktivität bei Kotransfektion des Lig.1-KO-Plasmides unter Verwendung des Donorplasmides mit 30 bp-MH-Armen könnte, unter der Annahme, dass die Kotransfektion des Lig.1-Plasmides tatsächlich einen KO der Lig.1 herbeiführt, demgegenüber auf eine zusätzliche Beteiligung einer Lig.1-abhängigen a-EJ- bzw. MMEJ-Unterform bei der 30 bp-MH-vermittelten Integration der Luziferase-Sequenz im betrachteten MMEJ-Assay hindeuten. Die erhaltenen Daten passen also zu einer differentiellen Beteiligung der Lig.1 und Lig.3 bei unterschiedlichen Homologiearmenlängen. Ein anderer Erklärungsansatz wäre, wie bereits oben beschrieben, eine Abnahme der Proliferations- oder Überlebensrate der Zellen bei Kotransfektion des Lig.1- bzw. Lig.3-KO-Plasmides (siehe

hierzu auch Kapitel 4.4). Ein herbeigeführter KO der Lig.3 verursacht tatsächlich nach einiger Zeit einen Wachstumsstopp und den Untergang der betroffenen Zellen (Arakawa et al., 2012; Shokolenko et al., 2013).

Die DSB-Reparatur durch NHEJ wird durch die Aktivität der Lig.4 komplettiert (Chaplin & Blundell, 2020). Bei Kotransfektion des Lig.4-KO-Plasmides konnte sowohl bei der Verwendung von Donorplasmiden mit einer Mikrohomologiearmlänge von 15 bp als auch 30 bp eine signifikante Abnahme der gemessenen Luziferaseaktivität im Vergleich zur Kotransfektion des Füllvektors beobachtet werden. Unter der Annahme, dass die auf dem Lig.4-KO-Plasmid codierte gRNA in Verbindung mit Cas9 tatsächlich geeignet ist, einen KO der Lig.4 herbeizuführen, könnte daher ebenfalls von einer Beteiligung von NHEJ bei der Integration der Luziferasesequenz mit einer Homologiearmlänge von 15 bzw. 30 bp im Rahmen unseres MMEJ-Assays ausgegangen werden. Im Falle eines solchen Integrationsevents wäre eine korrekte Expression des Luziferaseproteins möglich, wenn die Luziferasesequenz erstens in korrekter Orientierung in den murinen RPGR-ORF15-Locus integriert wird und zweitens die gegebenenfalls entstehenden Indels zu keiner Frameshiftmutation der Luziferasesequenz führen. Zu erwarten wäre dies in 1/6 der Fälle, aufgrund der Tatsache dass eine von zwei Orientierungen der Integration und einer von drei möglichen Leserahmen korrekt ist (Auer et al., 2014). Dass eine solche Integration von Fremdsequenzen unter Beteiligung von Komponenten des NHEJ-Mechanismus möglich ist, zeigen die Arbeiten von Maresca et al., Suzuki et al. sowie Schmid-Burgk et al. So konnten Maresca et al. für ihre, als Obligate Ligation-Gated Recombination (ObLiGaRe) bezeichnete, Homologie-unabhängige „knock-in“-Strategie zeigen, dass es bei Nu7026-vermittelter Hemmung der DNA-PK, welche eine Komponente des NHEJ-Mechanismus darstellt, zu einer verringerten Effizienz der ObLiGaRe-vermittelten Integration in HCT116-Zellen kam (Maresca et al., 2013). Auch Suzuki und Kollegen konnten für ihre Homologie-unabhängige, als HITI bezeichnete Integrationsstrategie eine Abnahme der Effizienz in HEK 293-Zellen bei Behandlung mit Nu7026 beobachten (Suzuki et al., 2016). Schmid-Burgk et al. konnten durch den CRISPR/Cas9-vermittelten KO von NHEJ-Komponenten wie DNA-PK, XLF und bemerkenswerterweise auch Lig.4 in HEK 293-Zellen eine Abhängigkeit ihrer, als CRISPaint bezeichneten, „knock-in“-Strategie von den genannten NHEJ-Faktoren aufzeigen (Schmid-Burgk et al., 2016). Eine alternative Erklärung wäre, wie bereits oben erwähnt, eine Einschränkung der Proliferations- oder Überlebensfähigkeit der Zellen bei Kotransfektion des Lig.4-KO-Plasmides, welche eine geringere Anzahl an Luziferase exprimierenden Tochterzellen

bedingen könnte (siehe hierzu auch Kapitel 4.4). In einigen Zell-Typen konnte eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit nach Lig.4-KO nachgewiesen werden (Arakawa et al., 2012; Frank et al., 1998).

Ein Argument, dass gegen die Annahme einer Beeinflussung der Luziferase-Aktivität durch eine Absenkung der Proliferations- oder Überlebensrate der Zellen mit bereits integrierter Luziferasesequenz durch die Kotransfektion der DNA-Ligase-KO-Plasmide hervorgebracht werden könnte, ist, dass in diesem Fall eine Beeinflussung unabhängig von der verwendeten MH-Arm-Länge zu erwarten gewesen wäre. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Es ist jedoch auch eine Kombination aus einer verringerten Integrationseffizienz und einer Abnahme der Proliferations- oder Überlebensrate denkbar. Ursächlich für die fehlende Beobachtung eines signifikanten Effektes bei der Kotransfektion unserer DNA-Ligase-KO-Plasmide unter Verwendung eines Donorplasmides mit 10 bp-MH-Armen war möglicherweise eine stärkere funktionelle Redundanz der drei DNA-Ligasen im Kontext der Integration der Luziferase-Sequenz vermittelt durch 10 bp-MHs. Dadurch kam es möglicherweise beim KO einer Ligase zur Übernahme ihres Anteils an der Integration der Luziferase-Sequenz durch die beiden verbleibenden DNA-Ligasen.

Generell wäre ein eindeutiger Nachweis einer verringerten DNA-Ligase-Proteinexpression durch die verwendete KO-Strategie wünschenswert, um die kausale Rolle des DNA-Ligase-KOs bei den hier beobachteten Veränderungen der Luziferaseaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe weiter zu untermauern. Eine weitere sinnvolle Modifikation der Experimente zur Erhöhung der Aussagekraft der in den Assays zur DNA-Reparatur generierten Ergebnisse wäre die Durchführung sogenannter Rescue-Experimente (Graham & Root, 2015). Hierbei würden zusätzlich zu den bereits transfizierten Plasmiden ein Rescue-Plasmid transfiziert werden, welches zu einer konstitutiven Expression der jeweils im Genom ausgeknockten DNA-Ligase führt. Es sollte dabei darauf geachtet werden, die DNA-Ligase-Sequenz auf dem Plasmid so zu modifizieren, dass eine Bindung der DNA-Ligase-KO-gRNA mit nachfolgender DSB-Induktion auf dem Plasmid nicht möglich ist (Graham & Root, 2015). Eine daraufhin beobachtete Normalisierung der Luziferase-Expression in Zellen, die ein zusätzliches Rescue-Plasmid erhalten haben, im Vergleich zu Zellen, welche lediglich ein DNA-Ligase-KO-Plasmid erhalten haben, würde die Hypothese einer Beeinflussung der DNA-Reparatur durch die Inaktivierung der DNA-Ligase-Gene durch die hier verwendete KO-Strategie weiter stützen.

Für das MMEJ-Assay existieren weitere Donorplasmide mit anderen MH-Arm-Längen als den hier verwendeten 10, 15 und 30 bp (Yanik et al., 2018). Die Erprobung der DNA-Ligase-KO-Plasmide kann daher auch auf weitere MH-Arm-Längen ausgeweitet werden. Des Weiteren wäre eine Erprobung der in der AG Stieger generierten DNA-Ligase-KO-Plasmide in weiteren Assays zur a-EJ- bzw. MMEJ-vermittelten DNA-Reparatur wie beispielsweise Plasmid-basierten MMEJ-Assays, wie sie zum Beispiel bei Oh und Kollegen Verwendung fanden (Oh et al., 2014), sinnvoll. Um die Auswirkungen auf die HDR-vermittelte DSB-Reparatur evaluieren zu können, wäre auch die Erprobung der verwendeten DNA-Ligase-KO-Strategie in Assays, die zur Quantifikation der HDR-Frequenz geeignet sind, wie zum Beispiel dem Traffic Light Reporter-System (Certo et al., 2011), zweckmäßig. Auch eine Erprobung im Rahmen des MMEJ-vermittelten Genome editings anderer Loci, beispielsweise mittels des PITCh-Systems (Nakade et al., 2014), wäre denkbar.

4.2 Auswirkungen der CRISPR/Cas9-vermittelten DNA-Ligase-KO-Strategie auf die NHEJ-Aktivität in HEK 293T-Zellen

Das in der AG Stieger entwickelte BRET-Reporter-Assay dient der relativen Quantifikation der NHEJ-Aktivität in Zellen. Eine durch die NHEJ-Aktivität der Zelle induzierte Frameshift-Mutation der GFP-Sequenz auf dem T11-Plasmid führt dabei zu einem Abfall der beobachtbaren BRET-Ratio. Eine niedrige BRET-Ratio spiegelt dementsprechend eine höhere NHEJ-Aktivität in der Zelle wieder, während eine hohe BRET-Ratio durch eine niedrige NHEJ-Aktivität hervorgerufen wird (Wimmer et al., 2021).

Ein Vorteil des BRET-Reporter-Assays ist die Unabhängigkeit der BRET-Ratio von Einflussfaktoren wie Schwankungen der Transfektionseffizienz, da die gemessene Aktivität der Luziferase eine Möglichkeit zur Standardisierung bietet (Wimmer et al., 2021). Die einzelnen Experimentalgruppen im BRET-Reporter-Assay waren daher als nicht-verbunden anzusehen, da im Vergleich zum MMEJ-Assay keine wesentliche Abhängigkeit von Faktoren wie der Transfektionseffizienz o.Ä. bestehen sollte. Zugleich wurde die Annahme einer Normalverteilung der Residuen durch den vorgeschalteten Shapiro-Wilk-Test abgelehnt. Als adäquater Test wurde daher der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test gewählt (Bewick et al., 2004).

Bei der Anwendung des BRET-Reporter-Assays im Rahmen dieser Arbeit ließ sich unter anderem ein signifikanter Unterschied zwischen der Transfektion des T11-Plasmides

alleine gegenüber der Kotransfektion des T11- und des T3-3-Plasmides und der alleinigen Transfektion eines Plasmides (RLuc8, siehe hierfür (Loening et al., 2006)), welches zur konstitutiven Expression einer Luziferase führt, beobachten. Die BRET-Ratio, die bei alleiniger Transfektion des T11-Plasmides beobachtet werden kann, spiegelt dabei eine fehlende NHEJ-Aktivität in den verwendeten HEK 293T-Zellen wieder, da das T3-3-Plasmid zur Induktion des DSB in der Targetsequenz zwischen der Luziferase und dem GFP auf dem T11-Plasmid mit nachfolgender möglicher NHEJ-Aktivität und Zerstörung der GFP-Sequenz fehlt. Die bei alleiniger Transfektion des RLuc8-Plasmides zu beobachtende BRET-Ratio spiegelt demgegenüber den Zustand bei vollständigem Fehlen des GFP wieder und ist damit äquivalent zu einer Situation, in welcher es zu einer vollständigen Zerstörung aller GFP-Sequenzen durch NHEJ-Aktivität mit nachfolgenden Frameshift-Mutationen gekommen ist. Sie entspricht daher quasi einer Hintergrund-BRET-Ratio. Die Tatsache, dass sie signifikant niedriger als die BRET-Ratio bei alleiniger Transfektion des T11-Plasmides ist, demonstriert einen Übergang von Energie vom Donor RLuc8 zum Akzeptor GFP2 im Rahmen des BRET. Dass die BRET-Ratio bei alleiniger Transfektion von RLuc8 sich nicht von der BRET-Ratio bei Transfektion eines BRET-Reporter-Konstruktes aus RLuc8 und einem durch ein in-frame Stopp-Codon in der Target-Sequenz inaktivierten GFP2 unterscheidet, konnte zuvor in einer Arbeit der AG Stieger gezeigt werden (Wimmer et al., 2021). Diejenige BRET-Ratio, die bei Kotransfektion des T11- und T3-3-Plasmides beobachtet werden konnte, spiegelt die basale NHEJ-bedingte Zerstörungsrate der GFP-Sequenzen in den HEK 293T-Zellen wieder.

Die Interpretation der Ergebnisse des BRET-Reporter-Assay muss, ebenso wie die der Ergebnisse des MMEJ-Assay, aufgrund des fehlenden sicheren Nachweises der Wirkung unserer DNA-Ligase-KO-Strategie auf Proteinebene vorsichtig erfolgen.

Bei Kotransfektion sowohl des Lig.1- als auch des Lig.3-KO-Plasmides konnte keine statistisch signifikante Veränderung der BRET-Ratio im Vergleich zur alleinigen Kotransfektion des T11- und T3-3-Plasmides beobachtet werden. Es kann daher die Nullhypothese einer fehlenden Beeinflussung der basalen NHEJ-Rate durch das Lig.1- und Lig.3-KO-Plasmid nicht verworfen werden. Die Kotransfektion des Lig.4-KO-Plasmides führte demgegenüber zu einem signifikanten Anstieg der BRET-Ratio. Dies ist vereinbar mit einer Absenkung der NHEJ-Aktivität in den HEK 293T-Zellen bei Kotransfektion des Lig.4-KO-Plasmides.

Lig.4 ist in die NHEJ-vermittelte Reparatur von DSBs involviert (Chaplin & Blundell,

2020). Für Lig.1 und Lig.3 wird demgegenüber eine Beteiligung an der a-EJ- bzw. MMEJ-vermittelten DSB-Reparatur angenommen (Liang et al., 2008; Lu et al., 2016; Masani et al., 2016; Paul et al., 2013; Sharma et al., 2015; Simsek, Brunet et al., 2011; Soni et al., 2014). Die im BRET-Reporter-Assay gemachten Beobachtungen sind somit vereinbar mit einer verringerten Aktivität der DNA-Ligasen nach Anwendung der verwendeten KO-Strategie: Ein möglicher KO von Lig.1 und Lig.3 sollte zu keiner verringerten NHEJ-Aktivität führen, sodass es zu keinem signifikanten Anstieg der BRET-Ratio im Vergleich zu Zellen mit einer basalen BRET-Aktivität kommt, was im Rahmen dieser Arbeit auch beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu könnte ein KO von Lig.4 zu einer Senkung der NHEJ-Aktivität mit signifikantem Anstieg der BRET-Ratio führen, so wie dies den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen entspricht.

Bemerkenswert ist der schnelle Wirkungseintritt bei Anwendung der Lig.4-KO-Strategie in HEK 293T-Zellen binnen 24 h. Ursächlich könnte hierfür eine schnelle Degradation des bereits in den HEK 293T-Zellen befindlichen Lig.4-Proteins sein, sodass der Lig.4-Proteingehalt und somit die für eine normale NHEJ-Aktivität notwendige Lig.4-Aktivität zügig abfallen. Ein möglicher schneller Wirkungsmechanismus wäre hierbei neben einer Frameshift-Mutation des Lig.4-Gens auch eine Blockade der Transkription des Lig.4-Gens für die Zeit, in welcher der im Lig.4-Locus induzierte DSB noch nicht repariert ist. Eine solche transkriptionelle Stilllegung findet an Loci mit DNA-Schäden statt (Blackford & Jackson, 2017). Unter Berücksichtigung der von Brinkman et al. berichteten Locus-abhängigen, langsamen Kinetik der Reparatur Cas9-induzierter DSBs mit Reparatur-Halbwertszeiten von 8,8 oder 10,7 h an manchen Loci (Brinkman et al., 2018), wäre auch eine solche transkriptionelle Stilllegung des Lig.4-Gens nach DSB-Induktion möglich. Des Weiteren könnte aufgrund der beschriebenen Langsamkeit der Reparaturkinetik mancher Cas9-induzierter DSB dem Lig.4-Protein genug Zeit zur Degradation gegeben werden, bevor der DSB auf dem T11-Plasmid repariert wird.

Zur weiteren Überprüfung der im BRET-Reporter-Assay generierten Ergebnisse wäre eine Erprobung der verwendeten DNA-Ligase-KO-Strategie in weiteren Assays zur NHEJ-vermittelten DNA-Reparatur wie beispielsweise dem TLR-Assay, welches auch geeignet ist, die Rate an mutagenem NHEJ zu quantifizieren (Certo et al., 2011), sinnvoll. Zudem ist eine Modifikation des in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsaufbaus unter Nutzung des BRET-Reporter-Assay im Sinne eines Rescue-Experimentes (Graham & Root, 2015) zu empfehlen (siehe Kapitel 4.1), um die kausale Wirkung des Lig.4-KO auf die Abnahme der NHEJ-Aktivität in HEK 293T-Zellen weiter zu untermauern. Des

Weiteren lässt sich das BRET-Reporter-Assay auch in anderen Zelllinien einsetzen (Wimmer et al., 2021), sodass eine Erprobung der verwendeten DNA-Ligase-KO-Strategie im BRET-Reporter-Assay auch in anderen humanen Zelllinien möglich wäre.

4.3 Veränderungen des DNA-Ligase-Protein-Gehalts von HEK 293T-Zellen nach Anwendung der CRISPR/Cas9-vermittelten KO-Strategie

Bei erfolgreicher Durchführung eines KO humaner DNA-Ligasen mittels der in der AG Stieger generierten DNA-Ligase-KO-Plasmide und Cas9 ist eine verringerte Expression des jeweiligen DNA-Ligase-Proteins in den Zellen zu erwarten. Die beiden auf den DNA-Ligase-KO-Plasmiden für Lig.1 und Lig.3 codierten gRNAs sollten dabei zu einer Cas9-vermittelten Induktion von zwei DSBs im jeweiligen DNA-Ligase-Locus im Genom der Zellen mit nachfolgendem Verlust der dazwischenliegenden DNA-Abschnitte führen. Dies sollte die Deletion eines großen Teils des jeweiligen Ligase-Gens bedingen. In der Literatur ist eine Erzeugung von Klonen mit Deletionen bis zu einer Größe von mehr als 1 Mbp sowie eine routinemäßige Erzeugung mehrerer biallelisch deletierter Klone mit Deletionen einer Größe von bis zu 100 kbp bei Verwendung von zwei gRNAs beschrieben (Bauer et al., 2015; Canver et al., 2017).

Die Target-Sequenz der verwendeten Lig.4-gRNA liegt in Exon 2 der Lig.4-Gens. Eine ähnliche Strategie der DSB-Induktion im zweiten Exon des Lig.4-Gens wurde in verschiedenen Studien angewandt, wobei eine Herunterregulation der Lig.4 gezeigt werden konnte (Luteijn et al., 2018; Schmid-Burgk et al., 2016).

Um den Nachweis einer Veränderung des DNA-Ligase-Protein-Gehalts in humanen Zellen nach Kotransfektion eines für Cas9 codierenden Plasmides und eines Plasmides, welches zur Expression einer gRNA, komplementär zu einem der drei humanen DNA-Ligase-Loci führt, zu erbringen, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Strategien angewendet.

Initial sollte der Nachweis einer verringerten DNA-Ligase-Protein-Expression im Western Blot erfolgen. Der Lig.3-Western Blot konnte dabei soweit optimiert werden, dass ein Vergleich von Gesamtproteinisolaten aus HEK 293T-Zellen, die lediglich mit einem Cas9-Expressions-Plasmid (Cas9-BFP) transfiziert worden waren, und HEK 293T-Zellen, die zusätzlich mit einem der drei DNA-Ligase-KO-Plasmide kotransfiziert worden waren, möglich wurde. Ein eindeutiger und reproduzierbarer Nachweis einer verringerten Lig.3-Expression nach erfolgtem Lig.3-KO ließ sich jedoch im Western Blot nicht erbringen. Ursächlich war hierfür mutmaßlich die in der Fluoreszenzmikroskopie

und der Auswertung der Anreicherung erfolgreich transfizierter Zellen mittels FACS abgeschätzte geringe Transfektionseffizienz der in dieser Arbeit angewandten PEI-vermittelten Transfektion. Der dadurch bedingte große Anteil an Zellen, die nicht mit dem Cas9-BFP- und dem Lig.3-KO-Plasmid transfiziert worden waren und somit weiterhin Lig.3-Protein exprimierten, erschwerte dabei die Detektion einer möglichen verringerten Lig.3-Expression in den wenigen Zellen, die erfolgreich transfiziert worden waren, im Western Blot. Verschiedene Gruppen konnten einen Nachweis der verminderten DNA-Ligase-Protein-Expression in humanen Zellen nach CRISPR-Cas9-vermitteltem KO im Western Blot erbringen (Balmus et al., 2019; Long et al., 2017; Luteijn et al., 2018; Schmid-Burgk et al., 2016). Der wesentliche Unterschied zur vorliegenden Dissertation dürfte dabei in der in den genannten Studien stattgefundenen Erzeugung DNA-Ligase-defizienter stabiler Zelllinien bestanden haben, sodass eine homogene Population von Zellen ohne DNA-Ligase-Expression und keine Mischpopulation von Zellen mit DNA-Ligase-Expression und möglicher fehlender DNA-Ligase-Expression, wie in der vorliegenden Arbeit, bestanden hatte. Eine Generierung einer solchen DNA-Ligase-defizienten stabilen Zelllinie durch Anwendung der in unserer Arbeitsgruppe hergestellten DNA-Ligase-KO-Plasmide mit nachfolgendem entsprechenden Selektionsschritt könnte dementsprechend eine Möglichkeit darstellen, eine verringerte Expression der DNA-Ligasen auch im Western Blot eindeutig darzustellen. Eine weitere Möglichkeit bestünde in einer Erhöhung der Transfektionseffizienz durch weitere Optimierung der PEI-vermittelten Transfektion oder der Anwendung alternativer Transfektionsstrategien wie beispielsweise alternativen chemischen Transfektionsmethoden, viraler Transduktion oder physikalischen Transfektionsmethoden (Fajrial et al., 2020).

In der vorliegenden Arbeit wurde, auch in Anbetracht der Probleme bei der Optimierung des Lig.1- und Lig.4-Western Blots, eine andere Strategie gewählt: Die Quantifikation der DNA-Ligase-Protein-Menge in Proteinisolaten mittels ELISA nach zuvor durchgeführter Anreicherung von BFP-positiven und damit erfolgreich transfizierten HEK 293T-Zellen mittels FACS. Hierbei gelang für Lig.1 und für Lig.3 der einmalige Nachweis sowohl des Zielproteins als auch eines verringerten DNA-Ligase-Proteingehalts der Zellen nach Kotransfektion des Cas9-BFP- und des entsprechenden DNA-Ligase-KO-Plasmides im Vergleich zur Transfektion des Cas9-BFP-Plasmides allein. Eine wesentliche Limitation ist in diesem Zusammenhang allerdings die Tatsache, dass die FACS-Anreicherung sowie auch das nachfolgende ELISA nur einmalig durchgeführt

werden konnte, sodass sich sowohl die angegebenen Standardabweichungen als auch die Durchführung des t-Tests auf die Messung der zwei verglichenen Proteinisolate als Triplikate beziehen. Die statistische Validität und somit die Aussagekraft sind dadurch eingeschränkt. Der einmalige Nachweis des verringerten Lig.1- und Lig.3-Proteingehalts ist somit nur als starker Hinweis auf eine verringerte Lig.1- und Lig.3-Expression durch die hier verwendete DNA-Ligase-KO-Strategie und nicht als abschließender Beweis zu werten. Eine wiederholte Durchführung des beschriebenen Experimentes wäre dementsprechend sinnvoll, um den Nachweis einer verringerten DNA-Ligase-Expression nach Anwendung der DNA-Ligase-KO-Strategie zu erbringen. Für Lig.4 konnten im ELISA keine sinnvollen Werte der Proteinkonzentration, bei einmaliger Durchführung, erhalten werden. Bedingt war dies möglicherweise durch den Auftrag eines zu gering konzentrierten Proteinisolats, sodass auch die Konzentration an Lig.4-Protein unterhalb des Bereiches lag, in welchem das verwendete Lig.4-ELISA-Kit valide Messwerte generieren kann. Jedoch sind auch andere Störeinflüsse bei der Durchführung des Lig.4-ELISA nicht auszuschließen. Auch das Lig.4-ELISA nach FACS-Anreicherung erfolgreich transfizierter Zellen sollte dementsprechend nach Optimierung der ELISA-Prozedur in mehrfacher Ausführung durchgeführt werden, um eine mögliche Verringerung der Lig.4-Expression durch die verwendete KO-Strategie erkennen zu können.

Eine weitere Option zur Darstellung des erfolgten DNA-Ligase-KO wäre der Nachweis eines verringerten DNA-Ligase-mRNA-Gehalts der Zellen nach Kotransfektion des Cas9-BFP- und jeweiligen DNA-Ligase-KO-Plasmides durch real time quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Ein derartiger Ansatz wurde zum Beispiel von Yan et al. nach RNA-Interferenz-induziertem „knock-down“ der Lig.4 in HEK 293T-Zellen gewählt (Yan et al., 2016). Des Weiteren wäre eine Darstellung der angestrebten CRISPR/Cas9- und NHEJ-vermittelten Mutationen in den DNA-Ligase-Genen auf Ebene des Genoms mittels Sequenzierung möglich, wie dies bereits in verschiedenen Studien an humanen Zellen durchgeführt wurde (Hwang et al., 2020; Long et al., 2017; Maffucci et al., 2018; Schmid-Burgk et al., 2016).

4.4 Auswirkungen der CRISPR/Cas9-vermittelten DNA-Ligase-KO-Strategie auf die Viabilität von HEK 293T-Zellen

Mögliche Auswirkung unserer DNA-Ligase-KO-Strategie auf die Viabilität von HEK 293T-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels MTT-Assay evaluiert. Gemessen wurde die über die Fläche der Zellkultur-Wells gemittelte optischen Dichte bei 570 nm

als Maß für die Reduktion von MTT zu Formazan durch die Stoffwechselaktivität lebender Zellen (Stepanenko & Dmitrenko, 2015). Die Zugabe von MTT zu den Wells erfolgte dabei jeweils ca. 24 h nach der entsprechenden Behandlung der Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte wie auch die Auswertung des MMEJ-Assay in Form einer Randomized Block-ANOVA bzw. Repeated Measures-ANOVA mit den einzelnen Wiederholungen des Versuchs als Blöcken, wie von Lew vorgeschlagen (Lew, 2007). Ziel war dabei Versuchstags-abhängige Störfaktoren wie beispielsweise Schwankungen in der Anzahl der initial ausgesäten Zellen, welche die beobachteten Ergebnisse über die Kontrollgruppe und alle Experimentalgruppen hinweg beeinflussten und somit zu einer starken Variabilität zwischen den Versuchstagen und einer Verbundenheit der einzelnen Gruppen führen können, zu kontrollieren.

In die Durchführung der Versuche wurde eine Mediumkontrolle ohne Aussaat von Zellen und eine Negativkontrolle, in welcher den Wells 60 µl Ethanol zugegeben wurden, um die Zellen sicher abzutöten, implementiert. Die in diesen Kontrollen gemessenen optischen Dichten bei 570 nm waren, wie erwartet, im Vergleich zu allen anderen Wells signifikant reduziert.

Kein signifikanter Unterschied der optischen Dichte bei 570 nm konnte zwischen Wells mit der Transfektion des Cas9-BFP-Plasmides alleine und Wells mit Kotransfektion des Cas9-BFP- und eines DNA-Ligase-KO-Plasmides gefunden werden. Es wurde daher die Alternativhypothese einer zusätzlichen Senkung der Viabilität durch die Kotransfektion des Cas9-BFP- und eines DNA-Ligase-KO-Plasmides im Vergleich zur alleinigen Transfektion des Cas9-BFP-Plasmides verworfen. Es konnte also in dem durchgeführten MTT-Assay im betrachteten Zeitraum von 24 h nach Transfektion kein zusätzlicher toxischer Effekt unserer DNA-Ligase-KO-Strategie im Vergleich zur alleinigen Transfektion des Cas9-BFP-Plasmides nachgewiesen werden.

Die fehlende Veränderung der zellulären Stoffwechselaktivität bei Kotransfektion des Cas9-BFP- und des Lig.1-KO-Plasmides im Vergleich zur alleinigen Transfektion des Cas9-BFP-Plasmides deckt sich mit den Beobachtungen von Maffucci et al., die in der Lage waren, eine lebensfähige Lig.1-defiziente HEK 293T-Zelllinie mittels CRISPR/Cas9-vermitteltem KO zu generieren (Maffucci et al., 2018). Lig.1-defiziente HEK 293T-Zellen scheinen also prinzipiell lebensfähig zu sein. Han et al., die in der Lage waren, eine lebensfähige, murine B-Zelllinie (CH12F3) mit Lig.1-Defizienz zu generieren, sowie Arakawa et al., die lebensfähige Hühner-B-Zellen (DT40) mit Lig.1-Defizienz erhalten konnten, stellten keine Einschränkung der Proliferationsfähigkeit

Lig.1-defizienter Zellen fest (Arakawa et al., 2012; Han et al., 2014). Allerdings könnte auch der in der vorliegenden Dissertation gewählte Zeitraum von 24 h nach Transfektion bis zur Durchführung des MTT-Assay zu kurz gewesen sein, um negative Effekte der verwendeten Lig.1-KO-Strategie erkennen zu können. Eine zu geringe Sensitivität des in dieser Arbeit verwendeten MTT-Assays wäre eine weitere Erklärungsmöglichkeit.

Die mitochondriale Lig.3-Isoform ist die einzige DNA-Ligase des Mitochondriums und daher für die Reparatur und Replikation des mitochondrialen Genoms notwendig (Tomkinson et al., 2013). Ein Fehlen der Lig.3-Aktivität führt dementsprechend schlussendlich zu einem Verlust der mitochondrialen DNA (mtDNA) mit Ausbildung eines sog. p^0 -Phänotyps, der zu einer Abhängigkeit von adäquat zusammengesetzten Kulturmedien führt (Shokolenko et al., 2013). Auch in humanen Zellen (HCT116) konnte eine Abhängigkeit der Lebensfähigkeit von der Tätigkeit der Lig.3 im Mitochondrium gezeigt werden (Oh et al., 2014). Shokolenko et al. konnten in einer Studie an einer murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)-Zelllinie, in denen beide Lig.3-Allele deletiert worden waren und die dementsprechend einen Verlust der mtDNA zeigten, zeigen, dass diese abhängig vom Zusatz von Pyruvat und Uridin zum Kulturmedium wurden. Fehlten Pyruvat und Uridin, so stellten die Zellen binnen 24 h ihr Wachstum ein. Binnen 48 h setzte ein deutlich erkennbares Sterben der Zellen ein. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass stark verringerte Proteinmengen an mitochondrialer Lig.3 in MEF für die Replikation der mtDNA und Aufrechterhaltung der Zellatmung sowie in HeLa-Zellen für den Erhalt einer normalen Anzahl an mtDNA-Kopien hinreichend waren (Shokolenko et al., 2013). In der vorliegenden Dissertation war das Medium nur mit Pyruvat, nicht jedoch mit Uridin supplementiert. Ein wesentlicher Unterschied der vorliegenden Dissertation zu der genannten Studie von Shokolenko ist, dass in der vorliegenden Dissertation die Depletion der mtDNA nicht abgewartet wurde. Die Herbeiführung des Lig.3-KO erfolgte stattdessen nur für die Dauer der einzelnen Experimente. Es ist unter Beachtung der Ergebnisse von Shokolenko et al. dementsprechend möglich, dass nach erfolgtem Lig.3-KO noch für eine gewisse Zeit eine für die Aufrechterhaltung einer ausreichenden mtDNA-Menge hinreichende Menge an Lig.3-Protein in den Mitochondrien vorhanden ist, bevor dieses verloren geht und es zu einer Abnahme des mtDNA-Gehalts mit der daraus folgenden Abhängigkeit von Pyruvat und Uridin oder dem Zugrundegehen der Zellen kommt. Die in dieser Arbeit beobachtete, fehlende Abnahme des zellulären Stoffwechsels im MTT-Assay 24 h nach Kotransfektion des Cas9-BFP- und des Lig.3-KO-Plasmids im Vergleich zur alleinigen Transfektion des Cas9-BFP-Plasmids könnte

hiermit erklärt werden. So konnten auch Arakawa et al. den Tod aller Zellen nach Cre-Rekombinase-vermittelter Lig.3-Deletion in DT40-Zellen erst 5 Tage nach Einleitung der Deletion beobachten. Eine deutliche Abnahme des Lig.3-Proteins war dabei erst nach 3 Tagen zu beobachten, obgleich die Lig.3-mRNA binnen 12 h unter die Nachweisgrenze fiel (Arakawa et al., 2012). Paul et al. konnten den Beginn der Apoptose von DT40-Zellen 4 Tage nach Cre-vermittelter Deletion des Lig.3-Gens beobachten (Paul et al., 2013). Bei Shokolenko et al. und auch in anderen Studien wurde die länger dauernde Kultur Lig.3-defizienter Zelllinien alternativ dadurch ermöglicht, dass eine DNA-Ligase-Variante, welche ausschließlich in die Mitochondrien transloziert wird, in den Zellen exprimiert wurde (Arakawa et al., 2012; Lu et al., 2016; Shokolenko et al., 2013; Simsek, Furda et al., 2011). Ein ähnliches Vorgehen oder die Supplementation von Pyruvat und Uridin wäre auch bei länger dauernden Experimenten unter Anwendung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lig.3-KO-Strategie empfehlenswert. Allerdings konnte auch bei Supplementation der mitochondrialen Lig.3 eine eingeschränkte Wachstumsrate von humanen HCT116-Zellen, möglicherweise durch das Fehlen der nukleären Lig.3 oder eine insuffiziente Tätigkeit der mitochondrialen Lig.3, beobachtet werden (Oh et al., 2014). Die fehlende Erkennung negativer Effekte der in dieser Arbeit angewandten Lig.3-KO-Strategie könnte auch in einer zu geringen Sensitivität des verwendeten MTT-Assay begründet liegen.

In verschiedenen Studien konnten lebensfähige Lig.4-defiziente Zellen erhalten werden. So zum Beispiel auch HEK 293-Zellen (Schmid-Burgk et al., 2016). Prinzipiell scheinen Lig.4-defiziente HEK 293-Zellen also lebensfähig zu sein. In Studien an murinen embryonalen Fibroblasten (Frank et al., 1998) und DT40-Zellen (Arakawa et al., 2012) konnte dabei eine verringerte Proliferationsfähigkeit Lig.4-defizienter Zellen beobachtet werden. CH12F3-Zellen ohne Zytokinstimulation (Han & Yu, 2008) und humane prä-B-Zellen (Nalm-6) (Grawunder et al., 1998) mit Lig.4-Defizienz wiesen demgegenüber keine Einschränkung der Proliferationsfähigkeit auf. In der vorliegenden Arbeit konnte innerhalb eines Zeitraums von 24 h kein negativer Effekt der verwendeten Lig.4-KO-Strategie auf die mit der Viabilität korrelierte Stoffwechselaktivität von HEK 293T-Zellen im Vergleich zur alleinigen Transfektion des Cas9-BFP-Plasmids ausgemacht werden. Mögliche Erklärungsstrategien hierfür wären u.a. eine Zelltyp-abhängige Notwendigkeit von Lig.4 für die Zellproliferation, ein späteres Auftreten von negativen Effekten auf die Viabilität der Zellen als 24 h sowie eine zu geringe Sensitivität des verwendeten MTT-Assay.

Eine signifikante Reduktion der optischen Dichte bei 570 nm konnte nachgewiesen werden, wenn Wells mit unbehandelten Zellen mit Wells verglichen wurden, in welchen die Zellen mit dem Cas9-BFP-Plasmid alleine oder dem Cas9-BFP-Plasmid in Kombination mit dem Lig.1-, Lig.3- oder Lig.4-KO-Plasmid kotransfiziert worden waren, also in allen Wells die mit Plasmid-DNA transfiziert worden waren. Die hier beobachtete Reduktion geht möglicherweise auf eine unspezifische Toxizität der PEI-vermittelten Transfektion von DNA zurück.

Die erhaltenen Ergebnisse im MTT-Assay müssen vor dem Hintergrund der niedrigen beobachteten Transfektionseffizienz unseres PEI-vermittelten Ansatzes mit Vorsicht interpretiert werden. Ein geringerer Anteil erfolgreich transfizierter Zellen resultiert in einem geringeren Anteil an Zellen, in denen die verwendete DNA-Ligase-KO-Strategie mögliche toxische Effekte entfalten kann. Dies könnte zu einer Unterschätzung möglicher negativer Effekte auf die Zellviabilität im MTT-Assay führen. Das Zeitfenster der MTT-Zugabe von 24 h nach erfolgter Transfektion wurde ebenfalls mit Blick auf die niedrige Transfektionseffizienz gewählt: Aufgrund der heterogenen Zellpopulation von erfolgreich transfizierten und nicht-transfizierten Zellen zu Gunsten der nicht-transfizierten Zellen hätte bei der Wahl größerer Zeiträume und dementsprechend dem Zustandekommen zusätzlicher Zellteilungen die Möglichkeit bestanden, dass sich die Zellpopulation zu einem späteren Zeitpunkt zu einem noch größeren Teil aus nicht-transfizierten Zellen zusammensetzt. Verstärkt worden wäre dieser Effekt eventuell zusätzlich durch mögliche Selektionsvorteile von nicht-transfizierten gegenüber transfizierten Zellen. Die zustande kommende MTT-Reduktion wäre dann im Wesentlichen durch die Stoffwechsellätigkeit nicht-transfizierter Zellen bedingt gewesen, was mögliche negative Effekte der verwendeten KO-Strategie auf die transfizierten Zellen potentiell maskiert hätte. Zudem sollte die Interpretation der Ergebnisse wie auch beim MMEJ- und BRET-Reporter-Assay aufgrund des fehlenden eindeutigen KO-Nachweises auf Proteinebene (siehe Kapitel 4.1) vorsichtig erfolgen.

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte MTT-Assay diene daher nur einer ersten Evaluation möglicher negativer Effekte unserer DNA-Ligase-KO-Strategie auf die Viabilität humaner Zellen. Zur genaueren Bewertung möglicher toxischer Effekte sollten sich weitere Versuche anschließen. Neben Maßnahmen zur Erhöhung des Anteils erfolgreich transfizierter Zellen ist hierbei unter anderem an eine Einbeziehung weiterer humaner Zelllinien zu denken, um eine Zelltyp-abhängige Zytotoxizität der KO-Strategie aufdecken zu können. Des Weiteren wäre bei erfolgreicher Erhöhung der

Transfektionseffizienz die Evaluation möglicher zytotoxischer Effekte über längere Zeiträume als 24 h sinnvoll, um die Detektion später auftretender Effekte auf die Viabilität humaner Zellen zu ermöglichen. Durch geeignete Selektionsstrategien könnten unter Anwendung unserer KO-Strategie auch homogene Zellpopulationen generiert werden, welche dann hinsichtlich ihrer Viabilität, Proliferations- und Nekrose/Apoptose-Rate mit Wildtypzellen verglichen werden könnten, wie dies bereits in verschiedenen Studien durchgeführt wurde (Arakawa et al., 2012; Han et al., 2014; Paul et al., 2013). Eine weitere Limitation liegt in der Natur des MTT-Assay, die Viabilität von Zellen nicht direkt zu messen, sondern stattdessen die Aktivität bestimmter metabolischer Vorgänge lebender Zellen. Dementsprechend ist ein Über- oder Unterschätzen von toxischen Effekten auf Zellen im MTT-Assay möglich, wenn die zugrundeliegende Behandlung der Zellen gleichzeitig einen Einfluss auf entsprechende zur MTT-Reduktion führende metabolische Vorgänge hat. Die Anwendung eines zweiten, nicht auf diesen metabolischen Vorgängen beruhenden Assays zur Evaluation der Zellviabilität wäre dementsprechend sinnvoll. (Stepanenko & Dmitrenko, 2015).

4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Bei Kotransfektion der in dieser Arbeit verwendeten DNA-Ligase-KO-Plasmide ließen sich Veränderungen in dem in der AG Stieger generierten MMEJ-Assay (Yanik et al., 2018) und BRET-Reporter-Assay (Wimmer et al., 2021) beobachten, welche sich möglicherweise auf eine Beeinflussung der DSB-Reparatur in den verwendeten HEK 293T-Zellen zurückführen lassen. Um die beobachteten Veränderungen ursächlich auf eine tatsächliche Suppression der DNA-Ligase-Aktivität bedingt durch eine verringerte Expression der DNA-Ligasen zurückführen zu können, sollte ein Nachweis der Abnahme von DNA-Ligase-mRNA oder -Protein in den Zellen erbracht werden. Eine mögliche Option um dies zu erreichen, wäre die mehrfache Wiederholung der in dieser Arbeit angewandten Strategie bestehend aus der FACS-Anreicherung erfolgreich transfizierter Zellen mit nachfolgender Quantifikation des DNA-Ligase-Proteins in Proteinisolaten aus derartig angereicherten Zellen. In einem Zeitraum 24 h nach Transfektion konnte im MTT-Assay keine zusätzliche Toxizität bei Kotransfektion der DNA-Ligase-KO-Plasmide gemeinsam mit einem Cas9-Expressionsplasmid im Vergleich zur alleinigen Transfektion des Cas9-Expressionsplasmides beobachtet werden. Trotzdem ist eine noch sensitivere und auch zu späteren Zeitpunkten stattfindende Evaluation möglicher Effekte der verwendeten DNA-Ligase-KO-Strategie auf Viabilität,

Proliferations- und Apoptose/Nekrose-Rate wünschenswert. Dies v.a. auch mit Blick auf die Tatsache, dass es im angewandten MMEJ-Assay zu einer Beeinflussung der Ergebnisse durch Änderungen von Viabilität, Proliferations- und Apoptose/Nekrose-Rate kommen müsste.

Eine Besonderheit des in dieser Arbeit verwendeten Ansatzes ist die gleichzeitige Transfektion der Assay-Komponenten mit den DNA-Ligase-KO-Plasmiden mit dem Ziel unter Ausnutzung der Fähigkeit des CRISPR/Cas9-Systems zum Multiplexing (Le Cong et al., 2013) simultan mit dem Beginn des jeweiligen Assay einen KO der entsprechenden DNA-Ligase herbeizuführen. In anderen Arbeiten zur nukleären DNA-Reparatur und Genome editing unter Verwendung CRISPR/Cas9-vermittelter DNA-Ligase-KOs wurden demgegenüber DNA-Ligase-defiziente Zellklone generiert, welche dann in den entsprechenden Experimenten zum Einsatz kamen (Balmus et al., 2019; Hwang et al., 2020; Lu et al., 2016; Schmid-Burgk et al., 2016).

Anzuraten wäre des Weiteren eine off target-Analyse der auf den DNA-Ligase-KO-Plasmiden codierten gRNAs, um mögliche off target-Effekte als Ursache der in den DNA-Reparatur-Assays beobachteten Veränderungen ausschließen zu können. Hierzu eignen sich verschiedene Sequenzierungsstrategien. Auch die Durchführung von Rescue-Experimenten wäre für die Bestätigung einer kausalen Rolle eines tatsächlichen DNA-Ligase-KOs an den gemachten Beobachtungen sinnvoll und könnte zum Ausschluss von off target-Effekten als Ursache für die gesehenen Veränderungen beitragen (Graham & Root, 2015).

Nach Erbringung des Nachweises, dass die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Ligase-KO-Plasmide tatsächlich einen KO der jeweiligen DNA-Ligase in humanen Zellen herbeiführen, kann die hier angewendete DNA-Ligase-KO-Strategie in weiteren Experimenten Anwendung finden. Aufgrund des irreversiblen Charakters eines so herbeigeführten KOs, sollte auf die Anwendung in vivo jedoch verzichtet werden. Hier sollte potentiell reversiblen Ansätzen zur Suppression der DNA-Ligase-Aktivität mittels zum Beispiel der pharmakologischen Manipulation durch SCR7 (Srivastava et al., 2012; Vartak et al., 2018), RNA-Interferenz (Robert et al., 2015; van Chu et al., 2015; Yan et al., 2016), der Verwendung der adenoviralen Proteine E1B55K und E4orf6 (Robert et al., 2015; van Chu et al., 2015) sowie CRISPRi (Ye et al., 2018) und CasRx (Pan et al., 2019) zur Beeinflussung des Ergebnisses von Genome editing-Strategien der Vorzug gegeben werden.

5 Zusammenfassung

Genome editing unter Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie genetisch bedingter Erkrankungen wie zum Beispiel erblicher Netzhautdystrophien dar. Die Korrektur pathogener Mutationen erfolgt dabei im Rahmen der Reparatur Cas9-induzierter Doppelstrangbrüche (DSBs) durch die zelleigenen DSB-Reparaturmechanismen wie Nonhomologous end joining (NHEJ), Homology-directed repair (HDR) und Microhomology-mediated end joining (MMEJ). Die DSB-Reparatur wird dabei durch die Mechanismus-spezifischen DNA-Ligasen 1, 3 und 4 komplettiert. Das Ergebnis der Korrektur ist dabei u.a. davon abhängig, welcher DSB-Reparaturmechanismus für die Reparatur verwendet wurde, sodass ein genaues Verständnis und Manipulationsmöglichkeiten der Reparaturmechanismen für die Entwicklung von Genome editing-basierten Therapiestrategien bedeutsam sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Erprobung einer CRISPR/Cas9-basierten „knock-out“ (KO)-Strategie für die drei humanen DNA-Ligasen in einem Luziferase-basierten Assay zu MMEJ-vermitteltem Genome editing und einem Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)-basierten Assay zu NHEJ-vermittelter DNA-Reparatur. Des Weiteren wurde mittels Western Blot und ELISA nach FACS-Anreicherung erfolgreich transfizierter Zellen der Versuch unternommen, eine Abnahme der DNA-Ligase-Proteinmenge in den Zellen nach Anwendung der DNA-Ligase-KO-Strategie nachzuweisen. Ein MTT-Assay diente der Evaluation möglicher toxischer Effekte der verwendeten DNA-Ligase-KO-Strategie. Die Durchführung der Versuche erfolgte an HEK-Zelllinien.

Bei Anwendung der DNA-Ligase-KO-Strategie konnten im Assay zu MMEJ-vermitteltem Genome editing eine verringerte Luziferaseaktivität in Abhängigkeit von der verwendeten Mikrohomologiemlänge und der individuellen DNA-Ligase, welche ausgeknockt wurde, beobachtet werden. Dies ist ein möglicher Hinweis auf einen verringerten Einbau der Luziferase-Sequenz in das zelluläre Genom. Im Assay zu NHEJ-vermittelter DNA-Reparatur konnte ein Anstieg der BRET-Ratio bei KO der NHEJ-assoziierten DNA-Ligase 4 beobachtet werden, als möglicher Hinweis auf eine verringerte NHEJ-Aktivität. Die Durchführung des ELISA nach FACS-Anreicherung erfolgreich transfizierter Zellen nach Anwendung der DNA-Ligase-KO-Strategie erbrachte einen ersten Hinweis auf einen verringerten Proteingehalt der DNA-Ligasen 1 und 3 in HEK 293T-Zellen. Im MTT-Assay konnten in einem Zeitraum von 24 h keine negativen Effekte der verwendeten DNA-Ligase-KO-Strategie auf die

Stoffwechselaktivität von HEK 293T-Zellen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ergaben sich erste Hinweise auf eine Beeinflussung der DNA-Reparatur in den verwendeten Assays in humanen Zellen durch die verwendete DNA-Ligase-KO-Strategie. Es konnten erste Hinweise auf eine verringerte Expression der DNA-Ligasen 1 und 3 nach Anwendung der betrachteten DNA-Ligase-KO-Strategie erhalten werden. Des Weiteren scheint die verwendete DNA-Ligase-KO-Strategie keine negativen Effekte auf die Viabilität von HEK 293T-Zellen in einem Zeitraum von 24 h zu haben.

6 Summary

Genome editing using the CRISPR/Cas9 system is a promising therapy approach for genetically diseases like inherited retinal dystrophies. The correction of pathogenic mutations is carried out as part of the repair of Cas9-induced double strand breaks (DSBs) by the cells own DSB repair mechanisms like Nonhomologous end joining (NHEJ), Homology-directed repair (HDR) and Microhomology-mediated end joining (MMEJ). The DSB repair is thereby completed by the mechanism-specific DNA ligases 1, 3 and 4. The result of the correction depends thereby on which DSB repair mechanism was used for the repair amongst others, so that a precise understanding as well as possibilities to manipulate the repair mechanisms are important for the development of genome editing-based therapy strategies.

The aim of the present thesis was therefore the testing of a CRISPR/Cas9-based knock out (KO) strategy for the three human DNA ligases in a luciferase-based Assay for MMEJ-mediated genome editing and a Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)-based assay for NHEJ-mediated DNA repair. Furthermore, the attempt was made to detect a decreased amount of DNA ligase protein within the cells after the application of the DNA ligase KO strategy by means of Western blot and ELISA after the enrichment of successfully transfected cells. An MTT assay served for the evaluation of possible toxic effects of the used DNA ligase KO strategy. The experiments were carried out on HEK cell lines.

When using the DNA ligase KO strategy, a reduced luciferase activity was observed in the assay for MMEJ-mediated genome editing, depending on the microhomology arm length and the individual ligase that was knocked out. This is a possible indication of a reduced incorporation of the luciferase sequence into the cellular genome. In the assay for NHEJ-mediated DNA repair an increase of the BRET-Ratio could be observed when knocking out the NHEJ-associated DNA ligase 4, as a possible indication of a reduced NHEJ activity. Carrying out the ELISA after FACS enrichment of successfully transfected cells after the application of the DNA ligase KO strategy provided a first indication of a reduced protein amount of the DNA ligases 1 and 3 in HEK 293T cells. In the MTT assay no negative effects of the used DNA ligase KO strategy on the metabolic activity of HEK 293T cells could be detected within a period of 24 h.

In summary, there were first indications for an influence of the used DNA ligase KO strategy on the DNA repair in the used assays in human cells. First indications for a reduced expression of the DNA ligases 1 and 3 after the application of the used DNA

ligase KO strategy could be obtained. Furthermore, the used DNA ligase KO strategy doesn't seem to have negative effects on the viability of HEK 293T cells within a period of 24 h.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
10x	zehnfach
1x	einfach
3′	3′-Ende einer Nukleinsäure
5′	5′-Ende einer Nukleinsäure
53BP1	TP53-binding protein 1
5x	fünffach
A	Adenin
a-EJ	alternative end joining
AG	Arbeitsgruppe
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	analysis of variance
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT	Österreich
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR/ATRIP	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein/ATR-interacting protein
BFP	blau-fluoreszierendes Protein
BLM	Bloom-Syndrom-Protein (RecQ2)
bp	Basenpaare
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein
BRCA2	Breast cancer type 2 susceptibility protein
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
C	Cytosin
CA	Kalifornien
Cas	CRISPR associated genes
Cas9	CRISPR associated protein 9
CasRx	guide-Sequenz-abhängige Ribonuklease
CH	Schweiz
CH12F3	Murine Lymphom-Zelllinie
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Zytomegalievirus
Cre	„causes recombination“ (Rekombinase)
CRISPaint	CRISPR-assisted insertion tagging
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CRISPRi	CRISPR interference
crRNA	CRISPR-RNA
CtIP	CtBP(C-terminal binding protein 1)-interacting protein
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMEM +++	DMEM mit Supplementen (siehe Tabelle 2.8)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DNA2	DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2
DNA-PKc	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DT40	<i>Gallus gallus</i> -Lymphoblasten-Zelllinie
E1B55K	adenovirales E1B-Protein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa
E4orf6	adenovirales Protein, welches mit E1B55K eine Ubiquitinligase bildet
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EXO1	Exonuclease 1
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FKS	Fetales Kälberserum
FR	Frankreich
G	Guanin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GOI	Gene of interest
gRNA	guide RNA
h	Stunden (hours)
HCT116	Humane Colocarcinom-Zelllinie
HDR	Homology-directed repair
HEK 293	human embryonic kidney 293(-Zellen)
HEK 293T	gut transfizierbares Derivat der HEK293T-Zellen
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HITI	homology-independent targeted integration
HRP	horseradish peroxidase
HTD114	Humane Fibrosarkom-Zelllinie
IgG	Immunglobulin G
IL	Illinois
Indel	Insertionen und/oder Deletionen
Kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KO	„knock-out“
Ku	Heterodimeres Protein aus Ku70 und Ku80. Beteiligt an Nonhomologous end joining.
LB	Luria Broth Base
Lig.1	DNA-Ligase 1
Lig.3	DNA-Ligase 3
Lig.4	DNA-Ligase 4
Luc	Luziferase
M	molar
mA	Milliampere

Mbp	Megabasenpaare
mBU	milli BRET units
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
mg	Milligramm
MH	Mikrohomologie/mikrohomologe Sequenz
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMEJ	Microhomology-mediated end joining
MO	Missouri
mORF15	murines RPGR-ORF15-Exon
Mre11	Double-strand break repair protein Mre11 (Meiotic recombination 11 homolog 1)
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex
mRNA	messenger-RNA
mtDNA	mitochondriale DNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N	beliebige Base
Nalm-6	Humane precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia-Zelllinie
Nbs1	Nibrin
ng	Nanogramm
NHEJ	Nonhomologous end joining
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
Nu7026	DNA-PK-Inhibitor
ObLiGaRe	Obligate Ligation-Gated Recombination
OD	optische Dichte
OH	Hydroxy-Gruppe
p	Wahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	protospacer adjacent motif
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	phosphate-buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PEI	Polyethylenimin
pH	Potentia hydrogenii
PITCh	Precise Integration into Target Chromosome
Pol μ	DNA-Polymerase mu
Pol δ	DNA-Polymerase delta
Pol ϵ	DNA-Polymerase epsilon
Pol θ	DNA-Polymerase theta
Pol λ	DNA-Polymerase lambda
Rad50	RAD50 Double Strand Break Repair Protein
Rad51	Rad51-Rekombinase
Rad52	DNA repair protein RAD52 homolog
RecA	Rekombinase A
RLU	relative luminescence units
RLuc8	durch Mutation optimierte Version der Renilla-Luziferase

RNA	ribonucleic acid
RP	Retinitis pigmentosa
RPA	Replication Protein A
RPE65	Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein
RPGR	Retinitis pigmentosa GTPase regulator
RPGR-Ex 1-19	RPGR-Isoform mit Expression der Exons 1 bis 19
RPGR-ORF15	RPGR-Isoform mit Expression der Exons 1 bis 14 sowie des Exons ORF15 bestehend aus dem alternativ gespleißten Exon 15 und Intron 15
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SCR7	Inhibitor von Lig.4 und (in geringerem Maße) Lig.3
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDSA	synthesis-dependend strand annealing
sgRNA	single guide RNA
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> -Cas9
T	Thymin
TALENs	Transcription activator-like effector nucleases
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	<i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethylendiamin
tracrRNA	trans-activating crRNA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX	Texas
U	Internationale Einheit
UK	United Kingdom
USA	United States of America
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
WA	Washington
WRN	Werner syndrome ATP-dependent helicase
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
XLF	XRCC4-like factor (Non-homologous end-joining factor 1)
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung der DSB-Induktion durch Cas9.	7
Abbildung 1.2:	Ablauf der DSB-Reparatur.	8
Abbildung 1.3:	Übersicht über die Nutzung der verschiedenen DSB-Reparaturmechanismen im Rahmen des Genome editing.	12
Abbildung 2.1:	Darstellung des in SDS-PAGE und Western Blot verwendeten Protein-Größenmarkers.	28
Abbildung 2.2:	Prinzip des MMEJ-Assay.	45
Abbildung 2.3:	Prinzip des BRET-Reporter-Assay.	49
Abbildung 3.1:	Graphische Zusammenfassung der in dieser Arbeit durchgeführten Arbeitsschritte mit Ergebnissen.	53
Abbildung 3.2:	Fluoreszenzmikroskopie.	54
Abbildung 3.3:	Verdünnungsreihe mit Gesamtproteinisolat aus nicht-transfizierten HEK 293T-Zellen. Es wurde ein anti-Lig.1-Antikörper verwendet.	55
Abbildung 3.4:	Verdünnungsreihe mit Gesamtproteinisolat aus nicht-transfizierten HEK 293T-Zellen. Es wurde ein anti-Lig.3-Antikörper verwendet.	55
Abbildung 3.5:	Verdünnungsreihe mit Gesamtproteinisolat aus nicht-transfizierten HEK 293T-Zellen unter Verwendung von anti-Lig.4-Antikörpern.	56
Abbildung 3.6:	Zwei exemplarisch dargestellte Western Blots zum Nachweis von Veränderungen des Lig.3-Proteingehalts in HEK 293T-Zellen.	57
Abbildung 3.7:	Darstellung der verwendeten Gates für die FACS-Anreicherung von Zellen, die nur mit dem Cas9-BFP-Plasmid transfiziert worden waren.	59
Abbildung 3.8:	Darstellung der verwendeten Gates für die FACS-Anreicherung von Zellen, die mit dem Cas9-BFP- und dem Lig.1-KO-Plasmid kotransfiziert worden waren.	60
Abbildung 3.9:	Darstellung der verwendeten Gates für die FACS-Anreicherung von Zellen, die mit dem Cas9-BFP- und dem Lig.3-KO-Plasmid kotransfiziert worden waren.	61

Abbildung 3.10: Darstellung der verwendeten Gates für die FACS-Anreicherung von Zellen, die mit dem Cas9-BFP- und dem Lig.4-KO -Plasmid kotransfiziert worden waren.	62
Abbildung 3.11: Ergebnisse des Lig.1-ELISA.	63
Abbildung 3.12: Ergebnisse des Lig.3-ELISA.	64
Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Donorplasmide für das MMEJ-Assay.	65
Abbildung 3.14: Luziferaseaktivität im MMEJ-Assay bei Verwendung von Donorplasmiden mit einer Mikrohomologiearmlänge von 10 bp.	66
Abbildung 3.15: Luziferaseaktivität im MMEJ-Assay bei Verwendung von Donorplasmiden mit einer Mikrohomologiearmlänge von 15 bp.	67
Abbildung 3.16: Luziferaseaktivität im MMEJ-Assay bei Verwendung von Donorplasmiden mit einer Mikrohomologiearmlänge von 30 bp.	68
Abbildung 3.17: Schematische Darstellung des BRET-Reporter-Assay.	69
Abbildung 3.18: Ergebnisse des BRET-Reporter-Assay.	70
Abbildung 3.19: Ergebnisse des MTT-Assay	73

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Verwendete Geräte.	21
Tabelle 2.2:	Verwendete Verbrauchsmaterialien.	23
Tabelle 2.3:	Verwendete Chemikalien.	24
Tabelle 2.4:	Verwendete Vektoren und Plasmide.	25
Tabelle 2.5:	gRNA-Sequenzen der DNA-Ligase-KO-Plasmide.	27
Tabelle 2.6:	Verwendete Antikörper.	27
Tabelle 2.7:	Verwendete Stammlösungen.	29
Tabelle 2.8:	Verwendete Medien für die Zellkultur.	30
Tabelle 2.9:	Verwendete Bakterienstämme.	30
Tabelle 2.10:	Verwendete Zelllinien.	31
Tabelle 2.11:	Verwendete Reagenziensysteme und Kits.	31
Tabelle 2.12:	Verwendete Software.	31
Tabelle 2.13:	Reagenzienvolumina für Transfektionsexperimente.	35
Tabelle 2.14:	Reagenzienvolumina für die Proteinisolation aus Säugetierzellen.	36
Tabelle 2.15:	Transfektionsschema für die Quantifikation von DNA-Ligase-Protein nach CRISPR/Cas9-vermitteltem DNA-Ligase-KO.	37
Tabelle 2.16:	Zusammensetzung des 10 %-Trenngels für die SDS-PAGE.	40
Tabelle 2.17:	Zusammensetzung des 4 %-Sammelgels für die SDS-PAGE.	40
Tabelle 2.18:	Zusammensetzung des Western Blot-Transfer-Puffers.	42
Tabelle 2.19:	Durchführung der Proteindetektion auf der Nitrocellulosemembran.	43
Tabelle 2.20:	Transfektionsschema für das MMEJ-Assay.	47
Tabelle 2.21:	Transfektionsschema für das BRET-Reporter-Assay.	50
Tabelle 2.22:	Behandlung der Wells für das MTT-Assay.	51

10 Literaturverzeichnis

- Arakawa, H., Bednar, T., Wang, M., Paul, K., Mladenov, E., Bencsik-Theilen, A. A. & Iliakis, G. (2012). Functional redundancy between DNA ligases I and III in DNA replication in vertebrate cells. *Nucleic acids research*, 40(6), 2599–2610. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1024>
- Audebert, M., Salles, B. & Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *The Journal of biological chemistry*, 279(53), 55117–55126. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404524200>
- Auer, T. O., Durooure, K., Cian, A. de, Concordet, J.-P. & Del Bene, F. (2014). Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome research*, 24(1), 142–153. <https://doi.org/10.1101/gr.161638.113>
- Balmus, G., Pilger, D., Coates, J., Demir, M., Sczaniecka-Clift, M., Barros, A. C., Woods, M., Fu, B., Yang, F., Chen, E., Ostermaier, M., Stankovic, T., Ponstingl, H., Herzog, M., Yusa, K., Martinez, F. M., Durant, S. T., Galanty, Y., Beli, P., . . . Jackson, S. P. (2019). ATM orchestrates the DNA-damage response to counter toxic non-homologous end-joining at broken replication forks. *Nature communications*, 10(1), 87. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07729-2>
- Barman, A., Deb, B. & Chakraborty, S. (2020). A glance at genome editing with CRISPR-Cas9 technology. *Current genetics*, 66(3), 447–462. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01040-3>
- Barnes, D. E., Johnston, L. H., Kodama, K., Tomkinson, A. E., Lasko, D. D. & Lindahl, T. (1990). Human DNA ligase I cDNA: cloning and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(17), 6679–6683. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.17.6679>
- Bauer, D. E., Canver, M. C. & Orkin, S. H. (2015). Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9. *Journal of visualized experiments : JoVE*(95), e52118. <https://doi.org/10.3791/52118>

- Benati, D., Patrizi, C. & Recchia, A. (2020). Gene editing prospects for treating inherited retinal diseases. *Journal of medical genetics*, 57(7), 437–444. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106473>
- Bétermier, M., Bertrand, P. & Lopez, B. S. (2014). Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS genetics*, 10(1), e1004086. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004086>
- Beumer, K. J., Trautman, J. K., Bozas, A., Liu, J.-L., Rutter, J., Gall, J. G. & Carroll, D. (2008). Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50), 19821–19826. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810475105>
- Beumer, K. J., Trautman, J. K., Mukherjee, K. & Carroll, D. (2013). Donor DNA Utilization During Gene Targeting with Zinc-Finger Nucleases. *G3 (Bethesda, Md.)*, 3(4), 657–664. <https://doi.org/10.1534/g3.112.005439>
- Bewick, V., Cheek, L. & Ball, J. (2004). Statistics review 10: further nonparametric methods. *Critical care (London, England)*, 8(3), 196–199. <https://doi.org/10.1186/cc2857>
- Bhat, S., Curach, N., Mostyn, T., Bains, G. S., Griffiths, K. R. & Emslie, K. R. (2010). Comparison of methods for accurate quantification of DNA mass concentration with traceability to the international system of units. *Analytical chemistry*, 82(17), 7185–7192. <https://doi.org/10.1021/ac100845m>
- Bischoff, N., Wimberger, S., Maresca, M. & Brakebusch, C. (2020). Improving Precise CRISPR Genome Editing by Small Molecules: Is there a Magic Potion? *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051318>
- Blackford, A. N. & Jackson, S. P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular cell*, 66(6), 801–817. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>
- Boboila, C., Oksenyich, V., Gostissa, M., Wang, J. H., Zha, S., Zhang, Y., Chai, H., Lee, C.-S., Jankovic, M., Saez, L.-M. A., Nussenzweig, M. C., McKinnon, P. J., Alt, F. W. & Schwer, B. (2012). Robust chromosomal DNA repair via alternative end-joining in the absence of X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), 2473–2478. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121470109>

- Bonner, W. A., Hulett, H. R., Sweet, R. G. & Herzenberg, L. A. (1972). Fluorescence activated cell sorting. *The Review of scientific instruments*, 43(3), 404–409.
<https://doi.org/10.1063/1.1685647>
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7297–7301.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- Brinkman, E. K., Chen, T., Haas, M. de, Holland, H. A., Akhtar, W. & van Steensel, B. (2018). Kinetics and Fidelity of the Repair of Cas9-Induced Double-Strand DNA Breaks. *Molecular cell*, 70(5), 801-813.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.04.016>
- Cai, Y., Cheng, T., Yao, Y., Li, X., Ma, Y., Li, L., Zhao, H., Bao, J., Zhang, M., Qiu, Z. & Xue, T. (2019). In vivo genome editing rescues photoreceptor degeneration via a Cas9/RecA-mediated homology-directed repair pathway. *Science advances*, 5(4), eaav3335. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav3335>
- Canver, M. C., Bauer, D. E., Dass, A., Yien, Y. Y., Chung, J., Masuda, T., Maeda, T., Paw, B. H. & Orkin, S. H. (2017). Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 292(6), 2556. <https://doi.org/10.1074/jbc.A114.564625>
- Cehajic Kapetanovic, J., McClements, M. E., La Martinez-Fernandez de Camara, C. & MacLaren, R. E. (2019). Molecular Strategies for RPGR Gene Therapy. *Genes*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/genes10090674>
- Certo, M. T., Ryu, B. Y., Annis, J. E., Garibov, M., Jarjour, J., Rawlings, D. J. & Scharenberg, A. M. (2011). Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints. *Nature methods*, 8(8), 671–676.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1648>

- Chaplin, A. K. & Blundell, T. L. (2020). Structural biology of multicomponent assemblies in DNA double-strand-break repair through non-homologous end joining. *Current opinion in structural biology*, 61, 9–16.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.09.008>
- Chen, X., Zhong, S., Zhu, X., Dziegielewska, B., Ellenberger, T., Wilson, G. M., MacKerell, A. D. & Tomkinson, A. E. (2008). Rational design of human DNA ligase inhibitors that target cellular DNA replication and repair. *Cancer research*, 68(9), 3169–3177. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6636>
- Le Cong, Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 819–823.
<https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Cox, D. B. T., Platt, R. J. & Zhang, F. (2015). Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature medicine*, 21(2), 121–131.
<https://doi.org/10.1038/nm.3793>
- Danner, E., Bashir, S., Yumlu, S., Wurst, W., Wefers, B. & Kühn, R. (2017). Control of gene editing by manipulation of DNA repair mechanisms. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 28(7-8), 262–274. <https://doi.org/10.1007/s00335-017-9688-5>
- Drenckhahn, D., Asan, E. & Benninghoff, A. (Hrsg.). (2004). *Anatomie: makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie / Benninghoff; Drenckhahn ; Bd. 2. Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut* (16. Aufl.). Elsevier Urban & Fischer.
- Ellenberger, T. & Tomkinson, A. E. (2008). Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights. *Annual review of biochemistry*, 77, 313–338.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061306.123941>
- Engvall, E. & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874.
[https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-x](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-x)
- Fajrial, A. K., He, Q. Q., Wirusanti, N. I., Slansky, J. E. & Ding, X. (2020). A review of emerging physical transfection methods for CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *Theranostics*, 10(12), 5532–5549. <https://doi.org/10.7150/thno.43465>

- Fonfara, I., Le Rhun, A., Chylinski, K., Makarova, K. S., Lécrivain, A.-L., Bzdrenga, J., Koonin, E. V. & Charpentier, E. (2014). Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic acids research*, 42(4), 2577–2590.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1074>
- Frank, K. M., Sekiguchi, J. M., Seidl, K. J., Swat, W., Rathbun, G. A., Cheng, H. L., Davidson, L., Kangaloo, L. & Alt, F. W. (1998). Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature*, 396(6707), 173–177. <https://doi.org/10.1038/24172>
- Gao, Y., Katyal, S., Lee, Y., Zhao, J., Rehg, J. E., Russell, H. R. & McKinnon, P. J. (2011). DNA ligase III is critical for mtDNA integrity but not Xrcc1-mediated nuclear DNA repair. *Nature*, 471(7337), 240–244.
<https://doi.org/10.1038/nature09773>
- Gaus, W. & Muehe, R. (2017). *Medizinische Statistik: Angewandte Biometrie für Ärzte und Gesundheitsberufe* (2. Aufl.). Schattauer Verlag. http://www.content-select.com/index.php?id=bib_view&ean=9783794590728
- Gerlach, M., Kraft, T., Brenner, B., Petersen, B., Niemann, H. & Montag, J. (2018). Efficient Knock-in of a Point Mutation in Porcine Fibroblasts Using the CRISPR/Cas9-GMNN Fusion Gene. *Genes*, 9(6).
<https://doi.org/10.3390/genes9060296>
- Goetz, J. D.-M., Motycka, T. A., Han, M., Jasin, M. & Tomkinson, A. E. (2005). Reduced repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination in a DNA ligase I-deficient human cell line. *DNA repair*, 4(6), 649–654.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.02.004>
- Graham, D. B. & Root, D. E. (2015). Resources for the design of CRISPR gene editing experiments. *Genome biology*, 16, 260. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0823-x>
- Grawunder, U., Zimmer, D., Fugmann, S., Schwarz, K. & Lieber, M. R. (1998). DNA Ligase IV Is Essential for V(D)J Recombination and DNA Double-Strand Break Repair in Human Precursor Lymphocytes. *Molecular cell*, 2(4), 477–484.
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80147-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80147-1)
- Han, L., Masani, S., Hsieh, C.-L. & Yu, K. (2014). DNA ligase I is not essential for mammalian cell viability. *Cell reports*, 7(2), 316–320.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.024>

- Han, L. & Yu, K. (2008). Altered kinetics of nonhomologous end joining and class switch recombination in ligase IV-deficient B cells. *The Journal of experimental medicine*, 205(12), 2745–2753. <https://doi.org/10.1084/jem.20081623>
- Hu, Z., Shi, Z., Guo, X., Jiang, B., Wang, G., Luo, D., Chen, Y. & Zhu, Y.-S. (2018). Ligase IV inhibitor SCR7 enhances gene editing directed by CRISPR-Cas9 and ssODN in human cancer cells. *Cell & bioscience*, 8, 12. <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0200-z>
- Hulett, H. R., Bonner, W. A., Barrett, J. & Herzenberg, L. A. (1969). Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science (New York, N.Y.)*, 166(3906), 747–749. <https://doi.org/10.1126/science.166.3906.747>
- Hwang, G.-H., Yu, J., Yang, S., Son, W. J., Lim, K., Kim, H. S., Kim, J.-S. & Bae, S. (2020). CRISPR-sub: Analysis of DNA substitution mutations caused by CRISPR-Cas9 in human cells. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 1686–1694. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.06.026>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Katyal, S. & McKinnon, P. J. (2011). Disconnecting XRCC1 and DNA ligase III. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(14), 2269–2275. <https://doi.org/10.4161/cc.10.14.16495>
- Keeler, A. M. & Flotte, T. R. (2019). Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Therapy in Light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where Are We, and How Did We Get Here? *Annual review of virology*, 6(1), 601–621. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015530>
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 10(3-4), 203–209. [https://doi.org/10.1016/0165-022x\(84\)90040-x](https://doi.org/10.1016/0165-022x(84)90040-x)
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

- Le Chalony, C., Hoffschir, F., Gauthier, L. R., Gross, J., Biard, D. S., Boussin, F. D. & Pennaneach, V. (2012). Partial complementation of a DNA ligase I deficiency by DNA ligase III and its impact on cell survival and telomere stability in mammalian cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *69*(17), 2933–2949. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0975-8>
- Lew, M. (2007). Good statistical practice in pharmacology. Problem 2. *British journal of pharmacology*, *152*(3), 299–303. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707372>
- Liang, L., Deng, L., Nguyen, S. C., Zhao, X., Maulion, C. D., Shao, C. & Tischfield, J. A. (2008). Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research*, *36*(10), 3297–3310. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn184>
- Lin, C., Li, H., Hao, M., Xiong, D., Luo, Y., Huang, C., Yuan, Q., Zhang, J. & Xia, N. (2016). Increasing the Efficiency of CRISPR/Cas9-mediated Precise Genome Editing of HSV-1 Virus in Human Cells. *Scientific reports*, *6*, 34531. <https://doi.org/10.1038/srep34531>
- Loening, A. M., Fenn, T. D., Wu, A. M. & Gambhir, S. S. (2006). Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, *19*(9), 391–400. <https://doi.org/10.1093/protein/gzl023>
- Long, Q., Yan, R., Hu, J., Cai, D., Mitra, B., Kim, E. S., Marchetti, A., Zhang, H., Wang, S., Liu, Y., Huang, A. & Guo, H. (2017). The role of host DNA ligases in hepadnavirus covalently closed circular DNA formation. *PLoS pathogens*, *13*(12), e1006784. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006784>
- Lu, G., Duan, J., Shu, S., Wang, X., Gao, L., Guo, J. & Zhang, Y. (2016). Ligase I and ligase III mediate the DNA double-strand break ligation in alternative end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(5), 1256–1260. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521597113>
- Luteijn, R. D., Drexler, I., Smith, G. L., Lebbink, R. J. & Wiertz, E. J. H. J. (2018). Mutagenic repair of double-stranded DNA breaks in vaccinia virus genomes requires cellular DNA ligase IV activity in the cytosol. *The Journal of general virology*, *99*(6), 790–804. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001034>
- Ma, M., Rodriguez, A. & Sugimoto, K. (2020). Activation of ATR-related protein kinase upon DNA damage recognition. *Current genetics*, *66*(2), 327–333. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01039-w>

- Mackey, Z. B., Ramos, W., Levin, D. S., Walter, C. A., McCarrey, J. R. & Tomkinson, A. E. (1997). An alternative splicing event which occurs in mouse pachytene spermatocytes generates a form of DNA ligase III with distinct biochemical properties that may function in meiotic recombination. *Molecular and cellular biology*, *17*(2), 989–998. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.2.989>
- Maffucci, P., Chavez, J., Jurkiw, T. J., O'Brien, P. J., Abbott, J. K., Reynolds, P. R., Worth, A., Notarangelo, L. D., Felgentreff, K., Cortes, P., Boisson, B., Radigan, L., Cobat, A., Dinakar, C., Ehlayel, M., Ben-Omran, T., Gelfand, E. W., Casanova, J.-L. & Cunningham-Rundles, C. (2018). Biallelic mutations in DNA ligase 1 underlie a spectrum of immune deficiencies. *The Journal of clinical investigation*, *128*(12), 5489–5504. <https://doi.org/10.1172/JCI99629>
- Maresca, M., Lin, V. G., Guo, N. & Yang, Y. (2013). Obligate ligation-gated recombination (ObLiGaRe): custom-designed nuclease-mediated targeted integration through nonhomologous end joining. *Genome research*, *23*(3), 539–546. <https://doi.org/10.1101/gr.145441.112>
- Maruyama, T., Dougan, S. K., Truttmann, M. C., Bilate, A. M., Ingram, J. R. & Ploegh, H. L. (2015). Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nature biotechnology*, *33*(5), 538–542. <https://doi.org/10.1038/nbt.3190>
- Masani, S., Han, L., Meek, K. & Yu, K. (2016). Redundant function of DNA ligase 1 and 3 in alternative end-joining during immunoglobulin class switch recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(5), 1261–1266. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521630113>
- Moser, J., Kool, H., Giakzidis, I., Caldecott, K., Mullenders, L. H. F. & Foustieri, M. I. (2007). Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Molecular cell*, *27*(2), 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.014>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, *65*(1-2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mühlfriedel, R., Sothilingam, V., Tanimoto, N. & Seeliger, M. W. (2017). Genersatztherapie bei hereditären Netzhauterkrankungen [Gene Replacement Therapy for Inherited Retinal Dystrophies]. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, *234*(3), 320–328. <https://doi.org/10.1055/s-0043-101817>

- Nakade, S., Tsubota, T., Sakane, Y., Kume, S., Sakamoto, N., Obara, M., Daimon, T., Sezutsu, H., Yamamoto, T., Sakuma, T. & Suzuki, K.-I. T. (2014). Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nature communications*, *5*, 5560. <https://doi.org/10.1038/ncomms6560>
- Nick McElhinny, S. A., Havener, J. M., Garcia-Diaz, M., Juárez, R., Bebenek, K., Kee, B. L., Blanco, L., Kunkel, T. A. & Ramsden, D. A. (2005). A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Molecular cell*, *19*(3), 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.012>
- Nishiguchi, K. M., Fujita, K., Miya, F., Katayama, S. & Nakazawa, T. (2020). Single AAV-mediated mutation replacement genome editing in limited number of photoreceptors restores vision in mice. *Nature communications*, *11*(1), 482. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14181-3>
- Oh, S., Harvey, A., Zimbric, J., Wang, Y., Nguyen, T., Jackson, P. J. & Hendrickson, E. A. (2014). DNA ligase III and DNA ligase IV carry out genetically distinct forms of end joining in human somatic cells. *DNA repair*, *21*, 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.04.015>
- Paix, A., Folkmann, A., Goldman, D. H., Kulaga, H., Grzelak, M. J., Rasolomon, D., Paidemarry, S., Green, R., Reed, R. R. & Seydoux, G. (2017). Precision genome editing using synthesis-dependent repair of Cas9-induced DNA breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(50), E10745-E10754. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711979114>
- Pan, H., Yu, W. & Zhang, M. (2019). Homology-directed repair in mouse cells increased by CasRx-mediated knockdown or co-expressing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF52. *Bioscience reports*, *39*(10). <https://doi.org/10.1042/BSR20191914>
- Pasquini, G., Cora, V., Swiersy, A., Achberger, K., Antkowiak, L., Müller, B., Wimmer, T., Fräschka, S. A.-K., Casadei, N., Ueffing, M., Liebau, S., Stieger, K. & Busskamp, V. (2020). Using Transcriptomic Analysis to Assess Double-Strand Break Repair Activity: Towards Precise in vivo Genome Editing. *International journal of molecular sciences*, *21*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041380>

- Paul, K., Wang, M., Mladenov, E., Bencsik-Theilen, A., Bednar, T., Wu, W., Arakawa, H. & Iliakis, G. (2013). DNA ligases I and III cooperate in alternative non-homologous end-joining in vertebrates. *PLoS one*, 8(3), e59505.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059505>
- Pereira, D. G., Afonso, A. & Medeiros, F. M. (2015). Overview of Friedman's Test and Post-hoc Analysis. *Communications in Statistics - Simulation and Computation*, 44(10), 2636–2653. <https://doi.org/10.1080/03610918.2014.931971>
- Pinder, J., Salsman, J. & Dellaire, G. (2015). Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucleic acids research*, 43(19), 9379–9392.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv993>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A. & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Ranjha, L., Howard, S. M. & Cejka, P. (2018). Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma*, 127(2), 187–214. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0658-1>
- Ribeiro, L. F., Ribeiro, L. F. C., Barreto, M. Q. & Ward, R. J. (2018). Protein Engineering Strategies to Expand CRISPR-Cas9 Applications. *International journal of genomics*, 2018, 1652567. <https://doi.org/10.1155/2018/1652567>
- Robert, F., Barbeau, M., Éthier, S., Dostie, J. & Pelletier, J. (2015). Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. *Genome medicine*, 7, 93. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0215-6>
- Russell, S., Bennett, J., Wellman, J. A., Chung, D. C., Yu, Z.-F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., Cross, D., Marshall, K. A., Walshire, J., Kehoe, T. L., Reichert, H., Davis, M., Raffini, L., George, L. A., Hudson, F. P., . . . Maguire, A. M. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, 390(10097), 849–860. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31868-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31868-8)
- Sakuma, T., Nakade, S., Sakane, Y., Suzuki, K.-I. T. & Yamamoto, T. (2016). MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCH systems. *Nature protocols*, 11(1), 118–133.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2015.140>

- Sallmyr, A., Rashid, I., Bhandari, S. K., Naila, T. & Tomkinson, A. E. (2020). Human DNA ligases in replication and repair. *DNA repair*, 93, 102908. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102908>
- Sallmyr, A. & Tomkinson, A. E. (2018). Repair of DNA double-strand breaks by mammalian alternative end-joining pathways. *The Journal of biological chemistry*, 293(27), 10536–10546. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000375>
- Sawatsubashi, S., Joko, Y., Fukumoto, S., Matsumoto, T. & Sugano, S. S. (2018). Development of versatile non-homologous end joining-based knock-in module for genome editing. *Scientific reports*, 8(1), 593. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18911-9>
- Schmid-Burgk, J. L., Höning, K., Ebert, T. S. & Hornung, V. (2016). CRISPaint allows modular base-specific gene tagging using a ligase-4-dependent mechanism. *Nature communications*, 7, 12338. <https://doi.org/10.1038/ncomms12338>
- Scully, R., Panday, A., Elango, R. & Willis, N. A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(11), 698–714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>
- Seol, J.-H., Shim, E. Y. & Lee, S. E. (2018). Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutation research*, 809, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.07.002>
- Shao, S., Ren, C., Liu, Z., Bai, Y., Chen, Z., Wei, Z., Wang, X., Zhang, Z. & Xu, K. (2017). Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* Rad52. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 92, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.09.012>
- Sharma, S., Javadekar, S. M., Pandey, M., Srivastava, M., Kumari, R. & Raghavan, S. C. (2015). Homology and enzymatic requirements of microhomology-dependent alternative end joining. *Cell death & disease*, 6, e1697. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.58>
- Shokolenko, I. N., Fayzulin, R. Z., Katyal, S., McKinnon, P. J., Wilson, G. L. & Alexeyev, M. F. (2013). Mitochondrial DNA ligase is dispensable for the viability of cultured cells but essential for mtDNA maintenance. *The Journal of biological chemistry*, 288(37), 26594–26605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.472977>

- Simsek, D., Brunet, E., Wong, S. Y.-W., Katyal, S., Gao, Y., McKinnon, P. J., Lou, J., Zhang, L., Li, J., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Holmes, M. C. & Jasin, M. (2011). DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. *PLoS genetics*, 7(6), e1002080. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002080>
- Simsek, D., Furda, A., Gao, Y., Artus, J., Brunet, E., Hadjantonakis, A.-K., van Houten, B., Shuman, S., McKinnon, P. J. & Jasin, M. (2011). Crucial role for DNA ligase III in mitochondria but not in Xrcc1-dependent repair. *Nature*, 471(7337), 245–248. <https://doi.org/10.1038/nature09794>
- Slijkerman, R. W. N., Song, F., Astuti, G. D. N., Huynen, M. A., van Wijk, E., Stieger, K. & Collin, R. W. J. (2015). The pros and cons of vertebrate animal models for functional and therapeutic research on inherited retinal dystrophies. *Progress in retinal and eye research*, 48, 137–159. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.04.004>
- Soni, A., Siemann, M., Grabos, M., Murmann, T., Pantelias, G. E. & Iliakis, G. (2014). Requirement for Parp-1 and DNA ligases 1 or 3 but not of Xrcc1 in chromosomal translocation formation by backup end joining. *Nucleic acids research*, 42(10), 6380–6392. <https://doi.org/10.1093/nar/gku298>
- Spadafora, D., Kozhukhar, N. & Alexeyev, M. F. (2016). Presequence-Independent Mitochondrial Import of DNA Ligase Facilitates Establishment of Cell Lines with Reduced mtDNA Copy Number. *PloS one*, 11(3), e0152705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152705>
- Srivastava, M., Nambiar, M., Sharma, S., Karki, S. S., Goldsmith, G., Hegde, M., Kumar, S., Pandey, M., Singh, R. K., Ray, P., Natarajan, R., Kelkar, M., De, A., Choudhary, B. & Raghavan, S. C. (2012). An inhibitor of nonhomologous end-joining abrogates double-strand break repair and impedes cancer progression. *Cell*, 151(7), 1474–1487. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.054>
- Stepanenko, A. A. & Dmitrenko, V. V. (2015). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, 574(2), 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.009>

- Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J., Kim, E. J., Hatanaka, F., Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., Kurita, M., Hishida, T., Li, M., Aizawa, E., Guo, S., Chen, S., Goebel, A., Soligalla, R. D., Qu, J., . . . Belmonte, J. C. I. (2016). In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, *540*(7631), 144–149. <https://doi.org/10.1038/nature20565>
- Tisi, R., Vertemara, J., Zampella, G. & Longhese, M. P. (2020). Functional and structural insights into the MRX/MRN complex, a key player in recognition and repair of DNA double-strand breaks. *Computational and structural biotechnology journal*, *18*, 1137–1152. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.05.013>
- Tomkinson, A. E., Howes, T. R.L. & Wiest, N. E. (2013). DNA ligases as therapeutic targets. *Translational cancer research*, *2*(3).
- Tomkinson, A. E., Naila, T. & Khattri Bhandari, S. (2020). Altered DNA ligase activity in human disease. *Mutagenesis*, *35*(1), 51–60. <https://doi.org/10.1093/mutage/gez026>
- Tsai, S. Q., Wyvekens, N., Khayter, C., Foden, J. A., Thapar, V., Reyon, D., Goodwin, M. J., Aryee, M. J. & Joung, J. K. (2014). Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature biotechnology*, *32*(6), 569–576. <https://doi.org/10.1038/nbt.2908>
- van Chu, T., Weber, T., Wefers, B., Wurst, W., Sander, S., Rajewsky, K. & Kühn, R. (2015). Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature biotechnology*, *33*(5), 543–548. <https://doi.org/10.1038/nbt.3198>
- van Weemen, B. K. & Schuur, A.H.W.M. (1971). Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters*, *15*(3), 232–236. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(71\)80319-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(71)80319-8)
- Vartak, S. V., Swarup, H. A., Gopalakrishnan, V., Gopinatha, V. K., Ropars, V., Nambiar, M., John, F., Kothanahally, S. K. S., Kumari, R., Kumari, N., Ray, U., Radha, G., Dinesh, D., Pandey, M., Ananda, H., Karki, S. S., Srivastava, M., Charbonnier, J. B., Choudhary, B., . . . Raghavan, S. C. (2018). Autocyclized and oxidized forms of SCR7 induce cancer cell death by inhibiting nonhomologous DNA end joining in a Ligase IV dependent manner. *The FEBS journal*, *285*(21), 3959–3976. <https://doi.org/10.1111/febs.14661>

- Vervoort, R., Lennon, A., Bird, A. C., Tulloch, B., Axton, R., Miano, M. G., Meindl, A., Meitinger, T., Ciccodicola, A. & Wright, A. F. (2000). Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. *Nature genetics*, 25(4), 462–466. <https://doi.org/10.1038/78182>
- Vervoort, R. & Wright, A. F. (2002). Mutations of RPGR in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Human mutation*, 19(5), 486–500. <https://doi.org/10.1002/humu.10057>
- Wei, Y. F., Robins, P., Carter, K., Caldecott, K., Pappin, D. J., Yu, G. L., Wang, R. P., Shell, B. K., Nash, R. A. & Schär, P. (1995). Molecular cloning and expression of human cDNAs encoding a novel DNA ligase IV and DNA ligase III, an enzyme active in DNA repair and recombination. *Molecular and cellular biology*, 15(6), 3206–3216. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.6.3206>
- Wilkinson, R. A., Martin, C., Nemudryi, A. A. & Wiedenheft, B. (2019). CRISPR RNA-guided autonomous delivery of Cas9. *Nature structural & molecular biology*, 26(1), 14–24. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0173-y>
- Wimmer, T., Lorenz, B. & Stieger, K. (2016). Quantification of the vascular endothelial growth factor with a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) based single molecule biosensor. *Biosensors & bioelectronics*, 86, 609–615. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.058>
- Wimmer, T., Bonthu, D., Moeschl, V., Kleekamp, P., Thiel, C., Lytvynchuk, L., Ellinwood, M. & Stieger, K. (2021). A Bioluminescence Resonance Energy Transfer-Based Reporter System: Characterization and Applications. *The CRISPR journal*, 4(6), 884–895. <https://doi.org/10.1089/crispr.2021.0023>
- Xia, Z. & Rao, J. (2009). Biosensing and imaging based on bioluminescence resonance energy transfer. *Current opinion in biotechnology*, 20(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.01.001>
- Xiong, X., Du, Z., Wang, Y., Feng, Z., Fan, P., Yan, C., Willers, H. & Zhang, J. (2015). 53BP1 promotes microhomology-mediated end-joining in G1-phase cells. *Nucleic acids research*, 43(3), 1659–1670. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1406>
- Yan, Q., Xu, K., Xing, J., Zhang, T., Wang, X., Wei, Z., Ren, C., Liu, Z., Shao, S. & Zhang, Z. (2016). Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering enhanced by Drosha-mediated sgRNA-shRNA structure. *Scientific reports*, 6, 38970. <https://doi.org/10.1038/srep38970>

- Yang, D., Scavuzzo, M. A., Chmielowiec, J., Sharp, R., Bajic, A. & Borowiak, M. (2016). Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. *Scientific reports*, 6, 21264. <https://doi.org/10.1038/srep21264>
- Yang, S., Zhou, X., Li, R., Fu, X. & Sun, P. (2017). Optimized PEI-based Transfection Method for Transient Transfection and Lentiviral Production. *Current protocols in chemical biology*, 9(3), 147–157. <https://doi.org/10.1002/cpch.25>
- Yanik, M., Müller, B., Song, F., Gall, J., Wagner, F., Wende, W., Lorenz, B. & Stieger, K. (2016). In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies. *Progress in retinal and eye research*, 56, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2016.09.001>
- Yanik, M., Ponnam, S. P. G., Wimmer, T., Trimborn, L., Müller, C., Gambert, I., Ginsberg, J., Janise, A., Domicke, J., Wende, W., Lorenz, B. & Stieger, K. (2018). Development of a Reporter System to Explore MMEJ in the Context of Replacing Large Genomic Fragments. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 11, 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.03.010>
- Ye, L., Wang, C., Hong, L., Sun, N., Chen, D., Chen, S. & Han, F. (2018). Programmable DNA repair with CRISPRa/i enhanced homology-directed repair efficiency with a single Cas9. *Cell discovery*, 4, 46. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0049-7>
- Zhang, J.-P., Li, X.-L., Li, G.-H., Chen, W., Arakaki, C., Botimer, G. D., Baylink, D., Zhang, L., Wen, W., Fu, Y.-W., Xu, J., Chun, N., Yuan, W., Cheng, T. & Zhang, X.-B. (2017). Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome biology*, 18(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1164-8>
- Zhang, Q., Giacalone, J. C., Searby, C., Stone, E. M., Tucker, B. A. & Sheffield, V. C. (2019). Disruption of RPGR protein interaction network is the common feature of RPGR missense variations that cause XLRP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(4), 1353–1360. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817639116>
- Zhang, Q. (2016). Retinitis Pigmentosa: Progress and Perspective. *Asia-Pacific journal of ophthalmology (Philadelphia, Pa.)*, 5(4), 265–271. <https://doi.org/10.1097/APO.0000000000000227>

- Zhang, Y., Zhang, Z. & Ge, W. (2018). An efficient platform for generating somatic point mutations with germline transmission in the zebrafish by CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *The Journal of biological chemistry*, 293(17), 6611–6622. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001080>
- Ziccardi, L., Cordeddu, V., Gaddini, L., Matteucci, A., Parravano, M., Malchiodi-Albedi, F. & Varano, M. (2019). Gene Therapy in Retinal Dystrophies. *International journal of molecular sciences*, 20(22). <https://doi.org/10.3390/ijms20225722>

11 Publikationsverzeichnis

Publikationen

Wimmer, T., Bonthu, D., **Moeschl, V.**, Kleekamp, P., Thiel, C., Lytvynchuk, L., Ellinwood, M. & Stieger, K. (2021). A Bioluminescence Resonance Energy Transfer-Based Reporter System: Characterization and Applications. *The CRISPR journal*, 4(6), 884–895. <https://doi.org/10.1089/crispr.2021.0023>

Posterpräsentationen

Möschl, V., Wimmer, T., Lorenz, B. & Stieger, K. (2019). The effect of Cas9-induced ligase-KOs on the integration of large DNA sequences into the murine RPGR-ORF15 exon. Science Day, Gießen.

Wimmer, T., Bonthu, D., Stumpf, C., Klekamp, P., **Moeschl, V.**, Kapynen, R., Lorenz, B. & Stieger, K. (2019). A Bioluminescence Resonance Energy Transfer based Reporter as a versatile Tool for Genome Editing Strategies. ProRetina Tagung, Potsdam.

Wimmer, T., Bonthu, D., Stumpf, C., Klekamp, P., **Moeschl, V.**, Kapynen, R., Lorenz, B. & Stieger, K. (2019). A bioluminescence resonance energy transfer based sensor for the precise determination of non-homologous end joining DNA repair events. ESGCT Meeting, Barcelona.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Zunächst möchte ich vielmals Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger für die Überlassung des Themas, die umfassende Betreuung, den wissenschaftlichen Austausch sowie das Korrekturlesen der Arbeit danken.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Tobias Wimmer für die Einarbeitung im Labor, die Beantwortung zahlreicher Fragen rund um die experimentellen Arbeiten, das Korrekturlesen der Arbeit und sein ständig offenes Ohr.

Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz möchte ich herzlich für die Bereitstellung von Labor- und Büroräumen danken.

Herrn Prof. Dr. Gregor Bein und Herrn Prof. Dr. Holger Hackstein danke ich vielmals für die Möglichkeit der Durchführung der FACS-Anreicherung in der FACS Core Facility des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin im ForMed.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. Markus Preising und Frau Dr. Brigitte Müller für ihre Anregungen betreffend die vorliegende Arbeit sowie ihre Ansprechbarkeit bei Problemen im Labor.

Außerdem gilt mein herzlicher Dank Frau Annabella Janise-Libawski für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor und ihre Antworten auf zahlreiche im Laboralltag aufkommende Fragen.

Mein Dank gilt zudem allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Experimentelle Ophthalmologie für die gute Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft, die tollen Gespräche und die wirklich prägende Zeit.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie für die Ermöglichung des Medizinstudiums und der Promotion sowie ihre Unterstützung und Motivation bedanken.