

Der Einfluss einer Modifizierung der PARP1-Expression auf
zelluläre DNA-Reparaturmechanismen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Schneider, Judith Sophia Elisabeth

aus Bonn

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Gutachter: PD Dr. A. Németh

Tag der Disputation: 20.12.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Gentherapeutische Ansätze	1
1.2	Endonukleasen	2
1.2.1	CRISPR/Cas.....	2
1.3	DNA-Reparaturmechanismen	4
1.3.1	NHEJ.....	5
1.3.2	MMEJ.....	5
1.3.3	HDR	6
1.4	PARP1	7
1.5	Aktuelle Herausforderungen der therapeutischen Genomeditierung	9
1.5.1	Therapeutische Genomeditierung durch Nutzung von DNA-Reparaturmechanismen.....	9
1.5.2	Herausforderungen der <i>in vivo</i> Genomeditierung	10
1.6	Nachweismethoden zur DNA-Reparatur	11
1.6.1	BRET-Assay	12
1.6.2	MMEJ-Assay.....	14
1.7	Zielsetzung	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Material	17
2.1.1	Geräte	17
2.1.2	Software	18
2.1.3	Chemikalien	19
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.5	Enzyme.....	20
2.1.6	Kit-Systeme.....	21
2.1.7	Bakterienstämme.....	21
2.1.8	Eukaryotische Zelllinien	22
2.1.9	Zellkulturmedien.....	22
2.1.10	Bakterienkulturmedien	23
2.1.11	Antibiotika.....	24
2.1.12	Puffer und Lösungen	25
2.1.13	Plasmide	26
2.1.14	Oligonukleotide und Primer	30
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Arbeiten mit DNA.....	33

2.2.2	Arbeiten mit Bakterien	37
2.2.3	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	39
2.2.4	Arbeiten mit Proteinen.....	41
2.2.5	Ergänzende Arbeiten der Arbeitsgruppe, die nicht selbst durchgeführt wurden.....	43
2.2.6	Statistische Auswertung	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Identifikation von geeigneten PARP1-KO-Target-Sequenzen und den dazugehörigen Guide-Sequenzen.....	46
3.2	Kontrolle der Transfektionseffizienz.....	47
3.3	Aktivitätsmessung der PARP1-KOs.....	47
3.4	Einfluss von PARP1-KOs auf die zelleigene Reparaturaktivität	49
3.4.1	BRET-Assay zur Bestimmung von Frameshift-Mutationen durch NHEJ- oder MMEJ-Reparatur.....	49
3.4.2	Einfluss von PARP1-KOs auf die MMEJ-Aktivität.....	51
3.4.3	Einfluss von PARP1-KOs und PARP1-Überexpression auf die HDR-Aktivität.....	53
4	Diskussion	57
4.1	CRISPR/Cas9-vermittelter PARP1-KO	57
4.2	Reparaturaktivität bei PARP1-Modifizierung	59
4.3	MMEJ-Aktivität bei PARP1-Modifizierung	60
4.4	HDR-Aktivität bei PARP1-Modifizierung.....	63
4.5	Ausblick.....	64
5	Zusammenfassung.....	68
6	Summary	69
7	Abbildungsverzeichnis	70
8	Tabellenverzeichnis.....	71
9	Abkürzungsverzeichnis	72
10	Literaturverzeichnis.....	74
11	Ehrenwörtliche Erklärung	86
12	Danksagung.....	87

1 Einleitung

1.1 Genterapeutische Ansätze

Genetisch bedingten Erkrankungen fehlt es häufig an wirksamer Therapie, weshalb Genterapien seit der Erforschung vieler krankheitsauslösender Mutationen als alternative Therapiemöglichkeiten entwickelt und getestet werden. Gerade monogene, hochpenetrante Krankheiten aus dem hämatologischen Formenkreis, erbliche Netzhautdefekte und bestimmte Enzymdefizite, die genetisch genau definiert sind, könnten von neuen, genomverändernden Therapieansätzen profitieren (Cox et al., 2015; Doudna, 2020; Yanik et al., 2017).

Auf diesem Gebiet haben sich bisher die Gentherapie, die die Wiederherstellung der fehlenden Genfunktion durch virale Transgenexpression ermöglicht und die RNA-Interferenz (RNAi), die die Unterdrückung defekter Gene durch Knockdown der Ziel-mRNA vermittelt, etabliert (Cox et al., 2015). Die Gentherapie wurde bereits erfolgreich bei PatientInnen mit hämatologischen Erkrankungen wie der schweren kombinierten Immundefizienz (SCID) oder dem Wiskott-Aldrich Syndrom angewandt, indem funktionelle Gene mit Hilfe von viralen Vektoren in hämatogene Stammzellen integriert wurden. Ein Problem stellt dabei die Entwicklung von leukämischen Erkrankungen durch Aktivierung eines Protoonkogens nach Integration des neuen Gens dar (Aiuti et al., 2013; Howe et al., 2008). Die RNAi-Therapie basiert auf herabgesetzter Genexpression durch Basenpaarung von siRNAs (small interfering RNAs) an die messenger RNAs (mRNAs) der defekten Gene. Klinisch wurden RNAi-Therapien u.a. zur Behandlung der exsudativen altersabhängigen Makuladegeneration und in der Krebstherapie getestet (Feng et al., 2021; Tiemann & Rossi, 2009). Probleme dabei sind die teilweise unzureichende Unterdrückung der pathogenen Gene sowie off-target-Aktivitäten an anderen mRNAs (Setten et al., 2019).

Die Genomeditierung beschreibt den Ansatz, bestimmte DNA-Abschnitte im Genom zu verändern, indem präzise Schnittstellen durch Endonukleasen gesetzt werden und ein Gen so z.B. ausgeschaltet oder durch eine andere DNA-Sequenz ersetzt werden kann. Damit könnten erbliche Erkrankungen durch Genomeditierung ursächlich therapiert werden, ohne dass unerwünschte Wechselwirkungen zwischen endogenen (mutierten) und transgenen Proteinen entstehen. Die zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen spielen

eine entscheidende Rolle bei der Prozessierung der gesetzten DSB. Eine fehlerhafte Reparatur kann zu einem Funktionsverlust eines pathogenen Gens kommen, während der korrekte Einbau eines neuen DNA-Abschnitts eine initial fehlerhafte Funktion wiederherstellen kann (Cox et al., 2015).

1.2 Endonukleasen

Programmierbare Nukleasen können gezielt DSB in Gene einfügen und im Rahmen des Genomeditierens für Knockouts, Knockins oder chromosomale Neuarrangements im Genom verwendet werden (Nakade et al., 2014). Im Jahr 1993 konnten Puchta et al. bereits mit der Meganuklease I-SceI *in vivo* DSB im Pflanzengenom erzeugen und nachweisen, dass es daraufhin zu erhöhter Reparaturaktivität in den Zellen kommt (Puchta et al., 1993). Meganukleasen sind eine heterogene Gruppe von Endonukleasen, die DNA über die Erkennung einer 14-40 bp langen Zielsequenz hochspezifisch binden können. Die Leseraster befinden sich in der Regel in Introns und Inteinregionen und bewirken, dass die Endonukleasen Strangbrüche in verwandten Allelen erzeugen, denen die intervenierende Sequenz fehlt, sowie an zusätzlichen ektopischen Stellen, die den Bereich der Intron- und Inteinmobilität erweitern (Stoddard, 2005).

Neben den Meganukleasen wurden weitere Endonukleasen als Alternativen für das Genomeditieren erforscht. Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) und transcription activator-like effector Nukleasen (TALEN) bestehen aus DNA-bindenden Proteinen und der *FokI*-Nukleasedomäne. Das binäre System bringt gegenüber den Meganukleasen den Vorteil, dass für gezielte DSB nur die erkennende Domäne designt werden muss und nicht der ganze Proteinkomplex (Yanik et al., 2017). Bei den ZFN besteht die DNA-bindende Domäne aus 3-6 Zinkfingern, die in Kombination eine große Breite an Zielsequenzen erreichen können. Bei den TALEN besteht die DNA-bindende Domäne aus mehreren Tandem-Repeats. Die Nuklease *FokI* dimerisiert, um einen Strangbruch zu erzeugen, sodass zwei Bindestellen notwendig sind (Carroll, 2014).

1.2.1 CRISPR/Cas

CRISPR/Cas ist ein in Bakterien und Archaea vorkommendes Abwehrsystem gegen Bakteriophagen und Fremdplasmide, wobei die Nuklease Cas (CRISPR associated) sequenzspezifisch fremde Nukleinsäuren spaltet. Der Name "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats" beschreibt die Struktur von CRISPR: Kurze

Repeats sind getrennt von Spacern, die Sequenzen der Fremd-DNA oder -RNA enthalten (Gasiunas et al., 2014). Die von CRISPR/Cas vermittelte Immunreaktion erfolgt in drei Schritten: In der adaptiven Phase werden bei Eindringen von Fremdorganismen kurze Sequenzen der fremden Nukleinsäure in die CRISPR-Loci als neue (Proto-)spacer integriert. In der Expressionsphase werden die Repeat-Spacer-Reihen in ein langes primäres RNA-Transkript überschrieben, das zu mehreren kleinen CRISPR-RNAs (crRNAs) weiterverarbeitet wird. Die crRNAs enthalten ein konserviertes Repeat-Fragment und eine variable Spacer-Sequenz (Guide), die komplementär zu der fremden Zielsequenz (Target) ist. In der Interferenzphase bilden die crRNAs mit den Cas Proteinen einen Effektor-Komplex, der die Targets mittels Basenpaarung erkennt und bindet (Gasiunas et al., 2014; Jinek et al., 2012). Eine weitere RNA, die trans-activating crRNA (tracrRNA), ist für die Bindung der crRNA an Cas und das Aktivieren der DNA-Spaltung notwendig. Die beiden RNAs bilden eine gemeinsame Struktur und leiten die Nuklease Cas an die Targetsequenz (Jinek et al., 2012). Um an fremde doppelsträngige DNA zu binden, muss in dieser eine bestimmte „Protospacer Adjacent Motif“ (PAM)-Sequenz erkannt werden. PAMs kommen im zelleigenen Genom nicht vor und verhindern so, dass die Nuklease Cas zelleigene Nukleinsäuren spaltet. Die Erkennung der PAM-Sequenz initiiert die Formatierung zu einem R-loop, um die DNA zu entwinden. Die Nuklease Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* erkennt die PAM-Sequenz 5'-NGG-3', wobei N für eine beliebige Base steht (Jinek et al., 2012).

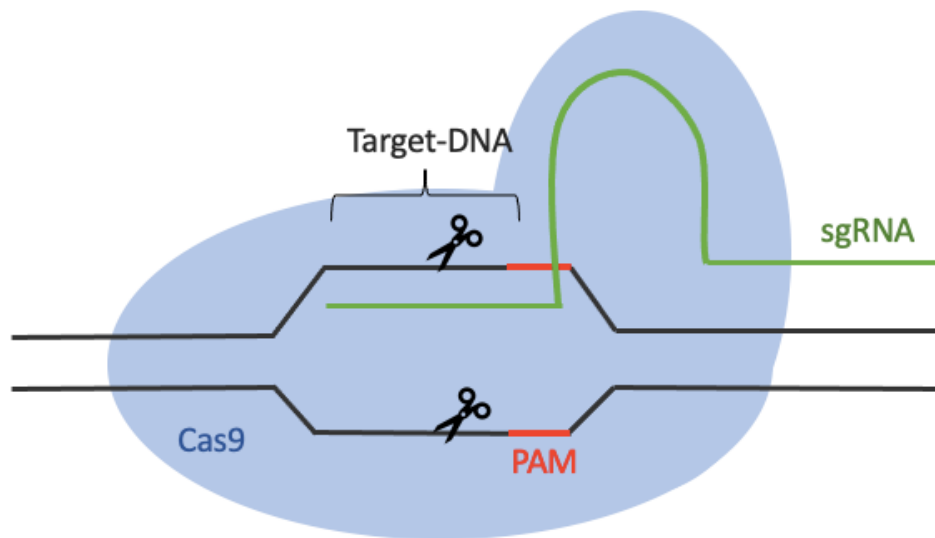


Abbildung 1: CRISPR/Cas9-induzierter Doppelstrangbruch Die sgRNA erkennt die PAM-Sequenz und bindet an die Zielsequenz (Target-DNA). Die Nuklease Cas9 setzt in der Target-DNA einen Doppelstrangbruch ein.

Jennifer Doudna und Emmanuelle Charpentier wurden im Jahr 2020 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt, für ihr Gelingen, das CRISPR/Cas-System für Genomeditierung zugänglicher zu machen, indem sie die tracrRNA und crRNA zu einer chimärischen single-guide-RNA (sgRNA) zusammenführten (Jinek et al., 2012). So kann Cas9 durch die Anpassung einer ca. 20 Nukleotiden langen Sequenz der sgRNA an die gewünschte Target-DNA praktisch jeden genomischen Ort, der eine PAM-Sequenz enthält, neu ausgerichtet werden (H. Wang et al., 2016). Die leicht programmierbare sgRNA macht das CRISPR/Cas9-System zu einer beliebten und erfolgreichen Methode im Genomeditieren.

1.3 DNA-Reparaturmechanismen

In diesem Kapitel wird es ausschließlich um die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) gehen. Einzelstrangbrüche, Fehlpaarungen oder Basenmodifikationen können über weitere Mechanismen behoben werden und stellen eine geringere Gefahr für das Genom dar. Doppelstrangbrüche können zu Nonsense-Mutationen oder dem Einfügen von Stopp-Codons führen, was genomische Instabilität bis hin zum Zelltod zur Folge hat. Die genomische Integrität hängt wesentlich davon ab, wie ein Doppelstrangbruch repariert wird. Welcher Weg (Pathway) gewählt wird, entscheiden reparaturassoziierte Proteine, die an die kaputten DNA-Enden binden

(Ceccaldi et al., 2016). Inwiefern welche Proteine die Reparatur von DNA-Schäden beeinflussen, ist Gegenstand aktueller Forschung.

1.3.1 NHEJ

Non-homologous end joining (NHEJ), auch als canonical NHEJ (c-NHEJ) bezeichnet, ist ein Reparaturmechanismus von DSB, bei dem kein homologes Template als Vorlage verwendet wird. Die DNA-Enden werden einander angepasst und ligiert. Initiiert wird dieser Pathway durch die Erkennung des DSB von Ku70 und Ku80, die an die kaputten DNA-Enden binden. Es folgt die Phosphorylierung von DNA-PKcs (DSB-dependent protein kinase), die Auffüllung von Nukleotiden durch Polymerase λ oder μ und die Ligierung durch DNA Ligase IV (Chiruvella et al., 2013). Auch die Polymerasen, besonders Polymerase μ , arbeiten im NHEJ templateunabhängig (Chang et al., 2017). Der DNA-Ligase IV-XRCC4-Komplex kann, anders als andere DNA-Ligasen, zwei inkompatible DNA-Enden, teils über lückenhafte Stränge, miteinander ligieren (Gu et al., 2007). Dabei kommt es zu zufälligen Insertionen und Deletionen (Indels), die häufig zu Frameshift-Mutationen mit der Folge von verfrühten Stopp-Codons oder Nonsense-Mutationen führen. Die Veränderung der genomischen Information kann die korrekte Genexpression verhindern. NHEJ kann während des gesamten Zellzyklus stattfinden, ist jedoch in der Mitose reprimiert und dominiert in der G0/G1 und G2 Phase (Ceccaldi et al., 2016; Her & Bunting, 2018).

1.3.2 MMEJ

Microhomology-mediated end joining (MMEJ) wird auch als alternative NHEJ (a-NHEJ) bezeichnet, da es, wie beim c-NHEJ, zur fehlerbehafteten Reparatur ohne Verwendung eines vollständig homologen Templates kommt. DNA-DSB werden repariert, indem sogenannte mikrohomologe Sequenzen, die meist aus 5-25 bp bestehen, miteinander verbunden werden (McVey & Lee, 2008; Truong et al., 2013). Die Mikrohomologien können dabei auf demselben oder auf einem anderen Chromosom liegen (Sinha et al., 2016). Um die kaputten Enden über die mikrohomologen Sequenzen zu verbinden, werden zum Teil lange Sequenzen eines Stranges reseziert und die Lücken mit neuen Nukleotiden aufgefüllt. Hierbei kann es zu großen Informationsverlusten durch Indel-Mutationen kommen (Sinha et al., 2016). MMEJ ist vor allem in der G1- und frühen S-Phase des Zellzyklus aktiv und funktioniert unabhängig von den Ku-Proteinen und Ligase

IV (Taleei & Nikjoo, 2013). Zu den MMEJ-assoziierten Proteinen gehören MRN-Komplexe, bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1, die zusammen mit CtIP an DSB binden und den MMEJ-Pathway initiieren. Es kommt zum nukleolytischen Abbau der 5'-Stränge durch Mre11, um 3' ssDNA-Überhänge zu erhalten, was als 5'-3'-Resektion bezeichnet wird (Deng et al., 2014; Truong et al., 2013). Polymerase θ stabilisiert die Bindung über die Mikrohomologien und fügt fehlende Nukleotide hinzu. Letztlich ligiert die Ligase I oder die Ligase III die DNA-Enden (Liang et al., 2008). In der Reparatur von zufällig durch Noxen oder ionisierender Strahlung entstandenen DSB ist MMEJ mit der Häufigkeit an Indel-Mutationen ein ineffizienter Pathway. Im experimentellen Setting kann man sich diesen Reparaturweg jedoch zu Nutze machen: Durch Einfügen eines DSB an einer definierten Stelle mittels einer Endonuklease und konstruierten Templates, die mikrohomologe Sequenzen an beiden Enden enthalten, können die Templates an der gewünschten Stelle eingebaut werden (Nakade et al., 2014).

1.3.3 HDR

Homology directed repair (HDR) ist ein Reparaturmechanismus, der DNA-DSB unter Vorlage eines homologen Templates repariert und somit eine meist fehlerfreie Reparatur von DSB ermöglicht. In der Regel handelt es sich bei dem homologen Template um das Schwesterchromatid, weshalb HDR hauptsächlich in der S- und G2-Phase des Zellzyklus, bei hoher Replikationsrate, stattfindet (Karanam et al., 2012). Neben dem Schwesterchromatid kann auch ein doppelsträngiges Plasmid als Vorlage dienen, oder ein einzelsträngiges Oligonukleotid (Richardson et al., 2018). Wie beim MMEJ, wird der HDR-Pathway durch das Binden eines MRN-Komplexes an den DSB initiiert, was eine 5'-3'-Resektion zur Folge hat (Truong et al., 2013). Eine größere Resektion begünstigt dabei den HDR-Pathway gegenüber dem MMEJ (Yeh et al., 2019). Die Resektion erfolgt zum Teil auch bei durch NHEJ inkomplett reparierten DSB (Her & Bunting, 2018). Rad51 verbindet BRCA2-vermittelt den 3'-Überhang mit der homologen Sequenz des Templates (strand invasion) und bildet einen Displacement loop (d-loop), in dem Polymerasen den Einzelstrang vervollständigen können (Heyer et al., 2010). Wie MMEJ, kann auch HDR in der Genomeditorung genutzt werden, indem ein Template, das lange homologe Sequenzen zum 3'-Überhang des DSB enthält, verwendet wird (Jasin & Haber, 2016).

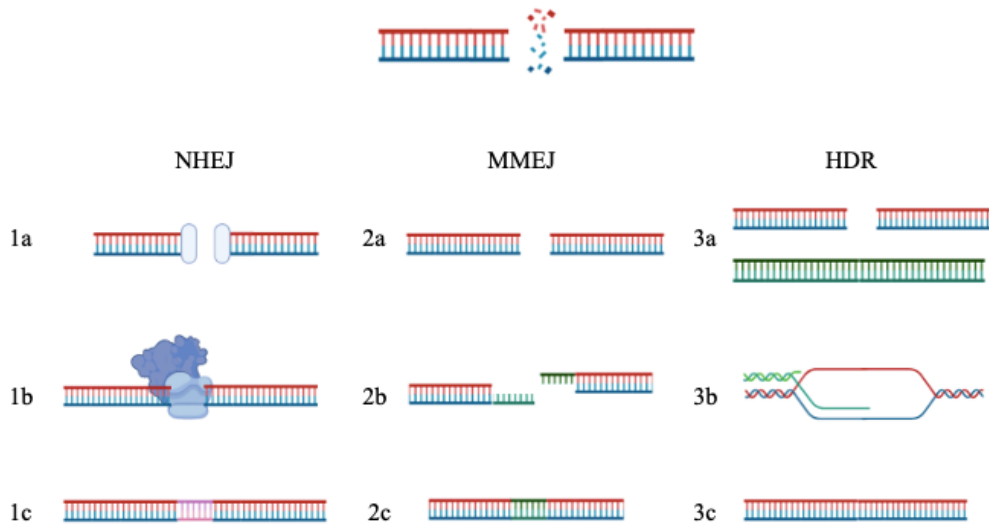


Abbildung 2: Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Der Übersicht wegen sind nicht alle Einzelschritte mit beteiligten Proteinen der DNA-Reparaturwege aufgezeigt. 1a: Ku70/80 binden an die freien DNA-Enden und initiieren den NHEJ-Weg. 1b: Der XRCC4/Ligase IV-Komplex verbindet die DNA-Enden miteinander. 1c: Durch die Reparatur ohne Vorlage entstehen häufig Indel-Mutationen. 2a: MMEJ wird ohne homologes Template durch Bindung von MRN-Proteinen initiiert. 2b: Es kommt zur Resektion der freien DNA-Enden und zur Anlagerung mikrohologer Sequenzen. 2c: Entstehung von Indel-Mutationen. 3a: HDR wird bei Vorhandensein eines homologen Templates, z.B. des Schwesterchromatids, initiiert. 3b: Entstehung eines d-loops zur DNA-Reparatur unter Vorlage des Templates. 3c: Die korrekte DNA-Sequenz ist wieder hergestellt.

1.4 PARP1

PARP1 ist das dominierende und erstbeschriebene Enzym aus der Familie der Poly-ADP-Ribose-Polymerasen (PARP). Es handelt sich um ein multifunktionales Enzym, das in verschiedenen DNA-Reparaturwegen von Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen, damit einhergehender Tumorentwicklung und aktuell auch in Entzündungsprozessen eukaryotischer Zellen beschrieben wird (Pazzaglia & Pioli, 2020; Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017). Unter Verwendung von NAD⁺ als Energiedonor aktiviert es reparaturassoziierte Proteine, indem es Poly-ADP-Ribosylreste (PAR) auf sich selbst und auf die Zielproteine überträgt. Dieser Vorgang wird auch als „PARylation“ bezeichnet. Neben der NAD⁺-bindenden Domäne verfügt es außerdem über eine DNA-bindende Domäne, die es ermöglicht, DNA-Schäden zu erkennen, an die kaputte DNA zu binden und weitere Reparaturproteine zu rekrutieren und zu aktivieren (Buki & Kun, 1988; Langelier et al., 2012). In Zellen, die genotoxischem oder oxidativem Stress ausgesetzt

waren, konnte eine deutlich erhöhte Aktivität von PARP1 nachgewiesen werden (Du et al., 2016).

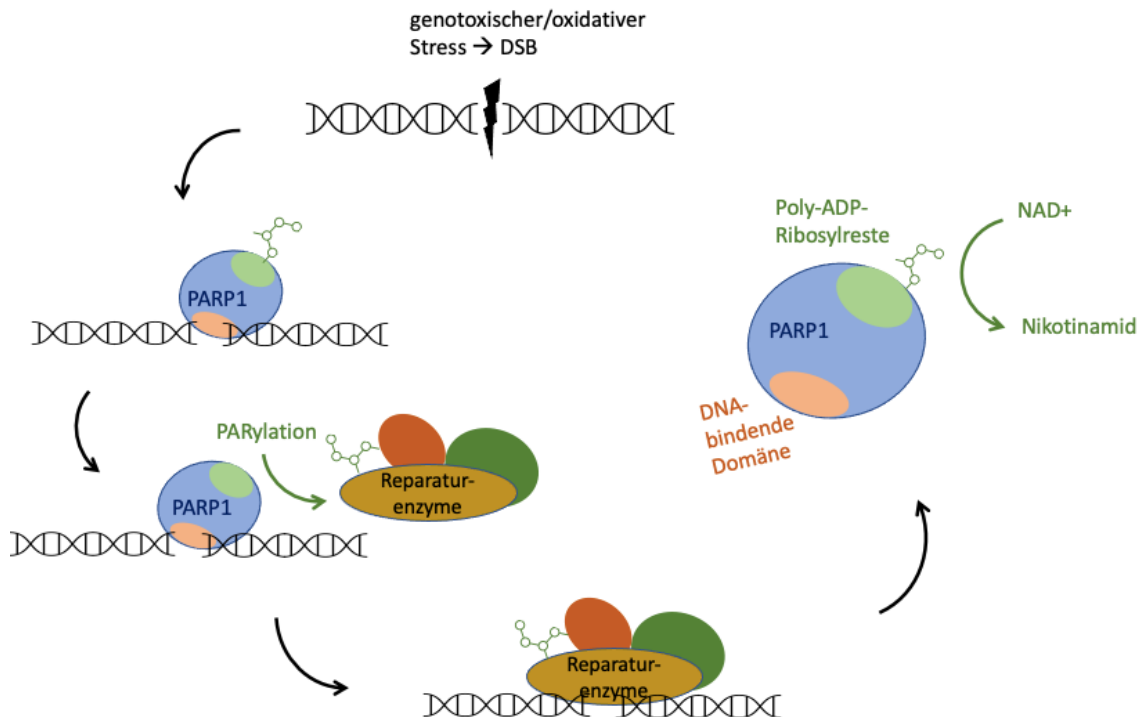


Abbildung 3: Funktionen von PARP1 PARP1 verfügt über eine DNA- und eine NAD+-bindende Domäne. NAD⁺ fungiert als Energiedonor und überträgt ADP-Ribosylreste auf das Protein. Über die DNA-bindende Domäne kann PARP1 an DSB binden, andere Reparaturenzyme rekrutieren und diese durch die Übertragung von ADP-Ribosylresten aktivieren. Dieser Vorgang wird auch als „PARylation“ bezeichnet.

In der Reparatur von DSB werden PARP1 verschiedene Einflüsse auf die Pathways zugeschrieben. Interaktionen zwischen PARP1 und DNA-PKcs, sowie der *in vivo* Nachweis eines PARP1/DNA-PKcs/Ku-Molekularkomplex haben gezeigt, dass PARP1 Einfluss auf die Strukturierung der DNA-PKcs am DSB hat und damit wichtige Schritte des NHEJ katalysiert (Ruscetti et al., 1998; Spagnolo et al., 2012). In anderen Studien ist beschrieben, dass PARP1 mit den Ku-Proteinen um die Bindungsstelle am DSB konkurriert und, bei Bindung, XRCC1 und Ligase III aus dem MMEJ Pathway rekrutiert (Audebert et al., 2008; Das et al., 2014; M. Wang et al., 2006). Für HDR scheint PARP1 nicht erforderlich zu sein, spielt aber eine indirekte Rolle, indem es Replikationsgabeln stabilisiert und HDR-assoziierte Reparaturproteine wie MRE11, Rad51 und BRCA2 rekrutiert (Bryant et al., 2009; Schultz et al., 2003; Zhang et al., 2015).

In der Forschung zu BRCA2-assoziierten Tumoren wurde herausgefunden, dass BRCA2-mutierte Zellen HDR-defizient sind und auf PARP1-Inhibitoren mit erhöhtem Zelltod

reagieren. Eine Erklärung dafür ist, dass HDR-defiziente Zellen genomisch instabil sind und auf die Stabilisierung der Replikationsgabeln durch PARP1 angewiesen sind (Bryant et al., 2005). Im Jahr 2014 wurde der erste PARP1-Inhibitor für KrebspatientInnen zugelassen (G. Kim et al., 2015).

1.5 Aktuelle Herausforderungen der therapeutischen Genomeditierung

1.5.1 Therapeutische Genomeditierung durch Nutzung von DNA-Reparaturmechanismen

Die Genomeditierung durch programmierte Endonukleasen zeigt neue Möglichkeiten auf, indem gezielte DSB in mutierten Genen durch zelleigene Reparaturmechanismen repariert werden. Dabei bringen die einzelnen Reparaturwege unterschiedlichen Nutzen für die Genomeditierung. Werden DSB in einem mutierten Gen durch NHEJ repariert, kann es durch Indels zu Frameshift-Mutationen und folgend zum verfrühten Einbau von Stopp-Codons oder zu Nonsense-Mutationen führen (s. 1.3.1). Das pathogene Genprodukt wird dann nicht mehr exprimiert, was ein ähnlicher Therapieansatz wie die RNAi-Therapie ist, wobei bei der Genomeditierung das Zielgen dauerhaft ausgeschaltet wird (Cox et al., 2015). Mit dieser Strategie entwarfen z.B. Antoniani et al. einen CRISPR/Cas9-genomeditierenden Ansatz zur Therapie von β -Hämoglobinopathien, indem sie durch Deletionen in den mutierten δ - und β -Globin-Genen die Expression des funktionierenden fetalen Hämoglobins (HbF) steigerten (Antoniani et al., 2018). Durch HDR kann ein konstruiertes Template mit Sequenzen, die homolog zu den Seiten der gesetzten DSB sind, die mutierte Stelle im Gen ersetzen und so die Wildtyp-Sequenz wieder herstellen. Alternativ kann eine Kopie des Wildtyp-Gens oder eine protektive Gain-of-function-Mutante an einem anderen Locus im Genom eingefügt werden. Sogenannte *safe harbors* eignen sich für eine additive Genomeditierung, da eine Veränderung in diesen Regionen keine Auswirkungen auf den Phänotyp, wie z.B. die Aktivierung eines Protoonkogens, hat (Cox et al., 2015). Das Template kann dabei auf einem Plasmid oder einem einzelsträngigen Oligonukleotid lokalisiert sein (Jasin & Haber, 2016).

In postmitotischen Neuronen, wie den Photorezeptoren in der Retina, ist die HDR-Aktivität sehr niedrig, weshalb HDR-basierte Genomeditierung dann eine ungeeignete Methode darstellt. MMEJ ist, neben NHEJ, in diesen Zellen vorherrschend (Pasquini et

al., 2020). In verschiedenen Studien wurden bereits MMEJ-assoziierte Systeme beschrieben, um präzise Gen-Knockins durchzuführen (Nakade et al., 2014; Yanik et al., 2018). MMEJ hat gegenüber HDR den Vorteil, dass kleinere Templates genutzt werden können und das System auch in Zellen mit niedriger HDR-Aktivität verwendet werden kann. Nakade et al. haben mit ihrem MMEJ-basierten System *in vivo* EGFP-Knockins in Fröschen und Seidenraupen durchführen können (Nakade et al., 2014).

Zur Optimierung der Genomeditierung gehört das *Pathway Engineering*, bei dem z.B. die Herabregulierung eines reparaturassoziierten Proteins die Wahl des Reparaturwegs beeinflusst. Die HDR-Aktivität kann zum Teil durch Inhibierung NHEJ-assoziiierter Reparaturenzyme erhöht werden (Z. Hu et al., 2018; Robert et al., 2015). Neben reparaturassoziierten Proteinen führt außerdem die Anwesenheit eines homologen Templates zur vermehrten HDR-Reparatur (Yeh et al., 2019). Da NHEJ unresezierte DNA-Enden religiert, begünstigen Proteine, die zur 5'-3'-Resektion führen, eher MMEJ oder HDR. Dabei sind für MMEJ kürzere Resektionen notwendig als für HDR. Eine Blockierung der 5'-3'-Resektion führt zu vermehrter NHEJ-Aktivität (Jasin & Haber, 2016; Yeh et al., 2019).

1.5.2 Herausforderungen der *in vivo* Genomeditierung

Bei der therapeutischen Genomeditierung gibt es verschiedene Ansätze, das Genom der Zielzellen zu verändern. Eine *ex vivo* Strategie zur Therapie von hämatologischen Erkrankungen ist es, hämatopoetische Stammzellen zu entnehmen, sie *in vitro* zu bearbeiten und sie dann zurück in den Blutkreislauf der PatientInnen zu bringen (Antoniani et al., 2018; Wu et al., 2019). Für die Therapie von erblichen Netzhautdefekten beinhaltet der *ex vivo* Ansatz die Entnahme einer Hautbiopsie, die Entdifferenzierung der Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs), eine *in vitro* Korrektur der Mutation durch Gentransfer, die Neudifferenzierung ausgewählter Zellen in Pigmentepithel- oder Photorezeptorzellen und die Reimplantation dieser Zellen in die Netzhaut (Yanik et al., 2017). Um solche Umwege zu umgehen, muss das genomverändernde Konstrukt *in vivo* in die Zielzellen eingebracht werden. Die effiziente und sichere Übertragung der genomeditierenden Konstrukte *in vivo* ist aktuell die limitierende Komponente für die klinische Anwendung. *In vitro* können die Nukleaseproteine durch Plasmid-DNA-Transfektion, virale Vektoren oder durch Transfektion einer synthetischen mRNA in der Zellkultur exprimiert werden. In aktuellen

Studien über *in vivo* Genomeditierung werden vor allem virale Vektoren oder Lipidnanopartikel getestet. Virale Vektoren, insbesondere AAVs, sind aufgrund ihrer Effizienz und Gewebespezifität beliebt. Schwierigkeiten sind hierbei, dass ein AAV nur eine begrenzte Größe an genetischer Information transportieren kann und es bei langfristiger Expression zu off-target-Aktivitäten und Immunreaktionen kommen könnte (D. Wang et al., 2019). Eine kostengünstigere Alternative zu den viralen Vektoren mit deutlich größeren Transportkapazitäten sind die Lipidnanopartikel, die DNA, mRNA und Ribonukleoproteine (RNP) transportieren können und über die Endozytose oder Makropinozytose in die Zelle aufgenommen werden. Nachteilig sind dabei eine erhebliche Toxizität der Nanopartikel und eine teilweise unerwünschte Selektivität durch zellspezifische Aufnahme (Doudna, 2020; Yanik et al., 2017).

1.6 Nachweismethoden zur DNA-Reparatur

Um herauszufinden, ob ein CRISPR/Cas9-induzierter DSB korrekt repariert wurde, ist eine naheliegende Methode, die Zell-DNA zu sequenzieren und die Sequenz mit der Wildtypsequenz zu vergleichen. Dazu wird in der Regel der zu untersuchende DNA-Abschnitt mittels PCR amplifiziert und durch eine Gelelektrophorese dargestellt. Nach der Isolation kann die DNA sequenziert werden. Neben erhöhten Kosten und Zeitaufwand ist es bei der DNA-Sequenzierung schwierig, die Entstehung von Mutationen zu quantifizieren. Dazu müsste für jedes Assay die DNA sehr vieler Zellen sequenziert werden, um so die Mutationsrate zu errechnen.

Eine schnellere und kostengünstigere Methode, Mutationen zu detektieren, sind fluoreszenzbasierte Reportersysteme. Die Effizienz der DNA-Reparatur wird bei Fluoreszenzreportern anhand von exprimierten Fluorophoren gemessen, sodass keine DNA isoliert und sequenziert werden muss. Die Methoden beruhen in der Regel auf dem Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Dabei handelt es sich um eine strahlungsfreie Energieübertragung eines angeregten Donor-Fluorophors an ein 1-10 nm entferntes Akzeptor-Fluorophor mit überlappendem Absorptionsspektrum. Die Distanz von 1-10 nm entspricht der Größe von Makromolekülen und ermöglicht somit eine sehr exakte Darstellung von interzellulären Interaktionen. Die Quantifizierung des Energietransfers erfolgt über die Messung der Emissionsintensitäten von Donor und Akzeptor (Shrestha et al., 2015).

1.6.1 BRET-Assay

Biolumineszenz ist ein natürlich vorkommender Mechanismus zur Lichterzeugung. Die zu den Seefedern gehörende Oktokorallenart *Renilla reniformis* zum Beispiel besitzt das Enzym *Renilla* Luziferase, das bei Umsetzung des Substrats Coelenterazin blaues Licht erzeugt. Dieses regt ein grün fluoreszierendes Protein an, das *Renilla* GFP. Dieser Mechanismus kann experimentell dazu genutzt werden, um Protein-Protein-Interaktionen darzustellen (Loening et al., 2007).

Im Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) wird das FRET-Prinzip mit Hilfe von Biolumineszenzen genutzt. Für das BRET-Reporter-Assay nach Wimmer et al. werden Vektoren, die die Gene für *Renilla* Luziferase 8 (RLuc8) und GFP2 enthalten, in die zu analysierenden Zellen transfiziert. Die RLuc8 besitzt acht Mutationen, die das Enzym im Vergleich zum Wildtyp 200-fach resistenter gegenüber muriner Inaktivierung machen und eine 4-fach erhöhte Lichtemission erzeugen (Loening et al., 2006). GFP2 ist eine mutierte Variante des in der Qualle *Aequorea victoria* vorkommenden GFPs, das an die Anregung bei 400 nm angepasst ist und dem GFP der *Renilla reniformis* sehr ähnlich ist (De et al., 2007; Loening et al., 2007). Zwischen der RLuc8- und der GFP2-Domäne befindet sich eine mit einer PAM-Sequenz markierten Klonierungsbox, in die Target-Sequenzen kloniert werden können. Ein auf die klonierte Target-Sequenz angepasstes CRISPR/Cas9-System fügt Doppelstrangbrüche zwischen dem Luziferasegen und dem GFP-Gen ein. Quantifiziert wird die Energieübertragung von RLuc8 auf GFP2, indem die Emissionen von Wellenlängenfiltern für blaues (370-450 nm) und grünes (510-540 nm) Licht gemessen werden. Aus der Luziferase- und GFP-Intensität wird dann der Quotient (BRET-Ratio) errechnet, der die Energieübertragung widerspiegelt (s. 2.2.4.2).

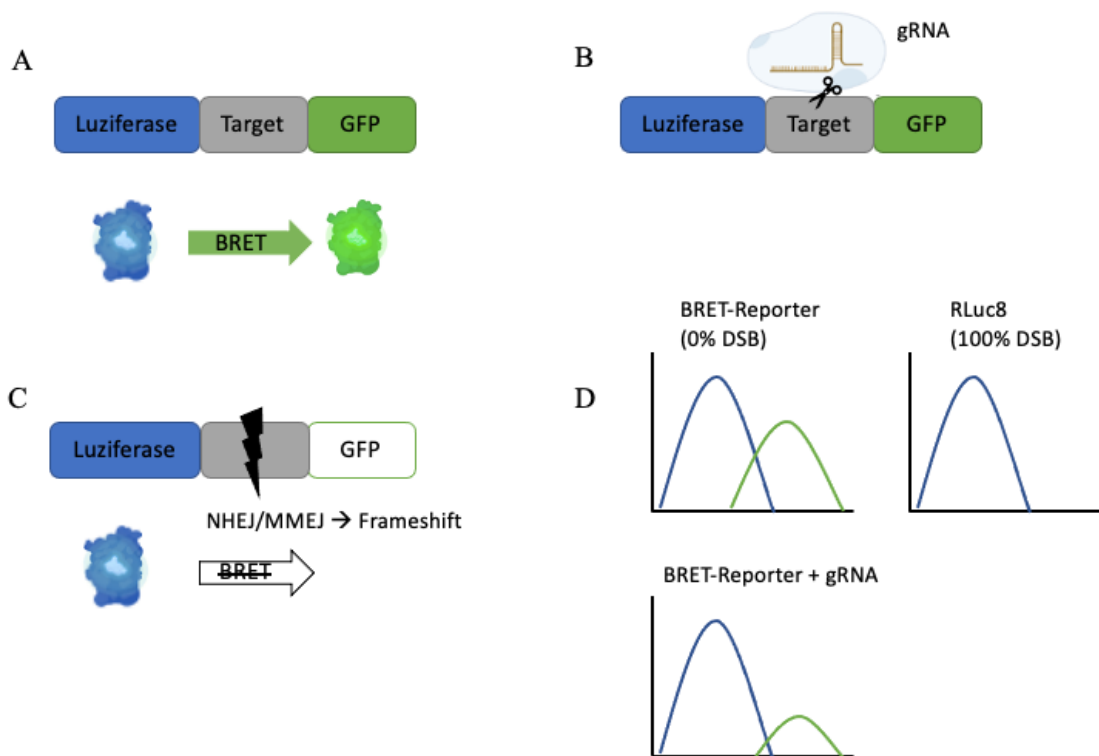


Abbildung 4: BRET-Assay, Übersicht auf Expressionsebene **A:** Der BRET-Reporter enthält zwischen dem Luziferasegen und dem GFP-Gen eine Klonierungsbox, in die eine gewünschte Target-Sequenz eingefügt werden kann. Nach Transfektion exprimieren die Zellen Luziferase und GFP. GFP wird durch die Luziferaseemission über den BRET-Mechanismus angeregt. **B:** Der zielgerichtete gRNA/Cas9-Komplex setzt in der Target-Sequenz einen DSB ein. **C:** Wird der DSB durch NHEJ oder MMEJ repariert, kommt es häufiger zu Indel-Mutationen mit resultierenden Frameshifts. GFP kann nicht mehr exprimiert werden, während die Expression von Luziferase nicht beeinflusst ist. **D:** Durch die Messung der Luziferase- und GFP-Intensitäten kann auf die Reparaturaktivität der Zellen geschlossen werden.

Entstehen in der Targetsequenz DSB, die nicht oder falsch repariert werden, z.B. durch NHEJ, können Frameshiftmutationen entstehen, die die Expression von GFP2 verhindern. Die Expression der Luziferase bleibt erhalten, sodass die relative Energieübertragung folglich geringer ist (Wimmer et al., 2021). Eine niedrige BRET-Ratio steht also für eine hohe Rate an Frameshift-Mutationen. Bei gleicher mutagener Exposition spricht eine höhere Frameshift-Rate für eine schlechtere Reparatureffizienz, die oft durch NHEJ-Reparatur begründet ist. Als 0 % DSB-Kontrolle wird der BRET-Reporter ohne zugehöriges CRISPR/Cas9-Plasmid verwendet, als 100 % DSB-Kontrolle gilt ein Plasmid, das nur das Luziferasegen und kein GFP-Gen enthält.

1.6.2 MMEJ-Assay

MMEJ funktioniert, wie in 1.3.2 beschrieben, indem kurze homologe Sequenzen in der Nähe des DSB aneinandergelagert werden. Verschiedene MMEJ-basierte Systeme zeigen, dass präzise Genomeditionierung über den MMEJ-Reparaturweg erfolgen kann (s. 1.5.1).

Yanik et al. haben ein CRISPR/Cas9-vermitteltes MMEJ-Reportersystem entwickelt, das die MMEJ-Aktivität in Zellen quantifiziert. Das System basiert auf Templates, die ein für Luziferase kodierendes Gen enthalten, flankiert von mikrohomologen Sequenzen unterschiedlicher Länge (MH = 10, 15 oder 30 bp). Der CMV-Promotor für das Luziferasegen wurde in eine stabile HEK293-Zelllinie integriert, sowie ein RPGR-ORF15-Exon und dazwischenliegende Sequenzen, die komplementär zu den MHs der Templates sind (s. 2.1.8).

Zwei gRNAs leiten die Nuklease Cas9 zu den beiden Seiten des ORF15-Exons, sodass dort DSB erzeugt werden. Diese Schnittstellen (PAM) in dem Knockin der HEK293-^{mORF15}-Zelllinie liegen 30 bp entfernt von den komplementären MH-Sequenzen, sodass diese bei NHEJ-Ereignissen nicht beeinflusst werden. Zwei weitere gRNAs fügen DSB in den MH-Luc-Plasmiden ein, die die Templates mit den MH (10, 15 oder 30 bp) und der Luziferasesequenz enthalten, sodass die Templates ausgeschnitten werden. Wenn für die Reparatur des DSB eines der konstruierten Templates mit mikrohomologen Sequenzen verwendet wird, wird die Luziferasesequenz hinter den entsprechenden CMV-Promotor, anstelle des ORF15-Exons, eingebaut. Die Zelle exprimiert im Verlauf Luziferase. Die MMEJ-Aktivität lässt sich dann durch ein Luziferase-Assay messen (Yanik et al., 2018).

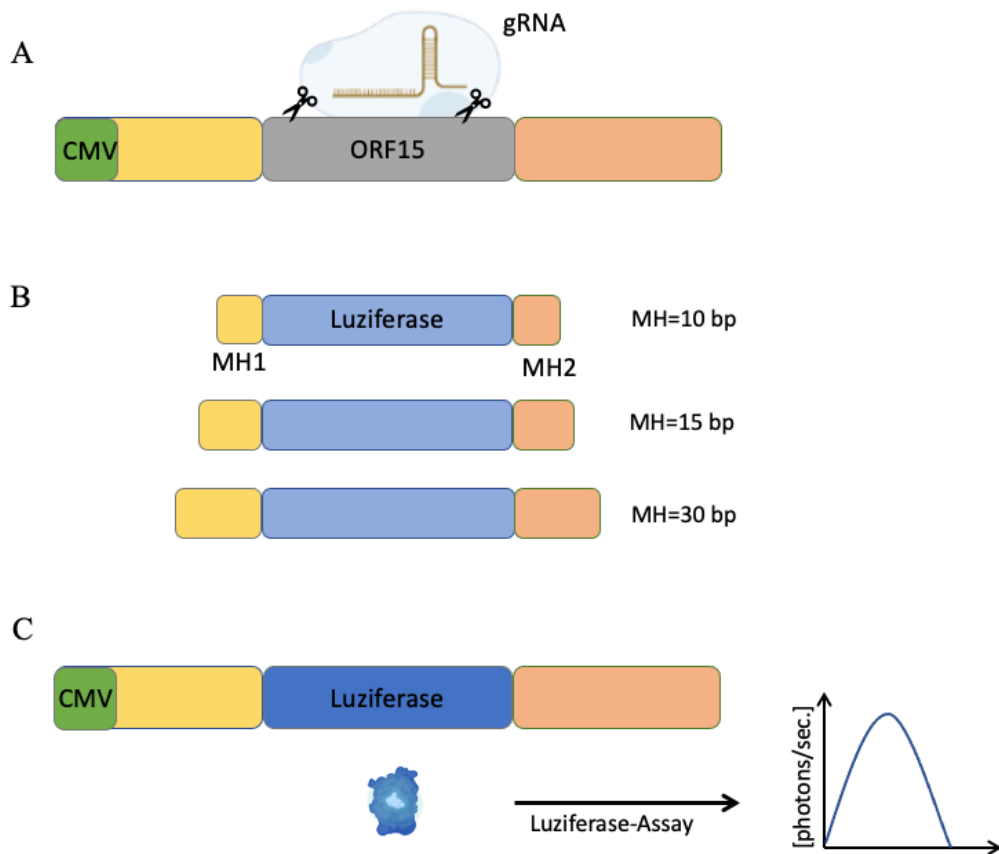


Abbildung 5: MMEJ-Assay, schematische Übersicht **A:** Durch programmierte gRNAs fügt die Nuklease Cas9 gezielt DSB im ORF15-Exon ein. **B:** Die designierten Templates enthalten 10, 15 oder 30 bp lange Mikrohomologien (MH1, MH2) zu beiden Seiten des DSB im ORF15-Exon, sowie ein Luziferasegen, das nur bei Einbau hinter den CMV-Promotor abgelesen werden kann. **C:** Ein MH-Template wird durch MMEJ für die Reparatur verwendet und die Zelle exprimiert Luziferase. Die Luziferaseintensität kann stellvertretend für die MMEJ-Aktivität gemessen werden.

1.7 Zielsetzung

Im Rahmen des *pathway engineering* zur Verbesserung der Genomeditierung wird diskutiert, ob eine Modifizierung von PARP1 auf Expressionsebene die therapeutische Anwendung der Genomeditierung verbessern könnte. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Auswirkungen einer verringerten oder erhöhten PARP1-Expression auf die verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen zu messen.

Es wurden fünf verschiedene CRISPR/Cas9-vermittelte PARP1-KOs, einzeln und in Kombination, mithilfe des BRET-Reporters oder des MMEJ-Assays getestet. Ergänzend wurde die PARP1-Überexpression durch Transfektion eines für humanes PARP1 kodierenden Plasmids in die BRET-Assays miteingeschlossen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav DX-65	Systec, Wetttenberg
BioPhotometer Typ 6131	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Eismaschine Scotsman AF80	Scotsman, Berlin
Fluoreszenzmikroskop BZ 8100 E	Keyence BioZero, Essen
Gasbrenner Fireboy	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr, Biberach an der Riß
Gefrierschrank, -80°C	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Gelkammer für Agarosegele (XS/S, M)	Biometra, Göttingen
Heizblock TB2	Biometra, Göttingen
Inkubatoren CD150 und BD115	Binder, Tuttlingen
Kühlschrank, +4°C	VWR International, Darmstadt Bosch, Gerlingen Liebherr, Biberach an der Riß
Mikroskop IT 400	VWR International, Darmstadt
Mikrowelle	Siemens, München
Multimode Platereader Infinite M100Pro	Tecan, Gröding, Österreich
Multiporator für Transformationen	Eppendorf, Hamburg
PCR Thermocycler T-Professional/T- Personal	Biometra, Göttingen

Pipetten	Brand, Wertheim Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe „Pipet Boy“	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power-Supply für Elektrophorese PS305T	Whatman-Biometra, Göttingen
Schüttler	Sartorius AG, Göttingen
Spülmaschine	Miele Professional, Gütersloh
Sterilbank, Laminar Flow	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Stickstofftonne Locator Plus 6, -196°C	Thermolyne, Pfullingen
Trockenschrank	Binder, Tuttlingen
Vortexer	VWR International, Darmstadt
Waage	Ohaus, Zürich, Schweiz
Wasseraufbereitungssystem	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 1-15PK	Sigma, München
Zentrifuge 4K15	Sigma, München
Zentrifuge Micro 200	Hettich Lab Technology, Tuttlingen

2.1.2 Software

Tabelle 2: Softwares

Software	Hersteller
FinchTV 1.5	Perkin Elmer, Rodgau
iControl Microplate Reader 1.11	Tecan, Männedorf, Schweiz
SigmaPlot 12.0	Systat, Erkrath
SnapGene 5.0	GSL Biotech LLC, San Diego, USA

2.1.3 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, insofern nicht anders aufgeführt, in Analysequalität oder in Qualität für die molekularbiologische Forschung bezogen und verwendet.

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agar	Life Technologies/Thermo Fisher, Darmstadt
Agarose	Genaxxon, Ulm
Borsäure	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid * 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Coelenterazin 400a	Nanolight Inc., Pinetop, USA
Coelenterazin h	Nanolight Inc., Pinetop, USA
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA Stain Clear G	Serva, Heidelberg
dNTPs (10mM)	Fermentas, St. Leon Rot
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol vergällt, ≥ 99,8 %	Roth, Karlsruhe
FCS	PAN-Biotech, Aidenbach
Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder	Life Technologies/Thermo Fisher, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol p.a., ≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich, Darmstadt
L-Glutamin 100X	Anprotec, Bruckberg
Luria Broth Base	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid * 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Methanol p.a., ≥ 99,8 %	Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Polyethylenimin (PEI)	PolyscienceAG, Cham, Schweiz
Salzsäure, rauchend, 37 %	Merck, Darmstadt
SOC	Invitrogen, Karlsruhe
Stickstoff (flüssig)	Linde, München
Tris-NH ₃	Roth, Karlsruhe

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Kulturplatten oder Reaktionsgefäße wurden von den Firmen Biozym (Hessisch Oldendorf), Brand (Wertheim), Corning (Wiesbaden), Eppendorf (Hamburg) Greiner Bio-One (Frickenhäuser), LVL-Technologies (Crailsheim), Roth (Karlsruhe) oder Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.1.5 Enzyme

Tabelle 4: Enzyme

Enzym	Hersteller
Accutase	eBioscience, Frankfurt a.M.
<i>Avr</i> II, Restriktionsenzym (20000 U/ml)	NEB, Frankfurt am Main
<i>Bbs</i> I, Restriktionsenzym (20000 U/ml)	NEB, Frankfurt am Main
<i>Bsi</i> WI, Restriktionsenzym (20000 U/ml)	NEB, Frankfurt am Main
Phusion® High-Fidelity Polymerase (2 U/μl)	Life Technologies/Thermo Fisher, Darmstadt
T4 DNA-Ligase (400000 U/ml)	NEB, Frankfurt am Main

2.1.6 Kit-Systeme

Tabelle 5: Kit-Systeme

Kit	Hersteller
DNA clean & concentrator-25	Zymo Research, Freiburg
Gel and PCR Clean-Up	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Plasmid Miniprep Kit	Macherey-Nagel, Düren
PARP1 (Human) ELISA Kit	MyBiosource, Inc., San Diego (USA)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

2.1.7 Bakterienstämme

Tabelle 6: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Marker	Hersteller
XLI-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F ['] proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene, Heidelberg

2.1.8 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 7: Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Art	Bezugsquelle
HEK293T #ATCC-CRL-3216	Humane embryonale Nierenzelllinie	LGC Standards GmbH, Wesel
HEK293 ^{-mORF15}	Humane embryonale Nierenzelllinie*	Herstellung der Arbeitsgruppe (Yanik et al., 2018)
NIH/3T3 #ATCC-CRL-1658	Murine embryonale Fibroblasten	LGC Standards GmbH, Wesel

* Die HEK293^{-mORF15}-Zelllinie wurde speziell für das MMEJ-Assay designt. Es handelt sich dabei um HEK293-Zellen mit einem murinen *RPGR-ORF15*-Knockin. ORF15 ist das terminale Exon auf dem Gen für den Retinitis-Pigmentosa-GTPase-Regulator (RPGR). Mutationen auf dem *RPGR*-Gen sind verantwortlich für die X-chromosomal vererbte Retinitis pigmentosa, eine chronisch-progredient verlaufende Erkrankung der Netzhaut. ORF15 besitzt hochrepetitive Sequenzen und ist für ca. 60 % der Mutationen des *RPGR*-Gens verantwortlich (Vervoort et al., 2000).

2.1.9 Zellkulturmedien

Für die Kultivierung der Zelllinien HEK293T und NIH/3T3 wurde DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium, 4500 mg/L Glukose) mit 10 % FCS (v/v), 2 % L-Glutamin (2 mM) und 1 % Penicillin/Streptomycin (100 IU/ml / 0,1 mg/ml) supplementiert. Für die Kultivierung von HEK293^{-mORF15}-Zellen wurde das supplementierte DMEM zusätzlich mit Geneticin versetzt.

Zum Einfrieren von Zellen bei -80 °C wurde Einfriermedium aus 10 % DMSO und 90 % FCS verwendet.

2.1.10 Bakterienkulturmedien

Die Anzucht von *E.coli* erfolgte in LB-Medium (Luria Broth) oder auf LB-Agar. Die Medien wurden nach Ansetzen autoklaviert. Für die Transformationen wurde steriles SOC-Medium (Super Optimal Broth mit Katabolitrepession durch Glukose) verwendet.

LB-Medium:

25 g/l Luria Broth Base

LB-Agar:

25 g/l Luria Broth Base

15 g/l Select Agar

SOC-Medium:

2 % (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glucose

2.1.11 Antibiotika

Tabelle 8: Antibiotika

Antibiotikum	Stockkonzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml	Sigma, München
Geneticin	50 mg/ml	200 µg/ml	Thermo Fisher, Darmstadt
Kanamycin	100 mg/ml	35 µg/ml	Sigma, München
Penicillin/ Streptomycin (100X)	Penicillin: 10000 U/mL Streptomycin: 10 mg/mL	200 µg/ml	Anprotec, Bruckberg
Tetrazyklin	12,5 mg/ml	12,5 µg/ml	Sigma-Aldrich, Darmstadt

2.1.12 Puffer und Lösungen

2.1.12.1 Allgemein

1x PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

1,8 mM KH₂PO₄

ad 1000 ml mit ddH₂O

10x TBE

1 M Tris-NH₃

0,8 M Borsäure

10 mM EDTA

ad 1000 ml mit ddH₂O

2.1.12.2 Kommerziell erhältliche Puffer

Tabelle 9: Puffer

Puffer	Hersteller
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
10x CutSmart buffer	New England Biosciences, Frankfurt a.M.
HF-Puffer (5x)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Ligase-Puffer (10x)	New England Biosciences, Frankfurt a.M.

2.1.13 Plasmide

Tabelle 10: Plasmide

Plasmid	Hersteller
BRET-Reporter (pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2)	Herstellung der Arbeitsgruppe (Wimmer et al., 2021), s. Abbildung 6
px459 (pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0)	Addgene #62988 (Ran et al., 2013), s. Abbildung 7
p-CMV-RLuc8	RLuc8 orf bereitgestellt durch Sanjiv Sam Gambhir (Loening et al., 2006), s. Abbildung 8
ORF15-gRNA	Basierend auf dem pSQT1313-Vektor (Tsai et al., 2014). Enthält die Sequenzen für 2 gRNAs, die DSB zu beiden Seiten der mORF15-Exons in der HEK293 ^{mORF15} -Zelllinie einsetzen (Yanik et al., 2018).
px459-MH-Luc	Basierend auf dem px459-Vektor (Ran et al., 2013). Enthält die Sequenzen für 2 gRNAs, die DSB zu beiden Seiten der Luziferasesequenz mit MH auf den MH-Luc-Plasmiden führen (Yanik et al., 2018).
10 bp-MH-Luc	Basierend auf dem pSQT1313-Vektor (Tsai et al., 2014). Enthalten eine Luziferasesequenz, die von 10, 15 oder 30 bp langen MH flankiert wird, die homolog zu der ORF15-Sequenz in der HEK293 ^{mORF15} -Zelllinie sind (Yanik et al., 2018).
15 bp-MH-Luc	
30 bp-MH-Luc	
TOPO VEGF Blunt Vektor	Vektor ohne Promotor und Expressionsaktivität. Invitrogen Thermo Fisher, USA
pCMV-PARP1-3xFlag-WT	Addgene #111575 (Liszcak et al., 2018)

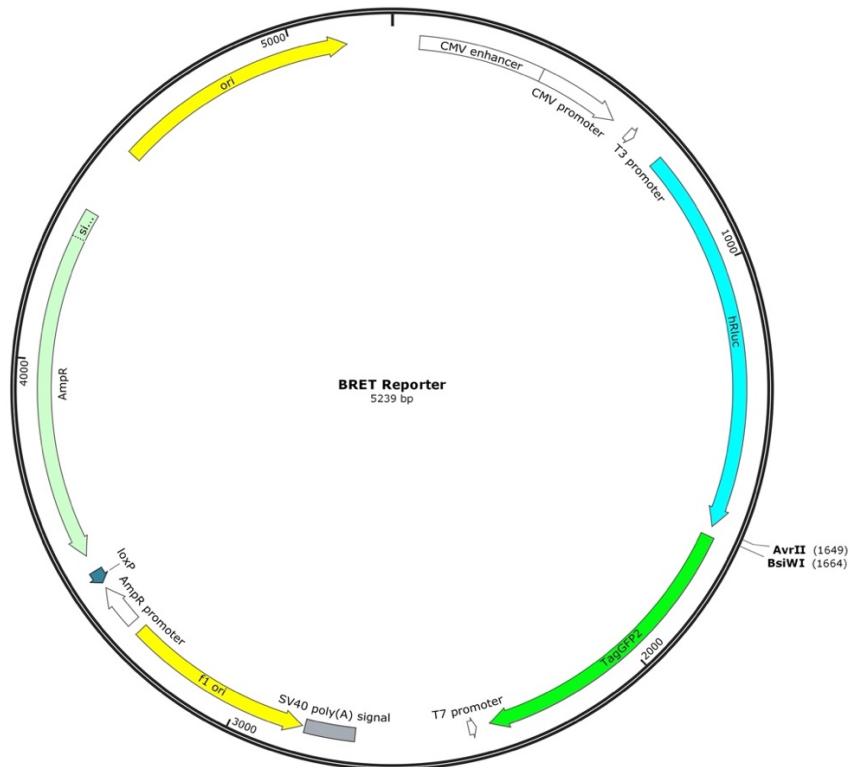


Abbildung 6: BRET-Reporter Der verwendete BRET-Reporter enthält die Domäne für *Renilla* Luziferase 8, gefolgt von einer mit einer PAM-Sequenz markierten Klonierungsbox, die von den Restriktionsenzymen *AvrII* und *BsiWI* geschnitten werden kann. Nach der Klonierungsbox folgt die Domäne für GFP2.

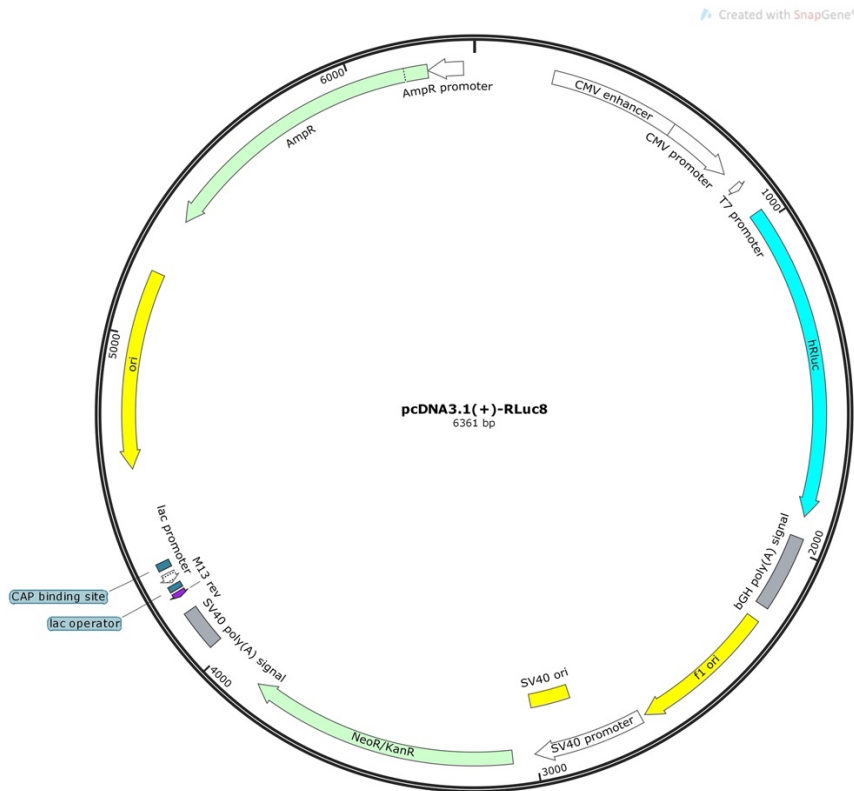


Abbildung 8: RLuc8-Vektor Der RLuc8-Vektor enthält die Sequenz für Luziferase, keine Sequenz für GFP. Somit kann dieser für die 100 %-DSB-Kontrollen verwendet werden.

2.1.14 Oligonukleotide und Primer

2.1.14.1 PARP1-Knockouts

Die Target-Oligonukleotide wurden in den BRET-Reporter und die Guide-Oligonukleotide in den px459-Vektor kloniert. Die Guide-Sequenzen entsprechen den PARP1-KO-gRNAs. Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden mit Hilfe des *gRNA design tools* (www.atum.bio) identifiziert.

Tabelle 11: Oligonukleotide für PARP1-Target- und -gRNA-Inserts

Oligonukleotid		Sequenz (5'-3')
Target 1	forward	CTA GGG TTA CCC ACT CCT TCC GGT TGG G
	reverse	GTA CCC CAA CCG GAA GGA GTG GGT AAC C
Guide 1	forward	CAC CGT TAC CCA CTC CTT CCG GTT
	reverse	AAA CAA CCG GAA GGA GTG GGT AAC
Target 2	forward	CTA GGG CCA CGG AGG CGC TGG TTT CTG G
	reverse	GTA CCC AGA AAC CAG CGC CTC CGT GGC C
Guide 2	forward	CAC CGC CAC GGA GGC GCT GGT TTC
	reverse	AAA CGA AAC CAG CGC CTC CGT GGC
Target 3	forward	CTA GGC TGA CCC GAG CAT TCC TCG CAG G
	reverse	GTA CCC TGC GAG GAA TGC TCG GGT CAG C
Guide 3	forward	CAC CCT GAC CCG AGC ATT CCT CGC
	reverse	AAA CGC GAG GAA TGC TCG GGT CAG
Target 4	forward	CTA GGA GAA ACC AGC GCC TCC GTG GCG G
	reverse	GTA CCC GCC ACG GAG GCG CTG GTT TCT C
Guide 4	forward	CAC CAG AAA CCA GCG CCT CCG TGG
	reverse	AAA CCC ACG GAG GCG CTG GTT TCT
Target 5	forward	CTA GGC ACG GAG GCG CTG GTT TCT GGG G
	reverse	GTA CCC CCA GAA ACC AGC GCC TCC GTG C

Guide 5	forward	CAC CCA CGG AGG CGC TGG TTT CTG
	reverse	AAA CCA GAA ACC AGC GCC TCC GTG

2.1.14.2 *CLN3*-BRET-Reporter

Das *CLN3*-BRET-Reportersystem wurde für das BRET-Reporter-Assay zur Bestimmung der Frameshift-Rate und der HDR-Aktivität verwendet. Das BRET-Reporterplasmid (s. 2.1.13) enthält eine intronische Targetsequenz des murinen *CLN3*-Gens, sodass bei Experimenten in humanen Zellen das Zellgenom nicht von der gRNA/Cas9 des BRET-Systems verändert wird.

Tabelle 12: Oligonukleotide für den *CLN3*-BRET-Reporter

Oligonukleotid		Sequenz (5'-3')
BRET In8T3 (Target)	forward	CTA GGT GTG GGG CTT GCT CAC CTC CAG G
	reverse	GTA CCC TGG AGG TGA GCA AGC CCC ACA C
Px459 In8T3 (Guide)	forward	CAC CTG TGG GGC TTG CTC ACC TCC
	reverse	AAA CGG AGG TGA GCA AGC CCC ACA
In6T4 HDR Template (Target)	forward	CTA GGC AGG CCC TTG TTC GGA CTG CTG G
	reverse	GTA CCC AGC AGT CCG AAC AAG GGC CTG C

2.1.14.3 MMEJ-Reporter

Tabelle 13: MMEJ-Reportersequenzen

Oligonukleotid		Sequenz
ORF15-gRNA1		GTCAGGGATACCAGAGGAGCAGG
ORF15-gRNA2		TCCAGAATCGTTCGGAGCCTAGG
MH-Luc-gRNA1		GAGCGCCACCATGGTGAGCAAGG
MH-Luc-gRNA2		GGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGG
MH-10 bp	MH1	TTCGATCTTA
	MH2	GACTGCTGAC
MH-15 bp	MH1	CAAAGTTCGATCTTA
	MH2	GACTGCTGACATGAC
MH-30 bp	MH1	CAACCAGATTTTCC CAAAGTTCGATCTTA
	MH2	GACTGCTGACATGACGTCGAATGCGTAGCA

2.1.14.4 Primer

Tabelle 14: Primer für Sequenzierung und PCR

Primer	Sequenz (5'-3')
Sequenzierprimer I (px459)	GAC TAT CAT ATG CTT ACC GT
Sequenzierprimer II (BRET-Reporter)	AGC CCG ACG TCG TCC AGA TTG
HDR-PCR-Primer I	ATT GTC CGC AAC TAC AAC GCC TAC
HDR-PCR-Primer II	TCG GGG CGG ATG TAC ACG TTG

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit DNA

Wenn nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Proben bei +4°C oder -20°C gelagert.

2.2.1.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde verwendet, um DNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen. Es wurden 1 %-ige Gele hergestellt, indem die Agarose in 1x TBE-Puffer aufgekocht wurde. Nach dem Abkühlen wurde die verdampfte Flüssigkeit durch H₂O aufgefüllt, die Lösung mit 5 µl DNA Stain Clear G (s. 2.1.3) versetzt und in eine Form gegossen, in die anschließend ein Kamm eingesetzt wurde. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur konnte der Kamm entfernt werden. Die DNA-Fragmente wurden mit 6x Loading Dye (s. 2.1.12) gefärbt, in die Taschen des Gels pipettiert und für 60 min bei 100 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurde ein 100 bp DNA-Marker (s. 2.1.3) verwendet. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators.

2.2.1.2 DNA-Extraktion aus Agarosegel

Um die DNA aus der Agarosegelelektrophorese weiterzuverwenden, wurden zwei verschiedene Kits genutzt. Erst wurden die sichtbaren Banden auf dem UV-Transilluminator mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten. Die DNA-Extraktion aus dem Agarosegel erfolgte mittels „PCR Clean up and Gel extraction“-Kit nach Herstellerangaben (s. 2.1.6). Um die DNA für eine folgende Transfektion zu entsalzen und aufzureinigen, wurde das „DNA clean & concentrator-25“-Kit (s. 2.1.6) nach Protokoll verwendet.

2.2.1.3 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Um doppelsträngige DNA-Fragmente für die Klonierung der gRNA- und Target-Sequenzen zu erhalten, wurden die jeweiligen „forward“ und „reverse“ Oligonukleotide (s. 2.1.14) miteinander hybridisiert.

Ansatz: 20 µl

Oligonukleotid I:	8 µl
Oligonukleotid II:	8 µl

ddH₂O: 4 µl

Die Ansätze wurden 15 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt und anschließend 30 min bei Raumtemperatur abgekühlt.

2.2.1.4 Klonierung

Für das Einbringen der Inserts in die entsprechenden Vektoren wurde die Methode der Restriktionsklonierung verwendet. Dabei erzeugten Restriktionsenzyme definierte Schnittstellen an den Plasmiden mit Überhängen („sticky ends“), die komplementär zu den entsprechenden Inserts waren. Die Inserts konnten dann mit den geschnittenen Plasmiden ligiert werden.

Kloniert wurden die hybridisierten Target-Sequenzen (s. 2.1.14) mit den BRET-Vektoren (pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2) und die hybridisierten Guide-Sequenzen (s. 2.1.14) mit den px459-Vektoren (pSpCas9(BB)-2A-Puro).

2.2.1.5 Restriktionsverdau

Die Plasmidvektoren wurden mit Restriktionsenzymen an definierten Stellen geschnitten, um sie später mit den Inserts ligieren zu können. Die Linearisierung des BRET-Reporterplasmids erfolgte durch die Restriktionsenzyme *AvrII* und *BsiWI*, die Linearisierung des px459-Plasmids durch das Restriktionsenzym *BbsI* (s. 2.1.5).

Ansatz: 20 µl

DNA:	1000 ng
10x Cut Smart:	2 µl
Restriktionsenzym I:	1,5 µl (30 U)
Restriktionsenzym II (bei Verwendung):	1,5 µl (30 U)
ddH ₂ O:	ad 20 µl

Die Ansätze wurden im Wasserbad (37 °C) über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme im Heizblock bei 65 °C für 20 min.

2.2.1.6 Ligation

Für die enzymatische Ligation von DNA-Inserts mit zuvor linearisierten Plasmidvektoren wurde die T4 DNA-Ligase verwendet (s. 2.1.5). Die Inserts wurden im Überschuss verwendet.

Ligationsansatz: 10 µl

Insert:	5 µl
Vektor:	2 µl (100 ng)
T4-Ligase:	1 µl
10x Ligasepuffer:	2 µl
ddH ₂ O:	ad 20 µl

Die Ligationsansätze wurden bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Die Hitzeinaktivierung der Ligase erfolgte am Folgetag 20 min bei 65 °C im Heizblock. Die Target-Ansätze wurden mit je 0,5 µl *Bsi*WI nachverdaut. Durch das Ligieren mit einem Insert verloren die Vektoren die *Bsi*WI-Bindestelle, sodass nur unverdaute oder religierte Vektoren verdaut und somit linearisiert wurden. Die Nachverdauansätze wurden zwei Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und das Enzym anschließend wieder für 20 min bei 65 °C im Heizblock inaktiviert.

2.2.1.7 Sequenzierung von Plasmidklonen

Die Sequenzierung der hergestellten Plasmidklone wurde von der Firma Microsynth Seqlab, Göttingen, durchgeführt und mit der Software FinchTV ausgewertet. Es wurden die Sequenzierprimer I oder II (s. 2.1.14.4) verwendet. Die Proben wurden nach beschriebem Schema vorbereitet und verschickt.

Ansatz: 15 µl

Plasmid-DNA:	1200 ng
Sequenzierprimer (10 pmol):	3 µl
ddH ₂ O:	ad 15 µl

2.2.1.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

DNA-Konzentrationen von Proben wurden photometrisch nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz mit Hilfe eines Photometers (s. 2.1.1) bestimmt. Lagen die gemessenen

Absorptionswerte außerhalb des linear messbaren Bereichs eines Extinktionskoeffizienten von 0,1-1,0, wurde die Probenverdünnung angepasst.

2.2.1.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Templates für das HDR-Assay wurden mit Hilfe der PCR amplifiziert. Die Ansätze wurden wie im Folgenden beschrieben pipettiert und haben anschließend im Thermocycler das aufgelistete Programm durchlaufen. Die in dem Programm festgelegten Temperaturen führen in der DNA zuerst zur Denaturierung in ihre Einzelstränge, dann zur Hybridisierung der beiden Einzelstränge mit den beiden Primern und schließlich zur Elongation des Zweitstrangs, wobei die zugegebenen Nukleotide von den Primern in 3'-Richtung mittels der Phusion® Polymerase (s. 2.1.5) eingebaut werden.

Ansatz: 20 µl

DNA:	5 ng
MgCl (50mM):	0,3 µl
dNTPs (10mM):	0,4 µl
HDR Primer I:	1 µl
HDR Primer II:	1 µl
5x HF-Puffer:	4 µl
DNA Polymerase Phusion (2 U/µl):	0,2 µl
ddH ₂ O:	ad 20 µl

PCR-Programm

98 °C	30 s	
98 °C	10 s	} x34
65 °C	20 s	
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	
10 °C	10 min	

2.2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.2.1 Herstellung elektrokompenter *E.coli*

Elektrokompente *E.coli* XLI wurden hergestellt, um mittels Elektroporation Plasmid-DNA in Bakterien zu transformieren und diese anschließend zu kultivieren.

Für die Kultivierung der Bakterien wurden zwei Kulturen mit je 5 ml LB-Medium mit Tetrazyklin (12,5 µg/ml) (s. 2.1.11) mit je 5 µl aus einem XLI-Glycerolstock beimpft und über Nacht im 37 °C-Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden zwei Hauptkulturen mit jeweils 200 ml vorgewärmten LB-Medium und Tetrazyklin (12,5 µg/ml) (s. 2.1.11) mit jeweils einer Übernachtskultur beimpft und ca. drei Stunden im 37 °C-Schüttler inkubiert, bis die photometrisch gemessene optische Dichte (OD_{600nm}) 0,6 bis 0,8 erreicht war.

Die aliquotierten Kulturen wurden 30 min auf Eis inkubiert und dann für 10 min zentrifugiert. Die Zentrifugationsschritte wurden bei 5100 x g und 4 °C durchgeführt, der Überstand wurde verworfen. Für die Resuspension der abzentrifugierten Pellets wurden auf Eis vorgekühlte HEPES-Puffer (1 mM) und Glycerin (10 %, v/v) verwendet. Als erstes wurden die Pellets mit 50 ml HEPES-Puffer resuspendiert, anschließend wurde dieser Schritt inklusive Zentrifugation für 10 min mit 25 ml HEPES, dann mit 10 ml Glycerin wiederholt. Es folgten zwei wie oben beschriebene Zentrifugationsschritte á 5 min, erst wurde das Pellet mit 5 ml 10 %igem Glycerin, beim zweiten Schritt mit 0,5 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert.

Die nun elektrokompenten Zellen wurden, wenn nicht umgehend zur Transformation genutzt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*

Für die Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompente XLI-*E.coli* wurde die Methode der Elektroporation genutzt. Dafür wurden die Bakterien (50 µl) auf Eis aufgetaut. 1-4 µl des zu transformierenden Ligationsansatz wurden zu der Bakterienlösung pipettiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz vollständig und ohne Luftblasen in eine kalte Elektroporationsküvette pipettiert und im Multiporator bei 2000 V für 5 ms elektroporiert. Der Ansatz wurde dann sofort mit 1 ml SOC-Medium aus der Küvette gespült und eine Stunde bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Um den Ansatz zu konzentrieren, wurde 5 min bei 17000 x g zentrifugiert, 800 µl vom Überstand verworfen und der restliche Überstand

mit dem Pellet wieder resuspendiert. Zur Kultivierung der transformierten *E.coli* wurde der gesamte Ansatz auf einer LB-Agarplatte, die das zur Selektion entsprechende Ampicillin oder Kanamycin (s. 2.1.11) enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.3 Verdünnungsausstrich

Mit dem Verdünnungsausstrich konnte aus zu dicht bewachsenen LB-Agarplatten ein isoliertes Wachstum einzelner Klone auf einer neuen LB-Agarplatte erzielt werden. Dafür wurde eine Impföse im Bunsenbrenner komplett ausgeglüht, abgekühlt, über die bewachsene Platte gestrichen und auf der frischen Platte Z-förmig ausgestrichen. Nach weiterem ausglühen und abkühlen der Impföse wurde ausgehend vom Ende des vorherigen Ausstrichs auf der neuen Platte wieder Z-förmig ausgestrichen. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Die Platte mit dem Verdünnungsausstrich wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.4 Beimpfen von LB-Flüssigkulturen

Für das Beimpfen von Flüssigkulturen wurde autoklaviertes LB-Medium mit dem zur Selektion notwendigen Antibiotikum in Arbeitskonzentration verwendet (s. 2.1.11). Es wurde entweder ein 5 ml-Ansatz mit einer einzeln wachsenden Kolonie aus einer LB-Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze beimpft oder ein 100 ml-Ansatz mit 100 µl aus einem Glycerolstock. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

2.2.2.5 Herstellung von Glycerolstocks

Glycerolstocks dienen zur Lagerung von Bakterienkulturen bei -80 °C. Dafür wurden 500 µl der Bakterienkultur mit 500 µl sterilem Glycerin in einem Kryoröhrchen gemischt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.2.6 Isolation und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Die Isolation und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur erfolgte mit einem entsprechenden Plasmid-Kit (s. 2.1.6) nach Herstellerangaben.

Für die Minipräparation wurden 2 ml der Bakterienkultur als Ausgangslösung genommen und mit den beigegeführten Puffern nach Herstellerangaben durch die Säulenmethode aufgereinigt. Der Elutionsschritt wurde mit 27 µl ddH₂O durchgeführt.

Für die Maxipräparation von DNA höherer Konzentration wurden 100 ml beimpfte Flüssigkultur als Ausgangslösung genommen und mittels Kit nach Herstellerangaben (s. 2.1.6) aufgereinigt. Der Elutionsschritt wurde mit 500 µl ddH₂O durchgeführt.

2.2.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.2.3.1 Kultivierung von Zellen

Die adhärennten Zelllinien HEK293T, HEK^{-mORF15} und NIH-3T3 wurden in supplementiertem DMEM (s. 2.1.9) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Eingefrorene Zellen (1 ml) wurden mit 9 ml Zellkulturmedium in eine 10 cm große Zellkulturschale überführt. Nach 24 h wurde das Medium ausgetauscht, um das restliche Einfriermedium zu entfernen. Die Zellen wurden bei Konfluenz mit 1 ml Accutase von der Zellkulturplatte abgelöst, mit 9 ml Kulturmedium resuspendiert und in 1:10 Verdünnung mit frischem Kulturmedium in eine neue Zellkulturplatte überführt. 3T3-NIH-Zellen wurden vor dem Ablösen mit Accutase mit 10 ml sterilem 1x PBS-Puffer gewaschen. Alle Zelllinien wurden maximal bis Passage 25 verwendet.

2.2.3.2 Kryokonservierung

Um eukaryotische Zellen in flüssigem Stickstoff zu konservieren, wurde zuerst das alte Kulturmedium verworfen und die Zellen mit 10 ml sterilem 1x PBS-Puffer gespült. Die Zellen wurden in 1 ml Accutase 5 min inkubiert und so von der Platte gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 9 ml supplementiertem DMEM (s. 2.1.9) resuspendiert und in ein 15 ml-Falcon überführt. Dann wurden die Zellen 5 min bei 280 x g, 4 °C abzentrifugiert und der entstandene Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde mit 1 ml Einfriermedium (s. 2.1.9) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen umgefüllt. Die Zellsuspension wurde 3 Tage bei -80 °C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.3.3 Zählen von Zellen

Um eine berechenbare Anzahl von eukaryotischen Zellen auf eine Well-Platte zu bringen, wurden die Zellen mittels einer Neubauerkammer gezählt. Dafür wurde altes Kulturmedium von der Zellkulturplatte abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in 1 ml Accutase 10 min inkubiert und so von der Platte gelöst. Anschließend wurden 9 ml supplementiertes DMEM (s. 2.1.9) dazugegeben, um die abgelösten Zellen darin zu

resuspendieren. 50 µl von der Zellsuspension wurden in einem 2 ml Tube mit 50 µl Kulturmedium vermischt, um eine 1:1 Verdünnung der Zellsuspension zu erreichen.

2.2.3.4 Transfektion eukaryotischer Zellen

Um Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen zu integrieren, wurde die Methode der Polyethylenimin (PEI)-Transfektion genutzt. Transfiziert wurde entweder im 6-Well- oder 24-Well-Format. Vor Transfektion wurde das Zellkulturmedium der zu transfizierenden Zellen durch frisches supplementiertem DMEM (s. 2.1.9) ersetzt, um die Zellteilung anzuregen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Ansatz 6-Well-Platte (pro Well)

NaCl (150 mM):	100 µl
PEI (0,1 mg/ml):	200 µl
DNA:	2-2,5 µg

Ansatz 24-Well-Platte (pro Well)

NaCl (150 mM):	30 µl
PEI (0,1 mg/ml):	40 µl
DNA:	0,5-1 µg

Die Transfektionsansätze wurden durch vortexen homogenisiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit der Pipette vollständig in die Wells der zu transfizierenden Zellen geträufelt. Die Zellen wurden bei 37 °C inkubiert und nach 6 Stunden wurde das Kulturmedium durch frisches supplementiertes DMEM ersetzt.

2.2.3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung des BRET-Reporters sowie der Transfektionseffizienz in den eukaryotischen Zellreihen verwendet. Der BRET-Reporter enthält eine Domäne für das grün-fluoreszierende Protein GFP2, sodass die Zellen nach erfolgreicher Transfektion des BRET-Reporter-Plasmids GFP2 exprimieren. Das Fluoreszenzmikroskop regt durch Belichtung das exprimierte Fluorophor GFP2 an, das dann grünes Licht emittiert, welches unter dem Mikroskop sichtbar ist. Die Aufnahmen der transfizierten Zellen wurden mit 200facher Vergrößerung gemacht. Es wurde ein Overlay aus einer Aufnahme im Phasenkontrast

und einem Foto im grünen Kanal hergestellt. Die Belichtungszeit im grünen Kanal betrug 0,5 s.

2.2.4 Arbeiten mit Proteinen

2.2.4.1 Isolation von Gesamtproteinextrakten

Die Proteinisolation aus eukaryotischen Zellen erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. Zuerst wurde das Zellkulturmedium abgenommen und verworfen. Die Wells der 6-Well-Platten wurden je mit 1 ml sterilem PBS-Puffer gewaschen, anschließend in 100 µl frischem 1x PBS-Puffer mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Bei den Wells in 24-Well-Platten wurden je 500 µl PBS zum Waschen und 200 µl PBS zum Lösen der Zellen verwendet. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml-Tube übertragen und anschließend zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und nach dem Auftauen jeweils gevortext. Die Zelltrümmer wurden 5 min bei 4 °C und 17968 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt und entweder sofort weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.2.4.2 BRET-Assay

Wie in Kapitel 1.6.1 beschrieben, kann mit Hilfe des BRET-Assays die Frameshift-Rate in Zellen bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde damit der mutagene Effekt der verschiedenen gRNA/Cas9-vermittelten PARP1-KOs quantifiziert, sowie die Reparatureffizienz hinsichtlich NHEJ-/MMEJ-Reparatur und die Reparatureffizienz im HDR-Assay.

Für das BRET-Assay wurden je 10 µl des Gesamtproteinextrakts aus eukaryotischen Zellen in eine 96 Flat White Well-Platte von Costar pipettiert und mit dem Infinite Multimode Platereader von Tecan analysiert. Coelenterazin 400a (1,0 mg/ml in EtOH) wurde 1:100 in 1x PBS-Puffer verdünnt. Das verdünnte Coelenterazin wurde vor Verwendung mindestens 20 min inkubiert, um das Substrat im Puffer zu stabilisieren. Der Injektor des Platereaders pipettierte automatisch 100 µl Coelenterazin 400a pro Well, sodass die Emissionen sofort im Anschluss gemessen werden konnten. Die Emission der Luziferase wurde durch den „Magenta“-Filter im Bereich von 370-450 nm gemessen und die Emission des GFP2 vom „Green“-Filter im Bereich von 510-540 nm. Von jeder Probe wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Die jeweilige BRET-Ratio wurde aus dem Quotienten der GFP2-Emission durch die Luziferase-Emission errechnet (s. Formel).

Anschließend wurde die BRET-Ratio mit der 100 % DSB-Kontrollprobe, die nur Luziferase enthielt, und der 0 % DSB-Kontrollprobe, die nur den BRET-Reporter ohne zugehörige gRNA/Cas9 enthielt, normiert. Zur Berechnung wurden die Mittelwerte der Vierfachbestimmung verwendet.

$$BRET - Ratio = \frac{Biosensor\ Em(Green)}{Biosensor\ Em(Magenta)}$$

2.2.4.3 Luziferase-Assay

Das Luziferase-Assay wurde verwendet, um die MMEJ-Aktivität zu bestimmen (s. 1.6.2). Dafür wurden je 60 µl des Gesamtproteinextrakts aus den transfizierten HEK293^{-mORF15}-Zellen (s. 2.1.8) in eine 96 Flat White Well-Platte von Costar pipettiert und mit dem Infinite Multimode Platereader von Tecan im Lumineszenzmodus analysiert. Coelenterazin h (1,0 mg/ml in EtOH) wurde 1:100 in 1x PBS-Puffer verdünnt. Das verdünnte Coelenterazin wurde vor Verwendung mindestens 20 min inkubiert, um das Substrat im Puffer zu stabilisieren. Wie beim BRET-Assay wurden die Wells durch den Injektor automatisch mit 100 µl Coelenterazin h versetzt und die Emission der Luziferase wurde mit automatischer Abschwächung und ohne Wellenlängenfilter gemessen. Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, deren Mittelwerte für die Auswertung verwendet wurden.

2.2.5 Ergänzende Arbeiten der Arbeitsgruppe, die nicht selbst durchgeführt wurden

2.2.5.1 ELISA-vermittelte PARP1-Bestimmung auf Proteinebene (durch Dr. T. Wimmer)

Mit Hilfe des PARP1 (human) ELISA-Kits (s. 2.1.6) wurde die PARP1-Expression in HEK293T-Zellen (s. 2.1.8) gemessen, die mit den verschiedenen CRISPR/Cas9-vermittelten KOs transfiziert wurden. Als Kontrolle wurde die Wildtyp (wt)-Expression in den nicht transfizierten Zellen gemessen.

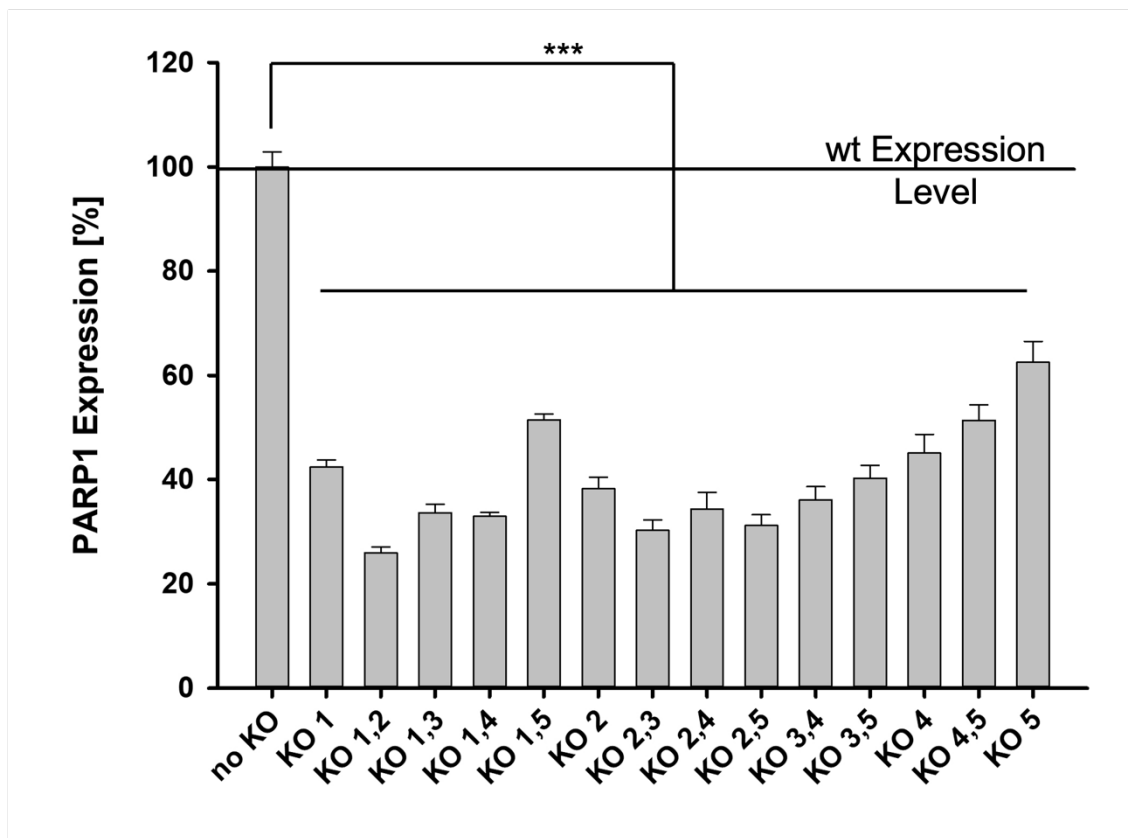


Abbildung 9: ELISA-vermittelte Messung der PARP1-Expression Prozentuale Auftragung der PARP1-Expression nach Transfektion von verschiedenen CRISPR/Cas9-vermittelten PARP1-KOs. *** $p < 0,001$

2.2.6 Statistische Auswertung

Falls nicht anders angegeben, besteht jeder Versuch aus drei unabhängigen Experimenten. Jede Probe wurde mindestens dreimal gemessen, die daraus resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für die statistische Auswertung verwendet. Für einen Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde der Paired-t-Test oder der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Für einen Vergleich mehrerer Gruppen untereinander diente der ANOVA-Test. Die Signifikanztestung erfolgte über das Programm SigmaPlot.

Als signifikant wurden P-Werte von $<0,05$ (*) angesehen, als sehr signifikant von $<0,01$ (**) und als höchst signifikant von $<0,001$ (***)).

3 Ergebnisse

Um den Einfluss von PARP1 auf die verschiedenen Reparaturwege zu quantifizieren, wurden zunächst die Aktivitäten der fünf PARP1-KOs in murinen Fibroblasten mit Hilfe des BRET-Assays gemessen. Die Reparaturassays wurden im Anschluss mit den KO-gRNA/Cas9-Komplexen in humanen Zellen durchgeführt. Ein BRET-Reporter wurde für die Quantifizierung von Frameshift-Mutationen und der HDR-Aktivität verwendet. Für das HDR-Assay wurde zusätzlich zu den KO-gRNA/Cas9-Komplexen ein, zu dem BRET-Reporter homologes, Template transfiziert, das sich in der Target-Sequenz unterscheidet, sodass es im Template nicht zu einem Doppelstrangbruch kommt. Zudem wurde eine PARP1-Überexpression in diese beiden Assays miteingeschlossen, indem statt einem PARP1-KO ein für humanes PARP1 kodierendes Plasmid kotransfiziert wurde. Für den MMEJ-Reporter wurden Templates, die eine Luziferasesequenz sowie mikrohomologe Sequenzen zu den gesetzten DSB enthielten, verwendet. Die MMEJ-Aktivität wurde mit Hilfe eines Luziferaseassays ermittelt.

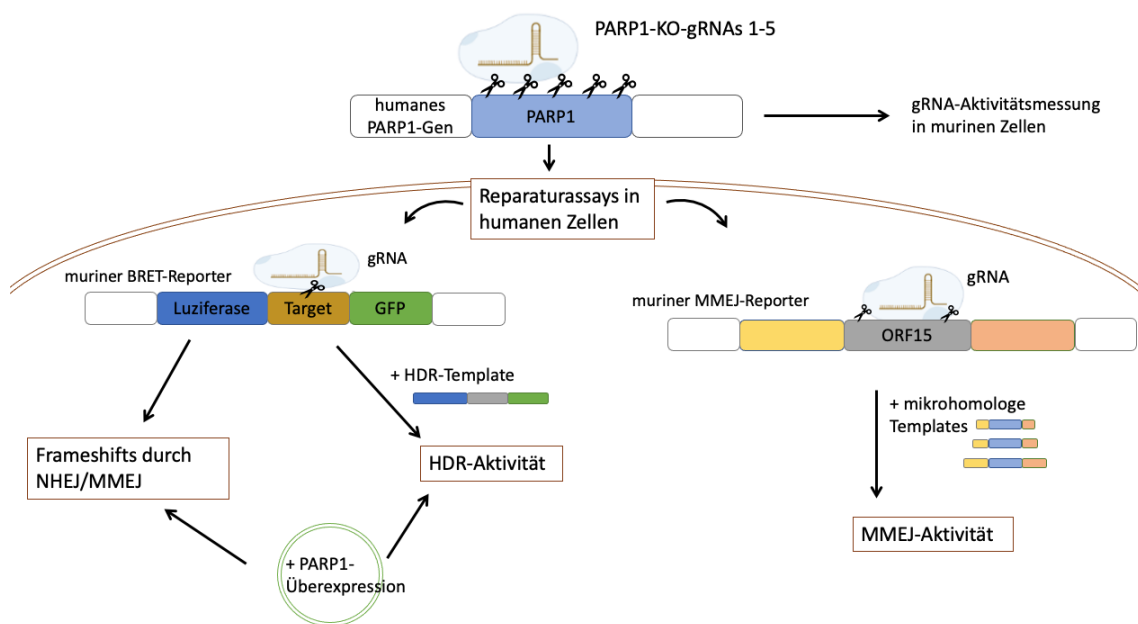


Abbildung 10: Graphische Übersicht der Versuchsreihen Um den Einfluss der PARP1-KOs auf die Reparaturaktivitäten zu messen, wurden die KO-gRNA/Cas9-Komplexe jeweils in Kombination mit dem BRET- oder MMEJ-Reporter in humane Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde eine PARP1-Überexpression in die BRET-Assays zu der Frameshift-Rate und der HDR-Aktivität miteingeschlossen.

3.1 Identifikation von geeigneten PARP1-KO-Target-Sequenzen und den dazugehörigen Guide-Sequenzen

In dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Knockout-Konstrukte für das humane PARP1 erstellt. Dafür wurden mit Hilfe des *gRNA design tools* (www.atum.bio) fünf verschiedene Zielsequenzen (Targetsequenzen) ausgewählt, die im *PARP1*-Gen liegen (s. 2.1.14.1). Komplementär zu den Zielsequenzen wurden die Guide-RNA-Sequenzen designt, die in px459-Plasmidvektoren (s. 2.1.13) kloniert wurden. Zur Überprüfung der Aktivität der CRISPR/Cas9-Konstrukte wurden die fünf Target-Sequenzen in das BRET-Reporter-System (s. 2.1.13) kloniert.

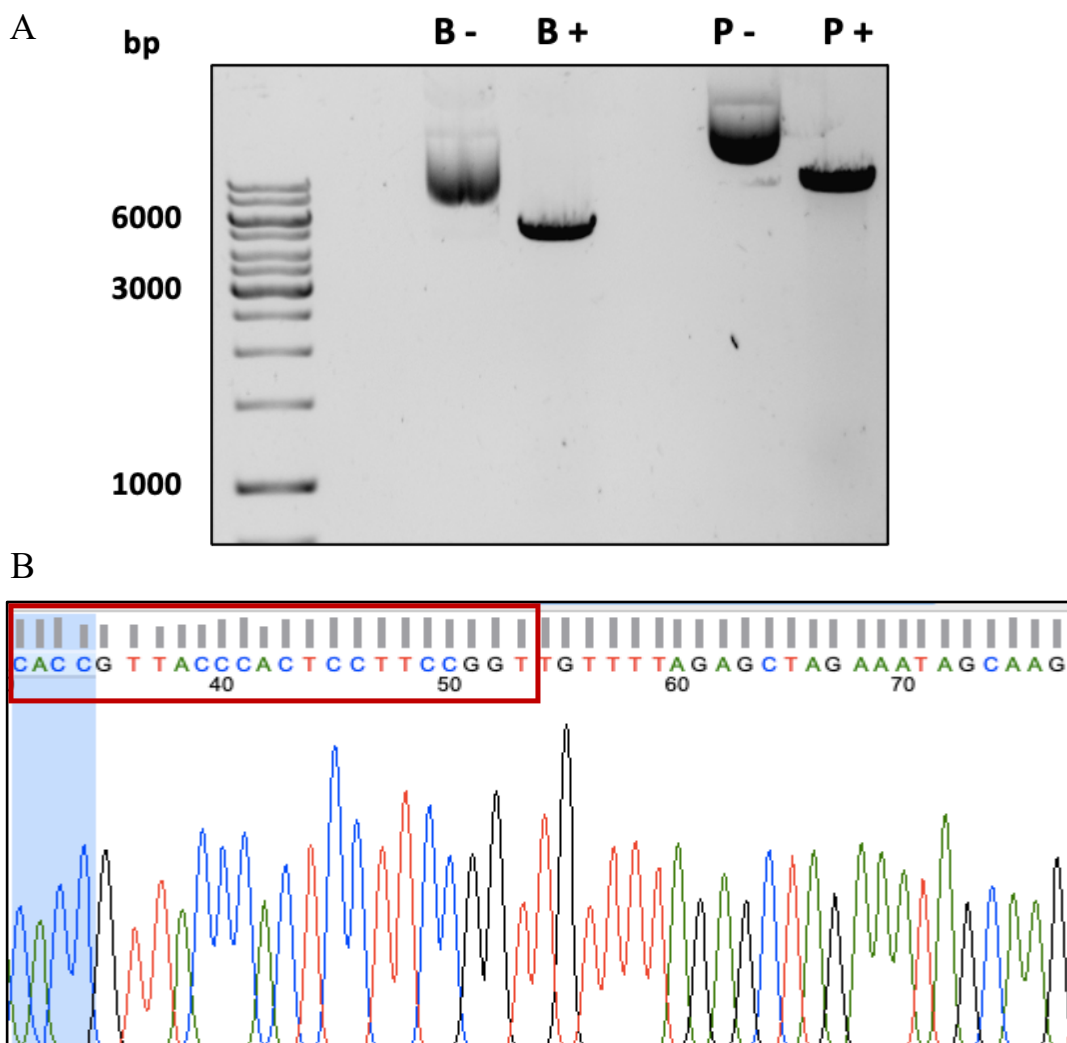


Abbildung 11: Kontrolle der Klonierung **A:** Kontrolle der Linearisierung der Vektorplasmide. BRET-Reporterplasmid vor (B-) und nach (B+) Restriktionsverdau. px459-Plasmid vor (P-) und nach (P+) Restriktionsverdau. **B:** Beispiel der Sequenzierung eines *E.coli*-Klons zur Überprüfung der erfolgreichen Integration der gRNA 1.

Die Klonierung erfolgte als Restriktionsklonierung (s. 2.2.1.4). Zur Kontrolle der Linearisierung der Plasmidvektoren wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die

Linearisierung führt zu einer veränderten Wanderung im Agarosegel (s. Abbildung 11A). Nach Transformation der klonierten DNA wurden die *E.coli*-Klone sequenziert. Die Sequenzen der Targets und der gRNAs wurden in die DNA der Klone integriert (s. Abbildung 11B).

3.2 Kontrolle der Transfektionseffizienz

Die Kontrolle der Transfektionseffizienz erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (s. 2.2.3.5). Die grün leuchtenden Zellen exprimieren das im BRET-Reporter enthaltene, grün fluoreszierende Protein GFP2.

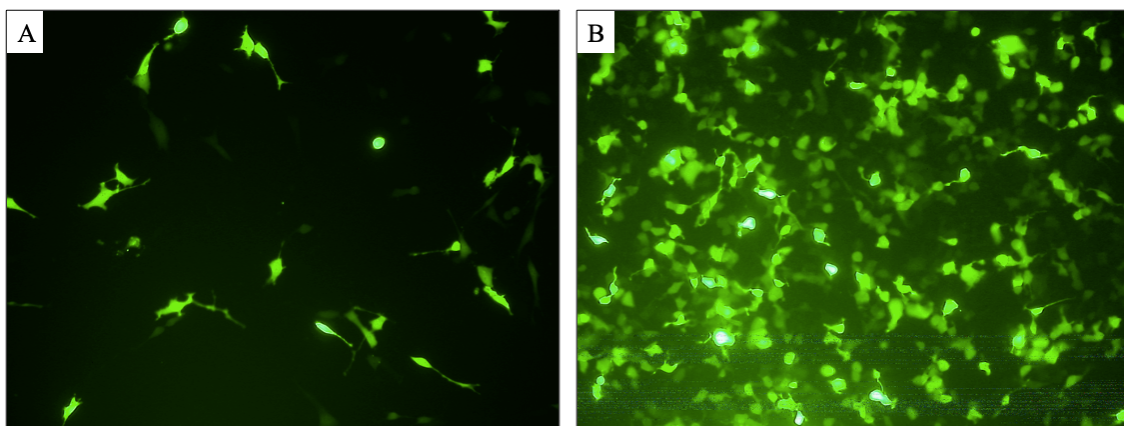


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Transfektion Transfektion von murinen NIH/3T3-Zellen (A) und humanen HEK293T-Zellen (B) mit dem BRET-Reporter-Plasmid. Das im BRET-Reporter enthaltene, grün fluoreszierende Protein GFP2 wird in den Zellen exprimiert.

3.3 Aktivitätsmessung der PARP1-KOs

Um die Aktivität der verschiedenen PARP1-KO-gRNAs zu prüfen, wurden die Target- und Guide-Plasmide in murine Fibroblasten (3T3/NIH) transfiziert. Es wurde keine humane Zelllinie verwendet, damit das Zellgenom nicht durch die Endonukleasen verändert wird. Transfiziert wurden jeweils ein BRET-Reporter-Plasmid (Target) mit dem zugehörigem gRNA/Cas9-Plasmid. Nach Isolation der Proteine aus den transfizierten Zellen wurden die BRET-Ratios mit dem BRET-Assay (s. 2.2.4.2) ermittelt.

Das BRET-Assay zeigt, dass jeder gRNA/Cas9-Komplex die BRET-Ratio signifikant ($***p < 0,001$) zu ihrer jeweiligen Kontrolle reduzieren (s. Abbildung 13A). Normiert mit den Kontrollen für 0 % und 100 % DSB zeigt sich, dass die gRNA 5 mit $55,9 \pm 3,7$ % die höchste prozentuale Frameshift-Rate aufweist und signifikant ($***p < 0,001$) mehr Frameshift-Mutationen zur Folge hat als die gRNA 2 mit $18,0 \pm 8,0$ %. Dazwischen liegen die Frameshift-Raten von gRNA 1 mit $41,9 \pm 6,3$ %, gRNA 3 mit $40,2 \pm 8,0$ % und gRNA 4 mit $47,4 \pm 3,9$ % (s. Abbildung 13B).

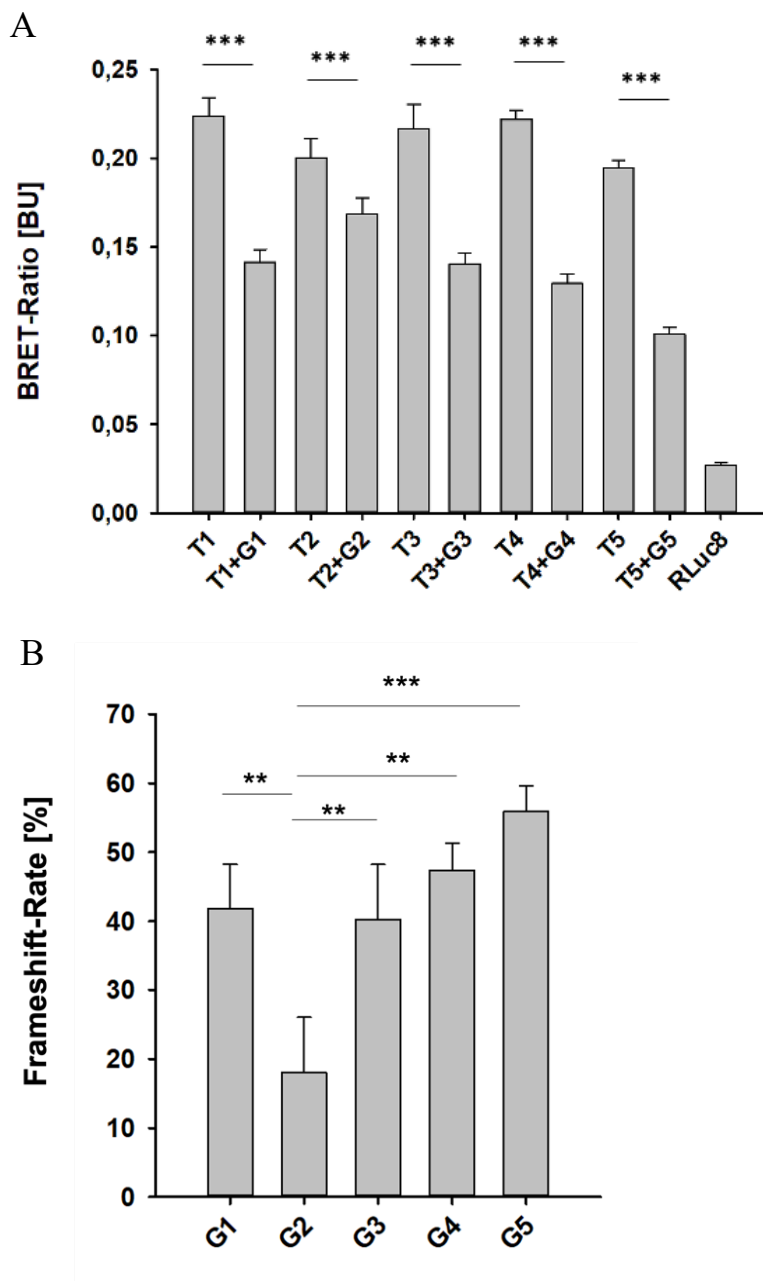


Abbildung 13: BRET-Assay-kontrollierte Aktivitätsmessung der PARP1-KOs A: BRET-Ratios der gRNA/Cas9-Komplexe (G1-5), verglichen mit der jeweiligen Kontrolle, die nur den

BRET-Reporter enthält (T1-5). *** $p < 0,001$ nach Paired-t-Test. **B:** Prozentuale Frameshift-Raten der gRNAs. *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ nach ANOVA-Test.

3.4 Einfluss von PARP1-KOs auf die zelleigene Reparaturaktivität

3.4.1 BRET-Assay zur Bestimmung von Frameshift-Mutationen durch NHEJ- oder MMEJ-Reparatur

Um die Reparaturaktivität zu messen, wurde das BRET-Reporter-Assay mit den verschiedenen PARP1-KOs durchgeführt. Dafür wurde das murine *CLN3*-BRET-Reportersystem (s. 2.1.14.2) mit den PARP1-KOs in HEK293T-Zellen transfiziert. Die KO-gRNA/Cas9-Komplexe wurden einzeln oder als Zweierkombination transfiziert, um die KO-Effizienz zu erhöhen. Anhand eines BRET-Assays wurden die Intensitäten von Luziferase und GFP gemessen (s. 1.6.1). Das BRET-Assay mit den PARP1-KOs (Abbildung 14A) zeigt, dass die KO-Kombination aus gRNA 2 und gRNA 4 (KO2,4) die BRET-Ratio, verglichen zur Kontrolle ohne KO (T+G), signifikant (** $p < 0,001$) vermindert. Die KO-Kombination aus gRNA 2 und gRNA 5 (KO2,5) führt ebenfalls zu einer signifikant niedrigeren BRET-Ratio (** $p = 0,003$). Normiert mit den Kontrollen für 0 % und 100 % DSB führt KO2,4 zu $23,8 \pm 5,0$ % und KO2,5 zu $7,4 \pm 5,0$ % mehr Frameshift-Mutationen. KO2,4 hat prozentual eine signifikant (** $p < 0,001$) höhere Frameshift-Rate zur Folge als alle anderen getesteten Knockouts (s. Abbildung 14B). Der Versuch besteht aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je vier Messungen.

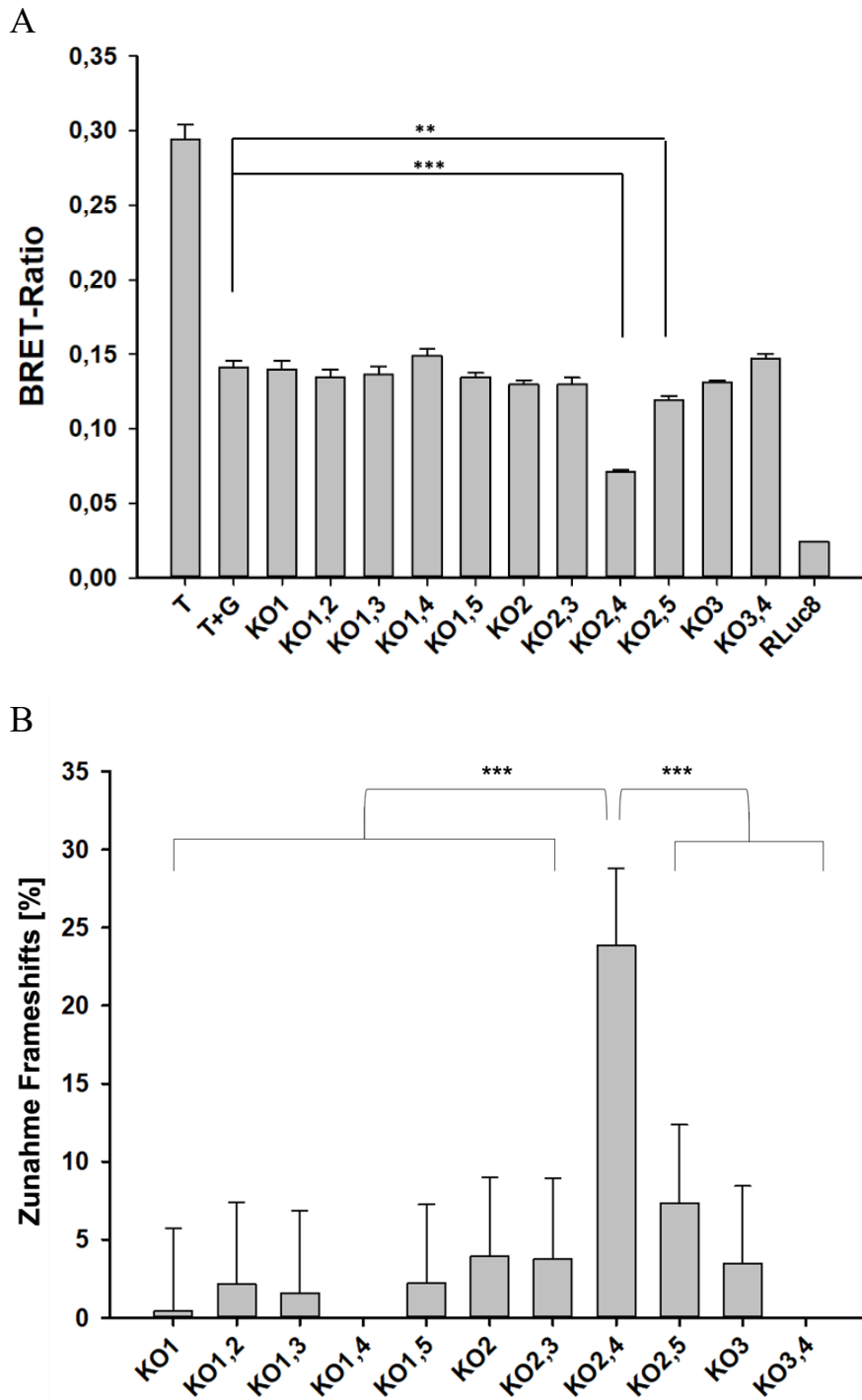
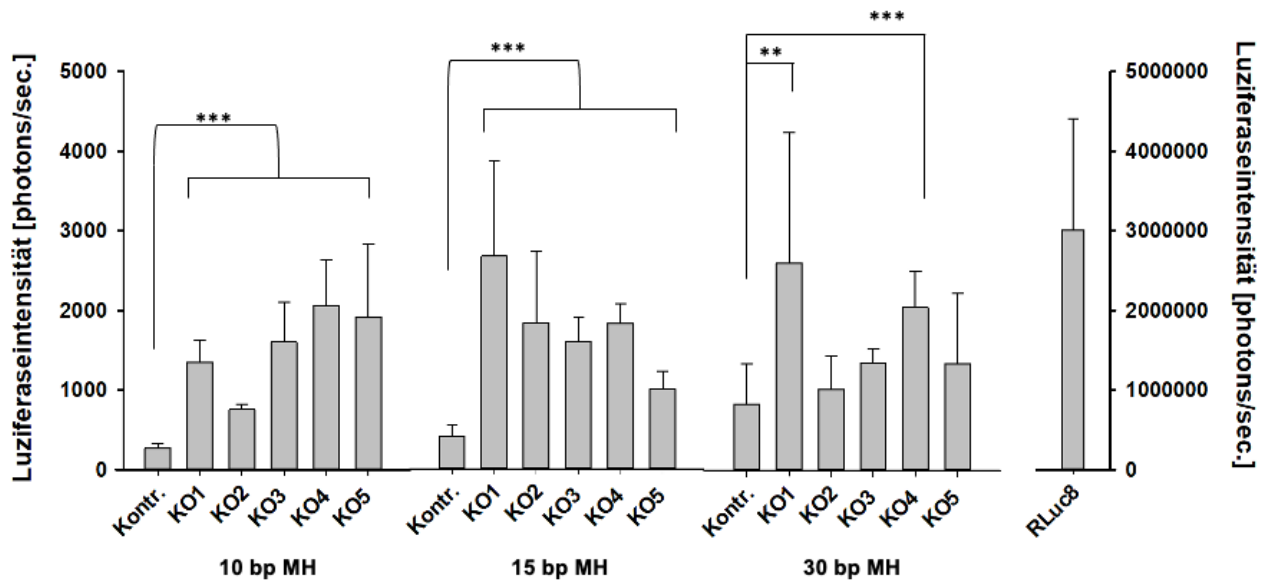


Abbildung 14: BRET-Assay-kontrollierte Bestimmung von Frameshift-Mutationen
A: BRET-Ratios der verschiedenen PARP1-KOs. T: 0 % DSB-Kontrolle, RLuc8: 100 % DSB-Kontrolle, T+G: Kontrolle ohne PARP1-KO. *** $p < 0,001$; ** $p = 0,003$ nach Mann-Whitney-U-Test. **B:** Prozentuale Zunahme der Frameshifts bei PARP1-KOs im Vergleich zu den Kontrollzellen. *** $p < 0,001$ nach ANOVA-Test.

3.4.2 Einfluss von PARP1-KOs auf die MMEJ-Aktivität

Für das MMEJ-Assay (s. 1.6.2) wurden die zwei Plasmide ORF15-gRNA und px459-MH-Luc, die je zwei gRNAs enthalten, ein MH-Luc-Plasmid (10, 15 oder 30 bp) (s. 2.1.13) und ein PARP1-KO in HEK^{-mORF15}-Zellen (s. 2.1.8) transfiziert. Als intrinsische Kontrolle wurde statt eines PARP1-KOs ein Blunt TOPO VEGF-Vektor transfiziert. Der RLuc8-Vektor enthält lediglich das Luziferasegen. Die Auswertung der MMEJ-Aktivität erfolgte durch ein Luziferase-Assay (s. 2.2.4.3). Bei Transfektion eines Templates mit je 10 oder 15 bp langen Mikrohomologien führen alle PARP1-KOs zu signifikant (**p<0,001) erhöhter Luziferaseintensität, verglichen mit der Kontrolle ohne PARP1-KO. Bei Transfektion eines Templates mit je 30 bp langen Mikrohomologien führt nur das KO1 (**p=0,006) und das KO4 (**p<0,001) zu signifikant erhöhter Luziferaseintensität (s. Abbildung 15A). Insgesamt führt das KO4 zur höchsten Luziferaseintensität (s. Abbildung 15B).

A



B

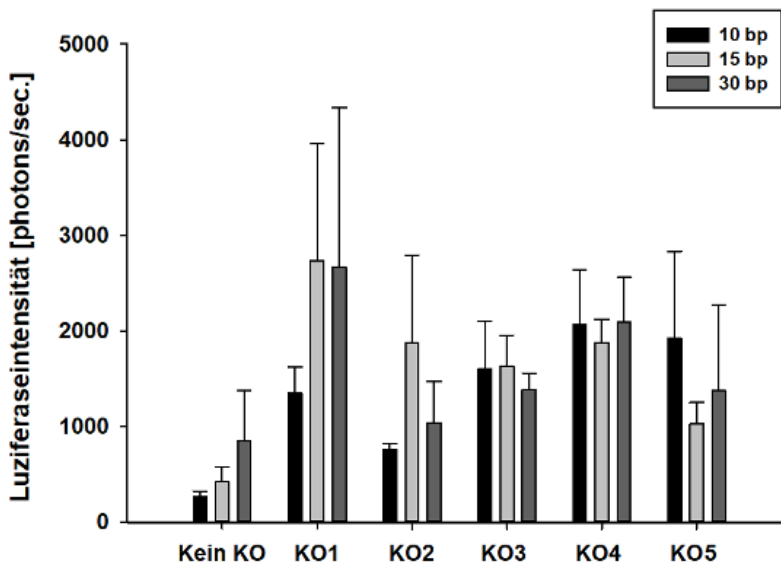
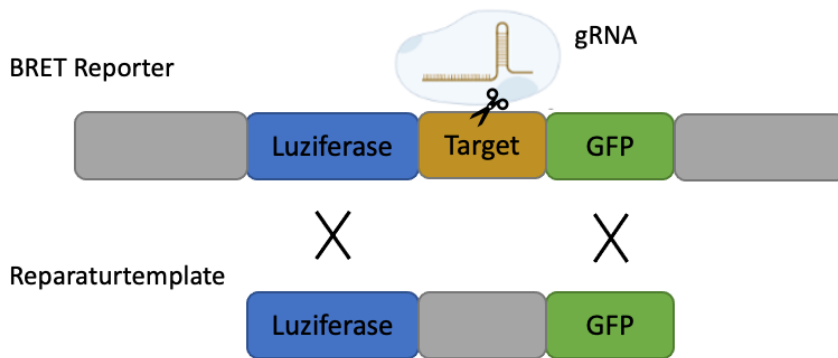


Abbildung 15: Luziferaseassay zur Bestimmung der MMEJ-Aktivität PARP1-KOs (KO1-5) bei Templates mit unterschiedlich langen Mikrohomologien (MH = 10, 15, 30 bp). Kontr./Kein KO: Blunt TOPO VEGF-Vektor. A: MMEJ-Aktivität nach Länge der MH in den Templates. * $p < 0,001$; ** $p = 0,006$ nach Mann-Whitney-U-Test. B: MMEJ-Aktivität, aufgetragen nach den einzelnen PARP1-KOs.**

3.4.3 Einfluss von PARP1-KOs und PARP1-Überexpression auf die HDR-Aktivität

Die HDR-Aktivität wurde mit dem BRET-Reporter-Assay gemessen (s. 1.6.1). Um die HDR-Aktivität zu erhöhen, wurde ein 700 bp langes, zu dem BRET-Reporter homologes Template durch eine PCR amplifiziert (s. Abbildung 16). Das HDR-Template enthält, wie der BRET-Reporter, die Sequenzen für Luziferase und GFP. Lediglich die Target-Sequenz unterscheidet sich, damit das Template nicht von dem CRISPR/Cas-System gespalten wird und als Reparaturvorlage dienen kann (s. 2.1.14.2). Wird das Template mittels HDR-Reparatur als Vorlage verwendet, können die korrekten Sequenzen von Luziferase und GFP nach dem DSB wiederhergestellt werden und es findet in der Expressionsphase BRET statt.

A



B

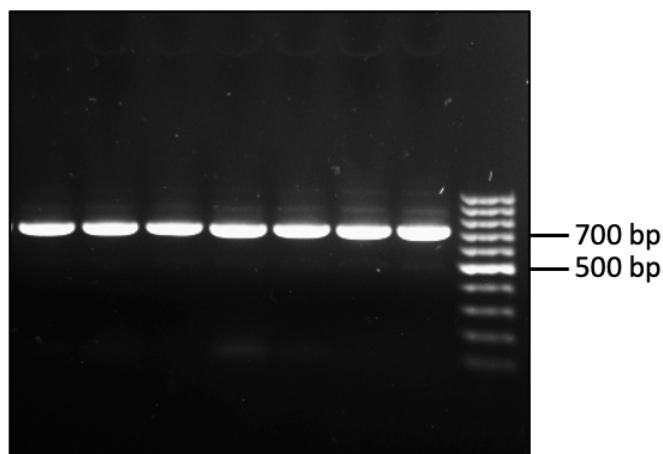
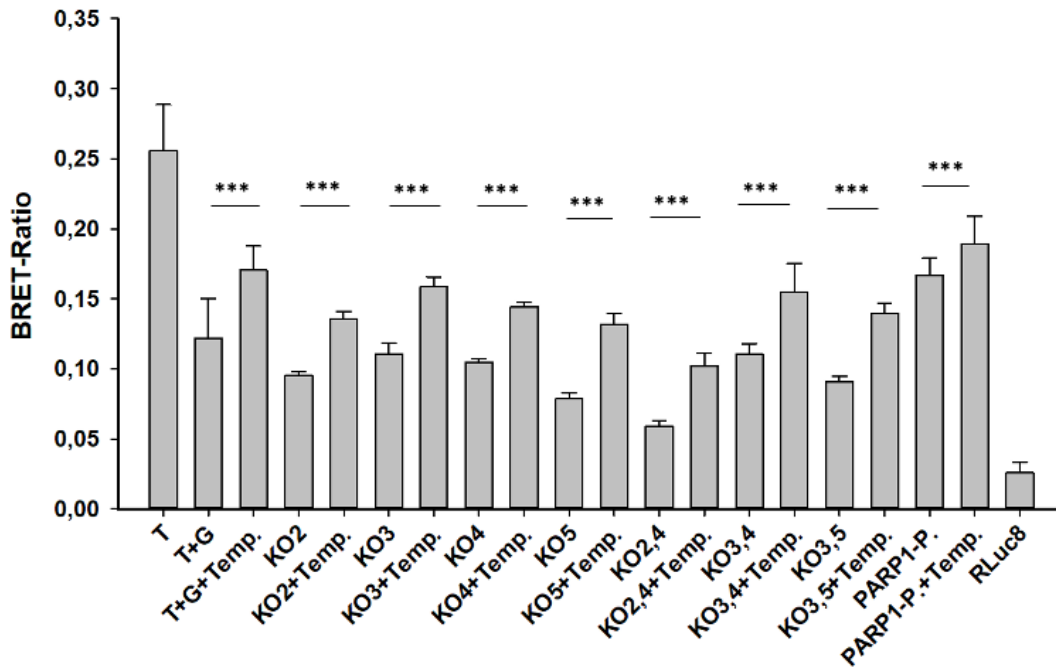


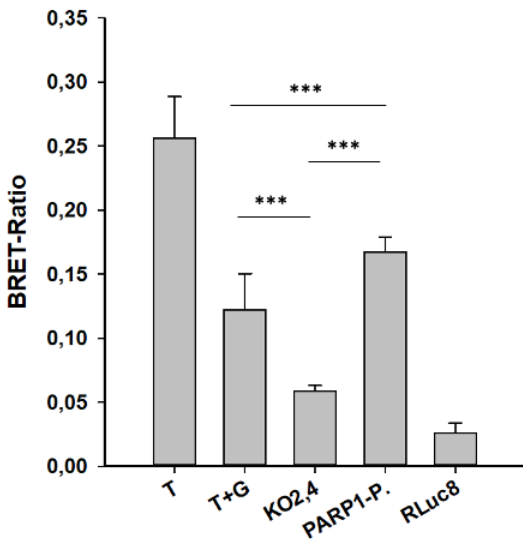
Abbildung 16: HDR-Template A: Schema des HDR-Template, das homolog zu Luziferase- und GFP-Sequenz des BRET-Reporters ist und als Vorlage zur korrekten Reparatur dienen kann. B: Gelelektrophorese des durch eine PCR amplifizierten Reparaturtemplates.

Die HEK293T-Zellen wurden mit dem BRET-Reportersystem, den teilweise kombinierten PARP1-KO-gRNAs und jeweils mit und ohne homologem Template transfiziert. Neben den PARP1-KOs wurde eine PARP1-Überexpression durch die Transfektion eines für PARP1 kodierenden Plasmids in den Versuch miteingeschlossen. Die Zunahme der BRET-Ratio, die durch Kotransfektion des homologen Templates erfolgt ist, wird als HDR-Aktivität festgelegt. Das BRET-Assay zeigt, dass die Transfektion des homologen Templates die BRET-Ratio bei jeder Probe signifikant ($***p < 0,001$) erhöht (s. Abbildung 17A). Die PARP1-Überexpression führt ebenfalls zu einer signifikant ($***p < 0,001$) erhöhten BRET-Ratio im Vergleich zu der Kontrolle, die weder KO noch Überexpression enthält (s. Abbildung 17B). Die HDR-Aktivität der Kontrolle beträgt $21,2 \pm 6,0$ %. Im Vergleich dazu ist die HDR-Aktivität bei den PARP1-KOs nicht signifikant verändert, bei der PARP1-Überexpression mit $9,8 \pm 2,9$ % jedoch signifikant ($***p < 0,001$) vermindert (s. Abbildung 17C).

A



B



C

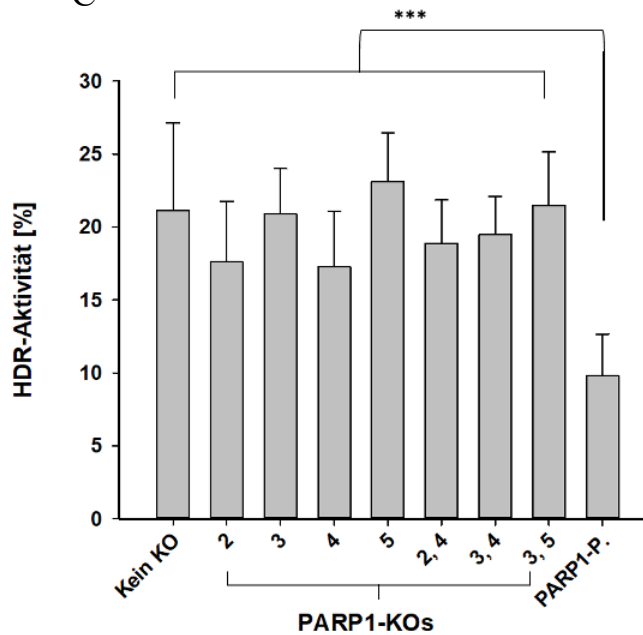


Abbildung 17: BRET-Assay-kontrollierte Bestimmung der HDR-Aktivität A: BRET-Ratios der Kontrolle (T+G), der PARP1-KO-Zellen (KO1-5) und der PARP1-Überexpressionszellen (PARP1-P.) jeweils mit und ohne Reparaturtemplate (Temp.). *** $p < 0,001$ nach Mann-Whitney-U-Test. B: Die PARP1-Überexpression führt zu signifikant höherer BRET-Ratio als die Kontrolle (T+G). Im Vergleich führt das KO2,4 zu einer signifikant niedrigeren BRET-Ratio. *** $p < 0,001$ nach Mann-Whitney-U-Test. C: Prozentuale HDR-Aktivität von PARP1-KOs und PARP1-Überexpression im Vergleich zu der Kontrolle (T+G). *** $p < 0,001$ nach ANOVA-Test.

In Abbildung 18 sind zusammenfassend die HDR-Aktivitäten durch das HDR-Template verglichen mit der Zunahme an Frameshifts aufgetragen. Die prozentuale Zunahme an Frameshifts wurde wie in Kapitel 3.4 als Abnahme der BRET-Ratio im Vergleich zu den

Kontrollzellen errechnet und hier als Zunahme der NHEJ- oder MMEJ-Aktivität festgelegt. Dabei ist die größte Zunahme an NHEJ-/MMEJ-Aktivität bei dem KO2,4 mit $27,5 \pm 6,6 \%$ und die größte Abnahme bei der PARP1-Überexpression mit $-19,6 \pm 6,3 \%$ zu sehen. Der Versuch besteht aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je vier Messungen.

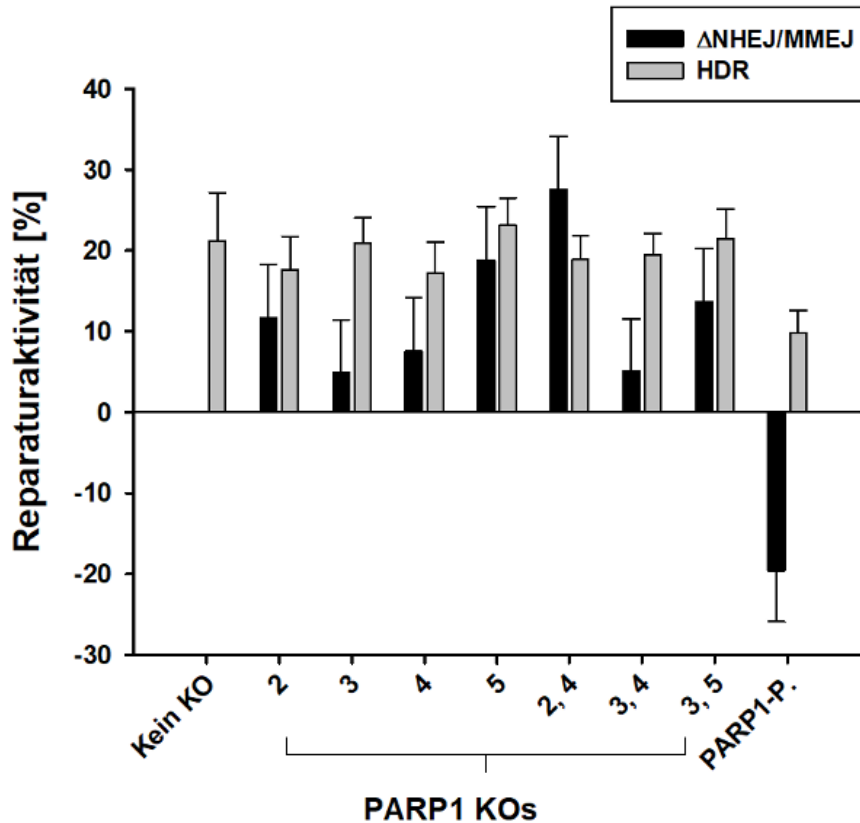


Abbildung 18: Übersicht über die BRET-Assay-kontrollierte Reparaturaktivität nach PARP1-KOs und PARP1-Überexpression Das KO2,4 führt mit $+27,5 \pm 6,6 \%$ zur größten Zunahme an NHEJ-/MMEJ-Aktivität, während die PARP1-Überexpression mit $-19,6 \pm 6,3 \%$ zu der größten Abnahme führt.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss eines CRISPR/Cas9-vermittelten KO von PARP1 auf Expressionsebene auf die verschiedenen Reparaturwege eines DSB getestet. Zusätzlich wurde die Überexpression von PARP1 hinsichtlich einer Veränderung der Reparatureffizienz untersucht.

In den BRET-Assays zu der Frameshift-Rate und der HDR-Aktivität zeigt sich, dass die PARP1-KO-Kombination KO2,4 zu 23,8 % bzw. 27,5 % mehr Frameshifts führt, während bei einer PARP1-Überexpression die Frameshifts um 19,6 % abnehmen. Die MMEJ-Aktivität ist in den PARP1-KO-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht. Die durch das homologe Template erzielte HDR-Aktivität ist in den PARP1-KO-Zellen nicht signifikant zu den Kontrollzellen verändert, jedoch signifikant niedriger in den Zellen mit einer PARP1-Überexpression.

4.1 CRISPR/Cas9-vermittelter PARP1-KO

Die BRET-Assay-kontrollierte Aktivitätsmessung der fünf PARP1-KO-gRNAs zeigt, dass jede gRNA die BRET-Ratio höchst signifikant vermindert. Es werden also DSB in der Target-Sequenz erzeugt, die in dem BRET-Reporter-Plasmid zwischen der Luziferase- und der GFP-Sequenz liegt. Die GFP-Expression ist vermindert, die der Luziferase bleibt erhalten und die BRET-Ratio nimmt ab. Jede gRNA leitet die Nuklease Cas9 an die programmierte Stelle. Prozentual hat die gRNA 5 mit $55,9 \pm 3,7$ % die höchste Frameshift-Rate, gefolgt von der gRNA 4 mit $47,4 \pm 3,9$ %.

Die Frameshift-Rate einer gRNA kann dabei maximal 66,7 % betragen, wenn man davon ausgeht, dass alle durch den gRNA/Cas9-Komplex gesetzten DSB fehlerhaft repariert werden. Jede Indel-Mutation, die eine Veränderung der Basensequenz um ein Vielfaches von drei zur Folge hat, führt nicht zu einer Verschiebung des Leserasters und verhindert somit nicht die Expression von GFP, dessen Sequenz hinter der Target-Sequenz liegt. Dazu kommt die Möglichkeit einer korrekten Reparatur des DSB, z.B. durch HDR-Reparatur, die ebenfalls zu einer GFP-Expression und somit einer niedrigeren Frameshift-Rate führt. Da mit Ausnahme der Mitosephase NHEJ aufgrund der kürzeren Reparaturzeit und der Unabhängigkeit von einem homologen Template vorherrschend ist, hat dieser Faktor einen kleineren Einfluss (Yeh et al., 2019).

Unterschiede im mutagenen Effekt von gRNA/Cas9-Komplexen können durch Faktoren wie der Ausbildung von Sekundärstrukturen und off-Target-Aktivitäten zustande

kommen (Xu et al., 2017). Neben der quantitativen Frameshift-Rate entscheidet auch das Target-Exon, wie effizient der KO auf Proteinebene ist (Kapahnke et al., 2016; Makino et al., 2016).

Bei der Aktivitätsmessung der PARP1-KO-gRNAs in den murinen Zellen liegt die PARP1-Sequenz auf dem kotransfizierten Target-Plasmid, während die PARP1-KO-gRNAs in den DSB-Reparaturassays in den humanen Zellen auf das Zellgenom zielen. Wenn sich das Target-Exon in einem endogenen Locus befindet, kann der Zugang zum Chromatin bei dem vergleichsweise großen Protein Cas9 durch Nukleosomen erschwert sein (Horlbeck et al., 2016). Die Aktivitätsmessung in den murinen Zellen ist also eine Kontrolle des verwendeten CRISPR/Cas9-Systems, die Frameshift-Rate kann aber in den folgenden KO-Experimenten abweichen, sodass eine Expressionskontrolle auf Proteinebene ergänzend sinnvoll ist.

Die Messung der PARP1-Expression auf Proteinebene erfolgte durch Dr. T. Wimmer mit dem PARP1-ELISA (s. 2.2.5.1). Dort führten alle CRISPR/Cas9-vermittelten PARP1-KOs zu verminderten PARP1-Proteinspiegeln in den HEK293T-Zellen, verglichen zu den Kontrollen, die nicht mit einem KO-Komplex behandelt wurden. Die Methodik des CRISPR-/Cas9-vermittelten KOs wurde in der Referenzarbeit zum BRET-Reportersystem bereits bei anderen Reparaturproteinen getestet. Dort wurde die Herunterregulierung von Ligase I und IV ebenfalls mittels ELISA gemessen, die verminderte Ku70-Expression wurde durch einen Western Blot gezeigt (Wimmer et al., 2021).

Das verwendete CRISPR/Cas9-basierte BRET-Reportersystem nach Wimmer et al. wurde in verschiedenen Zelllinien getestet, wobei der mutagene Effekt der gRNAs zwischen den Zelllinien signifikant variierte. Zelllinienspezifische Unterschiede bei der Reparatur von DSB sowie posttranslationale Modifikationen auf Proteinebene sind somit ebenfalls von Bedeutung (Wimmer et al., 2021).

Die fünf PARP1-KO-gRNAs, die über das *gRNA design tool* (www.atum.bio) identifiziert wurden, zielen auf das humane PARP1. PARP1 ist das erstbeschriebene und meisterforschte Enzym der PARP-Familie, die aus 18 Proteinen besteht (Amé et al., 2004). Einige Studien beschrieben bereits, dass zum Beispiel PARP2 überschneidende Aktivitäten mit PARP1 aufweist (Amé et al., 1999; Hanzlikova et al., 2017; Ménissier de Murcia et al., 2003). Ein kombinierter KO von PARP1 und PARP2 könnte in einigen

Fällen deutlichere Ergebnisse erzielen, jedoch würde sich dieser gravierend auf die Viabilität der Zellen auswirken. Ménissier de Murcia et al. kombinierten die PARP-KOs in Mäusen und beschrieben eine Letalität bereits im Embryonalstadium, sodass die PARP1^{-/-}-PARP2^{-/-}- Mäuse nicht lebensfähig waren (Ménissier de Murcia et al., 2003).

4.2 Reparaturaktivität bei PARP1-Modifizierung

Im BRET-Assay führten die KO-Kombinationen aus gRNA 2 und 4 (KO2,4) und aus gRNA 2 und 5 (KO2,5) zu signifikant erniedrigten BRET-Ratios. Die PARP1-Überexpression führte zu einer signifikant erhöhten BRET-Ratio. Die BRET-Ratio ist geringer, wenn die gesetzten DSB fehlerhaft repariert werden, sodass Indels mit folgenden Frameshift-Mutationen entstehen und GFP nicht mehr exprimiert wird (Wimmer et al., 2021). Bei der BRET-Ratio handelt es sich um den Quotienten aus GFP- und Luziferaseintensität, somit ist die BRET-Ratio unabhängig von den absoluten Werten. Damit ist das BRET-Assay unabhängig von Zellzahl und Transfektionseffizienz.

Prozentual führte das KO2,4 zu $23,8 \pm 5$ % mehr Frameshift-Mutationen als die Zellen ohne PARP1-KO. Da Indels häufig durch NHEJ-Reparatur zustande kommen, ist eine mögliche Erklärung, dass ein PARP1-KO die NHEJ-Rate erhöht. Auch die MMEJ-Reparatur ist fehlerbehaftet und führt häufiger zu Indels. Die PARP1-Überexpression führte zu einer Abnahme an Frameshift-Mutationen um 19,6 %.

Wei Du et al. veröffentlichten 2016 ihre Studie, in der Knochenmarkszellen aus PARP1-KO-Mäusen eine deutlich höhere NHEJ-Aktivität aufwiesen als bei den Wildtyp-Zellen. Bei den Wildtyp-Zellen dominierte, im Gegensatz zu den PARP1-KO-Zellen, die HDR-Aktivität. Die Autoren argumentierten auch, dass die Regulierung von NHEJ und HDR durch PARP1 im Zusammenhang mit dem FA-Core-Complex steht. Dieser besteht aus verschiedenen Ubiquitinasen, die HDR-assoziierte Enzyme, wie Rad51, aktivieren (Du et al., 2016). Yang et al. zeigten in ihrer Studie mittels fluoreszenzbasiertem Partikelnachweis, dass PARP1 in der S und G2-Phase die NHEJ-assoziierten Ku70/80-Proteine enzymatisch vom DSB verdrängt (G. Yang et al., 2018). Damit untermauern sie bereits veröffentlichte Studien, die das Konkurrieren von PARP1 und Ku70/80 um die Bindung an den DSB beschreiben (Cheng et al., 2011; M. Wang et al., 2006). Nach Bindung an den DSB rekrutiert PARP1 dann weitere Reparaturenzyme, die den MMEJ- oder HDR-Reparaturweg initiieren (Bryant et al., 2009; M. Wang et al., 2006; Zhang et al., 2015). Dass ein PARP1-KO zu vermehrter NHEJ-Aktivität führt, könnte mit der

vermehrten Bindung von Ku70/80 an DSB und damit einhergehender Initiierung von NHEJ begründet werden.

Leider führten in dieser Arbeit nur das KO_{2,4} und das KO_{2,5} zu signifikant verminderten BRET-Ratios. Vermutlich führen gerade diese KO-Kombinationen zu einem effizienteren KO von PARP1. Wie in 4.1 beschrieben, kann auch PARP2 Reparaturenzyme rekrutieren und aktivieren, sodass ein womöglich inkompletter KO von PARP1 sich nicht so deutlich in den Ergebnissen widerspiegelt.

Die signifikante Abnahme der Frameshift-Mutationen durch die PARP1-Überexpression kann spiegelbildlich die Folge einer verringerten NHEJ-Aktivität sein. Zudem wird insgesamt ein positiver Effekt von PARP1 auf die Reparatureffizienz beschrieben, wie z.B. die Erkennung von DSB, die Rekrutierung und Aktivierung von Reparaturenzymen und die Stabilisierung von Replikationsgabeln (Bryant et al., 2009; Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017; Wei & Yu, 2016; Y. G. Yang et al., 2004). Auch eine erhöhte HDR-Aktivität würde zu einer verbesserten Reparatur führen. Da für PARP1 kein direkter Einfluss auf die HDR-Reparatur beschrieben wird (s. 4.4), könnte eine HDR-Aktivitätserhöhung bei PARP1-Überexpression am ehesten als Folge der Inhibierung des NHEJ-Wegs erklärt werden (Ye et al., 2018; Yeh et al., 2019). Die Stimulierung der HDR-Aktivität durch ein homologes Template hatte, wie ebenfalls in 4.4 diskutiert, bei den Überexpressionszellen einen geringeren Effekt als bei den Kontrollzellen.

4.3 MMEJ-Aktivität bei PARP1-Modifizierung

Im MMEJ-Assay kommt es zur Expression von Luziferase, wenn die DSB im ORF15-Exon des murinen *RPGR*-Gens mit Hilfe der mikrohomologen Templates repariert wurden. Nur diese enthalten die Luziferasesequenz, die erst abgelesen werden kann, wenn die Sequenz in die Zelllinie integriert wird, die den zum Ablesen nötigen CMV-Promotor enthält. Demnach entspricht eine hohe Luziferaseintensität einer hohen MMEJ-Aktivität. Bei 10 oder 15 bp-langen MH im Template zeigten die Zellen, die mit den PARP1-KO-Komplexen transfiziert wurden, jeweils signifikant höhere Luziferasewerte im Assay, als die Zellen ohne CRISPR/Cas9-vermittelten PARP1-KO. Bei 30 bp langen MH führten nur die KOs 1 und 4 zu signifikant erhöhter Luziferaseintensität. Die übrigen KOs (2, 3 und 5) führten zu keiner signifikanten Änderung der Luziferaseintensität. Diese Versuchsreihe spricht also dafür, dass die PARP1-KOs zu vermehrter MMEJ-Aktivität führen.

In verschiedenen Studien wird beschrieben, dass PARP1 durch Rekrutierung und Aktivierung von MMEJ-assoziierten Reparaturenzymen wie XRCC1 den MMEJ-Weg initiiert (Audebert et al., 2008; Das et al., 2014; M. Wang et al., 2006). Es scheint sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu widersprechen, dass PARP1 die MMEJ-Reparatur unterstützt. Allerdings ist eine Rekrutierung von Reparaturenzymen nicht gleichzusetzen mit einer Notwendigkeit im Reparaturmechanismus. MMEJ kann ohne PARP1 stattfinden, da dieses nicht an der eigentlichen Reparatur des DSB beteiligt ist (Dutta et al., 2017; Patterson-Fortin & D'Andrea, 2020). Zudem haben Hanzlikova et al. beschrieben, dass auch PARP2 XRCC1 rekrutiert und sogar eine geringe ADP-Ribosylierung ausreicht, um XRCC1 zu aktivieren (Hanzlikova et al., 2017). So würde vermutlich die Restaktivität eines unvollständigen PARP1-KO ausreichen, um XRCC1 zu aktivieren und den MMEJ-Weg zu initiieren, zusätzlich zu der PARP2-Aktivität.

Fraglich ist weiterhin, warum die PARP1-KOs die MMEJ-Aktivität in diesem Versuchsaufbau erhöhen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass PARP1-KOs zu genomischer Instabilität führen (Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017). In einigen Studien wurde beschrieben, dass MMEJ in Zellen genomischer Instabilität hochreguliert wird und z.B. in Tumorzellen häufig vorherrschend ist (Cheng et al., 2011; Dutta et al., 2017). Demnach könnte eine durch die PARP1-KOs ausgelöste genomische Instabilität dazu führen, dass MMEJ vermehrt aktiviert wird, u.a. über die PARP2-induzierte Rekrutierung von XRCC1.

Ein weiterer Faktor könnte die PARP1-induzierte Hemmung der Exonuklease 1 (EXO1) sein. EXO1 ist für die 5'-3'-Resektion verantwortlich, die der erste Schritt der MMEJ- und HDR-Reparatur ist (s. 1.3.2). Caron et al. beschrieben eine Hyperresektion an DSB durch vermehrte EXO1-Aktivität sowohl bei pharmakologischer PARP1-Hemmung durch das Chemotherapeutikum BMN 673 als auch bei PARP1-Silencing mittels einer siRNA (Caron et al., 2019). Wie in 4.4 diskutiert, führten die PARP1-KOs in diesem Versuchsaufbau zwar nicht zu einer signifikanten HDR-Zunahme, die PARP1-Überexpression jedoch zu einer Abnahme der HDR-Aktivität.

Zudem besteht die Möglichkeit, dass, neben einer erhöhten MMEJ-Aktivität, die für die Luziferase kodierenden Templates mittels NHEJ eingebaut wurden. Maresca et al. konnten tatsächlich designte Knockins NHEJ-basiert in Zellgenome einfügen. Dabei benutzte die Arbeitsgruppe allerdings Zinkfinger-nukleasen und TALENs (s. 1.2), die DSB mit 5'-Überhang erzeugten, die komplementär zu den Überhängen der Knockins

waren (Maresca et al., 2013). Bei CRISPR/Cas9-induzierten DSB handelt es sich um sogenannte blunt-Ends, also DSB ohne Überhang (Jinek et al., 2012). Somit könnte es sich eher um einen kleinen Anteil der Luziferase-Templates handeln, der zufällig ohne Leserasterverschiebung durch NHEJ in das Zellgenom integriert wurde. Zur Überprüfung dessen haben Yanik et al. bei Validierung des MMEJ-Reportersystems die Zielschnittstelle der Cas9 (PAM) an den Seiten der MH-Templates variiert. Die PAMin-Variante hatte einen Abstand von PAM zu MH von nur 6 bp, während die PAMout-Variante einen längeren Überhang zu den MH von 17 bp verursachte. Die PAMout-Variante zeigte im Kontrollexperiment eine Steigerung der Luziferaseintensität um 100%. Wäre NHEJ der vorherrschende Reparaturweg beim Einbau der Templates, sollte die Lokalisierung der PAM keinen Einfluss auf die Luziferaseintensität haben. Beim NHEJ kommt es zu einer nicht zu einer 5'-3'-Resektion der DNA-Enden und zum anderen würde eine Veränderung der MH durch entstandene Deletionen am DSB keinen Einfluss auf den Reparaturweg haben, da NHEJ homologieunabhängig funktioniert (Yanik et al., 2018).

Bei Verwendung von Templates mit je 30 bp langen MH führten nur zwei der PARP1-KOs zu einer erhöhten MMEJ-Aktivität. Eine Begründung dafür, dass die 30 bp langen MH zu leicht abweichenden Ergebnissen führen, ist, dass die MH im MMEJ im Schnitt 5-25 bp lang sind (McVey & Lee, 2008). Villarreal et al. beschrieben ebenfalls, dass die MMEJ-Reparatur unter Verwendung von MH, die länger als 15 bp sind, dem Single Strand Annealing (SSA) ähnelt (Villarreal et al., 2012). SSA, auch Single Stranded Templated Repair (SSTR), ist eine Untervariante des HDR, wobei das homologe Template aus einem einzelsträngigen Oligonukleotid besteht (Richardson et al., 2018). 30 bp lange MH könnten demnach grenzwertig lang für eine MMEJ-Reparatur sein und teilweise den HDR-Weg initiieren. Wie in Kapitel 4.4 diskutiert, führte ein PARP1-KO in dieser Arbeit nicht zu einer erhöhten HDR-Aktivität, was diese These unterstreicht.

Auf eine Kotransfektion mehrerer KOs wie im BRET-Assay wurde aufgrund von bereits hoher DNA-Last bei der Transfektion verzichtet. Eine höhere KO-Effizienz durch KO-Kombinationen wäre ein nächster Schritt, um die Ergebnisse zu erweitern. Dafür würde sich auch eine Erprobung anderer Methoden als die hier verwendete PEI-Transfektion anbieten, z.B. über einen viralen Vektor oder physikalische Transfektion (Chong et al., 2021; Fajrial et al., 2020).

Anders als beim BRET-Assay werden bei dem Luziferaseassay absolute Intensitäten ausgewertet, die demnach abhängig von Zellzahl und Transfektionseffizienz sind. Durch Zellzählung mittels Neubauerkammer wurde die Zellzahl möglichst konstant gehalten, jedoch können Unterschiede in der Transfektionseffizienz nicht ausgeschlossen werden.

4.4 HDR-Aktivität bei PARP1-Modifizierung

Für die BRET-Assay kontrollierte Bestimmung der HDR-Aktivität wurde ein Reparaturtemplate mit den homologen Sequenzen für Luziferase und GFP kotransfiziert, das die HDR-Aktivität über das Vorhandensein eines homologen Templates erhöht. Da bei der HDR-Reparatur i.d.R. die korrekte Sequenz wiederhergestellt wird, steht, anders als beim NHEJ, eine hohe BRET-Ratio für eine hohe HDR-Aktivität. Die signifikante Erhöhung der BRET-Ratio durch Kotransfektion des HDR-Templates bei jeder Probe zeigt, dass das HDR-Template die Reparatur verbessert, indem es die HDR-Aktivität erhöht. Die durch das Template hinzugekommene HDR-Aktivität ist in den PARP1-KO-Zellen nicht signifikant zu den Kontrollzellen verändert. In den PARP1-Überexpressionszellen ist die zusätzliche HDR-Aktivität signifikant verringert.

Auch unter anderen Versuchsbedingungen wurde beschrieben, dass PARP1 nicht am eigentlichen HDR-Weg beteiligt ist. Es sind zwar Interaktionen von PARP1 mit HDR-assoziierten Reparaturenzymen beschrieben, diese scheinen jedoch nicht notwendig für den Reparaturmechanismus zu sein (Bryant et al., 2009; Schultz et al., 2003; Y. G. Yang et al., 2004). Ein PARP1-KO wirkt sich somit nicht negativ auf die HDR-Aktivität aus.

Wenn auch PARP1 nicht notwendig für die HDR-Reparatur ist, so wird dem Enzym eine übergeordnete Regulierung der Aktivität zugeschrieben (Schultz et al., 2003). Über die bereits erwähnte Hemmung der EXO1 wird eine überschießende 5'-3'-Resektion verhindert (Caron et al., 2019). Auch Hu et al. beschrieben in ihrer Studie eine HDR-regulierende Funktion von PARP1: Über Komplexbildung mit RAP80 und BRCA1 wird eine überschießende BRCA1-induzierte Rekombination verhindert (Y. Hu et al., 2014).

PARP1 ist kein klassischer Gegenspieler der HDR-Reparatur, jedoch könnte eine Überexpression zu einer stärkeren Herabregulierung von HDR über die genannten Mechanismen geführt haben, was sich in der signifikant verringerten Template-induzierten HDR-Aktivität bei insgesamt bereits verbesserter Reparatur im Vergleich zu den Kontrollzellen, widerspiegelt.

Der Versuchsaufbau des HDR-Assays deckt sich, bis auf die Kotransfektion des HDR-Templates, mit dem Versuchsaufbau des BRET-Assays zur Bestimmung der Frameshift-Rate. Eine Annäherung an die 0 % DSB-Kontrolle, die den BRET-Reporter ohne dazugehörige gRNA enthält, ist nur bis zu einem bestimmten Grad möglich. Der transfizierte gRNA/Cas9-Komplex kann bis kurz vor der Proteinisolation noch DSB in den BRET-Reporter einfügen, während bei der Reparatur von CRISPR/Cas9-induzierten DSB die Halbwertszeit bis zu 10 Stunden betragen kann (Brinkman et al., 2018). Die BRET-Ratio ist bei der PARP1-Überexpression ohne HDR-Template signifikant zu den Kontrollzellen erhöht. Es ist denkbar, dass durch die bereits erhöhte Reparatureffizienz der PARP1-Überexpression, die Annäherung an die 0 % DSB-Kontrolle durch das HDR-Template nur einen kleineren Anteil ausmachen kann, als bei den Kontrollzellen, die eine schlechtere intrinsische Reparatur aufweisen. Des Weiteren kann, wie in 4.2 diskutiert, die verbesserte Reparatur bei PARP1-Überexpression ebenfalls mit einer erhöhten HDR-Aktivität durch NHEJ-Inhibierung begründet werden. Die zusätzliche HDR-Erhöhung durch das homologe Template würde demnach einen kleineren Effekt haben als bei den Kontrollzellen mit niedrigerer HDR-Ausgangsaktivität. Eine HDR-Erhöhung durch NHEJ-Inhibierung widerspricht sich nicht damit, dass eine überschießende homologe Rekombination über die genannten Mechanismen durch die PARP1-Überexpression verhindert wird. Letzteres ist keine direkte Hemmung, sondern eine indirekte Regulierung des HDR-Wegs.

Da die Frameshift-Rate und die HDR-Aktivität mit derselben Methodik bestimmt wurden, können sie graphisch zusammen aufgetragen werden (s. Abbildung 18). Die Werte für die Frameshift-Rate wurden zur besseren Vergleichbarkeit aus derselben Versuchsreihe wie die HDR-Aktivitäten entnommen und nicht aus dem ersten BRET-Assay zur Bestimmung der Frameshift-Rate.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnten Einflüsse verschiedener PARP1-KOs und einer PARP1-Überexpression auf die Reparatur von DNA-DSB in HEK-Zellen beschrieben werden. In Anbetracht der Ergebnisse dieser Versuchsreihen vor dem Hintergrund der aktuellen Studienlage wird deutlich, dass PARP1 mit verschiedensten Reparaturenzymen interagiert und dadurch die Reparaturprozesse über unterschiedliche Mechanismen beeinflusst. Gewebespezifische Veränderungen können zu unterschiedlichen Ergebnissen

führen, je nachdem wie solche Mechanismen in den Zellen gewichtet sind. Perspektivisch ist es sinnvoll, die Ergebnisse durch PARP1-KOs in verschiedenen Zelllinien und mit unterschiedlichen Methodiken zu erweitern. Die Aktivitäten der einzelnen Reparaturwege können zusätzlich über fluoreszenzbasierten Nachweis assoziierter Loci nachgewiesen werden. Für NHEJ eignen sich dabei beispielsweise die Ku-Proteine, bei HDR das Reparaturprotein RAD51 (Du et al., 2016; G. Yang et al., 2018).

Transfektionsmethoden neben der hier verwendeten PEI-Transfektion sind z.B. die virale Transduktion oder die physikalische Transfektion. Mit der viralen Transduktion können hohe Transfektionseffizienzen erreicht werden, auch bei schwierig zu transfizierenden Zelllinien, wie z.B. Stammzellen. Retrovirale Vektoren, wie diejenigen basierend auf Lentiviren, haben gegenüber AAVs den Vorteil, ebenfalls stabile Transduktionen zu erreichen und eine höhere genetische Kapazität zu haben. Limitierungen dabei sind ein etwas höheres Risiko für insertionelle Mutagenese sowie immunogene und zytotoxische Reaktionen der Zielzellen gegenüber den viralen Vektoren (Chong et al., 2021; T. K. Kim & Eberwine, 2010). Auch physikalische Transfektionsmethoden können *in vitro* gute Transfektionseffizienzen erzielen, wenn die Zellen dem teils mechanischen Stress standhalten und die spezielle Technik dafür vorhanden ist (Chong et al., 2021; Fajrial et al., 2020).

Eine weitere Möglichkeit, Unterschiede in der Transfektionseffizienz zu umgehen, wäre die Etablierung einer stabilen PARP1-KO-Zelllinie durch pharmazeutische Selektion bei Resistenzen im KO-Plasmid.

Ein stabiler Protein-Knockdown kann auch über die RNAi-Methode erzeugt werden (s. 1.1). Während die siRNAs (small interfering RNAs) bei Transfektion im Zytosol der Zielzellen ankommen und somit die RNA-Konzentration nach mehreren Zellteilungen sinkt, ermöglicht die Transfektion einer shRNA (short hairpin RNA) die Integration der RNA in den Zellkern, sodass ein stabiler Knockdown erreicht werden kann. Um die Zelllinie mit dem stabilen Knockdown zu selektieren, kann mit Resistenzen gegenüber Medikamenten gearbeitet werden. Insgesamt ist die Etablierung einer Zelllinie mit stabilem Knockdown deutlich zeitaufwendiger als ein transienter Knockdown mittels siRNA (Moore et al., 2010).

Bezüglich des MMEJ-Assays würden kombinierte PARP1-KOs und eine PARP1-Überexpression, wie sie für die BRET-Assays in dieser Arbeit durchgeführt wurden, die Ergebnisse um einen wichtigen Aspekt ergänzen.

Eine Möglichkeit, das MMEJ-Assay unabhängig von der Transfektionseffizienz der CRISPR/Cas9-vermittelten PARP1-KOs zu machen, wäre die Etablierung eines stabilen PARP1^{-/-} in der HEK293^{-mORF15}-Zelllinie, die das murine RPGR-ORF15-Knockin enthält, verglichen zu den HEK293^{-mORF15}-Zellen mit PARP1^{WT}.

Ein Ansatz, eine interne Kontrolle in das MMEJ-Assay zu integrieren, wäre ein Dual-Luziferase-Assay. In dem von Sherf et al. entwickelten Reportersystem werden ein Firefly-Luziferase-Plasmid mit regulierbarem Promotor und als Kontrolle ein Renilla-Luziferase-Plasmid mit konstitutivem Promotor kotransfiziert. Durch zeitverzögerte Lumineszenzreaktion können die Luziferaseemissionen voneinander getrennt ausgewertet werden (Sherf et al., 1996). In dem MMEJ-Assay nach Yanik et al. wäre eine Kotransfektion eines Firefly-Luziferase-Plasmids ohne flankierende Mikrohomologien denkbar, sodass die MMEJ-Aktivität noch besser von anderen Reparaturmechanismen abgegrenzt werden kann.

Hinsichtlich der therapeutischen Genomeditierung bestätigt diese Arbeit, dass das MMEJ-basierte System nach Yanik et al. (2018) zu erfolgreichen Knockins der Luziferasesequenz geführt hat. Das Knockin erfolgte in das ORF15-Exon des murinen *RPGR*-Gens, das für ca. 60 % der Mutationen bei X-chromosomal vererbter Retinitis pigmentosa verantwortlich ist (Vervoort et al., 2000). Somit könnte eine etablierte Methode der Genomeditierung eine progrediente Sehverschlechterung bis hin zur Erblindung verhindern. Unter diesen Versuchsbedingungen hat die Knockin-Effizienz durch die PARP1-KOs zugenommen. Wichtig für das Ziel einer therapeutischen Genomeditierung sind gewebespezifische Besonderheiten des Zielorgans, wie im Falle der Retinitis pigmentosa die Netzhaut, die über vielfältige Versuchsreihen validiert werden müssen. Eine Übertragung allgemeingültiger Mechanismen ist hier leider nicht möglich.

Erfolge im Bereich der therapeutischen Genomeditierung haben als eine der ersten Gruppen Suzuki et al mit der Methode der *homology-independent targeted integration* (HITI) gezeigt (Suzuki et al., 2016). Die Integration von DNA durch NHEJ erzielte in einem Rattenmodell erste therapeutische Effekte beim Verhindern der Progression der

Retinitis pigmentosa. Mit dem CRISPR/Cas9-vermittelten DNA-Knockin wurde die Netzhaut von Ratten mit Retinitis pigmentosa *in vivo* therapiert. Die HITI-therapierten Ratten zeigten einen erfolgreichen DNA-Knockin, eine histologisch besser erhaltene äußere Kernschicht in der Netzhaut sowie verbesserte Ergebnisse in der Elektroretinographie von Stäbchen und Zapfen. Auch wenn die Sehkraft der Ratten nicht dauerhaft durch die HITI-Therapie erhalten werden konnte, so zeigen diese Ergebnisse erste Verbesserungen durch Genomeditierung *in-vivo* (Suzuki et al., 2016).

Ein weiterer erfolgversprechender Ansatz in der therapeutischen Genomeditierung wurde von Maeder et al für die Behandlung der Leber'schen kongenitalen Amaurose (LCA) Typ 10, verursacht durch Mutationen im *CEP290*-Gen, veröffentlicht. Bei dieser Methode wird NHEJ-vermittelte DNA-Modifizierung genutzt, um eine ektopische intronische Mutation im *CEP290*-Gen zu entfernen, sodass eine physiologische Expression von CEP290 wiederhergestellt wird. Die subretinale Einbringung des AAV basierten Vektors „EDIT-101“ *in vivo* bei humanisierten Mäusen und nichtmenschlichen Primaten zeigte in dieser Studie eine erfolgreiche Editierung des *CEP290*-Gens mit verbesserter Expression des Proteins (Maeder et al., 2019). Eine klinische Phase 1/2 Studie zur Evaluation der EDIT-101-Therapie unter Einschluss von an LCA erkrankten Erwachsenen und Kindern läuft aktuell in den USA (NCT03872479).

Neben dem Ziel der therapeutischen Genomeditierung zeigt auch die klinische Etablierung von PARP1-Inhibitoren als Krebstherapie, wie relevant die weitere Forschung an diesem und an weiteren Reparaturenzymen für die Klinik ist (G. Kim et al., 2015; Makin, 2021).

5 Zusammenfassung

Therapeutische Genomeditierung ist ein Ansatz, erblich bedingte, genetisch genau beschriebene Erkrankungen ursächlich zu behandeln, um so auf eine lebenslange Therapie verzichten zu können. Zu solchen Erkrankungen gehören z.B. Netzhauterkrankungen oder Erkrankungen des blutbildenden Systems.

Um defekte Gene reparieren oder funktionslos machen zu können ist, neben der zielgerichteten Anwendung programmierter Endonukleasen, die genaue Kenntnis über Reparaturmechanismen der durch die Endonukleasen entstandenen DSB grundlegend. Modifizierungen reparaturassoziierter Enzyme können die Wahl des Reparaturwegs beeinflussen und so für das Ergebnis der Genomeditierung entscheidend sein.

In dieser Arbeit wurden Modifizierungen des Reparaturenzyms PARP1 als Einflussfaktor auf die verschiedenen Reparaturwege von DNA-DSB untersucht. PARP1-KOs wurden durch CRISPR/Cas9-vermittelte DSB an unterschiedlichen Stellen der PARP1-Sequenz durchgeführt. Um eine PARP1-Überexpression zu erzielen, wurde ein für humanes PARP1 kodierendes Plasmid in die zu untersuchenden Zellen transfiziert.

Mithilfe eines BRET-Assays wurde die Reparatureffizienz hinsichtlich entstandener Frameshift-Mutationen untersucht. Dabei führten zwei der getesteten PARP1-KO-Kombinationen zu einer signifikant erhöhten Frameshift-Rate. Die PARP1-Überexpression führte zu einer signifikant verminderten Frameshift-Rate. Eine Korrelation von Frameshift-Rate und NHEJ-Aktivität ist wahrscheinlich und die Ergebnisse könnten auf einen hemmenden Einfluss von PARP1 auf den NHEJ-Reparaturweg interpretiert werden. Die Kofunktion eines homologen Templates führte in allen getesteten Proben zu einer signifikant verminderten Frameshift-Rate, was durch vermehrte HDR-Aktivität erklärt werden kann. Die vermehrte HDR-Aktivität war in den PARP1-KO-Zellen nicht signifikant zu den Kontrollzellen verändert, während sie in den PARP1-Überexpressionszellen signifikant niedriger war. Die MMEJ-Aktivität wurde bei Transfektion mikrohomologer Templates, die eine Luziferasesequenz enthielten, durch ein Luziferaseassay bestimmt. Die Luziferaseintensität war in den PARP1-KO-Zellen signifikant erhöht, was für eine erhöhte MMEJ-Aktivität spricht.

6 Summary

Therapeutic genome editing is an approach to treat hereditary, genetically precisely described diseases causally in order to be able to dispense with lifelong therapy. Such diseases include, for example, retinal diseases or diseases of the hematopoietic system.

To be able to repair defective genes or render them non-functional, precise knowledge of the repair mechanisms of endonuclease induced DSB is fundamental, as well as targeted application of programmed endonucleases. Modifications of repair-associated enzymes can influence the choice of repair pathway and thus be crucial for the outcome of genome editing.

In this study, modifications of the repair enzyme PARP1 were investigated as an influencing factor on the different repair pathways of DNA DSBs. PARP1 KOs were performed by CRISPR/Cas9-mediated DSB at different sites of the PARP1 sequence. To achieve PARP1 overexpression, a plasmid encoding human PARP1 was transfected into the cells under study.

Using a BRET assay, the repair efficiency was examined regarding occurred frameshift mutations. Two of the PARP1 KO combinations tested led to a significantly increased frameshift rate. PARP1 overexpression resulted in a significantly decreased frameshift rate. A correlation of frameshift rate and NHEJ activity is likely, and the results could be interpreted to an inhibitory effect of PARP1 on the NHEJ repair pathway. Cotransfection of a homologous template resulted in a significantly reduced frameshift rate in all tested samples, which can be explained by increased HDR activity. The increased HDR activity was not significantly altered in PARP1 KO cells compared to control cells, whereas it was significantly lower in PARP1 overexpressing cells. MMEJ activity was determined by luciferase assay upon transfection of microhomologous templates containing a luciferase sequence. Luciferase intensity was significantly increased in PARP1-KO cells, indicating increased MMEJ activity.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CRISPR/Cas9-induzierter Doppelstrangbruch.....	4
Abbildung 2: Reparatur von Doppelstrangbrüchen.....	7
Abbildung 3: Funktionen von PARP1.....	8
Abbildung 4: BRET-Assay, Übersicht auf Expressionsebene.....	13
Abbildung 5: MMEJ-Assay, schematische Übersicht.....	15
Abbildung 6: BRET-Reporter.....	27
Abbildung 7: px459-Vektor.....	28
Abbildung 8: RLuc8-Vektor.....	29
Abbildung 9: ELISA-vermittelte Messung der PARP1-Expression.....	43
Abbildung 10: Graphische Übersicht der Versuchsreihen.....	45
Abbildung 11: Kontrolle der Klonierung.....	46
Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Transfektion.....	47
Abbildung 13: BRET-Assay-kontrollierte Aktivitätsmessung der PARP1-KOs.....	48
Abbildung 14: BRET-Assay-kontrollierte Bestimmung von.....	50
Abbildung 15: Luziferaseassay zur Bestimmung der MMEJ-Aktivität.....	52
Abbildung 16: HDR-Template.....	53
Abbildung 17: BRET-Assay-kontrollierte Bestimmung der HDR-Aktivität.....	55
Abbildung 18: Übersicht über die BRET-Assay-kontrollierte Reparaturaktivität nach PARP1-KOs und PARP1-Überexpression.....	56

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	17
Tabelle 2: Softwares.....	18
Tabelle 3: Chemikalien	19
Tabelle 4: Enzyme.....	20
Tabelle 5: Kit-Systeme.....	21
Tabelle 6: Bakterienstämme.....	21
Tabelle 7: Eukaryotische Zelllinien	22
Tabelle 8: Antibiotika.....	24
Tabelle 9: Puffer.....	25
Tabelle 10: Plasmide	26
Tabelle 11: Oligonukleotide für PARP1-Target- und -gRNA-Inserts	30
Tabelle 12: Oligonukleotide für den <i>CLN3</i> -BRET-Reporter.....	31
Tabelle 13: MMEJ-Reportersequenzen.....	32
Tabelle 14: Primer für Sequenzierung und PCR.....	32

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
3'	Position der OH-Gruppe eines Nukleotids
5'	Position des Phosphatrestes eines Nukleotids
bp	Basenpaare
BRET	Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer
Cas	CRISPR associated protein
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
(d) dH ₂ O	(doppelt) destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GFP	grünfluoreszierendes Protein
gRNA	guide RNA
HEK	Human embryonic Kidney Cells
HDR	Homology dependent Recombination
Indel	Insertion/Deletion
KO	Knockout
L	Liter

LB	Luria Broth
min	Minute
m	Milli
μ	Mikro
MMEJ	Microhomology-mediated end joining
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n	Nano
NHEJ	Non-homologous end joining
PAM	Protospacer adjacent motif
PEI	Polyethylenimin
PBS	phosphate-buffered saline
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNP	Ribonukleoproteine
rpm	rounds per minute
ssDNA	single-stranded DNA
siRNA	small interfering RNA
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
x g	mal Erdbeschleunigung

10 Literaturverzeichnis

- Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Cicalese, M. P., Baricordi, C., Dionisio, F., Calabria, A., Giannelli, S., Castiello, M. C., Bosticardo, M., Evangelio, C., Assanelli, A., Casiraghi, M., di Nunzio, S., Callegaro, L., Benati, C., Rizzardi, P., Pellin, D., ... Naldini, L. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with wiskott-aldrich syndrome. *Science*, *341*(6148). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1233151/SUPPL_FILE/AIUTI.SM.PDF
- Amé, J. C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., Decker, P., Muller, S., Höger, T., Ménissier-de Murcia, J., & de Murcia, G. (1999). PARP-2, A Novel Mammalian DNA Damage-dependent Poly(ADP-ribose) Polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(25), 17860–17868. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.25.17860>
- Amé, J. C., Spenlehauer, C., & de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *26*(8), 882–893. <https://doi.org/10.1002/BIES.20085>
- Antoniani, C., Meneghini, V., Lattanzi, A., Felix, T., Romano, O., Magrin, E., Weber, L., Pavani, G., Hoss, S. el, Kurita, R., Nakamura, Y., Cradick, T. J., Lundberg, A. S., Porteus, M., Amendola, M., Nemer, W. el, Cavazzana, M., Mavilio, F., & Miccio, A. (2018). Induction of fetal hemoglobin synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human β -globin locus. *Blood*, *131*(17), 1960–1973. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-10-811505>
- Audebert, M., Salles, B., & Calsou, P. (2008). Effect of double-strand break DNA sequence on the PARP-1 NHEJ pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *369*(3), 982–988. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.11.132>
- Brinkman, E. K., Chen, T., de Haas, M., 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. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2018.04.016>
- Bryant, H. E., Petermann, E., Schultz, N., Jemth, A. S., Loseva, O., Issaeva, N., Johansson, F., Fernandez, S., McGlynn, P., & Helleday, T. (2009). PARP is

- activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *The EMBO Journal*, 28(17), 2601. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2009.206>
- Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N. J., & Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005 434:7035, 434(7035), 913–917. <https://doi.org/10.1038/nature03443>
- Buki, K. G., & Kun, E. (1988). Polypeptide domains of ADP-ribosyltransferase obtained by digestion with plasmin. *Biochemistry*, 27(16), 5990–5995. <https://doi.org/10.1021/BI00416A024>
- Caron, M. C., Sharma, A. K., O’Sullivan, J., Myler, L. R., Ferreira, M. T., Rodrigue, A., Coulombe, Y., Ethier, C., Gagné, J. P., Langelier, M. F., Pascal, J. M., Finkelstein, I. J., Hendzel, M. J., Poirier, G. G., & Masson, J. Y. (2019). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 antagonizes DNA resection at double-strand breaks. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10741-9>
- Carroll, D. (2014). Genome Engineering with Targetable Nucleases. <Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Biochem-060713-035418>, 83, 409–439. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060713-035418>
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., & D’andrea, A. D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break HHS Public Access. *Trends Cell Biol*, 26(1), 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>
- Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N., & Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 18, 495–506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
- Cheng, Q., Barboule, N., Frit, P., Gomez, D., Bombarde, O., Couderc, B., Ren, G. S., Salles, B., & Calsou, P. (2011). Ku counteracts mobilization of PARP1 and MRN in chromatin damaged with DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, 39(22), 9605. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR656>

- Chiruvella, K. K., Liang, Z., & Wilson, T. E. (2013). Repair of Double-Strand Breaks by End Joining. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012757>
- Chong, Z. X., Yeap, S. K., & Ho, W. Y. (2021). Transfection types, methods and strategies: A technical review. *PeerJ*, 9. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.11165/SUPP-1>
- Cox, D. B. T., Platt, R. J., & Zhang, F. (2015). Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature Medicine* 2015 21:2, 21(2), 121–131. <https://doi.org/10.1038/nm.3793>
- Das, B. B., Huang, S. N., Murai, J., Rehman, I., Amé, J. C., Sengupta, S., Das, S. K., Majumdar, P., Zhang, H., Biard, D., Majumder, H. K., Schreiber, V., & Pommier, Y. (2014). PARP1–TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I–induced DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 42(7), 4435. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKU088>
- De, A., Loening, A. M., & Gambhir, S. S. (2007). An Improved Bioluminescence Resonance Energy Transfer Strategy for Imaging Intracellular Events in Single Cells and Living Subjects. *Cancer Research*, 67(15), 7175. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4623>
- Deng, S. K., Gibb, B., Justino De Almeida, M., Greene, E. C., & Symington, L. S. (2014). RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2786>
- Doudna, J. A. (2020). The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* 2020 578:7794, 578(7794), 229–236. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5>
- Du, W., Amarachintha, S., Wilson, A. F., & Pang, Q. (2016). Hyper-active non-homologous end joining selects for synthetic lethality resistant and pathological Fanconi anemia hematopoietic stem and progenitor cells. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep22167>
- Dutta, A., Eckelmann, B., Adhikari, S., Ahmed, K. M., Sengupta, S., Pandey, A., Hegde, P. M., Tsai, M. S., Tainer, J. A., Weinfeld, M., Hegde, M. L., & Mitra, S. (2017). Microhomology-mediated end joining is activated in irradiated human cells due to

- phosphorylation-dependent formation of the XRCC1 repair complex. *Nucleic Acids Research*, 45(5), 2585. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW1262>
- 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. <https://doi.org/10.7150/THNO.43465>
- Feng, R., Patil, S., Zhao, X., Miao, Z., & Qian, A. (2021). RNA Therapeutics - Research and Clinical Advancements. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2021.710738>
- Gasiunas, G., Sinkunas, T., & Siksnys, V. (2014). Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(3), 449. <https://doi.org/10.1007/S00018-013-1438-6>
- Gu, J., Lu, H., Tippin, B., Shimazaki, N., Goodman, M. F., & Lieber, M. R. (2007). XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO Journal*, 26(4), 1010–1023. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601559>
- Hanzlikova, H., Gittens, W., Krejcikova, K., Zeng, Z., & Caldecott, K. W. (2017). Overlapping roles for PARP1 and PARP2 in the recruitment of endogenous XRCC1 and PNKP into oxidized chromatin. *Nucleic Acids Research*, 45(5), 2546–2557. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW1246>
- Her, J., & Bunting, S. F. (2018). How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10502–10511. <https://doi.org/10.1074/JBC.TM118.000371>
- Heyer, W. D., Ehmsen, K. T., & Liu, J. (2010). Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 44, 113. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-051710-150955>
- Horlbeck, M. A., Witkowsky, L. B., Guglielmi, B., Replogle, J. M., Gilbert, L. A., Villalta, J. E., Torigoe, S. E., Tjian, R., & Weissman, J. S. (2016). Nucleosomes impede Cas9 access to DNA in vivo and in vitro. *ELife*, 5(MARCH2016). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.12677>
- Howe, S. J., Mansour, M. R., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C., Hubank, M., Kempfski, H., Brugman, M. H., Pike-Overzet, K., Chatters, S. J., de Ridder, D., Gilmour, K. C., Adams, S., Thornhill, S. I., Parsley, K. L., Staal, F. J. T., Gale, R.

- E., Linch, D. C., Bayford, J., Brown, L., ... Thrasher, A. J. (2008). Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(9), 3143–3150. <https://doi.org/10.1172/JCI35798>
- Hu, Y., Petit, S. A., Ficarro, S. B., Toomire, K. J., Xie, A., Lim, E., Cao, S. A., Park, E., Eck, M. J., Scully, R., Brown, M., Marto, J. A., & Livingston, D. M. (2014). PARP1-driven poly-ADP-ribosylation regulates BRCA1 function in homologous recombination-mediated DNA repair. *Cancer Discovery*, *4*(12), 1430–1447. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0891>
- 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 and Bioscience*, *8*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13578-018-0200-Z/TABLES/1>
- Jasin, M., & Haber, J. E. (2016). The Democratization of Gene Editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair. *DNA Repair*, *44*, 6. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2016.05.001>
- 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*, *337*(6096), 816–821. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1225829/SUPPL_FILE/JINEK.SM.PDF
- Kapahnke, M., Banning, A., & Tikkanen, R. (2016). Random Splicing of Several Exons Caused by a Single Base Change in the Target Exon of CRISPR/Cas9 Mediated Gene Knockout. *Cells*, *5*(4). <https://doi.org/10.3390/CELLS5040045>
- Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A., & Lahav, G. (2012). Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid-S phase. *Molecular Cell*, *47*(2), 320. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2012.05.052>
- Kim, G., Ison, G., McKee, A. E., Zhang, H., Tang, S., Gwise, T., Sridhara, R., Lee, E., Tzou, A., Philip, R., Chiu, H. J., Ricks, T. K., Palmby, T., Russell, A. M., Ladouceur, G., Pfuma, E., Li, H., Zhao, L., Liu, Q., ... Pazdur, R. (2015). FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of

- Chemotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(19), 4257–4261. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0887>
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173. <https://doi.org/10.1007/S00216-010-3821-6>
- Langelier, M. F., Planck, J. L., Roy, S., & Pascal, J. M. (2012). Structural basis for DNA-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6082), 728. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1216338>
- 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. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKN184>
- Liszczyk, G., Diehl, K. L., Dann, G. P., & Muir, T. W. (2018). Acetylation blocks DNA damage-induced chromatin ADP-ribosylation. *Nature Chemical Biology*, 14(9), 837–840. <https://doi.org/10.1038/S41589-018-0097-1>
- Loening, A. M., Fenn, T. D., & Gambhir, S. S. (2007). Crystal Structures of the Luciferase and Green Fluorescent Protein from *Renilla reniformis*. *Journal of Molecular Biology*, 374(4), 1017. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2007.09.078>
- 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>
- Maeder, M. L., Stefanidakis, M., Wilson, C. J., Baral, R., Barrera, L. A., Bounoutas, G. S., Bumcrot, D., Chao, H., Ciulla, D. M., DaSilva, J. A., Dass, A., Dhanapal, V., Fennell, T. J., Friedland, A. E., Giannoukos, G., Gloskowski, S. W., Glucksmann, A., Gotta, G. M., Jayaram, H., ... Jiang, H. (2019). Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nature Medicine* 2019 25:2, 25(2), 229–233. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0327-9>
- Makin, S. (2021). What's next for PARP inhibitors? *Nature*, 600(7889), S36–S38. <https://doi.org/10.1038/D41586-021-03714-W>

- Makino, S., Fukumura, R., & Gondo, Y. (2016). Illegitimate translation causes unexpected gene expression from on-target out-of-frame alleles created by CRISPR-Cas9. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep39608>
- 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. <https://doi.org/10.1101/GR.145441.112>
- McVey, M., & Lee, S. E. (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends in Genetics : TIG*, 24(11), 529. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2008.08.007>
- Ménissier de Murcia, J., Ricoul, M., Tartier, L., Niedergang, C., Huber, A., Dantzer, F., Schreiber, V., Amé, J. C., Dierich, A., LeMeur, M., Sabatier, L., Chambon, P., & de Murcia, G. (2003). Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *The EMBO Journal*, 22(9), 2255–2263. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG206>
- Moore, C. B., Guthrie, E. H., Huang, M. T. H., & Taxman, D. J. (2010). Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 629, 141. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-657-3_10
- 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 2014 5:1*, 5(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms6560>
- Pasquini, G., Cora, V., Swiersy, A., Achberger, K., Antkowiak, L., Müller, B., Wimmer, T., Fraschka, 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 2020, Vol. 21, Page 1380*, 21(4), 1380. <https://doi.org/10.3390/IJMS21041380>

- Patterson-Fortin, J., & D'Andrea, A. D. (2020). Exploiting the Microhomology-Mediated End-Joining Pathway in Cancer Therapy. *Cancer Research*, 80(21), 4593. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1672>
- Pazzaglia, S., & Pioli, C. (2020). Multifaceted Role of PARP-1 in DNA Repair and Inflammation: Pathological and Therapeutic Implications in Cancer and Non-Cancer Diseases. *Cells*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/CELLS9010041>
- Puchta, H., Dujon, B., & Hohn, B. (1993). Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Research*, 21(22), 5034–5040. <https://doi.org/10.1093/NAR/21.22.5034>
- 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>
- Ray Chaudhuri, A., & Nussenzweig, A. (2017). The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 18, Issue 10, pp. 610–621). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.53>
- Richardson, C. D., Kazane, K. R., Feng, S. J., Zelin, E., Bray, N. L., Schäfer, A. J., Floor, S. N., & Corn, J. E. (2018). CRISPR–Cas9 genome editing in human cells occurs via the Fanconi anemia pathway. *Nature Genetics* 2018 50:8, 50(8), 1132–1139. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0174-0>
- Robert, F., Barbeau, M., Éthier, S., Dostie, J., & Pelletier, J. (2015). Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. *Genome Medicine*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/S13073-015-0215-6>
- Ruscetti, T., Lehnert, B. E., Halbrook, J., le Trong, H., Hoekstra, M. F., Chen, D. J., & Peterson, S. R. (1998). Stimulation of the DNA-dependent Protein Kinase by Poly(ADP-Ribose) Polymerase *. *Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14461–14467. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.23.14461>
- Schultz, N., Lopez, E., Saleh-Gohari, N., & Helleday, T. (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic Acids Research*, 31(17), 4959. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKG703>

- Setten, R. L., Rossi, J. J., & Han, S. ping. (2019). The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 2019 18:6, 18(6), 421–446. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>
- Sherf, B. A., Navarro, S. L., Hannah, R. R., & Wood, K. V. (1996, January). (PDF) *Dual-Luciferase TM Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and Renilla Luciferase Assays*. Promega Notes Magazine, Numer 57. https://www.researchgate.net/publication/238747666_Dual-Luciferase_TM_Reporter_Assay_An_Advanced_Co-Reporter_Technology_Integrating_Firefly_and_Renilla_Luciferase_Assays
- Shrestha, D., Jenei, A., Nagy, P., Vereb, G., & Szöllösi, J. (2015). Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 6718. <https://doi.org/10.3390/IJMS16046718>
- Sinha, S., Villarreal, D., Shim, E. Y., & Lee, S. E. (2016). Risky Business: Microhomology-Mediated End Joining. *Mutation Research*, 788, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.12.005>
- Spagnolo, L., Barbeau, J., Curtin, N. J., Morris, E. P., & Pearl, L. H. (2012). Visualization of a DNA-PK/PARP1 complex. *Nucleic Acids Research*, 40(9), 4168. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR1231>
- Stoddard, B. L. (2005). Homing endonuclease structure and function. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 38(1), 49–95. <https://doi.org/10.1017/S0033583505004063>
- 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. <https://doi.org/10.1038/NATURE20565>
- Taleei, R., & Nikjoo, H. (2013). Biochemical DSB-repair model for mammalian cells in G1 and early S phases of the cell cycle. *Mutation Research*, 756(1–2), 206–212. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2013.06.004>
- Tiemann, K., & Rossi, J. J. (2009). RNAi-based therapeutics—current status, challenges and prospects. *EMBO Molecular Medicine*, 1(3), 142. <https://doi.org/10.1002/EMMM.200900023>

- Truong, L. N., Li, Y., Shi, L. Z., Hwang, P. Y. H., He, J., Wang, H., Razavian, N., Berns, M. W., & Wu, X. (2013). Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(19), 7720–7725. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1213431110/-/DCSUPPLEMENTAL>
- 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>
- 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* *2000* *25*:4, *25*(4), 462–466. <https://doi.org/10.1038/78182>
- Villarreal, D. D., Lee, K., Deem, A., Shim, E. Y., Malkova, A., & Lee, S. E. (2012). Microhomology Directs Diverse DNA Break Repair Pathways and Chromosomal Translocations. *PLOS Genetics*, *8*(11), e1003026. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1003026>
- Wang, D., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* *2019* *18*:5, *18*(5), 358–378. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>
- Wang, H., la Russa, M., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and beyond. *Annual Review of Biochemistry*, *85*, 227–264. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014607>
- Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., & Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Research*, *34*(21), 6170–6182. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKL840>
- Wei, H., & Yu, X. (2016). Functions of PARylation in DNA Damage Repair Pathways. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, *14*(3), 131–139. <https://doi.org/10.1016/J.GPB.2016.05.001>

- Wimmer, T., Bonthu, D., Moeschl, V., Klekamp, 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>
- Wu, Y., Zeng, J., Roscoe, B. P., Liu, P., Yao, Q., Lazzarotto, C. R., Clement, K., Cole, M. A., Luk, K., Baricordi, C., Shen, A. H., Ren, C., Esrick, E. B., Manis, J. P., Dorfman, D. M., Williams, D. A., Biffi, A., Brugnara, C., Biasco, L., ... Bauer, D. E. (2019). Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells. *Nature Medicine* 2019 25:5, 25(5), 776–783. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0401-y>
- Xu, J., Lian, W., Jia, Y., Li, L., & Huang, Z. (2017). Optimized guide RNA structure for genome editing via Cas9. *Oncotarget*, 8(55), 94166. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.21607>
- Yang, G., Liu, C., Chen, S. H., Kassab, M. A., Hoff, J. D., Walter, N. G., & Yu, X. (2018). Super-resolution imaging identifies PARP1 and the Ku complex acting as DNA double-strand break sensors. *Nucleic Acids Research*, 46(7), 3446–3457. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY088>
- Yang, Y. G., Cortes, U., Patnaik, S., Jasin, M., & Wang, Z. Q. (2004). Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks. *Oncogene* 2004 23:21, 23(21), 3872–3882. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207491>
- Yanik, M., Müller, B., Song, F., Gall, J., Wagner, F., Wende, W., Lorenz, B., & Stieger, K. (2017). 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., Ponnamp, 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* 2018 4:1, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0049-7>

Yeh, C. D., Richardson, C. D., & Corn, J. E. (2019). Advances in genome editing through control of DNA repair pathways. *Nature Cell Biology* 2019 21:12, 21(12), 1468–1478. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0425-z>

Zhang, F., Shi, J., Bian, C., & Yu, X. (2015). Poly(ADP-ribose) mediates the BRCA2-dependent early DNA damage response. *Cell Reports*, 13(4), 678. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2015.09.040>

11 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. 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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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 und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum Unterschrift

12 Danksagung

Zunächst bedanke ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger für die Ermöglichung meiner Doktorarbeit in dieser Arbeitsgruppe und die herausragende Betreuung über die gesamte Zeit.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank meinem Betreuer Herrn Dr. Tobias Wimmer für die Einarbeitung in die Laborarbeit und die umfassende Betreuung während der experimentellen Zeit, sowie bei der Auswertung der Ergebnisse und dem Verfassen dieser Arbeit.

Frau Maria Weller danke ich für die geduldige Beantwortung vieler Fragen während meiner Labor- und Bürozeit und die Rechtschreibkorrektur dieser Arbeit.

Allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG experimentelle Ophthalmologie danke ich für den wissenschaftlichen Austausch, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die allgemeine Hilfsbereitschaft untereinander. Insbesondere danke ich Frau Annabella Janise für die stets hilfreichen Ratschläge während meiner Laborarbeit.

Schließlich bedanke ich mich ganz besonders bei meinen Eltern, Inge und Dr. Georg Schneider, für die unermüdliche Unterstützung während meines Medizinstudiums und meiner Forschungssemester.