

**Thiel, Christian Alexander**

---

Modifizierung von DNA-Reparaturproteinen  
auf Expressionsebene zur Optimierung der  
therapeutischen Genom Editierung

INAUGURALDISSERTATION

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



*édition scientifique*   
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2020

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Modifizierung von DNA-Reparaturproteinen auf  
Expressionsebene zur Optimierung der  
therapeutischen Genom Editierung**

**INAUGURALDISSERTATION**

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

vorgelegt von

**Thiel, Christian Alexander**  
aus Gießen

Gießen 2019

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Knut Stieger  
(kommissarische Leitung Forschung und Lehre)

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Gutachter: Prof. Dr. Günter Lochnit

Tag der Disputation: 01.09.2020

---

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Erbliche Netzhautdefekte und genetische Ursachen .....	1
1.2 Therapeutisches <i>Genome Editing</i> .....	3
1.3 Endonukleasen .....	5
1.3.1 Meganukleasen.....	5
1.3.2 Zinkfinger Nukleasen.....	6
1.3.3 TALEN .....	6
1.3.4 CRISPR/Cas .....	8
1.4 DNA-Reparaturmechanismen .....	10
1.4.1 NHEJ .....	11
1.4.2 HDR .....	12
1.4.3 MMEJ.....	13
1.5 Modifizierung der Expression von DNA-Reparaturproteinen.....	14
1.5.1 Chemisch/Pharmazeutisch.....	14
1.5.2 RNA-Interferenz .....	16
1.5.3 Gen-Knockout .....	19
1.6 Zielsetzung.....	20
2. Material und Methoden .....	22
2.1 Material .....	22
2.1.1 Geräteliste.....	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	23
2.1.3 Chemikalien .....	24
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	25
2.1.5 Antibiotika .....	26
2.1.6 DNA Größenstandards.....	27
2.1.7 Software.....	27
2.1.8 Enzyme .....	27

---

---

2.1.9	Plasmide .....	28
2.1.9.1	px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9) .....	28
2.1.9.2	pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 .....	29
2.1.9.3	gRNA/Cas9 Konstrukt für NHEJ Sensor (In6G2).....	30
2.1.9.4	NHEJ Sensor (In6T2).....	31
2.1.9.5	pRLuc8 .....	31
2.1.9.6	pTagGFP2-N.....	31
2.1.10	Oligonukleotide und Primer .....	33
2.1.11	siRNA.....	33
2.1.12	Medien für Bakterienkulturen.....	34
2.1.13	Medien für Zellkulturen .....	34
2.1.14	Bakterienstämme .....	35
2.1.15	Zelllinien.....	35
2.1.15.1	HEK 293T Zelllinie .....	35
2.1.15.2	C2C12 Zelllinie.....	36
2.1.15.3	NIH 3T3 Zelllinie.....	36
2.1.16	Kits.....	36
2.2	Methoden .....	37
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	37
2.2.1.1	Restriktionsverdau .....	37
2.2.1.2	Primerhybridisierung .....	39
2.2.1.3	Ligation .....	39
2.2.1.4	Herstellung elektrokompenter XL1-Blue E.coli.....	40
2.2.1.5	Elektroporation .....	40
2.2.1.6	Plasmidisolierung .....	41
2.2.1.7	DNA-Sequenzierung .....	43
2.2.1.8	Anlegen eines Glycerolstocks .....	43
2.2.1.9	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration .....	43
2.2.1.10	Extraktion genomischer DNA .....	44

---

---

2.2.1.11	PCR .....	44
2.2.1.12	Agarose-Gelelektrophorese .....	46
2.2.1.13	DNA-Extraktion aus Agarose-Gel .....	47
2.2.1.14	T7EI Assay.....	47
2.2.2	Zellbiologische Methoden.....	49
2.2.2.1	Kultivierung von HEK 293T-, C2C12- und NIH 3T3 Zellen .....	49
2.2.2.2	Kryokonservierung der Zellen.....	49
2.2.2.3	Auszählen der Zellen .....	49
2.2.2.4	Transfektion .....	50
2.2.2.5	Puromycinselektion .....	54
2.2.3	Proteinchemische Methoden.....	54
2.2.3.1	Proteinextraktion nach der „Freeze-Thaw“ Methode.....	54
2.2.3.2	BRET Assay.....	54
2.2.4	Statistik .....	58
3.	Ergebnisse .....	59
3.1	Artemis-Knockout Ansatz .....	59
3.1.1	Herstellung und Validierung der Plasmide.....	59
3.1.2	Testung der Aktivität in HEK 293T Zellen.....	62
3.1.3	Testung der Aktivität in NIH 3T3 Zellen.....	64
3.1.4	T7EI Assay zur Aktivitätsmessung im murinen Genom .....	65
3.1.5	Knockout und Testung in Zellkultur .....	67
3.2	Silencing Ansatz.....	75
3.3	Vergleich Knockout- und Silencing Ansatz .....	77
4.	Diskussion.....	78
4.1	Funktionen von Artemis.....	78
4.2	Erstellen von Artemis-defizienten Zellen.....	81
4.3	Das NHEJ-Reportersystem .....	83
4.4	Ausblick.....	86
5.	Zusammenfassung.....	87

---

---

6. Summary.....	88
7. Abkürzungsverzeichnis .....	89
8. Abbildungsverzeichnis.....	93
9. Tabellenverzeichnis.....	94
10. Literaturverzeichnis .....	96
11. Erklärung zur Dissertation .....	107
12. Danksagung.....	108

# 1. Einleitung

## 1.1 Erbliche Netzhautdefekte und genetische Ursachen

Erbliche Netzhautdefekte sind eine heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die zu fortschreitenden Sehbeeinträchtigungen führen (Sanjurjo-Soriano und Kalatzis 2018). Diese Erkrankungen weisen weltweit eine Prävalenz von 1:3000 bis 1:5000 auf und sind damit die häufigste Ursache für Erblindungen in Industrienationen (Simunovic et al. 2019). Laut RetNet werden mittlerweile über 250 Mutationen tragende Gene mit Netzhautdefekten in Verbindung gebracht (<https://sph.uth.edu/retnet/sumdis.htm#A-genes>, Stand: Januar 2018).

Hereditär bedingte Netzhauterkrankungen werden in syndromische und nicht-syndromische Formen unterteilt. Zu den nicht-syndromischen Erkrankungen werden zunächst Makuladystrophien gezählt. Ein Beispiel hierfür ist der Morbus Stargardt, der auf einer Mutation des ABCA4 Gens beruht und zu Sehschärfeverlust führt. Des Weiteren wird in den peripheren Netzhautregionen zwischen Stäbchen-Zapfen- und Zapfen-Stäbchen-Dystrophien unterschieden (Sanjurjo-Soriano und Kalatzis 2018). Ein bekanntes Beispiel für Stäbchen-Zapfen-Dystrophien stellt die Retinitis Pigmentosa (RP) dar, welche aufgrund von Mutationen in über 90 verschiedenen Genen entstehen kann (Chuang et al. 2017). Die RP umfasst eine heterogene Gruppe hereditärer Netzhautdegenerationen, welche zunächst durch einen Verlust der Stäbchen und später der Zapfen charakterisiert ist. Erste Symptome sind Nachtblindheit, gefolgt von einer fortschreitenden Einschränkung des Sichtfelds, bis hin zur Erblindung (Daiger et al. 2013; Verbakel et al. 2018).

Weitere Beispiele für nicht-syndromische Netzhautdefekte sind die Lebersche kongenitale Amaurose (LCA) und die Chorioideremie, welche auf Degenerationen der Makula und peripheren Retina bzw. auf Degenerationen der Choroidea und Retina beruhen. Ein Beispiel für syndromische hereditäre Netzhautdefekte stellt das Usher-Syndrom dar, welches durch eine RP und Hörverlust charakterisiert ist (Sanjurjo-Soriano und Kalatzis 2018).

Die aufgezählten Erkrankungen resultieren aus diversen mutierten Genen, deren fehlerhafte Genprodukte einen negativen Einfluss auf den Proteintransport, den

Sehzyklus und verschiedene Stoffwechselwege haben (Bennett 2017). Hierdurch kommt es zur gestörten Entwicklung, Fehlfunktion oder zum Absterben der Photorezeptor- und RPE-Zellen (Sanjurjo-Soriano und Kalatzis 2018).

### **Gentherapie:**

Allerdings gibt es für die meisten dieser Erkrankungen bisher keine adäquate Therapie (Peddle und MacLaren 2017). Einen möglichen Ansatz zur Behandlung dieser Patienten bietet die Gentherapie. Der Fokus der Gentherapie-Forschung ist hierbei insbesondere auf die Ophthalmologie gerichtet, da viele erbliche Netzhautdefekte eine monogenetische Ursache aufweisen. Gleichzeitig ist das Auge aufgrund von wenigen Antigen-präsentierenden Zellen immunprivilegiert, sodass injizierte virale Vektoren eher toleriert werden. Außerdem können virale Vektoren durch die Blut-Retina Schranke lokal auf das Auge begrenzt werden (Chan et al. 2017; Peddle und MacLaren 2017).

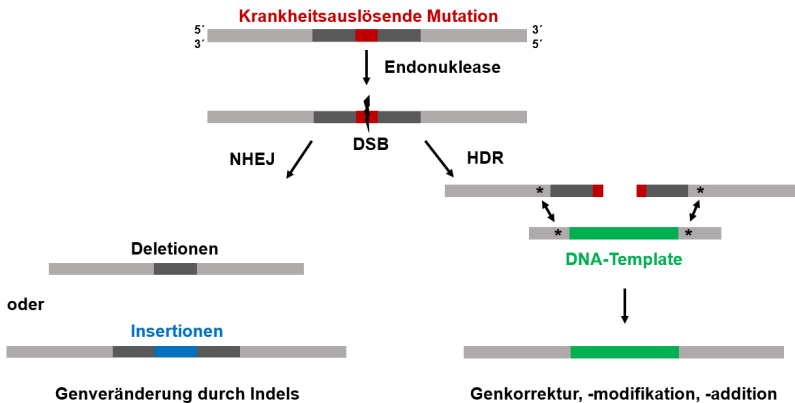
Die Gentherapie umfasst verschiedene Therapieansätze. Bei der Genaugmentation kann die korrekte cDNA-Sequenz eines mutierten Gens durch virale Vektoren in die Retina eingebracht werden (Yanik et al. 2017). Bei Patienten, deren Genmutation einen Funktionsverlust oder eine Funktionsminderung des entsprechenden Genprodukts bewirkt („Loss-of-function“ Mutation), stellt diese Therapieform einen möglichen Ansatz dar (Peddle und MacLaren 2017). Bestrebungen dieser Art wurden schon in klinischen Studien verwirklicht. Beispielsweise zeigt die Genaugmentation des RPE65 Gens bei der LCA vielversprechende Ergebnisse (Bennett 2017). Jedoch weist die Genaugmentation auch Schwächen auf. Zum einen beruhen nicht alle hereditären Netzhauterkrankungen auf Loss-of-function Mutationen, zum anderen könnte die Wechselwirkung der mutierten Genprodukte mit den künstlich eingebrachten Genprodukten problematisch sein (Yanik et al. 2017).

Einen weiteren Therapieansatz stellt das Gen-Silencing durch RNA-Interferenz dar, bei dem Proteine mit negativem Effekt oder zu hoher und damit toxischer Expression („Gain-of-function“ Mutation) ausgeschaltet werden können (Cox et al. 2015; Yanik et al. 2017). Hier besteht jedoch das Risiko von off-target Effekten und somit eines kompletten Ausfalls eines Genprodukts (Peddle und MacLaren 2017). In anderen Fällen konnte die RNA-Interferenz die Genexpression nicht komplett inhibieren (Cox et al. 2015).

Das im folgenden Kapitel beschriebene Therapeutische *Genome Editing* bildet hierzu eine vielversprechende Alternative.

## 1.2 Therapeutisches *Genome Editing*

Das Therapeutische *Genome Editing* ist im Gegensatz zu den beschriebenen Therapieformen durch einen anderen Ansatz charakterisiert. Hierbei wird nämlich nicht auf eine symptomatische Therapie abgezielt, sondern versucht, eine genetisch bedingte Erkrankung kausal zu therapieren (Yanik et al. 2017). Das Ziel des *Genome Editing* ist, eine krankheitsauslösende Mutation direkt im Genom eines Patienten zu korrigieren (Sanjurjo-Soriano und Kalatzis 2018). Abbildung 1.1 zeigt schematisch die möglichen Therapieansätze des *Genome Editings*. Das Prinzip beruht hierbei auf einem künstlich induzierten Doppelstrangbruch (DSB), welcher durch zelleigene Reparaturmechanismen repariert wird. Mögliche Reparaturwege sind der „Non-homologous end joining (NHEJ)“- Weg, bei dem die DNA-Enden unter Bildung von Insertionen oder Deletionen (Indels) religiert werden, sowie der „homology directed repair (HDR)“- Weg, bei welchem ein DNA-Template durch homologe Sequenzen integriert werden kann. Außerdem gibt es den „microhomology-mediated end joining (MMEJ)“- Weg, bei dem die DNA-Enden durch Mikrohomologien religiert werden (Cai et al. 2018; Yanik et al. 2017).

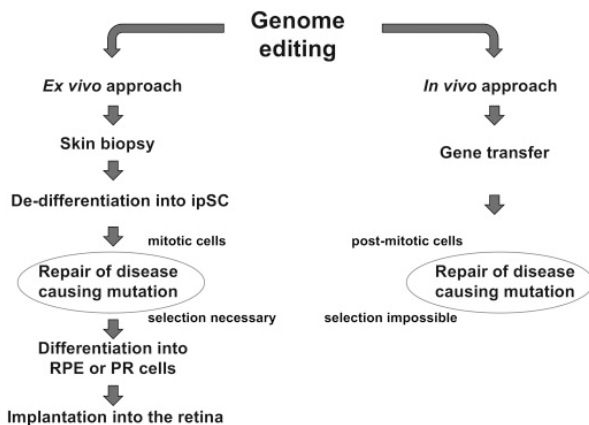


**Abbildung 1.1: Therapeutisches *Genome Editing***

Das Schaubild zeigt vereinfacht die Therapieansätze beim *Genome Editing*. Anders als bei herkömmlichen Verfahren kann hier die krankheitsauslösende Mutation direkt im Genom therapiert werden. Der künstlich erzeugte DSB wird entweder durch NHEJ oder HDR repariert. DSB: Doppelstrangbruch, \*: homologe Sequenzen

Durch die NHEJ-Reparatur kann demnach ein mutiertes Gen mit pathogenem Genprodukt ausgeschaltet werden, sodass nur noch das entsprechende, nicht mutierte Gen auf dem homologen Chromosom abgelesen wird. Andererseits kann durch die HDR-Reparatur ein in die Zielzelle eingebrachtes DNA-Template in das Genom integriert werden. Wenn dieses Template die ursprüngliche DNA-Sequenz ohne die krankheitsauslösende Mutation enthält, kann der Wildtyp eines Gens wieder hergestellt werden (Cox et al. 2015; Peddle und MacLaren 2017). Je nach Gestaltung des DNA-Templates ist es auch möglich, ein Gen zu modifizieren oder ein neues Gen in das Genom einzufügen (Yanik et al. 2017).

Wie in Abbildung 1.2 gezeigt, umfasst das *Genome Editing* zwei verschiedene therapeutische Strategien. Beim *ex vivo Genome Editing* können patienteneigene Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) dedifferenziert werden. Anschließend kann die krankheitsauslösende Mutation korrigiert und die Zellen nach Redifferenzierung in die Retina implantiert werden (Peddle und MacLaren 2017; Yanik et al. 2017). Durch diese autologe Transplantation können ethische Zweifel und eine überschießende Immunreaktion des Patienten umgangen werden (Sanjurjo-Soriano und Kalatzis 2018). Des Weiteren besteht die Möglichkeit des *in vivo Genome Editing*. Hierbei werden Bestandteile, die für die Genkorrektur nötig sind, direkt durch virale Vektoren in die Retina eingebracht. Herausforderungen hierbei sind der postmitotische Zustand der Zellen, sowie potenzielle off-target Effekte (Yanik et al. 2017).



**Abbildung 1.2: Ex vivo / in vivo Genome Editing in der Retina**

In der Abbildung sind die jeweiligen Schritte für das *ex vivo / in vivo Genome Editing* dargestellt (Yanik et al. 2017).

---

In den folgenden Kapiteln werden zunächst die spezifischen Endonukleasen und danach die Reparaturwege beschrieben.

### 1.3 Endonukleasen

Um einen gezielten Doppelstrangbruch zu erzeugen, werden verschiedene Endonukleasen verwendet. Diese werden derart programmiert, dass sie eine spezifische DNA-Sequenz erkennen und schneiden können (Fernández et al. 2017). Der entstandene DSB kann darauffolgend durch zelleigene Reparaturmechanismen repariert werden und führt zur genomischen Modifikation (Yanik et al. 2017). Erste Bestrebungen dieser Art gab es schon Mitte der 1990er Jahre. Choulika et al. zeigten, dass die Endonuklease I-SceI gezielte Doppelstrangbrüche im murinen Genom erzeugen konnte (Choulika et al. 1995). Seitdem wurden durch intensive Forschung weitere Endonukleasen identifiziert. Die für das *Genome Editing* verwendeten Endonukleasen werden verschiedenen Gruppen zugeordnet. Meganukleasen, TALEN und Zinkfinger-Nukleasen können die spezifische DNA-Sequenz durch Protein-DNA Interaktion erkennen und binden (s. Abbildung 1.3). Die Endonuklease Cas9 des CRISPR/Cas Systems wird durch eine Guide-RNA (gRNA) an den spezifischen DNA-Locus geleitet, wo die gRNA an die Ziel-DNA durch Basenpaarbindung direkt bindet (Cox et al. 2015).

#### 1.3.1 Meganukleasen

Meganukleasen, welche auch als LAGLIDADG Homing Endonukleasen bezeichnet werden, können DNA-Sequenzen zwischen 14 und 40 bp erkennen (Silva et al. 2011; Yanik et al. 2017). Diese Homing Endonukleasen erzeugen Doppelstrangbrüche an Stellen des Wirtsgenoms, wo das für die Homing Endonuklease codierende Gen noch nicht eingebaut ist. Durch homologe Reparatur des erzeugten DSB wird das Homing Endonuklease Gen in das Wirtsgenom eingebaut (Stoddard 2014). Meganukleasen konnten derart konstruiert werden, dass sie erfolgreich das menschliche XPC und RAG1 Gen schneiden (Arnould et al. 2007; Grizot et al. 2009). Diesen Gruppen gelang es, die DNA-Erkennungssequenz der Homing Endonuklease I-Crel so zu verändern, dass sie spezifisch das gewünschte Gen schneidet (Silva et al. 2011; Yanik et al. 2017). Jedoch können Meganukleasen nur eingeschränkt für neue DNA-Zielsequenzen verwendet

werden, da die DNA Binde- und Schneidedomäne nicht getrennt voneinander hergestellt werden können. Dies erfordert einen sehr großen Arbeitsaufwand, weshalb die Bedeutung der Meganukleasen für das therapeutische *Genome Editing* abgenommen hat (Yin et al. 2017; Yanik et al. 2017).

### 1.3.2 Zinkfinger Nukleasen

Zinkfinger Nukleasen weisen eine getrennte DNA-Binde- und DNA-Schneidedomäne auf (Carroll 2011). Kim et al. kombinierten das Typ IIS Restriktionsenzym FokI mit einer Zinkfingerdomäne, die an die DNA binden kann (Kim et al. 1996). Die DNA-Bindedomäne besteht aus 3 bis 6 Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> Zinkfingermotiven. Diese setzen sich aus etwa 30 Aminosäuren zusammen und binden ein Zink-Atom. Jedes Zinkfingermotiv erkennt 3-4 DNA-Basenpaare, sodass durch Kombination verschiedener Zinkfinger fast jede DNA-Sequenz erkannt und angesteuert werden kann (Carroll 2011; Yanik et al. 2017). Um die DNA effektiv schneiden zu können, muss die katalytische Domäne des FokI dimerisieren (Bitinaite et al. 1998). Dies wird erreicht, indem zwei spezifische Zinkfinger motive an den jeweiligen gegenüberliegenden DNA-Einzelstrang in invertierter Richtung binden. Die beiden Bindestellen haben hierbei einen Abstand von 5-7 Basenpaaren (Carroll 2011; Yanik et al. 2017). Zinkfinger Nukleasen wurden bereits in ersten klinischen Studien angewendet. 2014 benutzten Tebas et al. Zinkfinger Nukleasen bei HIV-Patienten, um das CCR5 Gen in T-Zellen zu schneiden (Tebas et al. 2014). Für viele Labore sind Zinkfinger Nukleasen jedoch zu teuer oder nicht zugänglich, sodass die Bedeutung für das therapeutische *Genome Editing* limitiert ist (Fernández et al. 2017).

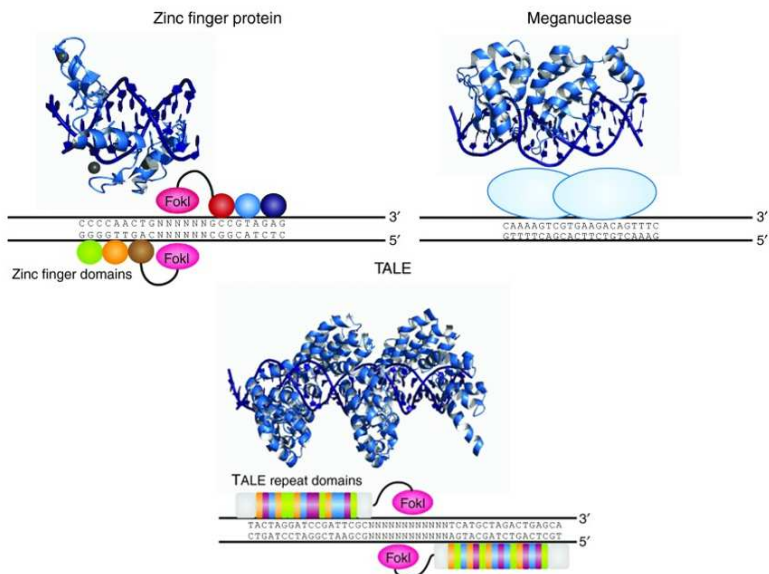
### 1.3.3 TALEN

Wie die Zinkfinger Nukleasen sind TALE-Nukleasen chimäre Proteine, die als DNA-Schneidedomäne das Restriktionsenzym FokI enthalten (Fernández et al. 2017). Mit den „transcription activator-like effectors“ (TALEs) enthalten diese Endonukleasen jedoch eine andere DNA-Bindedomäne, welche in dem pflanzenpathogenen Bakterium *Xanthomonas* gefunden wurde (Guha und Edgell 2017). Die TALE Proteine bestehen aus einer zentralen DNA-bindenden Domäne mit Tandemwiederholungen. Jede dieser Wiederholungen besteht aus etwa 34 AS, wobei die Aminosäuren an Stelle 12 und 13 variabel sind. Diese auch „repeat variable diresidues“ (RVD) genannten Aminosäuren erkennen eine Base in der DNA (Guha und Edgell 2017; Yanik et al. 2017). Durch

## Einleitung

---

Aneinanderreihung der verschiedenen TALEs kann man fast jede DNA-Sequenz ansteuern. Eine Limitierung hierbei ist, dass die gebundene DNA-Sequenz mit der Base Thymin am 5'-Ende starten muss (Gaj et al. 2013; Guha und Edgell 2017). Um einen DSB zu erzeugen, dimerisieren die TALEN Monomere am DNA-Doppelstrang (Joung und Sander 2013). TALEN wurden in diversen Studien für *Genome Editing* verwendet. 2014 konnten beispielsweise Low et al. das murine Gen *Crb1rd8* erfolgreich mit TALEN ansteuern und schneiden (Low et al. 2014). Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass durch die Größe der TALE-Nukleasen der Einbau in virale Vektoren erschwert ist (Yanik et al. 2017).



**Abbildung 1.3: Darstellung der Zinkfinger-Nukleasen, Meganukleasen und TALEN**

Die Abbildung zeigt vereinfacht die beschriebenen Endonukleasen. Die gezeigten Endonukleasen binden den DNA-Doppelstrang jeweils durch DNA-Protein Interaktion. Nach erfolgreicher Bindung entsteht ein Doppelstrangbruch. Verändert nach (Maeder und Gersbach 2016), <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

### 1.3.4 CRISPR/Cas

Das CRISPR/Cas System kommt ursprünglich in diversen Bakterien und Archaeen vor, wo es als Abwehrmechanismus gegen Viren und Plasmide dient (Jinek et al. 2012). Die Mikroorganismen können kurze Fragmente der Virus- bzw. Plasmid-DNA mit Hilfe der Endonukleasen Cas1 und Cas2 aus dem Fremdgenom ausschneiden (Hung et al. 2016). Diese etwa 20 bp langen Fragmente werden als Protospacer in den „clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)“-Abschnitt des eigenen Genoms eingebaut (Yanik et al. 2017). Der CRISPR-Abschnitt, welcher die eingebaute Fremd-DNA-Sequenz enthält, kann nun durch die Zelle transkribiert werden, wobei die sogenannte CRISPR RNA (crRNA) entsteht (Peddle und MacLaren 2017). Die crRNA wird danach durch die „trans-activating crRNA (tracrRNA)“ und die RNA spezifische Ribonuklease RNase III in die Endonuklease Cas9 integriert (Jinek et al. 2012). Wenn ein Virus die Zelle erneut befällt, erkennt die crRNA die Virus-DNA und initiiert dort einen DSB durch die Endonuklease Cas9 (Hung et al. 2016). Diese kann jedoch nur schneiden, wenn eine PAM (protospacer adjacent motif)-Sequenz an dem 3' Ende der Ziel-DNA vorhanden ist. Die PAM-Sequenz ist jedoch nicht in dem CRISPR Abschnitt des Bakteriengenoms vorhanden, sodass hier kein Schnitt erfolgen kann (Yanik et al. 2017).

Wie in Abbildung 1.4 gezeigt, bindet das CRISPR/Cas System die Zielsequenz durch Watson-Crick Basenpaarungen, wodurch es sich von den zuvor beschriebenen Endonukleasen unterscheidet. Um neue Zielsequenzen zu erkennen, muss hier kein neues Protein erstellt werden, sondern lediglich die Basensequenz der crRNA angepasst werden (Cox et al. 2015). Hierdurch ist es vergleichsweise einfach, eine beliebige Zielsequenz im Genom anzusteuern und durch die Endonuklease Cas9 zu schneiden (Yanik et al. 2017). Dies erklärt die große Bedeutung des CRISPR/Cas Systems für das therapeutische *Genome Editing*. Entscheidend war hierbei auch die Arbeit von Doudna und Charpentier. 2012 konnte diese Arbeitsgruppe die crRNA und tracrRNA Einzelstränge zu einer einzelnen „single guide RNA (sgRNA)“ kombinieren (Jinek et al. 2012). Dies vereinfachte nochmals das Erstellen von spezifisch im Genom schneidenden Cas Endonukleasen.

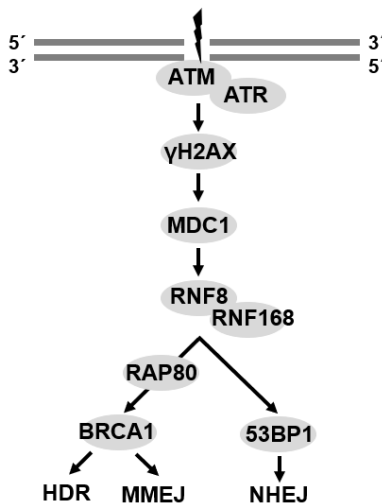
Für das therapeutische *Genome Editing* wird vor allem die Endonuklease Cas9 verwendet, welche aus dem Bakterium *Streptococcus pyogenes* stammt (Guha und Edgell 2017). Nach erfolgreichem Binden der sgRNA an der Zielsequenz kann Cas9 nur schneiden, wenn in der Zielsequenz das PAM-Motiv NGG vorhanden ist. Cas9 induziert



## 1.4 DNA-Reparaturmechanismen

DNA-Doppelstrangbrüche stellen eine große Gefahr für die Integrität des Genoms dar. DSB können in Folge von ionisierender Strahlung, Sauerstoffradikalen oder Fehlern bei der DNA-Replikation auftreten (Chang et al. 2017). Zur Reparatur dieser DSB bedient sich die Zelle verschiedener zelleigener Mechanismen.

Neben den beiden Hauptreparaturwegen NHEJ und HDR ist noch ein dritter Mechanismus, MMEJ, bekannt. In Eukaryoten ist der NHEJ-Weg während des gesamten Zellzyklus aktiv, wohingegen HDR nur in der späten S- und G2-Phase des Zellzyklus aktiv ist (Lieber 2008). Der NHEJ-Reparaturweg resultiert in zufälligen Insertionen oder Deletionen (Indels), während beim HDR-Weg das Schwesterchromatid als Template benutzt wird und somit der DSB fehlerfrei repariert wird (Sanjurjo-Soriano und Kalatzis 2018). Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, kann man sich diese Reparaturwege beim Therapeutischen *Genome Editing* zu Nutze machen.



**Abbildung 1.5: Erkennung eines Doppelstrangbruchs**

Nach Auftreten eines Doppelstrangbruchs werden die freien DNA-Enden durch dargestellte Proteine erkannt. Nach weiteren Schritten erfolgt die Bindung von BRCA1 oder 53BP1, welche HDR/MMEJ bzw. NHEJ einleiten. Angelehnt an (Yanik et al. 2017).

In Abbildung 1.5 sind die an der Erkennung eines DSB beteiligten Proteine gezeigt. Ist ein DSB induziert worden, binden ATM und ATR an die freien DNA-Enden. Diese Serin/Threonin-Kinasen phosphorylieren H2AX zu  $\gamma$ H2AX (Yanik et al. 2017).  $\gamma$ H2AX ist für die Rekrutierung von weiteren DNA-Reparaturproteinen verantwortlich (Yuan et al. 2010). Nach Auftreten eines DSB bindet MDC1 an  $\gamma$ H2AX, wodurch die E3 Ligase RNF8 aktiviert wird, welche H2AX ubiquitiniert. Außerdem ubiquitiniert die E3 Ligase RNF168 das um den DSB liegende Chromatin. Dadurch können die weiteren Proteine 53BP1, beziehungsweise RAP80, gefolgt von BRCA1 binden (Brandsma und Gent 2012; Yanik et al. 2017). Nach Binden von 53BP1 wird der NHEJ-Weg eingeleitet, wohingegen durch Binden von BRCA1 entweder HDR oder MMEJ folgt (Yanik et al. 2017).

### 1.4.1 NHEJ

Zunächst bindet das Heterodimer Ku70/Ku80 an die zuvor markierten freien DNA-Enden (s. Abbildung 1.6) (Yanik et al. 2017). Ku bindet mit hoher Affinität an die doppelsträngigen DNA-Enden und bildet dort durch Dimerisierung einen positiv geladenen Ring aus, der mit dem Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA interagiert. Hierdurch werden die DNA-Enden stabilisiert und vor Degradation geschützt (Fell und Schild-Poulter 2015). An den Ku/DNA Komplex können nun weitere Proteine des NHEJ-Wegs binden (Lieber 2010). Zunächst bindet die DNA-PKcs an die Ku/DNA-Enden und formt zusammen mit Ku den DNA-PK Komplex. Hierdurch kommt es zur Aktivierung der Kinaseaktivität der DNA-PKcs, wodurch sie autophosphoryliert wird. Außerdem wird dabei die Nuklease Artemis phosphoryliert, wodurch sie aktiviert wird (Chang et al. 2017; Lieber 2008). Artemis scheint eine wichtige Rolle in der DNA-Endprozessierung einzunehmen. Die Nuklease gehört der Familie der Metallo- $\beta$ -Laktamasen an und kann DNA in verschiedenen Konfigurationen hydrolysieren. An doppelsträngigen DNA-Enden weist Artemis eine 5'-, sowie 3'-Endonukleaseaktivität auf (Chang et al. 2017). Chang und Lieber entwickelten ein Modell, bei dem der Artemis:DNA-PKcs Komplex durch 3 Kontaktpunkte an die jeweilige DNA-Konfiguration bindet (Chang und Lieber 2016). Je nach Ausgangskonfiguration der DNA-Enden entstehen dann diverse DNA-Endstrukturen. Nach Prozessieren von 5'-Überhängen entstehen blunt-ends, wohingegen 3'-Überhänge und blunt-ends zu 3'-Überhängen geschnitten werden (Chang und Lieber 2016; Chang et al. 2017). Anschließend werden fehlende Nukleotide durch die Polymerasen  $\lambda$  und  $\mu$  ergänzt (Yanik et al. 2017). Die Pol  $\mu$  kann hierbei Nukleotide template-unabhängig polymerisieren, während die Pol  $\lambda$  durch primär template-abhängige Polymeraseaktivität gekennzeichnet ist. Somit kann die Pol  $\mu$  zwei

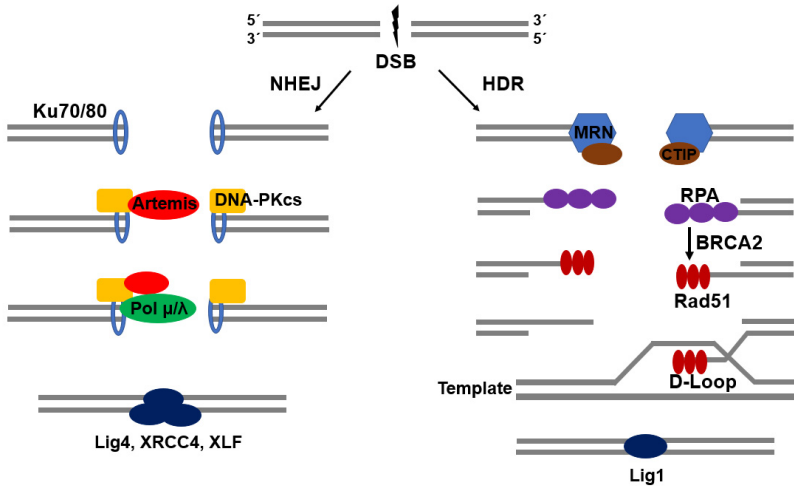
inkompatible 3'-Überhänge durch Polymerase von Mikrohomologien für eine anschließende Religation vorbereiten (Chang et al. 2017). Im letzten Schritt erfolgt die Ligation der beiden prozessierten DNA-Enden durch den Komplex aus Ligase 4, XRCC4 und XLF. Die Ligase 4 kann auch inkompatible DNA-Enden bzw. lückenhafte DNA religieren, wodurch sie für den NHEJ-Weg sehr gut geeignet ist (Smirnikhina et al. 2019).

### 1.4.2 HDR

Des Weiteren kann die Zelle den HDR-Weg zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen nutzen. HDR ist kurz nach der DNA-Replikation in der S- und G2-Phase des Zellzyklus aktiv. Beim HDR-Mechanismus dient das Schwesterchromatid als Vorlage, wodurch der Doppelstrangbruch ohne Fehler repariert werden kann (Smirnikhina et al. 2019). Im Gegensatz zum NHEJ-Weg kommt es hierbei also nicht zur Formierung von Indels und anschließend auch nicht zu einem fehlerhaften Genprodukt. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, kann der HDR-Reparaturweg für das Therapeutische *Genome Editing* ausgenutzt werden. Bringt man ein DNA-Template mit homologen Sequenzen künstlich in eine Zelle ein, kann dieses DNA-Template durch HDR ins Genom eingebaut werden. Je nach Gestaltung des DNA-Template kommt es dann zur Genkorrektur, -modifikation, oder -addition (Yanik et al. 2017).

Der HDR-Weg wird mit der Rekrutierung des MRN-Komplex, bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1, eingeleitet (s. Abbildung 1.6). Zusammen mit CTIP ist der MRN Komplex für die Endresektion der freien DNA-Enden verantwortlich. Hierbei werden durch 5'-3'Exonukleaseaktivität 3'-Überhänge generiert. Des Weiteren sind die 5'-3'Exonukleasen EXO1 und DNA2 in die Endresektion involviert, wodurch die 3'-Überhänge nochmals verlängert werden (Symington und Gautier 2011).

Danach bindet RPA an die generierten 3'-Überhänge, wodurch diese vor der Formation von Sekundärstrukturen geschützt werden. RPA wird daraufhin durch einen BRCA2-abhängigen Prozess mit RAD51 ersetzt. Durch RAD51 kann der einzelsträngige 3'-Überhang an homologe Sequenzen des DNA-Templates binden, wodurch ein sogenannter D-Loop entsteht (Kakarougkas und Jeggo 2014). Hierdurch kommt es zur Ausbildung von sogenannten Holliday-Strukturen, bei denen die fehlenden DNA-Abschnitte synthetisiert werden und welche in Cross-over oder non-Cross-over Produkten enden (Smirnikhina et al. 2019). Die Ligation der DNA-Enden wird durch die DNA-Ligase 1 durchgeführt (Yanik et al. 2017). Einen Überblick über NHEJ und HDR gibt Abbildung 1.6.



**Abbildung 1.6: Darstellung von NHEJ und HDR**

In dieser Abbildung sind die beiden Hauptreparaturwege mit den wichtigsten beteiligten Proteinen skizziert. Der DSB wird zunächst durch ATM und ATR erkannt und gebunden, wodurch weitere Proteine rekrutiert werden. Durch die Bindung von BRCA1 wird schließlich der HDR-Reparaturweg eingeleitet, welcher zunächst durch die Rekrutierung vom MRN-Komplex und CTIP charakterisiert ist. Durch weitere Zwischenschritte kann der DSB unter Verwendung eines DNA-Templates oder des Schwesterchromatids ohne Fehler repariert werden. Durch die Bindung von 53BP1 anstelle von BRCA1 wird der NHEJ-Weg eingeleitet. Charakteristisch ist hierbei die initiale Bindung durch KU70/Ku80. Nach weiteren Schritten kommt es zur Ligation des DSB unter Ausbildung von Indels.

### 1.4.3 MMEJ

Der dritte mögliche DSB-Reparaturweg ist der MMEJ (microhomology-mediated end joining)-Weg, welcher eine Subgruppe des alternativen-NHEJ (a-NHEJ) darstellt (Smirnikhina et al. 2019). Einige Details des a-NHEJ bzw. MMEJ sind bisher nicht geklärt und sind deshalb Gegenstand aktueller Forschung (Seol et al. 2018; Yanik et al. 2017). MMEJ ist ähnlich wie NHEJ ein sehr fehleranfälliger Reparaturmechanismus und resultiert in diversen Insertionen oder Deletionen. Anders als beim NHEJ-Weg werden die freien DNA-Enden jedoch über die Bildung von 5-25 bp langen mikrohologen Sequenzen religiert (Cubbon et al. 2018). MMEJ ist Ku- und Ligase 4-unabhängig und kommt hauptsächlich in der S-Phase des Zellzyklus vor (Yanik et al. 2017).

MMEJ wird durch das ADP-ribosylierende Enzym PARP1 eingeleitet, welches DNA Schäden erkennen kann (Chang et al. 2017). Es folgt die DNA-Endresektion durch den MRN-Komplex und CTIP, wodurch 3'-Überhänge generiert werden (Yanik et al. 2017). Des Weiteren ist die Polymerase  $\theta$  im MMEJ-Weg involviert. Diese Polymerase kann das Binden der beiden DNA-Einzelstränge stabilisieren, indem es fehlende Nukleotide hinzufügt und so die mikrohologen Sequenzen verlängert (Chang et al. 2017). Im letzten Schritt werden die DNA-Einzelstränge durch die Ligase 3 religiert (Sfeir und Symington 2015).

## 1.5 Modifizierung der Expression von DNA-Reparaturproteinen

Durch präzises *Genome Editing* mit hochspezifischen Endonukleasen ist es theoretisch möglich, Gene dauerhaft zu modifizieren, zu korrigieren oder hinzuzufügen, indem man den HDR-Reparaturweg ausnutzt (Yanik et al. 2017). Erblieh bedingte Netzhauterkrankungen beruhen auf Gendefekten in postmitotischen retinalen Zellen. Der HDR-Weg kommt jedoch überwiegend in der S- und G2-Phase des Zellzyklus vor und ist deshalb in den Retinazellen eher inaktiv (Peddle und MacLaren 2017). Damit die Zelle eingebrachte DNA-Templates in das Genom integriert, ist es also notwendig, die Effizienz und Aktivität des HDR-Reparaturwegs in postmitotischen (Retina)zellen zu erhöhen. Es gibt verschiedene Ansätze zur Erhöhung der HDR-Effizienz. Zunächst hat das Design des DNA-Templates einen Einfluss auf die HDR-vermittelte Knock-in Effizienz. Chen et al. konnten beispielweise zeigen, dass die HDR-Rate bei einzelsträngigen DNA-Donortemplates höher ist als bei doppelsträngigen Substraten (Chen et al. 2011). Weitere Ansätze sind das Inhibieren von NHEJ-Schlüsselproteinen oder die künstliche Stimulation von HDR-Schlüsselproteinen. Diese Möglichkeiten werden im Folgenden näher erläutert.

### 1.5.1 Chemisch/Pharmazeutisch

In verschiedenen Studien konnte der Einfluss diverser Moleküle auf NHEJ- und HDR-Schlüsselproteine gezeigt werden. Einige dieser Moleküle können NHEJ-Proteine inhibieren, wodurch die NHEJ-Aktivität abnimmt und HDR effizienter werden kann (Li et al. 2017). Das Molekül Scr7 inhibiert die DNA-Ligase 4, indem es die DNA-Bindedomäne

blockiert. Dadurch kann die Ligase nicht mehr an Doppelstrangbrüche binden und verliert somit ihre Funktion. Maruyama et al. verwendeten Scr7 in verschiedenen Säugetierzelllinien und in der Maus und konnten eine bis zu 19-fach gesteigerte HDR-Effizienz feststellen (Maruyama et al. 2015). Weitere Gruppen konnten durch Scr7 vermitteltes Inhibieren der Ligase 4 eine Erhöhung der HDR-Effizienz erzielen. Chu et al. zeigten in HEK 293 Zellen eine 5-fache HDR-Effizienz, Li et al. erreichten einen 2-fachen Anstieg der HDR-Effizienz in porcinen fetalen Fibroblasten (Li et al. 2017; van Chu et al. 2015). Jedoch wird die Wirkung von Scr7 kontrovers diskutiert. Zhang et al. und Yang et al. konnten keinen Einfluss auf die HDR-Effizienz in iPSC bzw. humanen embryonalen Stammzellen zeigen (Yang et al. 2016; Zhang et al. 2017).

Außerdem konnten Li et al. in ihrer Arbeit eine 2- bzw. 3-fache Erhöhung der HDR-Effizienz durch die beiden Moleküle L755507 und Resveratrol erzeugen. Resveratrol verringert hierbei die Expression der NHEJ-Proteine Ligase 4, Ku70 und Ku80, zeigte aber eine schwere Zytotoxizität auf (Li et al. 2017).

Der  $\beta$ 3-Adrenozeptor-Agonist L755507 konnte in einer weiteren Studie eine 3-fach erhöhte HDR-Effizienz in murinen embryonalen Stammzellen erzeugen. Außerdem konnte in der gleichen Arbeit Brefeldin A, ein Inhibitor des intrazellulären Proteintransports, die HDR-Effizienz auf das Doppelte steigern. Die genauen Wirkungsweisen im Zusammenhang mit den DNA-Reparaturmechanismen sind hierbei jedoch unklar (Yu et al. 2015).

Des Weiteren konnten Robert et al. die DNA-PKcs durch die Pharmazeutika NU7441 und KU-0060648 inhibieren. Bei der Verwendung von einzelsträngigen DNA-Templates konnte die HDR-Effizienz auf das 3- bis 4-fache gesteigert werden, während die Anzahl der NHEJ-Events um die Hälfte reduziert wurde (Robert et al. 2015).

Neben den genannten Molekülen gibt es auch Substanzen, die die HDR-Effizienz durch Stimulation von HDR-Schlüsselproteinen steigern. Das Molekül RS-1 kann das HDR-Protein RAD51 bei der Interaktion mit DNA stabilisieren. Außerdem wird die durch RAD51 vermittelte Ausbildung von D-Loops aktiviert (Jayathilaka et al. 2008).

Song et al. erreichten durch die Verwendung von RS-1 eine bis zu 6-fache Knock-in Effizienz in Kaninchenembryonen verglichen mit der Kontrollgruppe (Song et al. 2016). Die Wirkung von RS-1 auf RAD51 und somit auf den HDR-Weg wurde auch in der Arbeit von Pinder et al. bestätigt. Hier konnte in humanen HEK 293 Zellen die HDR-Effizienz um das 3- bis 6-fache gesteigert werden (Pinder et al. 2015). Eine Übersicht über die genannten Moleküle gibt Tabelle 1.1.

**Tabelle 1.1: Wirkung verschiedener Moleküle auf Reparaturwegproteine**

<b>Inhibition von NHEJ-Schlüsselproteinen</b>	
<b>Molekül</b>	<b>Inhibition</b>
Scr7	DNA-Ligase 4
Resveratrol	DNA-Ligase 4, Ku70, Ku80
NU7441	DNA-PKcs
KU-0060648	DNA-PKcs
<b>Stimulation von HDR-Schlüsselproteinen</b>	
<b>Molekül</b>	<b>Stimulation</b>
RS-1	Rad51

### 1.5.2 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein Mechanismus, bei welchem die Expression eines Zielgens durch nicht-codierende RNA-Moleküle herunterreguliert werden kann (Ipsaro und Joshua-Tor 2015). Die Genexpression wird hierbei durch Schneiden der mRNA eines bestimmten Gens oder durch Blockieren der mRNA bei der Translation beeinflusst (Hu et al. 2019). RNA-Interferenz ist ein zelleigener Mechanismus, welcher die Genexpression während der Entwicklung reguliert und welcher vor Fremd-DNA z.B. bei einer Virusinfektion schützt (Wilson und Doudna 2013). RNAi kann in der Wissenschaft zur Erforschung von Proteinfunktionen angewendet werden. Außerdem wird die RNA-Interferenz zur Bekämpfung von pathogenen Bakterien, Pilzen und Viren benutzt und ist zudem Gegenstand bei der Entwicklung neuer Therapieansätze, zum Beispiel gegen Krebs (Fakhr et al. 2016).

Erste Erkenntnisse zur RNA-Interferenz gab es schon Ende der 90er Jahre. 1998 konnten Fire et al. in dem Fadenwurm *C.elegans* Gene durch Injektion von doppelsträngigen RNA-Molekülen inhibieren (Fire et al. 1998). 2001 konnte RNA-Interferenz dann auch in Säugetierzelllinien gezeigt werden (Elbashir et al. 2001).

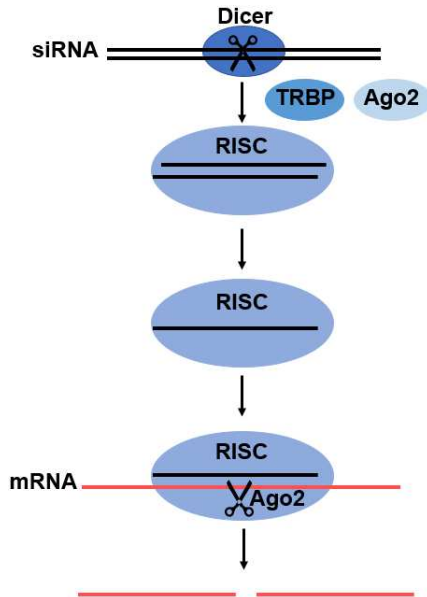
RNAi wird hauptsächlich durch die sogenannte micro-RNA (miRNA), sowie die small interfering-RNA (siRNA) erzeugt. Die miRNA bezieht ihren Ursprung aus dem

zelleigenen Genom. Die Synthese der miRNA beginnt im Nucleus, wo sie als „primary mi-RNA (pri-miRNA)“ zunächst unter der Mitwirkung der RNA-Polymerase II oder III transkribiert wird (Gavrilov und Saltzman 2012; Hu et al. 2019). Die pri-miRNA wird durch den Drosha-DGCR8 Komplex zur etwa 70 Nukleotide umfassenden „precursor miRNA (pre-miRNA)“ umgewandelt (Hu et al. 2019). Der nukleäre Export der pre-miRNA erfolgt durch den Exportin-5-Transporter (Yi et al. 2003). Im Zytoplasma wird die pre-miRNA durch die RNase III Dicer zu der etwa 22 Nukleotide umfassenden miRNA gespalten (Lee et al. 2003). Dicer überträgt danach mit Hilfe des TRBP (human immunodeficiency trans activating response RNA-binding protein) die miRNA auf die Argonaute Proteine 1-4. Hierdurch wird der sogenannte RNA-Induced Silencing Komplex (RISC), bestehend aus Dicer, TRBP und den Argonaute Proteinen 1-4, gebildet. Der Einzelstrang, der mit dem Argonaute Protein bindet, führt den RISC zu der komplementären mRNA (*Guide Strand*). Der zweite Einzelstrang wird degradiert (*Passenger Strand*). Die miRNA ist im Gegensatz zur siRNA nur teilweise komplementär zur 3'-UTR Region der Ziel-mRNA. Durch Bindung des RISC an diese mRNA wird hauptsächlich die Translation gehemmt (Gavrilov und Saltzman 2012; Wilson und Doudna 2013).

Small interfering RNA (siRNA) kann in Form von langer, doppelsträngiger RNA künstlich in eine Zelle eingebracht werden. Diese dsRNA wird dann durch Dicer zu 21-25 Nukleotiden umfassenden RNA geschnitten. Hierdurch wird am 3'-Ende ein Zwei-Nukleotid-Überhang gebildet, das 5'-Ende ist durch eine Monophosphatgruppe charakterisiert. Wie die miRNA wird auch die siRNA in den RISC integriert, jedoch ist hierbei nur das Argonaute Protein 2 beteiligt (Gavrilov und Saltzman 2012). Auch hier kommt es zur Bildung eines Guide Strangs, während der Passenger Strang degradiert wird. Anders als bei der miRNA bindet die siRNA komplementär an die Ziel-mRNA. Anschließend bewirkt Argonaute 2 eine Spaltung der mRNA, wodurch das entsprechende Protein nicht mehr korrekt hergestellt werden kann (s. Abbildung 1.7) (Ozcan et al. 2015).

RNA-Interferenz kann man sich beim Therapeutischen *Genome Editing* zu Nutzen machen, indem man die Expression bestimmter Proteine herabreguliert. Einen Ansatz stellt hier das Silencing von Schlüsselproteinen des NHEJ dar, um eine höhere Effizienz des HDR-Wegs zu erreichen. Robert et al. konnten die HDR-Effizienz durch Anwenden der RNA-Interferenz um etwa das 2-3-fache steigern, wobei die Anzahl der NHEJ-Events sank. Dies erreichten sie durch das Silencing der NHEJ-Proteine Ku70/Ku80, DNA-PKcs sowie der DNA-Ligase 4 mittels siRNA (Robert et al. 2015).

Mit der Arbeit um Li et al. konnte noch eine weitere Arbeitsgruppe die HDR-Effizienz durch Verwendung von siRNA steigern. Durch Silencing von Ku70 und Ku80 in porcinen fetalen Fibroblasten konnte hier die HDR-Effizienz auf das etwa 1,6 bis 3-fache gesteigert werden (Li et al. 2018).



**Abbildung 1.7: Wirkweise der siRNA und beteiligte Proteine**

Die Abbildung zeigt eine in die Zelle eingebrachte synthetisch hergestellte, doppelsträngige siRNA. In weiteren Schritten wird die siRNA prozessiert. Der Guide-Einzelstrang kann nun komplementär an die Ziel-mRNA binden. Durch Ago2 wird diese mRNA gespalten. Dadurch kann die mRNA nicht mehr korrekt translatiert werden und es kommt zu einem fehlerhaften Genprodukt.



verschiedener NHEJ-Schlüsselproteine kann durch ein geeignetes Reportersystem deren Rolle im NHEJ-Reparaturweg untersucht werden.

Diese Strategie verfolgten auch Ma et al. bei ihren Untersuchungen in *B.mori*. Hier wurden 3 verschiedene Sequenzen auf dem *B.mori* Gen für Ku70 (*Bmku70*) mit gRNA/Cas9 Konstrukten angesteuert. Hierbei konnten Mutationsraten des *Bmku70* Gens zwischen 16,8% und 30,3% erzielt werden. Durch ein Reportersystem konnte in *Bmku70*-Knockout Embryos, im Vergleich zur Kontrolle, eine gesteigerte HR-Aktivität festgestellt werden (Ma et al. 2014).

Eine weitere Arbeit dieser Art wurde von Zhu et al. publiziert. Hier wurde in *B.mori* ein CRISPR/Cas vermittelter Knockout der NHEJ-Gene *BmKu70*, *BmKu80*, *BmLIG IV*, *BmXLF* und *BmXRCC4* durchgeführt. Dadurch konnte die HR-Aktivität auf das bis zu 7-fache gesteigert werden (Zhu et al. 2015).

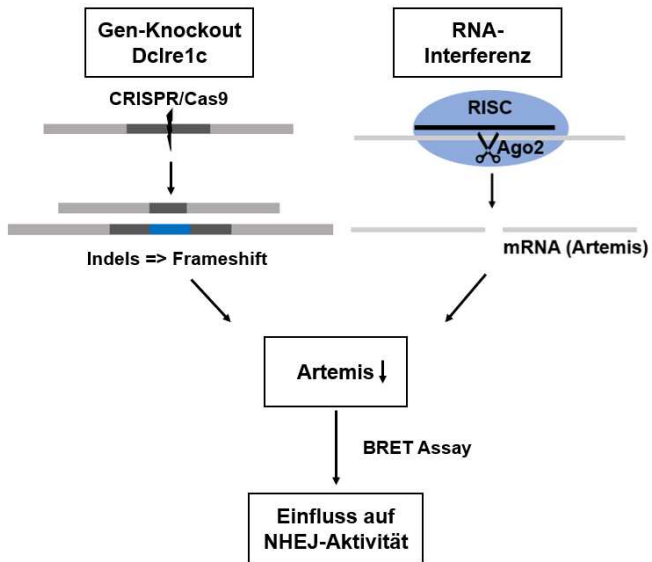
## 1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Aktivität des NHEJ-Reparaturwegs in murinen Zelllinien herab zu regulieren. Wie in Kapitel 1.5 beschrieben, konnte die Aktivität des NHEJ-Reparaturwegs durch Inhibition verschiedener NHEJ-Schlüsselproteine erfolgreich reduziert und die HDR-Effizienz gesteigert werden. In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob und inwieweit ein Knockout bzw. Knockdown (RNA-Interferenz) der Nuklease Artemis zu einer Herabregulation des NHEJ-Reparaturwegs führt. Hierzu sollte die Expression dieser Nuklease, welche in die DNA-Endprozessierung im NHEJ-Weg involviert ist, durch zwei verschiedene Methoden herabreguliert werden: Gen-Knockout und RNA-Interferenz.

Für den CRISPR/Cas9 vermittelten Gen-Knockout wurden zunächst 7 Target Sequenzen aus dem murinen *Dclre1c* Gen (codierend für Artemis) ausgewählt. Die entsprechenden gRNA/Cas9 Konstrukte sollten anschließend durch verschiedene Methoden auf ihre Schneideaktivität geprüft und validiert werden.

Anschließend wurden die gRNA/Cas9 Konstrukte bzw. die synthetische siRNA in murine Zelllinien transfiziert. Die Messung der NHEJ-Aktivität, nach Inhibition von Artemis, erfolgte durch eine BRET basierte Methodik.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Einfluss des CRISPR/Cas9 vermittelten Gen-Knockouts bzw. der RNA-Interferenz auf die NHEJ-Aktivität zu vergleichen. In Abbildung 1.9 sind die Ansätze dieser Arbeit dargestellt.



**Abbildung 1.9: Schematische Darstellung des Projekts**

Das Schaubild zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Ansätze. Der Einfluss nach Knockout/Knockdown von Artemis auf die NHEJ-Aktivität wurde durch eine BRET basierte Methodik untersucht. Dclre1c: murines, für Artemis codierendes Gen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräteliste

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller, Ort
Autoklav	DX-65	Systec, Linden
Dest. H <sub>2</sub> O Anlage	Arium 611DI	Sartorius, Göttingen
Eismaschine	AF 80 Ice Flaker	Scotsman, Berlin
Fluoreszenz Mikroskop	BioZero	Keyence, Essen
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80 °C)	Hera Freeze	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Gelkammer für Agarosegele	Biometra Compact XS/S und M	Biometra, Göttingen
Heizblock	Biometra TB2	Biometra, Göttingen
Inkubator für eukaryotische Zellen	C150	Binder, Tuttlingen
Inkubator für prokaryotische Zellen	BD115	Binder, Tuttlingen
Kühlschrank (+4 °C)	/	Bosch, Gerlingen
Kühlschrank (+4 °C)	/	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank (+4 °C)	/	VWR, Darmstadt
Küvetten (Elektroporation)	71-2010	Peqlab, Erlangen
Magnetrührer	IKA RCT classic	IKA, Staufen
Mikroskop	VWRI 630	VWR, Darmstadt
Multimode Platereader	Tecan Infinite M1000Pro	Tecan Austria, Grödig
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipette	0,5-10 µl/ 2-20 µl/ 20-200 µl/ 100-1000 µl/ 0,5-5,0 ml	Brand, Wertheim
Pipette	Handy Step	Brand, Wertheim
Pipette	Eppendorf Reference 0,5-10 µl/ 2-20 µl/10-100 µl/ 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette	Eppendorf Research Plus 20- 200 µl/ 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Power-Supply für Elektrophoresen	PS305T	Whatman-Biometra, Göttingen

## Material und Methoden

Schüttler	Centromat H/MOII	Sartorius, Göttingen
Spülmaschine	Miele Professional	Miele, Gütersloh
Sterilbank	MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Stickstofftonne (-196 °C)	Thermolyne Locator Plus 6	Thermolyne, Pfullingen
Thermoblock	TB2 Thermoblock	Biometra, Göttingen
Trockenschrank	/	Binder, Tuttlingen
UV-Transilluminator	BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen
Vortexer	Digital Vortex Mixer	VWR International, Darmstadt
Vortexer	Q04	VWR International, Darmstadt
Vortexer	uniTexer1	LLG Labware, Meckenheim
Waage	Pioneer	Ohaus, Naenikon
Wasserbad	Julabo TW12	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Mikro200	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	MiniStar silverline	VWR International, Darmstadt
Zentrifuge	1-15 PK	Sigma, München
Zentrifuge	4K15	Sigma, München

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Material	Typ	Hersteller, Ort
Bakterienkulturplatte	Petri Dish 100 x 15	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Filteraufsatz	Rapid-Filtermax	TPP, Trasadingen
Filterpipettenspitzen	10 µl/ 200 µl/ 1250 µl	Nerbe plus, Winsen
Glaspipetten	5 ml/ 10 ml/ 20 ml	Brand, Wertheim
Kryoröhrchen	MX 500	LVL Technologies, Crailsheim
Multipipettenspitzen	PD-Tips 5 ml	Brand, Wertheim
Paraffinfilm	Laboratory Film	Bemis, Braine L'Alleud
PCR Soft Tubes	0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen	1-10 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen	1-10 µl	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	2-200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht

## Material und Methoden

Pipettenspitzen	0,5-5,0 ml	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte	Cell culture dishes 100 x 20 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Cell Scraper 16 cm	Sarstedt, Nümbrecht
6-Well Platte	Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
24-Well Platte	Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Well Platte	Costar 96 Flat White	Corning, Wiesbaden

### 2.1.3 Chemikalien

**Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
Agar	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Agarose LE	Genaxxon Bioscience, Ulm
Borsäure	Merck, Darmstadt
Coelenterazine 400a	Nanolight Technology, Pinetop
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Fermentas, Waltham
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FKS	Anprotec, Bruckberg
Glycerin	Merck, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Anprotec, Bruckberg
Luria Broth (LB)	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Magnesiumchlorid (25mM)	Promega, Madison
Magnesiumchlorid x 7 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

PEI (Polyethylenimin)	Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstraße
Tris	Roth, Karlsruhe

## 2.1.4 Puffer und Lösungen

### Verwendete Puffer und Lösungen (eigene Herstellung):

#### dNTP:

dATP	12,5 µl
dCTP	12,5 µl
dGTP	12,5 µl
dTTP	12,5 µl
1x TE Puffer	Ad 1000 µl

#### PBS (10x):

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
ddH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml, pH 7,4

#### PEI-Mix:

PEI	0,1 g/l
NaCl	150 mM

#### TBE (10x):

Tris	121,0 g
Borsäure	51,5 g
EDTA	3,5 g
ddH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml

**TE Puffer (1x):**

Tris	10 mM
EDTA	1 mM
ddH <sub>2</sub> O	Ad 100 ml

**Tabelle 2.4: Weitere verwendete Puffer und Lösungen**

Bezeichnung	Hersteller, Ort
Cut Smart Buffer (10x)	NEB, Frankfurt a.M.
DNA Loading Dye (6x)	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Green GoTaq Flexi Buffer (5x)	Promega, Madison
Ligase-Puffer (10x)	NEB, Frankfurt a.M.
NEB 2 Buffer	NEB, Frankfurt a.M.
PrimeSTAR Buffer (5x)	Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye
Serva DNA Stain Clear G	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
S1-Resuspension Buffer	Macherey-Nagel, Düren
S2-Lysis Buffer	Macherey-Nagel, Düren
S3-Neutralization Buffer	Macherey-Nagel, Düren

**2.1.5 Antibiotika**

**Tabelle 2.5: Verwendete Antibiotika**

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller, Ort
Ampicillin	100 µg/ml	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Kanamycin	100 mg/ml	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin	0,2 mg/ml	Anprotec, Bruckberg
Puromycin	10 µg/µl	Roth, Karlsruhe
Tetrazyklin	10 µg/ml	Sigma-Aldrich, Darmstadt

## 2.1.6 DNA Größenstandards

**Tabelle 2.6: Verwendete DNA Größenstandards**

Bezeichnung	Hersteller, Ort
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

## 2.1.7 Software

Die verwendete Software wurde zur Bearbeitung und Auswertung von Bildmaterial sowie zur statistischen Auswertung von Messergebnissen eingesetzt.

**Tabelle 2.7: Verwendete Software**

Bezeichnung	Hersteller, Ort
ImageJ	NIH, Bethesda
SigmaPlot	Systat, Erkrath

## 2.1.8 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden mit den mitgelieferten Puffern nach Herstellerangaben eingesetzt. Die jeweiligen Schnittstellen sind durch Pfeile markiert. In Tabelle 2.8 sind die Restriktionsenzyme in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet. Weitere Enzyme sind in Tabelle 2.9 vermerkt und wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.

**Tabelle 2.8: Verwendete Restriktionsenzyme**

Bezeichnung	Erkennungssequenz	Hersteller, Ort
AvrII	5'...C↓CTAGG...3' 3'...GGATC↑C...5'	NEB, Frankfurt a.M.
BbsI-HF	5'...GAAGAC(N) <sub>2</sub> ↓...3' 3'...CTTCTG(N) <sub>6</sub> ↑...5'	NEB, Frankfurt a.M.
BsiWI-HF	5'...C↓GTACG...3' 3'...GCATG↑C...5'	NEB, Frankfurt a.M.
DrIII-HF	5'...CACNNN↓GTG...3' 3'...GTG↑NNNCAC...5'	NEB, Frankfurt a.M.

**Tabelle 2.9: Weitere verwendete Enzyme**

Bezeichnung	Hersteller, Ort
Accutase	Anprotec, Bruckberg
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt a.M.
GoTaq DNA Polymerase	Promega, Mannheim
T7 Endonuklease I	NEB, Frankfurt a.M.
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye

### 2.1.9 Plasmide

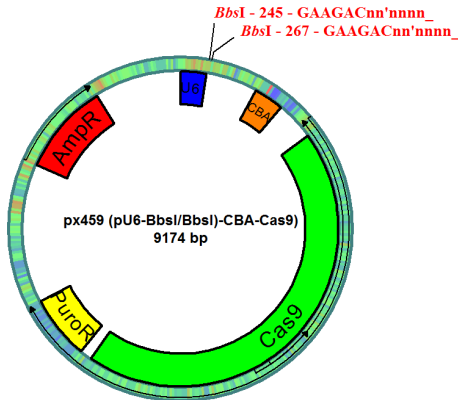
**Tabelle 2.10: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Hersteller, Ort
<b>px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9)</b>	Addgene #62988
<b>pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2</b>	Eigene Herstellung
gRNA/Cas9 Konstrukt für NHEJ Sensor ( <b>In6G2</b> )	Eigene Herstellung
NHEJ Sensor ( <b>In6T2</b> )	Eigene Herstellung
<b>pRLuc8</b>	Bereitgestellt durch Sanjiv Sam Gambhir
<b>pTagGFP2-N</b>	Evrogen, Heidelberg

#### 2.1.9.1 px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9)

Das 9174 bp umfassende px459 Plasmid wurde in dieser Arbeit zur Integration und Klonierung der Guide-Sequenzen 1-7 verwendet (s. Abbildung 2.1). An den Nukleotidpositionen 245 und 267 liegen Schnittstellen für das Restriktionsenzym BbsI vor. An dieser Stelle wurden die Guide-Sequenzen, welche auf das murine Artemis-Gen abzielen, integriert. An der Nukleotidposition 1-241 befindet sich der U6 Promotor, welcher die Expression der Guide-RNA ermöglicht. Es liegt weiterhin der Promotor CBA (Nukleotidposition 727-1004) vor, welcher für die Expression der Cas9-Sequenz zuständig ist. Das Plasmid enthält zudem das Ampicillin- und Puromycinresistenzgen. Die auf diesem Plasmid codierten gRNA/Cas9 Konstrukte wurden in dieser Arbeit zunächst durch das pRLuc8-AvrII/Target/BsiWI-GFP2 Plasmid auf ihre Schneideaktivität getestet (s. Kapitel 3.1.2 und 3.1.3). In einer weiteren Versuchsreihe diente dieses Plasmid für einen gRNA/Cas9 vermittelten Artemis Gen-Knockout (s. Kapitel 3.1.5). Der pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 Vektor wurde von Feng Zhang bereitgestellt;

Addgene plasmid #62988; <http://n2t.net/addgene:62988>; RRID:Addgene\_62988), (Ran et al. 2013).



**Abbildung 2.1:** Vektorkarte des px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9)

### 2.1.9.2 pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2

Das Plasmid pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 wurde zur Integration und Klonierung der 7 Target-Sequenzen verwendet (s. Abbildung 2.2). Diese wurden in die Schnittstelle der Restriktionsenzyme AvrII und BsiWI an der Nukleotidposition 1649 bzw. 1664 integriert. Die Target-Sequenzen wurden zwischen das RLuc8 und GFP2 Gen ligiert. Das Plasmid enthält einen CMV Promoter für die Expression der Luziferase und des GFPs. An Nukleotidposition 2448-2831 befindet sich der Transkriptionsterminator SV40 Polyadenylierungssignal (pA). Außerdem ist ein Ampicillinresistenzgen integriert. Das Plasmid dient in der vorliegenden Arbeit als BRET-basiertes Reporterplasmid für die Aktivität der gRNA/Cas9 Konstrukte, welche auf das murine Artemis-Gen abzielen (s. Kapitel 3.1.2 und 3.1.3). Die BRET basierte Methodik ist in Kapitel 2.2.3.2 näher erläutert. Des Weiteren diente dieses Plasmid bei Monotransfektion als 0% DSB Kontrolle.

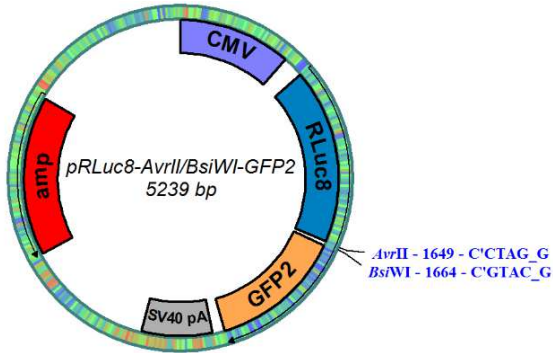


Abbildung 2.2: Vektorkarte des pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2

### 2.1.9.3 gRNA/Cas9 Konstrukt für NHEJ Sensor (In6G2)

Das In6G2 Plasmid (s. Abbildung 2.3) ist wie der unter 2.1.9.1 beschriebene px459 Vektor aufgebaut. Der Unterschied besteht hier in der integrierten gRNA-Sequenz. Die gRNA ist auf eine Target-Sequenz des humanen CLN3 Gens konzipiert. Bei Transfektion in die C2C12 bzw. NIH 3T3 Zelllinien findet keine Induktion eines DSB im murinen Genom statt. Dieser Vektor wurde zusammen mit dem NHEJ-Sensor (In6T2) in murine Zelllinien transfiziert, um die NHEJ-Aktivität vor und nach einem Artemis Knockout/Knockdown zu messen (s. Kapitel 3.1.5 und 3.2).

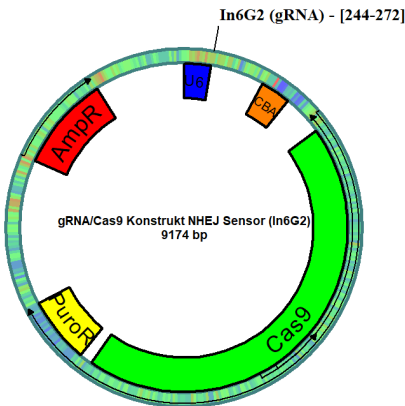


Abbildung 2.3: Vektorkarte des In6G2 Plasmids

---

#### 2.1.9.4 NHEJ Sensor (In6T2)

Das NHEJ Sensorplasmid In6T2 (s. Abbildung 2.4) enthält eine Target-Sequenz aus dem humanen CLN3 Gen, welche von einer RLuc8- und GFP2-Sequenz flankiert ist. Diese NHEJ Sensor Sequenz steht unter der Kontrolle eines CMV Promotors. Das Plasmid wurde zusammen mit dem oben beschriebenen In6G2 Plasmid für die NHEJ-Aktivitätsmessung vor und nach einem Artemis Knockout/Knockdown in murine Zelllinien transfiziert. Die NHEJ-Aktivitätsmessung basiert auf der BRET-Methodik.

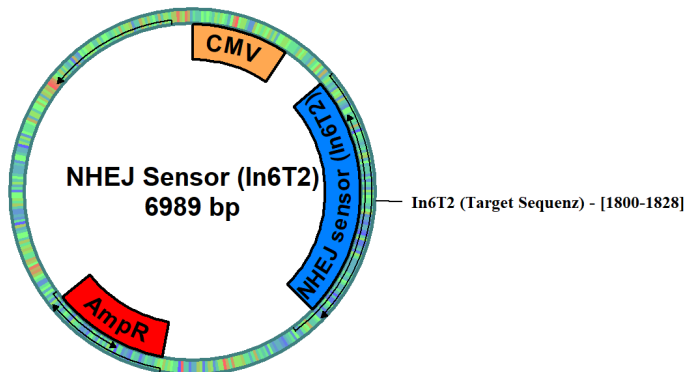


Abbildung 2.4: Vektorkarte des NHEJ Sensorplasmids (In6T2)

#### 2.1.9.5 pRLuc8

Die Expression der auf dem Plasmid codierten RLuc8 ist durch einen CMV Promotor reguliert. Das Plasmid diente in dieser Arbeit zur 100% DSB Kontrolle bei der Durchführung der BRET Assays.

Der pcDNA-RLuc8 Vektor wurde von Sanjiv Sam Gambhir bereitgestellt (Loening et al. 2006).

#### 2.1.9.6 pTagGFP2-N

Das 4729 bp umfassende pTagGFP2-N Plasmid wurde zur Bestimmung der Transfektionseffizienz verwendet (s. Abbildung 2.5). Es enthält einen CMV Promoter und eine darauffolgende GFP2-Sequenz. Außerdem ist auf dem Plasmid ein

---

Kanamycinresistenzgen codiert. Wenn Zellen erfolgreich mit dem Plasmid transfiziert werden und das GFP2 exprimieren, können diese im Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht werden.

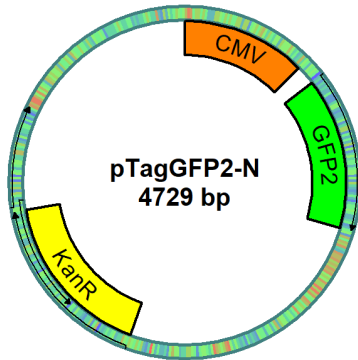


Abbildung 2.5: Vektorkarte des pTagGFP2-N

### 2.1.10 Oligonukleotide und Primer

Die verwendeten Target-Sequenzen wurden über das Online-tool [www.atum.bio](http://www.atum.bio) generiert. Hierbei wurde nach potenziellen Target-Sequenzen im murinen Genom für das Dclre1c Gen (Artemis) auf dem Chromosom 2 gesucht. Die Guide-Sequenzen wurden entsprechend der Target-Sequenzen erstellt. Um die Oligonukleotidsequenzen in die Vektoren zu ligieren, wurden sie mit spezifischen Überhängen (sticky-ends) versehen. Die Target- und Guide-Sequenzen sind im Kapitel 3.1.1 in der Tabelle 3.1 aufgelistet.

Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 2.11 vermerkt.

**Tabelle 2.11: Verwendete Primer**

Bezeichnung	Sequenz
G1F2	ACTTTCTGTGACCCAAGGTTTTAT
G1R2	AGAGGAAGGGATGGGAAGGG
G5F2	ATGGGGTTCAAACCTAATTCTTTA
G5R2	ATTATCTAAGAACCCGTGCC
G7F2	AGCGTTCTGTCTCTCTCCCTCAT
G7R2	ACTGCCATAGTTTGAAGAAACAC
Pyr-11a (#2509)	TTGGAAAAGTTGCTGATAATGAAAGT
Pyr-11b (#2510)	AACAGATGAGTTGAATGAAATGTAA
SeqKas (#4041)	AGCCCGACGTCGTCCAGATTG
Wolle610 (#3056)	GACTATCATATGCTTACCGT

### 2.1.11 siRNA

Die auf das murine Dclre1c Gen konzipierte siRNA wurde von der externen Firma Life Technologies/Thermo Fisher (Darmstadt) bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt.

**Tabelle 2.12: Verwendete siRNA**

Bezeichnung	Sequenz
Silencer Pre-designed siRNA (Dclre1c)	Sense (5'-3'): GGAUCACAUGAAAGGAUUAtt Antisense (5'-3'): UAAUCCUUUCAUGUGAUCctt

### 2.1.12 Medien für Bakterienkulturen

#### LB-Medium:

Luria-Broth	25,0 g
ddH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml

#### LB-Ampicillin-Platten:

LB-Medium	500 ml
Agar	1,5% (w/v)
Ampicillin	0,1%

#### SOC-Medium:

Trypton	2%
Hefeextrakt	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glukose	20 mM
ddH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml

### 2.1.13 Medien für Zellkulturen

#### DMEM +++:

Pen/Strep	1% (v/v)
FKS	10% (v/v)
L-Glutamin	4 mM
DMEM ---	Ad 500 ml

**DMEM ++:**

Pen/Strep	1% (v/v)
L-Glutamin	4 mM
DMEM ---	Ad 500 ml

**Einfriermedium:**

DMSO	10%
FKS	90%

### 2.1.14 Bakterienstämme

**Tabelle 2.13: Verwendete Bakterienstämme**

<b>E.coli Stamm</b>	<b>Genetische Eigenschaften</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F <sub>pro</sub> ABlacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene, Heidelberg

### 2.1.15 Zelllinien

**Tabelle 2.14: Verwendete Zelllinien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Bezugsquelle, Ort</b>
C2C12 (ATCC® CRL-1772™)	LGC Standards GmbH, Wesel
HEK 293T (ATCC® CRL-3216™)	LGC Standards GmbH, Wesel
NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™)	LGC Standards GmbH, Wesel

#### 2.1.15.1 HEK 293T Zelllinie

Die HEK 293T Zelllinie ist eine humane Nierenzelllinie embryonalen Ursprungs. Graham et al. transfizierten embryonale Nierenzellen mit DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5, wodurch zunächst die HEK 293 Zelllinie entstand (Graham et al. 1977). Die HEK 293T Zelllinie enthält zusätzlich das SV40 T-Antigen. Die adhären in einer Zellschicht wachsenden Zellen weisen einen epithelialen Charakter auf. Die Zelllinie gilt als gut

---

kultivierbar und transfizierbar und wird daher für die Expression von auf Vektoren befindlichen Genen benutzt.

#### **2.1.15.2 C2C12 Zelllinie**

Die adhärenente C2C12 Zelllinie ist eine immortalisierte murine Myoblasten Zelllinie. Sie wurde ursprünglich von Yaffe und Saxel aus dem Muskelgewebe von C3H Mäusen generiert (Yaffe und Saxel 1977). Der in dieser Arbeit verwendete Subtyp wurde von der Arbeitsgruppe um H.M. Blau hergestellt und nach hoher Differenzierungsrate selektiert (Blau et al. 1985).

#### **2.1.15.3 NIH 3T3 Zelllinie**

Die murine embryonale Fibroblasten Zelllinie wurde von Todaro und Green aus 17 bis 19 Tage alten Schweizerischen Mausembryonen generiert. Hierbei wurden  $3 \times 10^5$  Zellen alle 3 Tage auf neue Platten übertragen. Der Name 3T3 entstand aus diesem Protokoll: **3-day transfer, inoculum  $3 \times 10^5$  cells** (Todaro und Green 1963). Die adhärenente Zelllinie weist eine gute Transfektionseffizienz auf (Copeland und Cooper 1979).

#### **2.1.16 Kits**

**Tabelle 2.15: Verwendete Kits**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit	Invitrogen, Carlsbad
PCR clean-up Gel extraction	Macherey-Nagel, Düren
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau beruht auf der Entdeckung von sogenannten Restriktionsenzymen, welche bakteriellen Ursprungs sind. Restriktionsenzyme können DNA an spezifischen Stellen erkennen und schneiden, wobei die entstandene Basensequenz an der Schnittstelle charakteristisch für das jeweilige Enzym ist. Im Bakterium dienen Restriktionsenzyme zur Erkennung und Spaltung von Bakteriophagen-DNA (Hermey 2011).

Durch hydrolytische Spaltung wird die DNA geschnitten, wobei je nach Restriktionsenzym typische „sticky-ends“ mit einem 5´ oder 3´ Überhang oder „blunt-ends“ entstehen. An diese sticky-ends können dann DNA Fragmente mit komplementären Basen binden, sodass dieses DNA-Fragment in das Plasmid integriert wird (Rassow et al. 2016).

In dieser Arbeit wurde ein Restriktionsverdau für verschiedene Zwecke durchgeführt. Zunächst wurden die Plasmide pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 und px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9) für die Integration der Target- bzw. Guide-Sequenzen linearisiert (s. Tabelle 2.16). Außerdem wurde ein Nachverdau des Plasmids pRLuc8-AvrII/Target1-7/BsiWI-GFP2 durchgeführt, um sicherzustellen, dass nur die rekombinanten Plasmide in *E. coli* repliziert werden (s. Tabelle 2.17). Das Enzym BsiWI-HF linearisiert nicht rekombinante Plasmide, kann jedoch nicht schneiden, wenn das DNA-Fragment erfolgreich inseriert wurde, da dadurch die BsiWI-HF-Erkennungssequenz nicht mehr vorhanden ist.

Des Weiteren wurde ein Kontrollverdau der Plasmide px459 (pU6-BbsI/guide1,5,7/BbsI-CBA-Cas9) durchgeführt (s. Tabelle 2.18). Hierdurch konnte verifiziert werden, ob in der vorhandenen Plasmidlösung das gewünschte Plasmid vorhanden ist. Der Restriktionsverdau der Plasmidlösungen mit dem Enzym Dra III erzeugt DNA-Fragmente definierter Größe, welche anschließend durch eine Gelelektrophorese analysiert werden können.

Die Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben verwendet und sind in Tabelle 2.8 aufgelistet.

**Tabelle 2.16: Reaktionsansatz für die Linearisierung von pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 (1) und px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9) (2)**

Komponenten	Menge (1)	Menge (2)
Plasmid-DNA	1000 ng	1000 ng
10 x Cut Smart Buffer	2 µl	2 µl
Restriktionsenzym I: BsiWI-HF	1,5 µl	/
Restriktionsenzym II: AvrII	1,5 µl	/
Restriktionsenzym III: BbsI-HF	/	1,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	Ad 20 µl	Ad 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht im Wasserbad bei 37°C inkubiert und danach wurden die Enzyme für 20 min bei 65°C inaktiviert.

**Tabelle 2.17: Ligationsansatz für den Nachverdau von pRLuc8-AvrII/target1-7/BsiWI-GFP2**

Komponenten	Menge
Rekombinante Plasmid-DNA	20 µl
Restriktionsenzym: BsiWI-HF	1 µl

Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C für 60 min inkubiert. Danach erfolgte die Hitzeinaktivierung bei 65°C für 20 min.

**Tabelle 2.18: Reaktionsansatz für den Kontrollverdau von px459 (pU6-BbsI/guide1,5,7/BbsI-CBA-Cas9)**

Komponenten	Ansatz mit Restriktionsenzym	Ansatz ohne Restriktionsenzym
Plasmid-DNA	1 µg	1 µg
Cut Smart Buffer (10-fach)	1 µl	1 µl
Dra III	1 µl	/
ddH <sub>2</sub> O	Ad 10 µl	Ad 10 µl

Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente durch die Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt.

### 2.2.1.2 Primerhybridisierung

Die einzelsträngigen Target- und Guide-Sequenzen wurden zunächst für 10 min bei 90°C erwärmt und danach 30 min bei RT abgekühlt, sodass sich die komplementären Einzelstränge zu Doppelsträngen zusammenlagern konnten. Die Target- und Guide-Sequenzen sind in der Tabelle 3.1 aufgelistet.

**Tabelle 2.19: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für Target- bzw. Guide-Hybridisierung**

Komponenten		Menge
ddH <sub>2</sub> O		4 µl
Target (1-7) DNA forward	Guide (1-7) DNA forward	8 µl
Target (1-7) DNA reverse	Guide (1-7) DNA reverse	8 µl

### 2.2.1.3 Ligation

Um die doppelsträngigen Target- und Guide-Sequenzen in das jeweilige Plasmid zu ligieren, wurde die T4 DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen den DNA-Strängen.

**Tabelle 2.20: Zusammensetzung des Ligationsansatzes**

Komponenten	Menge
10 x Ligase Puffer	2 µl
Linearisiertes Plasmid	2 µl
Hybridisierte Target-/Guide-Sequenzen	5 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	Ad 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

### 2.2.1.4 Herstellung elektrokompetenter XL1-Blue E.coli

Es wurde eine über Nacht Kultur aus 5 ml LB-Medium, 5  $\mu$ l XL1-Blue E.coli und 5  $\mu$ l Tetrazyklin hergestellt. Der Ansatz wurde 16 h bei 37°C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurden zu 150 ml vorgewärmten LB-Medium 2 ml dieser über Nacht Kultur gegeben und der Ansatz mit 150  $\mu$ l Tetrazyklin [10  $\mu$ g/ml] versetzt. Die Bakterienkultur wurde wiederum bei 37°C und 180 rpm für 2-3 h auf den Schüttler gestellt bis eine  $OD_{600}$  von 0,6-0,8 erreicht war. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Falcons übertragen und 30 min auf Eis gekühlt. Daraufhin wurden die Ansätze 10 min bei 5100 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml eiskaltem 1 mM HEPES Puffer resuspendiert. Diese Ansätze wurden wiederum für 10 min bei 5100 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 25 ml eiskaltem 1 mM HEPES Puffer gelöst. Daraufhin wurde wieder 10 min bei 5100 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet jetzt mit 10 ml eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert. Anschließend wurden die Ansätze bei 5100 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Vorgang wurde nochmals mit 5 ml eiskaltem 10% Glycerin durchgeführt. Nach der Zentrifugation (5 min, 5100 x g, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml eiskaltem 10% Glycerin gelöst. Die Zellsuspension wurde nun zu 60  $\mu$ l Aliquots aufgeteilt, in flüssigen Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.1.5 Elektroporation

Die Elektroporation ist eine Methode, um elektrokompetente Bakterienzellen mit Fremd-DNA zu transformieren. Die erstmals von Neumann beschriebene Methode beruht auf dem Prinzip von kurzen elektrischen Impulsen in einem bestimmten elektrischen Feld. Dies führt zu einer vorübergehenden Erhöhung der Permeabilität der Zellwand (Neumann et al. 1982).

Zunächst wurden die elektrokompetenten Bakterien, die Küvetten und Tubes auf Eis gekühlt. Das S.O.C. Medium und die Agarplatten wurden auf 37°C vorgewärmt. Zu 60  $\mu$ l Bakteriensuspension wurden jeweils 3  $\mu$ l des Ligationsansatzes pipettiert. Dieser Ansatz wurde leicht gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Transformation im Multiporator. Die Bakteriensuspension wurde mit 1 ml S.O.C. aus der Küvette gespült, in ein 1,5 ml Tube übertragen und 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Danach wurden die Bakteriensuspensionen für 5 min bei 25150 x g zentrifugiert und 800 µl Überstand verworfen. Die restlichen 200 µl der Bakteriensuspension wurden gevortext und auf die Agarplatten, welche das Antibiotikum Ampicillin [100 µg/ml] enthalten, ausplattiert. Die Agarplatten wurden 16 h über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.2.1.6 Plasmidisolation**

#### **Mini-Präparation:**

Das Prinzip der Plasmidaufreinigung beruht auf der alkalischen Lyse. Durch die Verschiebung des pH-Werts ins Alkalische denaturiert die DNA. Nach der Neutralisierung können die Plasmid-DNA Stränge wieder hybridisieren, während die chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und ausfällt. (Birnboim und Doly 1979; Mülhardt 2013).

Zunächst wurden 15 ml Falcons mit 5 ml LB Medium (37 °C) und 5 µl Ampicillin vorbereitet. Daraufhin wurden von jeder Agarplatte 4 Kolonien ausgewählt und mit einer 10 µl Pipettenspitze gepickt. Die Pipettenspitze wurde in die Falcons abgeworfen und der Ansatz bei 37°C und 180 rpm 16 h über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden 1,5 ml der jeweiligen Bakterienlösung in 2 ml Tubes übertragen. Die Ansätze wurden für 5 min bei RT und 8380 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Daraufhin wurden 100 µl Resuspension Buffer S1 zu den Tubes pipettiert und die darin enthaltenen Pellets durch Vortexen gelöst. Jetzt wurden 100 µl Lysis Buffer S2 dazugegeben und einmal invertiert. Es folgte die Zugabe von 100 µl Neutralization Buffer S3 und wiederum das Invertieren. Diese Ansätze wurden für 10 min bei 16770 x g und RT zentrifugiert. Die feste Phase, welche die Zelltrümmer enthält, wurde verworfen. Die flüssige Phase mit der gewünschten Plasmid DNA wurde in ein neues Tube übertragen und 700 µl Ethanol abs. (-20°C) dazu pipettiert. Dieser Ansatz wurde 30 min bei 4°C und 17968 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden 200 µl 70% Ethanol (RT) hinzugefügt und der Ansatz 5 min bei 4°C und 17968 x g zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand verworfen, das Pellet 5 min luftgetrocknet und mit 30 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### **Maxi-Präparation:**

Um größere Mengen hochreiner Plasmid DNA zu erhalten, wurde eine Maxi-Präparation nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip dieser Plasmidaufreinigung beruht auch hier auf der alkalischen Lyse. Unter geeignetem pH-Wert und salzarmen Verhältnissen wurde die Plasmid-DNA an Anionenaustauscherharze gebunden. Verunreinigungen, Proteine, RNA und Färbemittel wurden durch einen Waschvorgang entfernt. Die Plasmid-DNA wurde in einem stark salzhaltigen Puffer eluiert und dann durch Isopropanol konzentriert und entsalzt. Zunächst wurden in einen Erlenmeyer-Kolben 100 ml LB-Medium (37°C), 100 µl Ampicillin und 100 µl von der jeweiligen Bakterienlösung (aus den Glycerolstocks) appliziert. Dieser Ansatz wurde 16 h über Nacht auf dem Schüttler bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die jeweiligen Ansätze in 50 ml Falcons überführt, zentrifugiert (10 min, 17440 x g, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Danach wurden 10 ml Puffer P2 hinzugefügt und die Falcons 4 bis 6 Mal invertiert. Nach 5 min Inkubationszeit (RT) wurden 10 ml Puffer P3 dazugegeben und wiederum 4 bis 6 Mal invertiert. Daraufhin wurden die Ansätze 20 min auf Eis gelagert und im Anschluss 40 min zentrifugiert (17440 x g, 4°C). Der flüssige Überstand, welcher nun die Plasmide enthielt, wurde in neue Falcons übertragen und diese Ansätze nochmal für 25 min bei 17440 x g und 4°C zentrifugiert. Währenddessen wurde das Qiagen-tip mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Nachdem der Puffer durch die Schwerkraft durchgelaufen war, wurde der Überstand in die Qiagen-tips übertragen. Danach folgte der Waschvorgang mit 2 x 30 ml Puffer QC. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert und in einem neuen Falcon aufgefangen. Zu den Falcons wurden 10,5 ml Isopropanol (abs., RT) appliziert, um die DNA zu präzipitieren. Der Ansatz wurde einmal invertiert und 40 min bei 17440 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA Pellet mit 5 ml 70% Ethanol (RT) gewaschen. Wiederum wurden die Ansätze zentrifugiert (10 min, 17440 x g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das DNA Pellet wurde 10 bis 15 min luftgetrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 400 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und über Nacht bei 4°C gelagert.

### 2.2.1.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte durch die externe Firma Microsynth SeqLab (Göttingen). Die Sequenzierprimer wurden 1:10 verdünnt und sind in der Tabelle 2.11 aufgelistet.

**Tabelle 2.21: Ansatz für die Sequenzierungen der rekombinanten Plasmide pRLuc8-AvrII/target1-7/BsiWI-GFP2 bzw. px459 (pU6-BbsI/guide1-7/BbsI-CBA-Cas9)**

Komponenten	Menge
ddH <sub>2</sub> O	6 µl
Rekombinantes Plasmid	6 µl
Sequenzierprimer #4041 bzw. #3056	3 µl

### 2.2.1.8 Anlegen eines Glycerolstocks

Zur langfristigen Aufbewahrung der Bakterienkolonien wurden Glycerolstocks erstellt. Hierzu wurden zu 100 µl Glycerin (100%), 300 µl der Bakterienlösung pipettiert. Dieser Ansatz wurde auf – 80°C gelegt.

### 2.2.1.9 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Um die Plasmid-DNA-Konzentration zu quantifizieren, wurde eine photometrische Absorptionsmessung durchgeführt. Hierbei wird die UV-Absorption der Nukleinsäuren bei 260 nm gemessen, da diese bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum haben. Um die DNA Konzentration in einer Lösung bestimmen zu können, muss zunächst die Extinktion gemessen werden. Diese beschreibt wie viel Licht von den Nukleinsäuren absorbiert, bzw. wie viel Licht durchgelassen wird und ist durch das Lambert-Beer'sche Gesetz charakterisiert (Hauk 2013). Die Konzentration der Nukleinsäuren im Lösungsmedium ist laut diesem Gesetz proportional zur Extinktion.

$$E = \log(I_0/I_1) = \epsilon \cdot c \cdot d$$

$I_0$ : Intensität des einfallenden Lichts

$I_1$ : Intensität des transmittierten Lichts

$\epsilon$ : Extinktionskoeffizient

$c$ : Konzentration eines gelösten Stoffs im Medium

$d$ : Schichtdicke eines durchstrahlten Körpers

Zunächst wurde das Photometer mit dem Lösungsmittel ddH<sub>2</sub>O geeicht. Danach wurde die zu messende DNA in ddH<sub>2</sub>O verdünnt und die DNA Konzentration mit dem Photometer bestimmt.

### 2.2.1.10 Extraktion genomischer DNA

Zur Extraktion genomischer DNA aus den NIH 3T3 Zellen wurde das Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit verwendet. Zuerst wurde das Medium aus den Wells entfernt und ein Waschschrift mit 1 ml PBS (1x) durchgeführt. Danach wurden die Zellen von den 6-Well Platten durch Zellschaber abgelöst und bei 300 x g und 4 °C für 7 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS (1x) resuspendiert. Danach wurde die genomische DNA nach Herstellerprotokoll isoliert.

### 2.2.1.11 PCR

Die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) dient der künstlichen Vervielfältigung von DNA. Benötigt werden neben der zu vervielfältigenden DNA, die dazu passenden Oligonukleotidprimer (s. Tabelle 2.11), eine hitzestabile Polymerase mit Puffer, MgCl<sub>2</sub> und freie Nukleotide. Im Denaturierungsschritt wird der Reaktionsansatz auf 95°C erhitzt, sodass die doppelsträngige Ausgangs-DNA in zwei Einzelstränge zerfällt. Im darauffolgenden Annealingschritt wird der Ansatz auf eine für die jeweiligen Primer spezifische Temperatur abgesenkt. Dadurch lagern sich die Oligonukleotidprimer an die beiden Einzelstränge an. Danach wird der Ansatz auf das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase (72°C) erhitzt. In dem Elongationsschritt fügt diese Polymerase in 5'-3' Richtung neue Nukleotide an die jeweiligen Primer an. In dem von den Primern begrenzten DNA-Abschnitt entstehen nun neue Doppelstränge. Bei mehreren Zyklen

## Material und Methoden

---

kommt es schließlich zur exponentiellen Amplifikation des DNA-Abschnitts (Mülhardt 2013).

In dieser Arbeit wurden Primer gewählt, welche im murinen Dclre1c Gen an den Targetregionen 1,5 und 7 binden (s. Tabelle 2.11). Hierdurch wurden DNA-Fragmente von einer Größe zwischen 400 und 600 bp gewonnen. Zuvor wurde die optimale Annealing Temperatur für alle Primerpaare durch einen Gradienten bestimmt.

Der PCR-Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

<b>Komponenten</b>	<b>Menge</b>
ddH <sub>2</sub> O	27,00 µl
5x Green GoTaq Flexi Buffer	12,00 µl
dNTP (1,25 mM)	9,60 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4,80 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	2,40 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	2,40 µl
Genomische DNA	120 ng
GoTaq® DNA Polymerase	0,6 µl

Die PCR wurde anschließend in einem Thermocycler mit folgendem Protokoll durchgeführt:

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
Initiale Denaturierung	95°C	120 s
Denaturierung	95°C	30 s
Annealing	58-70°C	30 s
Elongation	72°C	60 s
Final Extension	72°C	300 s
Hold	10°C	60 s

} 40 x

Die DNA-Fragmente wurden in der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Länge separiert.

PCR Ansatz für die Positivkontrolle im T7EI Assay (siehe Kapitel 2.2.1.14):

Komponenten	Menge
ddH <sub>2</sub> O	30,75 µl
5X PrimeSTAR Buffer	10,00 µl
dNTP (10 mM)	4,00 µl
Primer #2509 (10 µM)	2,00 µl
Primer #2510 (10 µM)	2,00 µl
Genomische DNA	120 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (5U/ µl)	0,5 µl

Protokoll Thermocycler (Positivkontrolle T7EI Assay):

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98°C	30 s
Denaturierung	98°C	10 s
Annealing	60°C	15 s
Elongation	72°C	60 s
Final Extension	72°C	600 s
Hold	10°C	60 s

} 40 x

### 2.2.1.12 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden zu verschiedenen Volumina TBE (1x) Puffer 1-2% (w/v) Agarose LE Pulver gemischt. Dieser Ansatz wurde bei 600 W für 2 min in der Mikrowelle aufgeköcht. Das verdampfte Wasser wurde danach wieder hinzugefügt, sodass das Ausgangsgewicht der Lösung wieder erreicht war. Daraufhin wurde der Ansatz auf etwa 42°C abgekühlt. Der Lösung wurden 3-14 µl Serva DNA Stain Clear G hinzugefügt. Danach wurde das Gel in die Gießapparatur gegossen und ein Kamm aufgesetzt. Nach etwa 20 min war das Gel ausgehärtet und konnte in die mit TBE (1x) Puffer aufgefüllte Elektrophorese Apparatur übertragen werden. Zu den DNA-Ansätzen wurden je nach Ausgangsvolumen 3-4 µl DNA Loading Dye (6x) gegeben und das Gemisch in die jeweiligen Geltaschen appliziert. Als Größenstandard wurden 7 µl GeneRuler 1 kb DNA Ladder oder 7 µl GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder pipettiert. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 100-120 Volt für 45-90 min durchgeführt. Danach wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente durch den UV-Lichttisch analysiert.

### **2.2.1.13 DNA-Extraktion aus Agarose-Gel**

Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Banden unter dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und ausgestanzt. Die DNA wurde mit dem PCR clean-up Gel extraction Kit (s. Tabelle 2.15) nach Herstellerangaben extrahiert. Hierzu wurden pro 100 mg ausgestanzten DNA-Banden 200 µl Buffer NT1 hinzugefügt und das Gel 10 min bei 50°C im Heizblock aufgelöst. In einem weiteren Schritt wurde die DNA an eine Säule gebunden und anschließend durch den Buffer NT3 gewaschen. Danach wurde die Säule durch Zentrifugieren (1:20 min, 11.000 x g) getrocknet. Durch Hinzufügen von 27 µl ddH<sub>2</sub>O und einen weiteren Zentrifugationsschritt (1:20 min, 11.000 x g) wurde die DNA aus der Säule eluiert. Die Konzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt.

### **2.2.1.14 T7EI Assay**

Das T7 Endonuklease I (T7EI) Assay dient zur Darstellung von Mutationen (Vouillot et al. 2015).

In dieser Arbeit wurden die Zellpopulationen mit den potenziell aktiven Guides 1,5 und 7 transfiziert. Wenn die gRNA/Cas9 Konstrukte im murinen Genom einen Doppelstrangbruch induzieren, wird dieser hauptsächlich durch NHEJ wieder repariert. In den erfolgreich transfizierten Zellen entstehen dann an diesen Stellen Mutationen. Im T7EI Assay werden die mutierten und Wildtyp DNA-Doppelstränge zunächst zu Einzelsträngen denaturiert. Im anschließenden Annealing Schritt lagern sich die Einzelstränge wieder zusammen. Hierbei kann es zu einem Zusammenlagern von einem Wildtyp- und mutierten Einzelstrang kommen. Die T7 Endonuklease I erkennt und schneidet dann die entstandene Heteroduplex-DNA (Mashal et al. 1995). Wenn Mutationen in der DNA vorhanden waren, zeigen sich in der folgenden Gelelektrophorese drei verschieden große DNA-Banden. Zum einen eine Bande mit der Länge der Ausgangs-DNA und zudem zwei DNA-Banden mit kleineren Fragmentgrößen, welche aus der geschnittenen Ausgangs-DNA entstehen.

Für das T7EI Assay wurden die NIH 3T3 Zellen zunächst mit den Guides 1,5 und 7 transfiziert und danach mit Puromycin selektiert. Daraufhin wurde die genomische DNA extrahiert. Anschließend wurden die jeweiligen Targetregionen in einer PCR amplifiziert und die DNA-Fragmente nach der Gelelektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert. Für die Negativkontrolle wurden die gleichen Schritte bei nicht transfizierten Zellpopulationen angewendet.

## Material und Methoden

---

Für die Positivkontrolle wurde Heteroduplex-DNA aus der Arbeit von Schlegel et al. verwendet (Schlegel et al. 2019).

Hierbei wurde zunächst ein HEK 293 Zellkulturmodell erstellt, welches eine I-SceI Schnittstelle enthält. Diese Zellen wurden mit einem Vektor transfiziert, welcher die Expressionskassette CMV.I-SceI-T2A-GFP enthält. Bei erfolgreicher Expression der Endonuklease I-SceI entsteht ein DSB im Genom der HEK 293 Zelle, welcher durch NHEJ repariert wird und zu Indels führt.

72 Stunden nach der Transfektion wurden die GFP-positiven Zellen durch FACS angereichert und in einem T7EI Assay auf NHEJ-Events untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an NHEJ-Events höher als bei der Negativkontrolle ist und somit ein hoher Anteil an Heteroduplex-DNA vorhanden ist (Schlegel et al. 2019).

Die Ansätze für das T7EI Assay wurden wie folgt zusammengestellt:

Komponenten	Ansatz ohne Endonuklease (-)	Ansatz mit Endonuklease (+)
Genomische DNA	330 ng	330 ng
NEB2 Buffer	2 µl	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	Ad 20 µl	Ad 19 µl

Das T7EI Assay wurde in einem Thermocycler nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Rate
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	/
Annealing	95-85°C	5 s	-2°C/s
	85-25°C	600 s	-0,1°C/s
Hold	4°C	/	/

Anschließend wurden die Proben kurz auf Eis abgekühlt. Danach wurden zu den Ansätzen mit Endonuklease (+) 1 µl T7 Endonuklease I appliziert. Die Ansätze wurden 15 min bei 37°C inkubiert. Den Proben wurden 4 µl DNA Loading Dye (6x) hinzugefügt. Anschließend wurden die Ansätze auf ein 2% Agarose-Gel aufgetragen und aufgetrennt (100 Volt/ 90 min). Die Auswertung der Gelelektrophorese erfolgte unter einem UV-Lichttisch.

## **2.2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 Kultivierung von HEK 293T-, C2C12- und NIH 3T3 Zellen**

Die Arbeit mit den humanen HEK 293T und murinen C2C12 bzw. NIH 3T3 Zellen wurde unter einer Sterilbank durchgeführt. Für die Kultivierung der Zellen wurde das Medium DMEM +++ (37°C) verwendet (s. Kapitel 2.1.13). Die Zellkulturen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die kryokonservierten Zellen wurden zunächst aufgetaut und dann mit 10 ml DMEM +++ auf eine Zellkultur-Petrischale appliziert. Die Zellkulturen wurden solange inkubiert, bis 80-90% Konfluenz erreicht war. Dann wurden die Zellen wieder geteilt. Hierzu wurde zunächst das Medium entfernt. Danach wurde ein Waschvorgang mit 10 ml PBS (1x, steril) durchgeführt. Jetzt folgte das Ablösen der Zellen mit 1 ml Accutase (37°C). Nach etwa 10 min wurden die Zellen in 9 ml DMEM +++ resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden je 1 ml auf neue Zellkulturschalen appliziert und mit 10 ml DMEM +++ aufgefüllt und inkubiert.

### **2.2.2.2 Kryokonservierung der Zellen**

Um die Zellen über einen längeren Zeitraum zu konservieren, wurden sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Hierbei wurde zunächst das Medium von den Zellkulturschalen verworfen und mit 10 ml PBS (1x, steril) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 1 ml Accutase (37°C) gelöst und in 5 ml DMEM +++ resuspendiert. Diese Ansätze wurden danach zentrifugiert (10 min, 4°C, 300 x g). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl Einfriermedium gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und in flüssigen Stickstoff gelagert.

### **2.2.2.3 Auszählen der Zellen**

Zunächst wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben, von der Zellkulturschale (mind. 80% Konfluenz) mit 1 ml Accutase (37°C) gelöst. Um eine Zellsuspension mit möglichst vielen gelösten Zellen zu erhalten, wurden die Zellen von zwei Zellkulturschalen abgelöst und in 8 ml DMEM +++ resuspendiert. Vor dem Auszählen wurde die Zellsuspension 1:1 mit DMEM +++ verdünnt.

---

Für das Auszählen der Zellen wurde die Zählkammer „Neubauer improved“ verwendet. Die Zählkammer weist 3x3 Großquadrate mit jeweils 1 mm<sup>2</sup> Fläche und eine Kammertiefe von 0,1 mm auf. Für die Zählung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden lediglich die vier Eckquadrate der Zählkammer verwendet, welche nochmals in weitere 16 Kleinquadrate unterteilt sind.

Die Zellen, welche in einem Großquadrat gezählt wurden, entsprechen einem Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup> = 1 µl. Um auf die Zellzahl pro ml zu gelangen, müssen die gezählten Zellen also mit dem Faktor 10<sup>4</sup> multipliziert werden.

Für das Auszählen der Zellen ergibt sich folgende Formel:

Zellzahl/ml = MW der ausgezählten Großquadrate \* Vf \* 10<sup>4</sup> Zellen/ml

MW: Mittelwert

Vf: Verdünnungsfaktor

### **2.2.2.4 Transfektion**

Die Transfektion erfolgte durch das kationische Polymer Polyethylenimin (PEI). PEI bildet einen Komplex mit DNA, wodurch positiv geladene Partikel entstehen. Diese können an die anionische Zelloberfläche binden und die DNA kann per Endozytose in die Zelle aufgenommen werden (Sonawane et al. 2003).

Zunächst wurden 200.000 Zellen auf jedes Well einer 6-Well Platte ausplattiert und mit 2 ml DMEM +++ aufgefüllt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um die Zellteilung anzuregen.

Die Transfektionsansätze wurden nach folgenden Protokollen (s. Tabellen 2.22-2.26) erstellt:

**Tabelle 2.22: Transfektionsansatz zur Identifizierung potenziell aktiver gRNA/Cas9 Konstrukte in den humanen HEK 293T Zellen**

Komponenten	0% DSB Kontrolle	Co-Transfektion (NHEJ-Aktivitätsmessung)	100% DSB Kontrolle
NaCl (150 mM)	100 µl	100 µl	100 µl
Plasmid 1	2000 ng	2000 ng	/
Plasmid 2	/	2500 ng	/
Plasmid 3	/	/	1000 ng
PEI-Mix (0,1 mg/ml)	200 µl	200 µl	200 µl

**Plasmid 1:** pRLuc8-AvrII/Target1-7/BsiWI-GFP2 (0% DSB Kontrolle)

**Plasmid 2:** px459 (pU6-BbsI/Guide1-7/BbsI-CBA-Cas9)

**Plasmid 3:** pRLuc8 (100% DSB Kontrolle)

**Tabelle 2.23: Transfektionsansatz zur Bestätigung aktiver gRNA/Cas9 Konstrukte in den murinen NIH 3T3 Zellen**

Komponenten	0% DSB Kontrolle	Co-Transfektion (NHEJ-Aktivitätsmessung)	100% DSB Kontrolle
NaCl (150 mM)	100 µl	100 µl	100 µl
Plasmid 1	2000 ng	2000 ng	/
Plasmid 2	/	2500 ng	/
Plasmid 3	/	/	1000 ng
PEI-Mix (0,1 mg/ml)	300 µl	300 µl	300 µl

**Plasmid 1:** pRLuc8-AvrII/Target5/BsiWI-GFP2 (0% DSB Kontrolle)

**Plasmid 2:** px459 (pU6-BbsI/Guide5/BbsI-CBA-Cas9)

**Plasmid 3:** pRLuc8 (100% DSB Kontrolle)

**Tabelle 2.24: Transfektionsansatz zur Messung der NHEJ-Aktivität vor und nach einem Artemis-Knockout in den murinen C2C12- und NIH 3T3 Zellen**

Komponenten	0% DSB Kontrolle	Co-Transfektion (NHEJ-Aktivität vor Artemis-Knockout)	Triple-Transfektion (NHEJ-Aktivität nach Artemis-Knockout)	100% DSB Kontrolle
NaCl (150 mM)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Plasmid 1	2500 ng	2500 ng	2500 ng	/
Plasmid 2	/	2000 ng	2000 ng	/
Plasmid 3	/	/	100-4000 ng	/
Plasmid 4	/	/	/	1000-2000 ng
PEI-Mix	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl

**Plasmid 1:** NHEJ Sensor (In6T2) (0% DSB Kontrolle)

**Plasmid 2:** gRNA/Cas9 Konstrukt für NHEJ Sensor (In6G2)

**Plasmid 3:** px459 (pU6-BbsI/Guide1,5,7/BbsI-CBA-Cas9)

**Plasmid 4:** pRLuc8 (100% DSB Kontrolle)

**Tabelle 2.25: Transfektionsansatz zur Isolation genomischer DNA für das T7EI Assay**

Komponenten	Einfache Transfektion
NaCl (150 mM)	100 µl
Plasmid 1	3000 ng
PEI-Mix (0,1 mg/ml)	300 µl

**Plasmid 1:** px459 (pU6-BbsI/Guide1,5,7/BbsI-CBA-Cas9)

**Transfektion mit siRNA:**

Für die Transfektion mit siRNA wurden 40.000 Zellen auf die Wells einer 24-Well Platte übertragen und mit 1 ml DMEM +++ aufgefüllt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium verworfen und 0,5 ml serumfreies Medium (DMEM ++) appliziert. Die Transfektionsansätze wurden nach folgendem Protokoll erstellt:

**Tabelle 2.26: Transfektionsansatz zur Messung der NHEJ-Aktivität vor und nach einem Artemis-Knockdown in den murinen NIH 3T3 Zellen nach Transfektion mit siRNA**

Komponenten	0% DSB Kontrolle	Co-Transfektion (NHEJ-Aktivität vor Artemis-Knockdown)	Triple-Transfektion (NHEJ-Aktivität nach Artemis-Knockdown)	100% DSB Kontrolle
NaCl (150 mM)	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
Plasmid 1	2500 ng	2500 ng	2500 ng	/
Plasmid 2	/	2000 ng	2000 ng	/
siRNA	/	/	0,5-5,0 pmol	/
Plasmid 3	/	/	/	1000 ng
PEI-Mix	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl

**Plasmid 1:** NHEJ Sensor (In6T2) (0% DSB Kontrolle)

**Plasmid 2:** gRNA/Cas9 Konstrukt für NHEJ Sensor (In6G2)

**Plasmid 3:** pRLuc8 (100% DSB Kontrolle)

Die Reaktionsansätze wurden gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Ansätze unter der Sterilbank auf die jeweiligen Wells geträufelt. Anschließend wurden die 6-Well bzw. 24-Well Platten für 4-6 h inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) und danach das Medium gewechselt.

### **2.2.2.5 Puromycinselektion**

Die mit dem px459 (pU6-BbsI/Guide1,5,7/BbsI-CBA-Cas9) Plasmid transfizierten NIH 3T3 Zellen wurden mit Puromycin selektiert. Hierfür wurden bei einer 6-Well Platte 4 µg Puromycin pro Well appliziert. Die abgestorbenen Zellen wurden täglich durch einen Mediumwechsel (DMEM +++) entfernt. Nachdem wieder eine Konfluenz von mindestens 80% erreicht war, wurden die selektierten Zellen für die Gewinnung von genomischer DNA für das T7E1 Assay (s. Kapitel 2.2.1.14) von den Platten abgelöst.

### **2.2.3 Proteinchemische Methoden**

#### **2.2.3.1 Proteinextraktion nach der „Freeze-Thaw“ Methode**

Zunächst wurde das Medium verworfen und die Wells mit 1 ml PBS (1x) gewaschen. Dieses wurde direkt danach verworfen. Anschließend wurden auf jedes Well 100 µl PBS appliziert und die Zellen abgeschabt. Die in PBS gelösten Zellen wurden in 2 ml Tubes übertragen und in flüssigem Stickstoff schockgefrostet („freeze“). Die Ansätze wurden bei RT aufgetaut („thaw“) und gevortext. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Durch diesen Prozess schwellen die Zellen an und werden durch die Bildung von Eiskristallen zerstört. Danach wurden die Ansätze 10 min bei 17968 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, welcher die isolierten Proteine beinhaltet, wurde in neue Tubes übertragen.

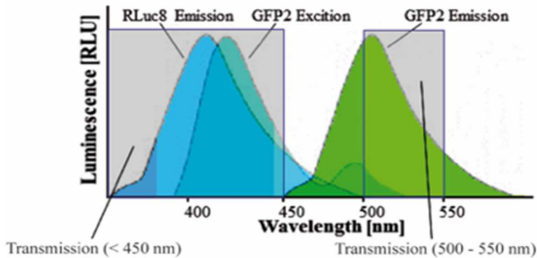
#### **2.2.3.2 BRET Assay**

Der Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) bezeichnet den strahlungslosen Energietransfer von einem Donorenzym auf ein passendes Akzeptorprotein durch Substratoxidation (Pfleger und Eidne 2006). BRET kann aus verschiedenen Varianten von Donor- und Akzeptorproteinen bestehen. Als Donorenzym wurde in dieser Arbeit die Renilla Luziferase 8 (RLuc8) verwendet. Diese mutierte Form der RLuc ist stärker resistent gegenüber der Inaktivierung im murinen Serum und hat eine vierfach gesteigerte Lichtemission (Loening et al. 2006). Das grün fluoreszierende Akzeptormolekül GFP2 ist eine mutierte Variante des im *Aequorea victoria* vorkommenden natürlichen GFPs (De et al. 2007). Das Substrat für die RLuc8 war in dieser Arbeit Coelenterazine 400a, wodurch RLuc8 Licht mit dem Emissionsmaximum

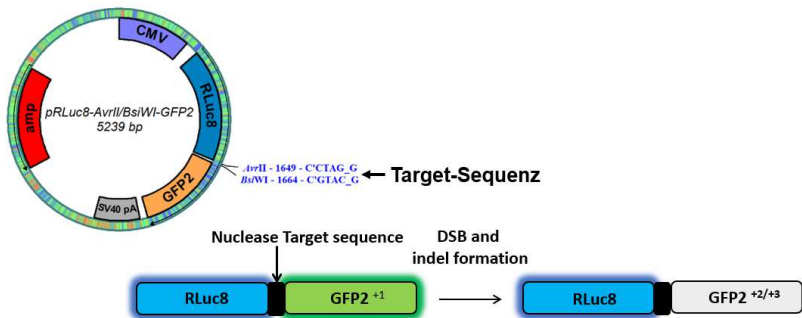
## Material und Methoden

von  $\lambda_{em} \approx 415$  nm emittiert. Die RLuc8 Lichtemission stimmt zum Großteil mit der Anregungswellenlänge für GFP2 überein. Durch diese Anregung und folgenden Energietransfer emittiert GFP2 Licht mit dem Emissionsmaximum von  $\lambda_{em} \approx 513$  nm (siehe Abbildung 2.6 A). Durch die hohe spektrale Separation ( $\Delta\lambda_{em} \approx 100$  nm) stellt die Kombination aus RLuc8 und GFP2 ein sehr sensitives BRET System dar (Wimmer et al. 2016).

**A**



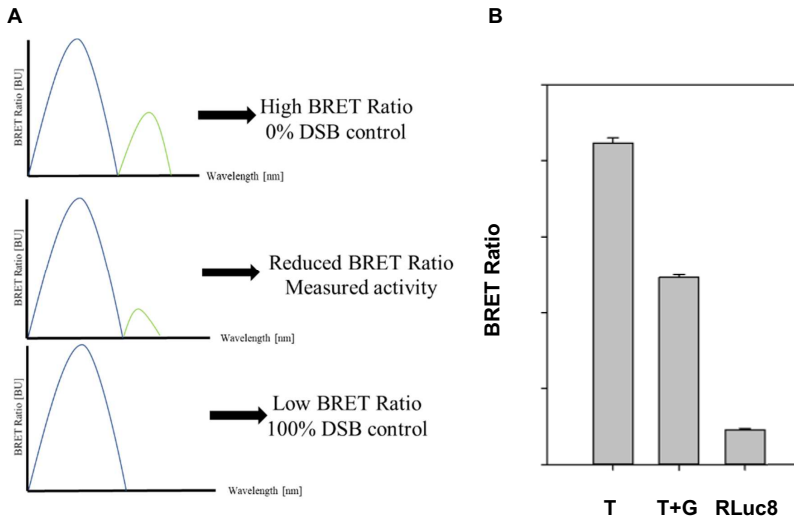
**B**



**Abbildung 2.6: Prinzip des BRET Assays**

**A** Aufgezeigt sind die Emissions- bzw. Erregungsspektren der RLuc8 und GFP2 (Wimmer et al. 2016).

**B** Das Schaubild zeigt das Prinzip der NHEJ-Aktivitätsmessung. Die beteiligten Komponenten sind auf dem NHEJ-Reporterplasmid *pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2* codiert. Quelle Plasmid: s.Kapitel 2.1.9.1, Quelle NHEJ-Aktivitätsmessung: Bereitstellung durch Dr. T. Wimmer



**Abbildung 2.7: Darstellung der NHEJ-Aktivität**

**(A)** In Abbildung A sind die gemessenen emittierten Lichtintensitäten der RLuc8 (blau) und des GFP2 (grün) veranschaulicht. Die Monotransfektion mit dem NHEJ-Reporterplasmid pRLuc8-AvrII/target/BsiWI-GFP2 dient als 0% DSB Kontrolle. Die Monotransfektion mit dem pRLuc8 stellt die 100% DSB Kontrolle dar. Bei Transfektion des NHEJ-Reporterplasmids mit dem korrespondierenden gRNA/Cas9 Konstrukt und bei vorhandener Schneideaktivität misst man eine geringere GFP2-Lichtemission. Hierdurch erhält man eine reduzierte BRET Ratio. Bereitgestellt durch Dr. T. Wimmer.

**(B)** Durch Übertragung der Messwerte in ein Balkendiagramm lässt sich die NHEJ-Aktivität durch den Vergleich der Zellpopulationen ermitteln, welche nur mit dem NHEJ-Reporterplasmid (T) bzw. welche zusätzlich mit dem korrespondierenden gRNA/Cas9 Konstrukt (T+G) transfiziert worden sind. T: pRLuc8-AvrII/Target/BsiWI-GFP2, G: px459 (pU6-BbsI/Guide/BbsI-CBA-Cas9)

Für die NHEJ-Aktivitätsmessung wurde in dieser Arbeit eine BRET basierte Methodik verwendet. Hierbei wurde das in Abbildung 2.6 B dargestellte Prinzip angewendet. In den pRLuc8-AvrII/Target/BsiWI-GFP2 Vektor wurde zwischen die RLuc8- und GFP2-Sequenz eine Target-Sequenz kloniert. Bei Transfektion des korrespondierenden px459 (pU6-BbsI/Guide/BbsI-CBA-Cas9) Vektors kann ein gRNA/Cas9 Konstrukt diese Target-Sequenz erkennen und schneiden. Ist dies erfolgt, wird der DSB durch NHEJ repariert, wobei durch Indel-Formationen, welche kein Vielfaches von drei sind, ein Frameshift in der GFP2-Sequenz entsteht.

Anschließend wird die Intensität der Lichtemission der RLuc8 und des GFP2 gemessen. Bildet man hierbei den Quotienten, erhält man einen Zahlenwert, der die BRET Ratio angibt: Die gemessene BRET Ratio ergibt sich somit durch die Formel:

$$\text{BRET Ratio} = \frac{\text{Intensität Lichtemission GFP}}{\text{Intensität Lichtemission Luziferase}}$$

Transfiziert man Zellen nur mit dem NHEJ-Reporterplasmid ohne korrespondierendes gRNA/Cas9 Konstrukt, wird die GFP2-Sequenz nicht durch einen Frameshift verändert und die BRET Ratio ist vergleichsweise hoch (s. Abbildung 2.7 A, oberes Schaubild). Transfiziert man das NHEJ-Reporterplasmid mit korrespondierendem gRNA/Cas9 Konstrukt, bewirkt der Doppelstrangbruch und die anschließende NHEJ Reparatur einen Frameshift in der GFP2-Sequenz. GFP2 wird nicht mehr korrekt exprimiert, wodurch der Energieübertrag und somit auch die Intensität der Lichtemission des GFP2 abnimmt. Folglich wird auch die BRET Ratio kleiner (s. Abbildung 2.7 A, mittleres Schaubild). Vergleicht man die Werte dieser beiden beschriebenen BRET Ratios miteinander, kann man auf die NHEJ-Aktivität schließen. Als 100% DSB Kontrolle wurde in den Versuchen ein nur die RLuc8 beinhaltendes Plasmid in die Zellen transfiziert (s. Abbildung 2.7 A, unteres Schaubild).

Die berechneten BRET Ratio Zahlenwerte kann man zudem in ein Balkendiagramm übertragen, wodurch eine NHEJ-Aktivität veranschaulicht werden kann (s. Abbildung 2.7 B). Eine BRET-basierte Methodik wurde zur Aktivitätsbestimmung von gRNA/Cas9 Konstrukten verwendet (s. Kapitel 3.1.2 und 3.1.3). Des Weiteren wurde unter der Verwendung des NHEJ Sensorplasmids In6T2 und des korrespondierenden gRNA/Cas9 Konstrukts (In6G2) die NHEJ-Aktivität in Zellkultur bestimmt (s. Kapitel 3.1.5 und 3.2).

### **Durchführung des BRET Assays:**

Zunächst wurde das Luziferasesubstrat hergestellt. Hierfür wurde Coelenterazine 400a (1,0 mg/ml in EtOH abs.) 1:100 in PBS (1x) verdünnt. Der Ansatz wurde gevortext und mindestens 20 min lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden 5-10 µl einer Proteinlösung in jeweils 4 Wells einer 96-Well Platte (Costar 96 Flat White) pipettiert. Das Injizieren des Substrats und die Messung der Lichtemissionen erfolgten durch das Gerät „Tecan Infinite M1000Pro“ und durch die Software „icontrol“. Die Lichtemissionen wurden durch zwei verschiedene Transmissionsfilter gemessen. Das durch die Luziferase erzeugte Emissionsmaximum (~415 nm) wird durch den Filter „Magenta“

gemessen, welcher Wellenlängen bis zu 450 nm erfasst. Das von dem GFP2 emittierte Licht (513 nm) wird durch den Filter „Green“ mit einer Transmission zwischen 500 nm und 550 nm erfasst. Die Emissions- bzw. Erregungsspektren der RLuc8 und des GFP2 sind in Abbildung 2.6 A skizziert.

#### **2.2.4 Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte durch SigmaPlot. Zur Ermittlung der p-Werte wurde der paired t-test sowie der One Way ANOVA Test herangezogen. P-Werte unter 0,001 wurden als statistisch signifikant erachtet. Falls nicht anders angegeben, wurden die Ergebnisse durch Messung von Triplikaten generiert.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Artemis-Knockout Ansatz

#### 3.1.1 Herstellung und Validierung der Plasmide

Zur Herstellung und Validierung der beim Knockout Ansatz benötigten Plasmide wurde ein episomales System bestehend aus den in Abbildung 3.1 dargestellten Vektoren verwendet. Dargestellt sind das Plasmid, welches die auf das murine Artemis Gen konzipierten gRNA/Cas9 Konstrukte codiert, sowie das NHEJ-Reporterplasmid für deren Aktivitätsbestimmung (s. Kapitel 3.1.2). Wie in dem Kapitel 2.2.1.3 beschrieben, wurden die Target- bzw. Guide-Sequenzen (s. Tabelle 3.1) in ihre jeweiligen linearisierten Vektoren ligiert. Die anschließend durchgeführte Sequenzierung ergab, dass alle sieben Target- und Guide-Sequenzen erfolgreich in die Plasmide integriert wurden.

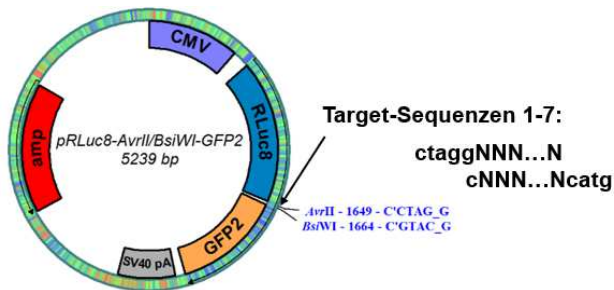
Die Target- (ARTt) und Guide- (ARTg) Sequenzen sind in 5'-3' Richtung (forward) bzw. in 3'-5' Richtung (reverse) in Tabelle 3.1 aufgelistet.

**Tabelle 3.1: Verwendete Target- und Guide-Oligonukleotidsequenzen:**

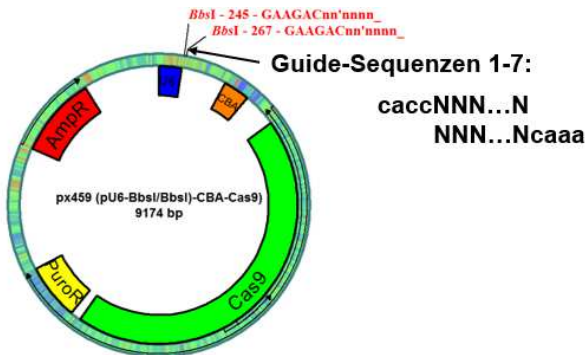
Bezeichnung	Sequenz	Exon
ARTt1f	<b>ctagg</b> GGAGTCCGCACCACGTCGTGTGG	8
ARTt1r	<b>c</b> CCTCAGGCGTGGTGCAGCACACC <b>catg</b>	
ARTt2f	<b>ctagg</b> TTTTGGAGCTGGTTCGGAGCTGG	8
ARTt2r	<b>c</b> AAAACCTCGACCAAGCCTCGACC <b>catg</b>	
ARTt3f	<b>ctagg</b> TTCAGCCACACGACGTGGTGCGG	8
ARTt3r	<b>c</b> AAGTCGGTGTGCTGCACCACGCC <b>catg</b>	
ARTt4f	<b>ctagg</b> TCCCAGCTCCTCGCTTAGGTTGG	8
ARTt4r	<b>c</b> AGGGTCGAGGAGCGAATCCAACC <b>catg</b>	
ARTt5f	<b>ctagg</b> CAGTACCTTTGGGTGGCGGCAGG	9
ARTt5r	<b>c</b> GTCAATGGAAACCCACCGCCGTCC <b>catg</b>	
ARTt6f	<b>ctagg</b> TAGAGCACTTGTGGTTTTGTGG	15
ARTt6r	<b>c</b> ATCTCGTGAACAGCCAAAACACC <b>catg</b>	
ARTt7f	<b>ctagg</b> GAAAAACCAACGTGATCGTTAGG	10
ARTt7r	<b>c</b> TTTTTGGTTGCACTAGCAATCC <b>catg</b>	
ARTg1f	<b>cacc</b> GGAGTCCGCACCACGTCGTG	
ARTg1r	<b>C</b> CTCAGGCGTGGTGCAGCAC <b>caaa</b>	
ARTg2f	<b>cacc</b> TTTTGGAGCTGGTTCGGAGC	
ARTg2r	<b>A</b> AAACCTCGACCAAGCCTCG <b>caaa</b>	

ARTg3f	<b>cacc</b> TTCCAGCCACACGACGTGGTG
ARTg3r	AAGTCGGTGTGCTGCACCAC <b>caaa</b>
ARTg4f	<b>cacc</b> TCCCAGCTCCTCGCTTAGGT
ARTg4r	AGGGTCGAGGAGCGAATCC <b>caaa</b>
ARTg5f	<b>cacc</b> CAGTACCTTTGGGTGGCGGC
ARTg5r	GTCATGGAACCCACCGCCG <b>caaa</b>
ARTg6f	<b>cacc</b> TAGAGCACTTGTGGTTTTG
ARTg6r	ATCTCGTGAACAGCCAA <b>caaa</b>
ARTg7f	<b>cacc</b> GAAAACCAACGTGATCGTT
ARTg7r	CTTTTTGGTTGCACTAGCA <b>caaa</b>

A



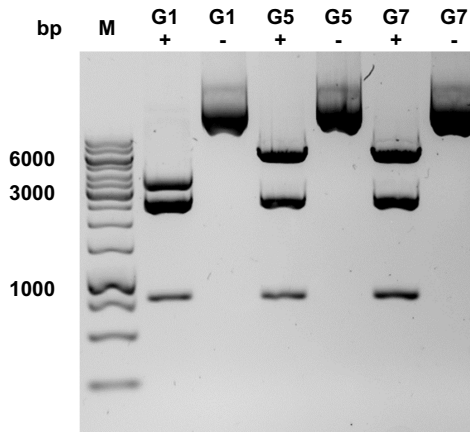
B



**Abbildung 3.1: Integration der Target- und Guide-Sequenzen in die Vektoren**  
**(A)** Integration der Target-Sequenzen 1-7 in den pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 Vektor  
**(B)** Integration der Guide-Sequenzen 1-7 in den px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9) Vektor

**Kontrollverdau des px459 Vektors:**

Um sicherzustellen, dass das gewünschte Plasmid in der Plasmidlösung vorhanden ist, wurde ein Kontrollverdau der Plasmide px459 (pU6-BbsI/Guide1,5,7/BbsI-CBA-Cas9) mit dem Restriktionsenzym Dra III durchgeführt. Die dabei entstehenden DNA-Fragmente hatten die erwartete Länge von 6055 bp, 2393 bp und 726 bp. Bei Guide 1 lag zusätzlich in der Guide-Sequenz eine Schnittstelle für Dra III vor. Dadurch wurden vier Fragmente der Länge 3925 bp, 2393 bp, 2130 bp und 726 bp erzeugt. Das in Abbildung 3.2 gezeigte Ergebnis der Gelelektrophorese bestätigte die erwarteten Fragmentlängen, sodass von keiner Kontamination der Plasmidlösungen auszugehen ist.



**Abbildung 3.2: Kontrollverdau des px459 Vektors mit integrierten Guide-Sequenzen 1,5,7**  
Dargestellt sind hier diejenigen Konstrukte, welche nach Testung der Aktivität in den HEK 293T Zellen als aktiv erachtet worden sind (s. Kapitel 3.1.2). G1,5,7: px459 (pU6-BbsI/Guide1,5,7/BbsI-CBA-Cas9), +: Ansatz mit Dra III, - Ansatz ohne Dra III, M: Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder

### 3.1.2 Testung der Aktivität in HEK 293T Zellen

Nach der Herstellung und DNA-Sequenzierung der verwendeten Plasmide wurde eine Aktivitätstestung in den humanen HEK 293T Zellen durchgeführt. Hierbei sollten gRNA/Cas9 Konstrukte detektiert werden, welche einen DSB in der Target-Sequenz (murines Dclre1c Gen) des NHEJ-Reporterplasmids (pRLuc8-AvrII/Target1-7/BsiWI-GFP2) erzeugen. Hierzu wurden die Zellen zunächst nur mit dem Reporterplasmid transfiziert. Dieses Plasmid dient zur 0% DSB Kontrolle. Es kommt zu keinem Schnitt in der Target-Sequenz und somit auch nicht zu NHEJ mit folgendem Frameshift in der GFP2-Sequenz. GFP2 wird korrekt exprimiert, was sich in der verhältnismäßig hohen BRET Ratio ausdrückt.

Um die Schneideaktivität der gRNA/Cas9 Konstrukte zu messen, wurden die Zellen mit dem Reporterplasmid und dem korrespondierenden Vektor px459 (pU6-BbsI/Guide1-7/BbsI-CBA-Cas9) transfiziert. Wie in Kapitel 2.1.9.1 beschrieben, befindet sich auf dem px459 Plasmid die integrierte Guide-RNA- und eine Cas9-Sequenz. Bei Transkription und Expression der gRNA bzw. der Endonuklease Cas9 kommt es zur Zusammenlagerung der RNA und des Proteins. Wenn die Guide-RNA das Cas9 erfolgreich zur Target-Sequenz „führt“ und bindet, erzeugt Cas9 einen DSB. Dieser wird unter Bildung von Indels repariert und resultiert in einem Frameshift der GFP2-Sequenz. In diesen Zellen wird weniger GFP2 korrekt exprimiert als in Zellen, die nur mit dem Reporterplasmid transfiziert wurden. Die Intensitäten der Lichtemissionen der isolierten Proteine wurden im BRET Assay gemessen. Wenn gRNA/Cas9 Konstrukte in den HEK 293T Zellen aktiv sind, kommt es zu einer Verringerung der BRET Ratio, da hier weniger GFP2 exprimiert ist.

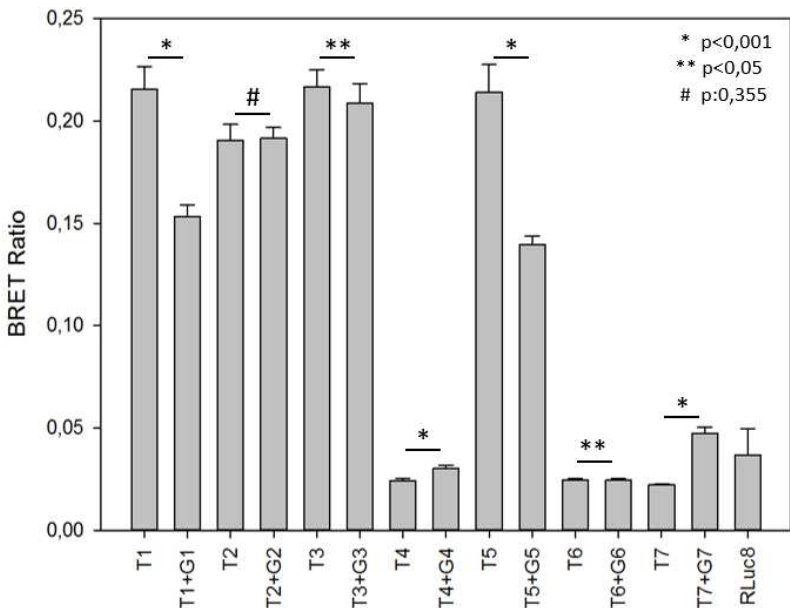
In Abbildung 3.3 sind die BRET Ratios der getesteten Konstrukte aufgezeigt. Bei Transfektion der Zellen mit dem Reporterplasmid und dem px459 Vektor mit Guide 1 und 5 kommt es zu einer deutlichen Abnahme der BRET Ratio verglichen mit einer Monotransfektion des Reporterplasmids ( $p < 0,001$ ). Somit ist hier von einer Aktivität der gRNA/Cas9 Konstrukte in den humanen HEK 293T Zellen auszugehen.

Bei Transfektion mit den T7, bzw. T7/G7 Konstrukten ist die BRET Ratio bei Monotransfektion mit dem Reporterplasmid zunächst niedrig und erhöht sich bei zusätzlicher Transfektion des px459 Vektors. In der Target-Sequenz 7 ist das Stopcodon „TGA“ enthalten, wodurch es zum Abbruch der Transkription und keiner Expression des GFP2 kommt. Bei Transfektion des Reporterplasmids mit dem px459/Guide7 Vektor kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der BRET Ratio. Dies ist durch eine Target-Sequenzveränderung nach Induktion und Reparatur eines DSB zu erklären. Durch die

---

NHEJ-Reparatur wurden die DNA-Enden derart prozessiert, sodass es zu einem Verlust des Stopcodons gekommen ist und die GFP2-Sequenz wieder im Frame liegt. Hierdurch ist die vergleichbar hohe BRET Ratio zu erklären und somit ist auch bei dem gRNA/Cas9 Konstrukt 7 von einer Schneideaktivität auszugehen. Auch bei T4 und T6 lagen Stopcodons in der Target-Sequenz vor. Bei dem gRNA/Cas9 Konstrukt 4 ist ebenfalls von einer Schneideaktivität auszugehen. Bei T6/G6 kam es jedoch zu keiner signifikanten Erhöhung der BRET Ratio. Als 100% Doppelstrangbruchkontrolle dient die auf dem Plasmid pRLuc8 codierte RLuc8.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die gRNA/Cas9 Konstrukte 1, 4, 5 und 7 eine signifikante Schneideaktivität in den humanen HEK 293T Zellen aufweisen. In den darauffolgenden Experimenten wurden die drei aktivsten gRNA/Cas9 Konstrukte 1,5 und 7 verwendet.

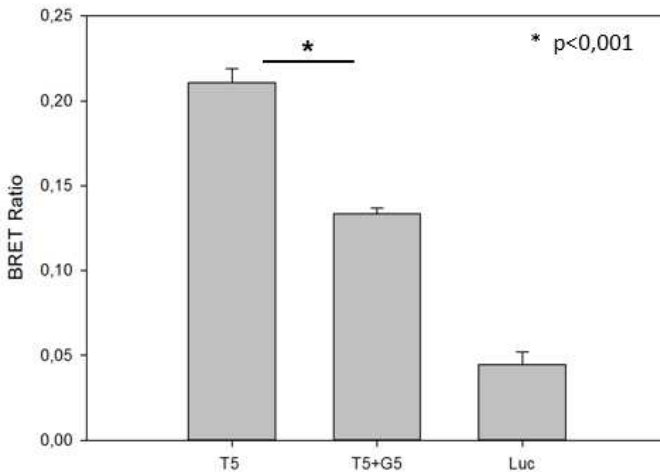


**Abbildung 3.3: Identifizierung potenziell aktiver gRNA/Cas9 Konstrukte**

Gemessene BRET Ratio nach Transfektion der HEK 293T Zellen mit den Plasmiden pRLuc8-AvrII/Target1-7/BsiWI-GFP2, hier T1-T7, und px459 (pU6-BbsI/Guide1-7/BbsI-CBA-Cas9), hier G1-G7. Die BRET Ratio wurde in BRET Units (BU) gemessen. Als 100% Doppelstrangbruchkontrolle dient die auf dem Plasmid pRLuc8 enthaltene RLuc8.

### 3.1.3 Testung der Aktivität in NIH 3T3 Zellen

Nach der Aktivitätstestung der Konstrukte in der humanen HEK 293T Zelllinie wurde exemplarisch das gRNA/Cas9 Konstrukt 5 in den murinen NIH 3T3 Zellen nach dem gleichen Prinzip getestet. Dieses BRET Assay wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass die getesteten Konstrukte auch in murinen Zelllinien aktiv sind. In Abbildung 3.4 ist das Ergebnis des BRET Assays zu sehen. Die BRET Ratio ist signifikant niedriger nach Transfektion mit dem Reporterplasmid und dem px459 Vektor ( $p < 0,001$ ). Somit zeigt das getestete Konstrukt auch in diesen Zellen eine Schneideaktivität auf. Das BRET Assay wurde 24 Stunden nach Transfektion durchgeführt. Als 100% DSB Kontrolle wurde wiederum RLuc8 verwendet.



**Abbildung 3.4: Bestätigung potenziell aktiver gRNA/Cas9 Konstrukte in NIH 3T3 Zellen**  
Gemessene BRET Ratio nach Transfektion von murinen NIH 3T3 Zellen mit den Plasmiden pRLuc8-AvrII/Target5/BsiWI-GFP2, hier T5, und px459 (pU6-BbsI/Guide5/BbsI-CBA-Cas9), hier G5. Luc: RLuc8 (100% DSB Kontrolle). Die BRET Ratio wurde in BRET Units (BU) gemessen. Der Versuch wurde einmal durchgeführt und die Messwerte durch eine Vierfachbestimmung errechnet.

### 3.1.4 T7EI Assay zur Aktivitätsmessung im murinen Genom

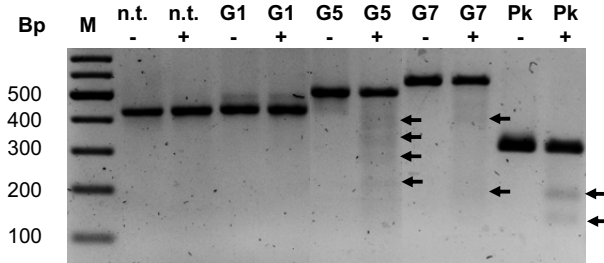
Um zu validieren, ob die gRNA/Cas9 Konstrukte im murinen Genom aktiv sind wurde das T7EI Assay durchgeführt. Bindet die gRNA erfolgreich an der Target-Sequenz im murinen Genom, schneidet die Endonuklease Cas9 an dieser Stelle und erzeugt einen DSB. Dieser wird durch den NHEJ-Reparaturweg beseitigt, wobei es zur Bildung von Indels kommt. Zellen, die erfolgreich mit dem aktiven gRNA/Cas9 Konstrukt transfiziert wurden, tragen schließlich an dieser Stelle eine Mutation in ihrem Genom. In der gesamten Zellpopulation werden jedoch nicht alle Zellen transfiziert, sodass der Wildtyp weiter bestehen bleibt. Bei der Durchführung des T7EI Assays können sich die Einzelstränge des Wildtyps und des mutierten Genoms zur Heteroduplex-DNA zusammenlagern. Die T7 Endonuklease I erkennt und schneidet spezifisch diese Heteroduplex-DNA, wodurch sich das T7EI Assay zur Analyse von Mutationen und der Feststellung von NHEJ-Events eignet.

In Abbildung 3.5 A ist das Ergebnis der Gelelektrophorese nach Durchführung des T7EI Assays dargestellt. Als Negativkontrolle wurden NIH 3T3 Zellen verwendet, welche nicht mit einem Plasmid transfiziert wurden und somit keine gesteigerte Anzahl an Mutationen aufweisen sollten. Die DNA-Fragmente der Negativkontrolle wurden nicht durch die Endonuklease geschnitten, da keine Banden geringerer Länge als die Ausgangs-DNA zu sehen sind. Hier ist also von keinen Mutationen auszugehen. Auch Zellen, welche mit dem Plasmid px459 (pU6-BbsI/Guide1/BbsI-CBA-Cas9) transfiziert wurden, geben keinen Hinweis auf eine Schneideaktivität der T7 Endonuklease I. Bei diesen DNA-Fragmenten sind weder Banden geringerer Länge, noch eine Abnahme der Integrated Density (s. Abbildung 3.5 B) zu sehen. Somit ist davon auszugehen, dass es durch die Transfektion mit der Guide-RNA 1 zu keinem DSB im murinen Genom gekommen ist.

Zellen, die mit den gRNA/Cas9 Konstrukten 5 und 7 transfiziert wurden, zeigen eine Aktivität der Endonuklease. Hier ist also davon auszugehen, dass es zu einem DSB im murinen Genom, mit anschließender Bildung von Indels, gekommen ist. Diese Feststellung wird weiterhin durch die Berechnung der Mean Gray Value und Integrated Density der DNA-Banden gestützt. Vergleicht man die Werte zwischen den jeweiligen Ansätzen mit und ohne T7 Endonuklease I (+/-), so erkennt man, dass bei Vorhandensein der Endonuklease eine Reduzierung dieser Werte erfolgt ist. Da die beiden Ansätze die gleiche Ausgangsmenge DNA beinhalteten, wurde bei den + Ansätzen ein bestimmter Anteil der Ausgangs-DNA in kleinere DNA-Fragmente geschnitten.

Die in Kapitel 2.2.1.14 beschriebene Positivkontrolle weist nach dem T7EI Verdau zwei kleinere DNA Fragmente der Größe von ca. 180 bp und 120 bp auf.

**A**



**B**

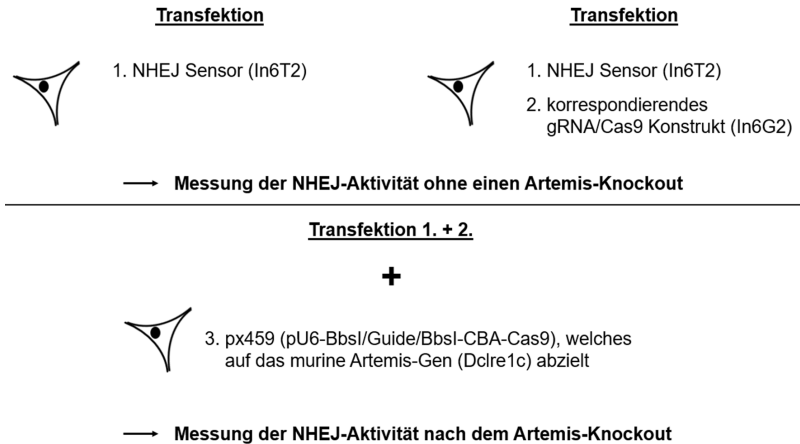
	n.t. -	n.t. +	G1 -	G1 +	G5 -	G5 +	G7 -	G7 +	Pk -	Pk +
Mean Gray Value [x 10 <sup>6</sup> ]	44,1	47,1	46,3	46,5	47,2	42,1	45,5	41,1	49,7	43,0
IntDen [x 10 <sup>3</sup> ]	494	527	518	521	547	528	510	460	556	482

**Abbildung 3.5: Aktivität der gRNA/Cas9 Konstrukte im murinen Genom**

**(A):** Gelelektrophorese nach T7EI Assay. Die Pfeile weisen auf geschnittene DNA-Fragmente hin. N.t.: nicht transfizierte NIH 3T3 Zellen, G1,5,7: px459 (pU6-BbsI/Guide1,5,7/BbsI-CBA-Cas9), Pk: Positivkontrolle, +: Ansätze mit Endonuklease, -: Ansätze ohne Endonuklease, M: Marker GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder

**(B):** Mit der Software Imagej berechnete Werte der einzelnen Banden. Mean Gray Value: Durchschnittsgrauwerte, IntDen: Integrated Density

### 3.1.5 Knockout und Testung in Zellkultur



**Abbildung 3.6: Schema zur Messung der NHEJ-Aktivität nach dem Artemis Knockout**

Die Plasmide 1. und 2. sind in den Kapiteln 2.1.9.3 und 2.1.9.4 beschrieben und auf das humane CLN3 Gen konzipiert. Diese Plasmide dienen zur NHEJ-Aktivitätsmessung. Plasmid 3. (s. Kapitel 2.1.9.1) enthält eine auf das murine Dclre1c konzipierte gRNA-Sequenz und wurde für den Artemis Knockout verwendet.

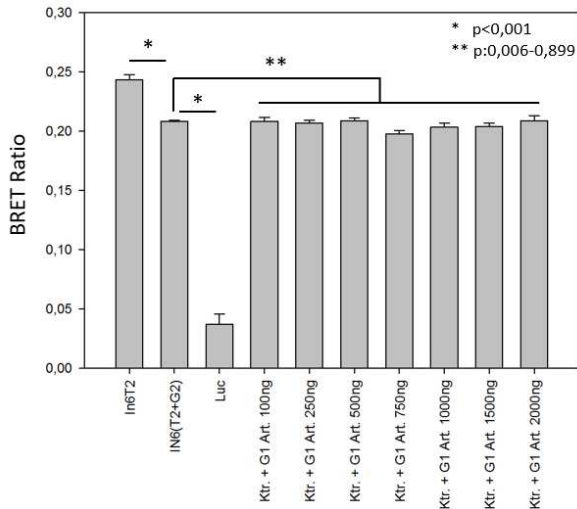
Die Messung der NHEJ-Aktivität vor und nach dem Artemis Knockout wurde, wie in Abbildung 3.6 gezeigt, durchgeführt. In die murinen Zelllinien C2C12 und NIH 3T3 wurden zunächst das NHEJ Sensorplasmid In6T2 (1.) sowie das Sensorplasmid mit dem dazugehörigen In6G2 Plasmid (1.+2.) transfiziert. Das hier verwendete NHEJ-Sensorplasmid unterscheidet sich von dem in den Aktivitätsmessungen (s. Kapitel 3.1.2 und 3.1.3) verwendeten NHEJ-Reporterplasmid hinsichtlich der Target-Sequenz. Die in diesem Plasmid verwendete Target-Sequenz wurde vom humanen CLN3 Gen generiert. Das In6G2 Plasmid (2.) enthält die entsprechende Guide-Sequenz. Dieser Vektor wurde also auf das humane Genom konzipiert, sodass von keiner Induktion eines DSB im murinen Genom auszugehen ist. Mit diesen Konstrukten wurde in einem BRET Assay die NHEJ-Aktivität in den Zellen ohne einen Artemis Knockout gemessen. Gleichzeitig wurden weitere murine Zellen mit dem beschriebenen Konstrukt (1.+2.) sowie dem px459 (pU6-BbsI/Guide1,5,7/BbsI-CBA-Cas9), welches für das murine Artemis-Gen Dclre1c konzipiert wurde, transfiziert. Durch diese Triple-Transfektion konnte die NHEJ-Aktivität nach dem Artemis-Knockout gemessen werden. Nach Expression der Plasmide

px459 (pU6-BbsI/Guide1,5,7/BbsI-CBA-Cas9) kommt es in den Zellen zur Bildung der gRNA/Cas9 Konstrukte 1,5 und 7. Die gRNA führt dann das Cas9 zur entsprechenden Target-Sequenz im murinen *Dclre1c* Gen. Die Endonuklease Cas9 kann nun einen DSB im Artemis-Gen induzieren. Dieser DSB wird durch den NHEJ-Weg repariert, wobei es bei der DNA-Endprozessierung zur Bildung von Indels kommt, die einen Frameshift erzeugen. Durch Einfügen bzw. Entfernen von Basen, welche kein Vielfaches von drei sind, kommt es zu einer derartigen Sequenzveränderung, dass falsche Aminosäuren in das Protein eingebaut werden oder dass es zur Bildung eines Stopcodons kommt. Hierdurch entsteht ein Funktionsverlust von dem auf dem Gen codierten Protein (Artemis). Inwiefern der Artemis-Knockout Einfluss auf die NHEJ-Aktivität hat, kann durch die auf das humane Genom konzipierten Konstrukte (1.+ 2.) gemessen werden. In der Target-Sequenz des NHEJ-Sensorplasmids wird ein DSB durch das auf dem In6G2 Plasmid codierte gRNA/Cas9 Konstrukt erzeugt. Hierdurch kommt es zu einem Frameshift der GFP2-Sequenz, welches sich in einer relativ niedrigen BRET Ratio zeigt. Falls ein Artemis-Knockout eine Herabregulation des NHEJ-Reparaturwegs bewirkt, zeigt sich im BRET Assay eine höhere BRET Ratio verglichen mit der Kontrolle (mit 1. und 2. transfizierte Zellen). Bei erfolgreichem Herabregulieren des NHEJ-Wegs nähert sich die BRET Ratio der triple-transfizierten Zellen wieder der BRET Ratio an, welche in den nur mit dem NHEJ-Sensorplasmid transfizierten Zellen (1.) gemessen wird. Hat der Artemis-Knockout keinen Einfluss auf den NHEJ-Reparaturweg, ändert sich die BRET Ratio im Gegensatz zu den mit dem humanen Konstrukt (1.+2.) transfizierten Zellen nicht signifikant. Das Prinzip dieser BRET basierten NHEJ-Aktivitätsmessung wird in Kapitel 4.3 näher erläutert und diskutiert.

Bei Transfektionen mit den gRNA/Cas9 Konstrukten 5 und 7 war nach Durchführung des T7EI Assays von einer Schneideaktivität im murinen Genom auszugehen. Hierdurch ist eine geringere Expression von Artemis zu erwarten. Das gRNA/Cas9 Konstrukt 1 wurde in den gezeigten Versuchen auch berücksichtigt, da es zumindest bei den Aktivitätsmessungen in den HEK 293T Zellen eine Schneideaktivität aufwies.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten BRET Assays mit den Knockout Ansätzen aufgezeigt.

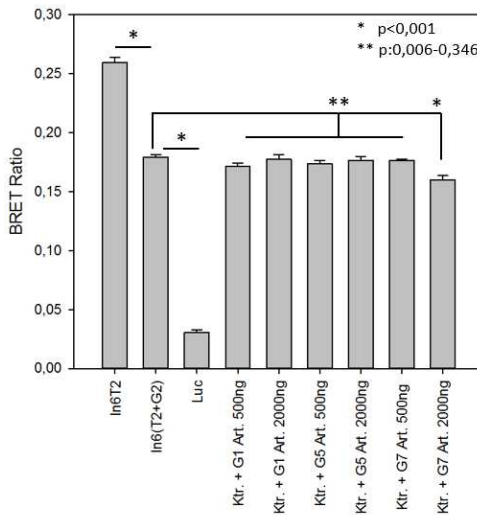
### Testung der NHEJ Aktivität nach Artemis Knockout in murinen C2C12 Zellen:



**Abbildung 3.7: BRET Assay nach Transfektion der C2C12 Zellen mit Guide 1 (100-2000 ng)**  
 Die murinen C2C12 Zellen wurden mit den dargestellten Plasmiden transfiziert. Die BRET Messung wurde 24 h nach Transfektion durchgeführt. Die BRET Ratio wurde in BRET Units (BU) gemessen. Der Versuch wurde einmal durchgeführt und die Messwerte durch eine Vierfachbestimmung errechnet. In6T2: NHEJ Sensorplasmid, In6G2: codiert zu In6T2 korrespondierendes gRNA/Cas9 Konstrukt, Luc: pRLuc8, Ktr.: In6T2 und In6G2, G1 Art.: px459 (pU6-BbsI/Guide1/BbsI-CBA-Cas9).

Für die NHEJ-Aktivitätsbestimmung mit und ohne Artemis Knockout wurde nach dem in Abbildung 3.6 beschriebenen Schema vorgegangen. Als 0% Doppelstrangbruchkontrolle diente das In6T2 Plasmid. Um die NHEJ-Aktivität zunächst ohne einen Artemis Knockout zu bestimmen, wurde eine zweite Zellpopulation mit dem In6T2 Plasmid und dem korrespondierenden gRNA/Cas9 Konstrukt (In6G2) transfiziert. Durch die Differenz dieser beiden gemessenen BRET Ratios (Balken 1 und 2 in der Abbildung 3.7) konnte dann die NHEJ-Aktivität bestimmt werden. Außerdem wurde auch hier die RLuc8 als 100% DSB Kontrolle eingesetzt. Die Abbildung zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den 100% und 0% DSB Kontrollen mit der Zellpopulation, welche mit den Plasmiden In6T2/G2 transfiziert wurde. Hierdurch kann man davon ausgehen, dass die Gene auf den Plasmiden korrekt exprimiert wurden. Die gemessenen BRET Ratios weisen zudem auf eine vorhandene NHEJ-Aktivität in den Zellen ohne Artemis Knockout hin.

Die Zellpopulationen wurden mit verschiedenen Mengen vom gRNA/Cas9 Konstrukt 1, sowie den Plasmiden In6T2 und In6G2 (zur NHEJ-Aktivitätsmessung) transfiziert. Bei keiner dieser Zellpopulationen konnte durch das BRET Assay eine signifikant unterschiedliche BRET Ratio im Vergleich zur Kontrolle In6T2/G2 (Balken 2) festgestellt werden. Somit kann man hier von einer Bestätigung der Ergebnisse im T7EI Assay ausgehen. Artemis wird hier nicht inhibiert, sodass es auch zu keiner Herabregulation des NHEJ-Reparaturwegs kommt (s. Abbildung 3.7).

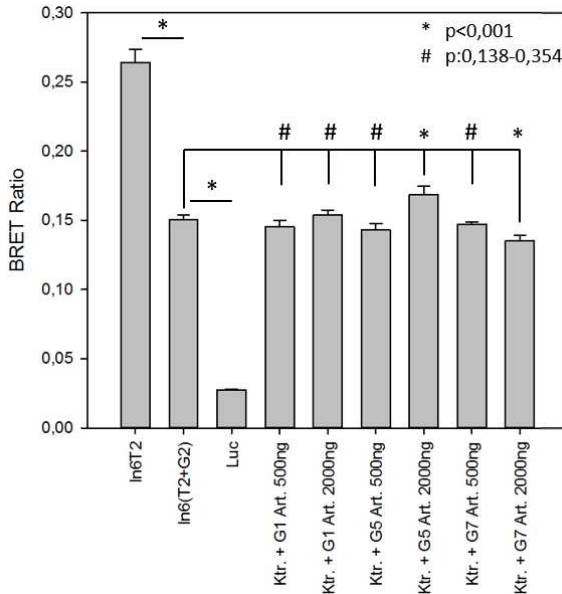


**Abbildung 3.8: BRET Assay nach Transfektion der C2C12 Zellen mit Guide 1,5,7 (500/2000 ng)**

Die murinen C2C12 Zellen wurden mit den dargestellten Plasmiden transfiziert. Die BRET Messung wurde 48 h nach Transfektion durchgeführt. Die BRET Ratio wurde in BRET Units (BU) gemessen. Der Versuch wurde einmal durchgeführt und die Messwerte durch eine Vierfachbestimmung errechnet. In6T2: NHEJ Sensorplasmid, In6G2: codiert zu In6T2 korrespondierendes gRNA/Cas9 Konstrukt, Luc: pRLuc8, Klr.: In6T2 und In6G2, G1,5,7 Art.: px459 (pU6-BbsI/Guide1,5,7/BbsI-CBA-Cas9).

In den Abbildungen 3.8 und 3.9 sind die Ergebnisse der BRET Assays nach Transfektionen der C2C12 Zellen mit den gRNA/Cas9 Konstrukten 1,5 und 7 zu sehen. Die in Abbildung 3.8 dargestellte BRET Messung wurde 48 Stunden nach Transfektion durchgeführt. Hierbei wurde wiederum die NHEJ-Aktivität zunächst ohne einen Artemis Knockout durchgeführt. Nach Transfektion mit den gRNA/Cas9 Konstrukten 1,5 und 7

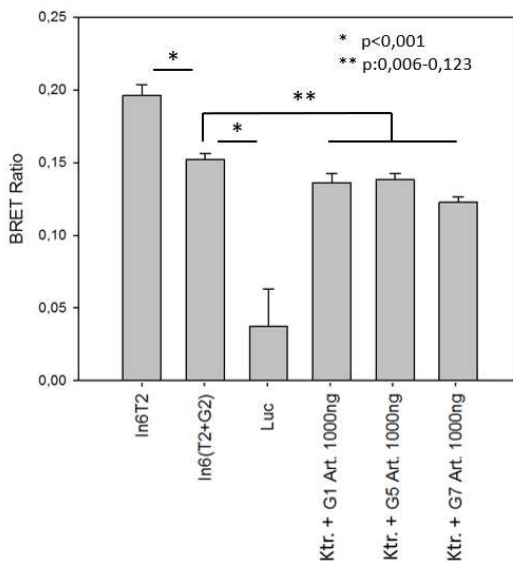
konnte keine Herabregulation des NHEJ-Wegs gezeigt werden. Anzumerken ist hierbei auch, dass die Transfektion mit dem gRNA/Cas9 Konstrukt 7 (2000 ng) eine signifikante Verringerung der BRET Ratio zeigt.



**Abbildung 3.9: BRET Assay nach Transfektion der C2C12 Zellen mit Guide 1,5,7 (500/2000 ng)**

Die murinen C2C12 Zellen wurden mit den dargestellten Plasmiden transfiziert. Die BRET Messung wurde 72 h nach Transfektion durchgeführt. Die BRET Ratio wurde in BRET Units (BU) gemessen. Der Versuch wurde einmal durchgeführt und die Messwerte durch eine Vierfachbestimmung errechnet. In6T2: NHEJ Sensorplasmid, In6G2: codiert zu In6T2 korrespondierendes gRNA/Cas9 Konstrukt, Luc: pRLuc8, Ktr.: In6T2 und In6G2, G1,5,7 Art.: px459 (pU6-BbsI/Guide1,5,7/BbsI-CBA-Cas9).

In Abbildung 3.9 sind die BRET Ratios nach 72h Expressionszeit aufgezeigt. Auch hier zeigt das gRNA/Cas9 Konstrukt 7 eine Verringerung der BRET Ratio. Eine Erhöhung der BRET Ratio zeigt in diesem Versuch das gRNA/Cas9 Konstrukt 5 (2000 ng) auf. Dies kann auf eine Herabregulation des NHEJ-Reparaturwegs hindeuten, jedoch konnte das Ergebnis in den murinen NIH 3T3 Zellen nicht reproduziert werden (siehe Abbildung 3.11).



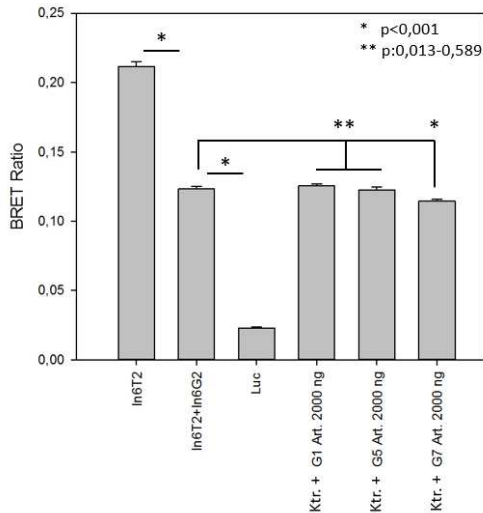
**Abbildung 3.10: BRET Assay nach Transfektion der C2C12 Zellen mit Guide 1,5,7 (1000 ng)**

Die murinen C2C12 Zellen wurden mit den dargestellten Plasmiden transfiziert. Die BRET Messung wurde 72 h nach Transfektion durchgeführt. Die BRET Ratio wurde in BRET Units (BU) gemessen. Der Versuch wurde einmal durchgeführt und die Messwerte durch eine Vierfachbestimmung errechnet. In6T2: NHEJ Sensorplasmid, In6G2: codiert zu In6T2 korrespondierendes gRNA/Cas9 Konstrukt, Luc: pRLuc8, Ktr.: In6T2 und In6G2, G1,5,7 Art.: px459 (pU6-BbsI/Guide1,5,7/BbsI-CBA-Cas9).

In einer weiteren BRET Messung (s. Abbildung 3.10) wurden die murinen C2C12 Zellen mit je 1000 ng der gRNA/Cas9 Konstrukte 1,5 und 7 transfiziert. Hier konnte ohne einen Artemis-Knockout eine NHEJ-Aktivität gezeigt werden. Die Knockout Zellpopulationen zeigten jedoch keine Erhöhung der BRET Ratio. Somit ist auch hier von keiner Herabregulation des NHEJ-Reparaturwegs auszugehen. Auffällig ist hier wiederum die vergleichbar geringe BRET Ratio der Zellpopulationen, welche mit dem gRNA/Cas9 Konstrukt 7 transfiziert worden sind.

### Testung der NHEJ Aktivität nach Dclre1c Knockout in murinen NIH 3T3 Zellen:

Um die bisher gezeigten Ergebnisse nochmals zu evaluieren, wurde der gleiche Versuchsaufbau bei den murinen NIH 3T3 Zellen durchgeführt. Hierbei sollte ausgeschlossen werden, dass die bisherigen Ergebnisse durch die spezifische Zelllinie verfälscht werden. Die murine embryonale Fibroblasten Zelllinie NIH 3T3 gilt zudem als gut transfizierbar (s. Kapitel 2.1.15.3).

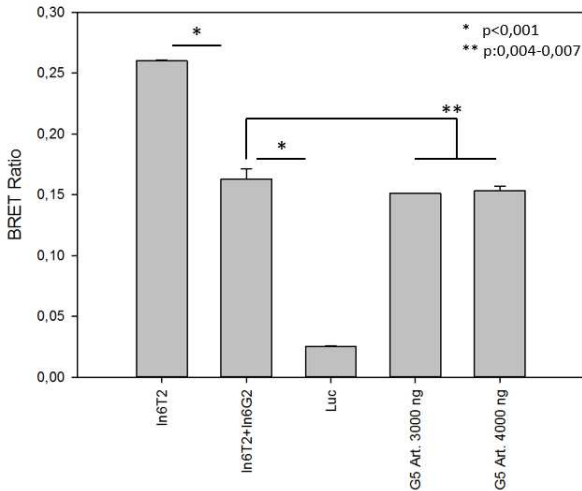


**Abbildung 3.11: BRET Assay nach Transfektion der NIH 3T3 Zellen mit Guide 1,5,7 (2000 ng)**

Die murinen NIH 3T3 Zellen wurden mit den dargestellten Plasmiden transfiziert. Die BRET Messung wurde 72 h nach Transfektion durchgeführt. Die BRET Ratio wurde in BRET Units (BU) gemessen. Der Versuch wurde einmal durchgeführt und die Messwerte durch eine Vierfachbestimmung errechnet. In6T2: NHEJ Sensorplasmid, In6G2: codiert zu In6T2 korrespondierendes gRNA/Cas9 Konstrukt, Luc: pRLuc8, Ktr.: In6T2 und In6G2, G1,5,7 Art.: px459 (pU6-BbsI/Guide1,5,7/BbsI-CBA-Cas9).

Die NIH 3T3 Zellen wurden mit den gRNA/Cas9 Konstrukten 1,5 und 7 transfiziert (s. Abbildung 3.11). Da das gRNA/Cas9 Konstrukt 5 in den murinen C2C12 in dem in Abbildung 3.9 gezeigten Versuch eine Erhöhung der BRET Ratio zeigte, wurde auch hier die Menge von 2000 ng verwendet. Eine Erhöhung der BRET Ratio und somit eine

wahrscheinlich herabregulierte NHEJ-Aktivität konnte in diesem Versuch jedoch nicht reproduziert werden.

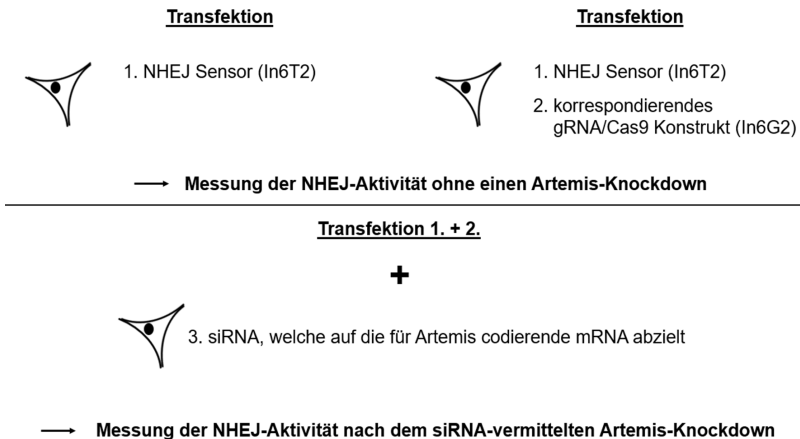


**Abbildung 3.12: BRET Assay nach Transfektion der NIH 3T3 Zellen mit Guide 5 (3000/4000 ng)**

Die murinen NIH 3T3 Zellen wurden mit den dargestellten Plasmiden transfiziert. Die BRET Messung wurde 72 h nach Transfektion durchgeführt. Die BRET Ratio wurde in BRET Units (BU) gemessen. Der Versuch wurde einmal durchgeführt und die Messwerte durch eine Vierfachbestimmung errechnet. In6T2: NHEJ Sensorplasmid, In6G2: codiert zu In6T2 korrespondierendes gRNA/Cas9 Konstrukt, Luc: pRLuc8, Ktr.: In6T2 und In6G2, G5 Art.: px459 (pU6-BbsI/Guide5/BbsI-CBA-Cas9).

In einer weiteren BRET-basierten Messung wurden höhere Plasmidmengen eingesetzt (s. Abbildung 3.12). Hierzu wurde das gRNA/Cas9 Konstrukt 5 mit 3000 und 4000 ng in murine NIH 3T3 Zellen transfiziert. Hierbei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (Balken 2) festgestellt werden. Auch hier wurde nach dem Artemis-Knockout keine signifikante Veränderung der NHEJ-Aktivität gemessen.

## 3.2 Silencing Ansatz



### Abbildung 3.13: Schema zur Messung der NHEJ-Aktivität nach Verwendung von RNA-Interferenz

Die Plasmide 1. und 2. sind in den Kapiteln 2.1.9.3 und 2.1.9.4 beschrieben und auf das humane CLN3 Gen konzipiert. Diese Plasmide dienen zur NHEJ-Aktivitätsmessung. Für das Silencing von Artemis wurde eine synthetische siRNA transfiziert (3.).

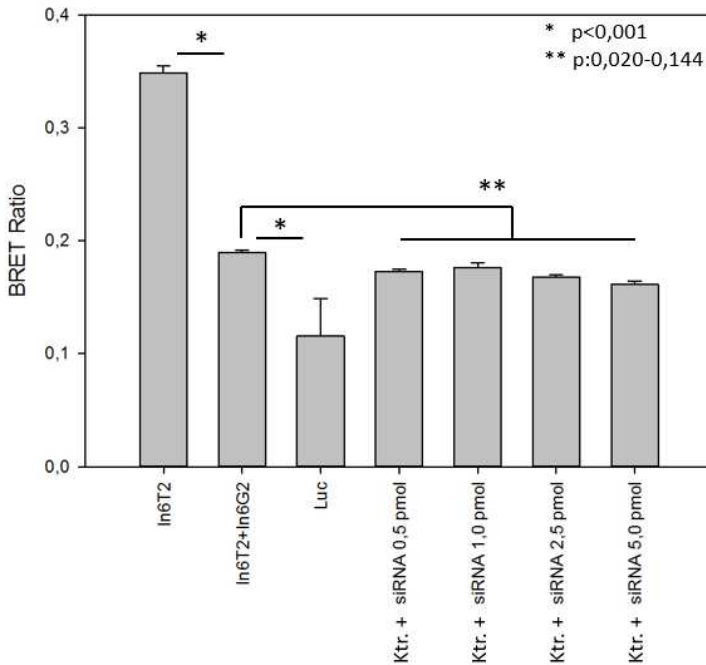
Für die Messung der NHEJ-Aktivität nach siRNA vermittelter RNA-Interferenz wurde ein BRET Assay nach aufgezeigtem Schema durchgeführt (s. Abbildung 3.13). Die NHEJ-Aktivitätsmessung erfolgte auch hier mit den auf das humane CLN3 Gen konzipierten Plasmiden In6T2 und In6G2 (1. + 2.). Im Gegensatz zum Knockout-Ansatz wurden die Zellen mit der siRNA, anstelle eines gRNA/Cas9 tragenden Plasmids, transfiziert. Die synthetisch hergestellte siRNA bindet an die für Artemis codierende mRNA. Nach Bildung des RISC kommt es schließlich zur Spaltung der mRNA und folglich zu einem fehlgestalteten oder fehlenden Genprodukt.

### Testung der NHEJ-Aktivität nach siRNA vermittelter RNA-Interferenz in murinen NIH 3T3 Zellen:

Die murinen NIH 3T3 Zellen wurden mit verschiedenen Mengen siRNA transfiziert (s. Abbildung 3.14). Danach wurde eine BRET basierte Messung der NHEJ-Aktivität durchgeführt. Die BRET Ratio Differenz der 0% DSB Kontrolle und der Zellpopulation, welche zusätzlich mit dem korrespondierenden gRNA/Cas9 Konstrukt transfiziert wurde,

---

zeigt eine deutliche NHEJ-Aktivität auf (Balken 1 und Balken 2). Nach Inhibition der Artemis-Expression durch die siRNA konnte keine signifikant unterschiedliche BRET Ratio verglichen zur Kontrolle (Balken 2) festgestellt werden. Auch hier wird davon ausgegangen, dass die Herabregulation von Artemis keinen Einfluss auf die NHEJ-Aktivität hat.



**Abbildung 3.14: BRET Assay nach Transfektion der NIH 3T3 Zellen mit der siRNA (0,5-5,0 pmol)**

Die murinen NIH 3T3 Zellen wurden mit den dargestellten Plasmiden sowie der siRNA transfiziert. Die BRET Messung wurde 72 h nach Transfektion durchgeführt. Die BRET Ratio wurde in BRET Units (BU) gemessen. Der Versuch wurde einmal durchgeführt und die Messwerte durch eine Vierfachbestimmung errechnet. In6T2: NHEJ Sensorplasmid, In6G2: codiert zu In6T2 korrespondierendes gRNA/Cas9 Konstrukt, Luc: pRLuc8, Ktr.: In6T2 und In6G2.

### **3.3 Vergleich Knockout- und Silencing Ansatz**

Weder der Knockout Ansatz in zwei verschiedenen murinen Zelllinien noch der Silencing Ansatz konnten nach einem Artemis-Knockout bzw. -Knockdown eine signifikante Erhöhung der BRET Ratio zeigen. Die einzige Ausnahme bildet hier die Transfektion mit dem gRNA/Cas9 Konstrukt 5 in den murinen C2C12 Zellen (s. Abbildung 3.9). Dieses Ergebnis konnte jedoch in den murinen NIH 3T3 Zellen bei gleichem Versuchsaufbau nicht reproduziert werden (s. Abbildung 3.11). Durch die Aktivitätsmessung in den HEK 293T Zellen wurden die 3 potenziell aktiven gRNA/Cas9 Konstrukte 1, 5 und 7 identifiziert (s. Abbildung 3.3). Das nachfolgende T7EI Assay zeigte zudem eine Schneideaktivität der Konstrukte 5 und 7 im murinen Genom (s. Abbildung 3.5). Trotz des CRISPR/Cas9 vermittelten Gen-Knockouts bzw. des siRNA-vermittelten Knockdowns von Artemis konnte keine Herabregulation des NHEJ-Reparaturwegs gezeigt werden.

## 4. Diskussion

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits eine Herabregulation des NHEJ-Reparaturwegs sowie eine folgende Erhöhung der HDR-Effizienz erzielen. Dies erreichten sie durch die Inhibition der Expression diverser NHEJ-Schlüsselproteine wie zum Beispiel den Ku70/80 Komplex, die DNA-PKcs oder die DNA-Ligase 4. In verschiedenen Zelllinien wurden hierbei Methoden wie die Anwendung diverser Moleküle, die RNA-Interferenz oder der CRISPR/Cas9 vermittelte Gen-Knockout durchgeführt. Hierbei konnten Maruyama et al. eine bis zu 19-fach gesteigerte HDR-Effizienz erzielen (Li et al. 2017; Maruyama et al. 2015; Robert et al. 2015; van Chu et al. 2015; Zhu et al. 2015).

Die Rolle der Nuklease Artemis bezüglich des NHEJ-Reparaturwegs wurde schon in diversen Publikationen untersucht und beschrieben (Chang und Lieber 2016; Ma et al. 2014; Lieber 2008; Ma et al. 2014). Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer Inhibition von Artemis auf die NHEJ-Aktivität zu untersuchen. Durch einen CRISPR/Cas9 vermittelten Gen-Knockout bzw. durch RNA-Interferenz wurde mit einer BRET basierten Methodik die NHEJ-Aktivität nach dem Artemis Knockout/Knockdown gemessen. Die aufgestellte Hypothese, dass die fehlende Nukleaseaktivität Artemis' eine Herabregulation der NHEJ-Aktivität bewirken würde, konnte durch die in dieser Arbeit verwendete Methodik nicht bestätigt werden.

### 4.1 Funktionen von Artemis

Die Nuklease Artemis nimmt eine wichtige Rolle im NHEJ-Reparaturweg bei der DNA-Endprozessierung ein. Zusammen mit der DNA-Pkcs bildet Artemis einen Komplex, der bei der Prozessierung von doppelsträngigen DNA-Enden eine Endonukleaseaktivität aufweist (Chang et al. 2017). Eine weitere wichtige Rolle übernimmt Artemis bei der V(D)J-Rekombination. Dieser Prozess ermöglicht eine Variabilität von Genen, die für Immunglobuline und T-Zellrezeptoren kodieren (Moshous et al. 2001). Artemis ist hierbei an der Prozessierung von DNA-Hairpin Strukturen beteiligt (Chang und Lieber 2016).

Die Auswirkungen eines Artemis-Knockout oder -Knockdown auf die DNA-Reparaturwege wurden schon in diversen Publikationen beschrieben. Die Arbeitsgruppe um Kurosawa untersuchte die Folgen eines Artemis-Knockouts auf die HR-Effizienz. Für die Generierung von Artemis-Knockout Zellen wurde die Methodik des traditionellen Gen-Targeting in der humanen prä-B Zelllinie Nalm-6 angewendet (Kurosawa et al. 2008; Kurosawa et al. 2013). Das traditionelle Gen-Targeting unterscheidet sich von dem in dieser Arbeit verwendeten Gen-Targeting in der Verwendung von programmierbaren Endonukleasen (CRISPR/Cas9). Das traditionelle Gen-Targeting beschreibt die Integration eines Targetingvektors durch homologe Rekombination in ein bestimmtes Zielgen. Hierdurch können Gene modifiziert und somit ihre Funktion analysiert werden (Saito und Adachi 2016). Dabei wird jedoch kein künstlicher Doppelstrangbruch durch Endonukleasen induziert. Targetingvektoren enthalten zunächst zwei zu dem Zielgen homologe Regionen, welche ein Selektionsmarker Gen flankieren (Tokunaga et al. 2016). Diese Positiv-Selektionsmarker sind häufig Antibiotika-Resistenzgene, wodurch bei Antibiotikagabe diejenigen Zellen selektiert werden können, die den Targetingvektor erfolgreich ins Genom integriert haben. Um der zufälligen Integration des Targetingvektors entgegenzuwirken, gibt es die Möglichkeit der negativen Selektion. Hierbei können Suizidgene, wie das Diphtherietoxin A (DT-A) oder das Herpes Simplex Virus Thymidinkinase Gen (HSV-TK), in den Vektor außerhalb der homologen Regionen integriert werden (Saito und Adachi 2016). Um mögliche Interaktionen des Selektionsmarker Gens mit den Expressionsprodukten des Zielgens auszuschließen, kann dieses nach erfolgreicher Integration und Selektion entfernt werden. Hierfür kann das Flp-FRT System angewendet werden, bei dem die Rekombinase Flp zwei das Selektionsgen flankierende FRT-Regionen miteinander verknüpfen und somit das Selektionsgen entfernen kann. Ein weiteres System ist die Cre-vermittelte Rekombination. Hierbei kann die spezifische Rekombinase Cre zwei LoxP-Regionen miteinander verknüpfen. Verwendet man zwei unabhängige Targetingvektoren, die jeweils eine LoxP Region tragen, können nach Cre-Verdau große Deletionen im Zielgen erzeugt werden (Kühn und Schwenk 1997; Tokunaga et al. 2016). Durch die HR-vermittelte Integration verschieden gestalteter Targetingvektoren können Gene ausgeknockt oder modifiziert werden. Nachteile des traditionellen Gen-Targetings sind die sehr geringe Effizienz und die limitierte Anwendbarkeit. Nur in ausgewählten Zelllinien ist die Gen-Targeting Effizienz hoch genug, um Gene gezielt verändern zu können. Diese Nachteile können durch die Verwendung von programmierbaren Nukleasen, wie das in dieser Arbeit verwendete CRISPR/Cas9, umgangen werden. Durch diese Nukleasen können sowohl gezielte Mutationen induziert als auch die

Integration von Targetingvektoren in das Genom gesteigert werden. Hierdurch ist es weiterhin möglich, gezielte Genmodifikationen in einer großen Anzahl von Säugertierzelllinien vorzunehmen (Tokunaga et al. 2016).

Kurosawa et al. verwendeten das traditionelle Gen-Targeting, um eine Artemis-Knockout Zelllinie zu generieren. Hierzu wurden zwei verschiedene Artemis Targetingvektoren erstellt. Der Artemis-Puro Vektor enthielt ein Puromycin-Resistenzgen und wurde so konzipiert, dass er die Exone 8 und 9 im Artemis-Gen ersetzte. Der Artemis-Hyg Vektor enthielt ein Hygromycin-Resistenzgen und sollte die Exone 6-9 ersetzen. Die Targetingvektoren enthielten DT-A Gene und die enthaltenen Resistenzgene waren von LoxP-Sequenzen flankiert. Der Artemis-Knockout wurde nach Generieren der Zelllinien durch Southern Blot, RT-PCR und einen Western Blot Test verifiziert (Kurosawa et al. 2008; Kurosawa et al. 2013). Diese Knockout-Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe generiert, um die aufgestellte Hypothese zu überprüfen, dass Artemis die homologe Rekombination unterdrückt und ein Verlust von Artemis eine HR-vermittelte DSB-Reparatur begünstigt. Um die HR-Effizienz in den Artemis-Knockout Zelllinien zu ermitteln, wurde ein Targetingvektor für den HPRT Locus erstellt. Beim traditionellen Gen-Targeting wird dieser Vektor durch homologe Rekombination gezielt in das Genom integriert und resultiert in einem Knockout des HPRT Gens. Zellen, die einen intakten HPRT Locus haben, sterben durch Zugabe von 6-Thioguanin ab, während HPRT-Knockout Zelllinien überleben. Durch diese Methodik kann somit auf die HR-Effizienz in einer Zelllinie geschlossen werden (Iizumi et al. 2008; Kurosawa et al. 2013). Kurosawa et al. konnten durch Anwendung dieser Methodik zeigen, dass Artemis-Knockout Zelllinien verglichen zur Wildtyp-Kontrollgruppe eine höhere Gen-Targeting- und somit HR-Effizienz aufwiesen. Dieser Effekt konnte durch einen Ligase 4-Knockout nochmals gesteigert werden (Kurosawa et al. 2013).

In einer weiteren Arbeit wurde der Einfluss Artemis' auf die NHEJ-Aktivität untersucht (Moscariello et al. 2015). Als NHEJ-Reportersystem wurde hier der EJ5-GFP Reporter verwendet. Dieser Reporter besteht aus einem Promoter, der von einem GFP-Gen durch ein Puromycin-Resistenzgen separiert ist. Das Puromycin-Gen ist hierbei von zwei I-SceI Erkennungssequenzen flankiert. Nach einem durch I-SceI induzierten Doppelstrangbruch geht das Puromycin-Gen verloren und der Promoter wird durch die NHEJ-Reparatur an die Expressionskassette angefügt. Dadurch kann das GFP-Gen exprimiert werden (Bennardo et al. 2008). Dieser EJ5-GFP Reporter ist in einem spezifischen intra-chromosomalen Locus in den U2OS Zellen integriert. Diese Zelllinie wurde mit siRNA, welche auf die für Artemis codierende mRNA abzielt, transfiziert. Der

Artemis Knockdown wurde durch einen Western Blot Test verifiziert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Plasmid transfiziert, welches die Sequenz für die Nuklease I-SceI enthält. 24 Stunden später wurde die GFP-Expression anhand der Durchflusszytometrie bestimmt. Nach einem Artemis-Knockdown konnte mit dem beschriebenen NHEJ-Reportersystem eine statistisch signifikante NHEJ-Reduzierung von 20%, verglichen mit einer Kontrollgruppe, gemessen werden. Als Kontrolle wurde das gleiche Verfahren nach Knockdown von dem NHEJ-Faktor Ku70 sowie der HDR-Proteine CTIP und Rad51 durchgeführt. Durch das EJ5-GFP Reportersystem konnte hierbei nur bei NHEJ-Schlüsselproteinen eine NHEJ-Herabregulierung gezeigt werden (Moscariello et al. 2015).

Die von den Arbeitsgruppen um Kurosawa und Moscariello erzielten Ergebnisse bezüglich der Rolle Artemis' im NHEJ-Reparaturweg decken sich nicht mit den in dieser Arbeit erzeugten Ergebnissen. Moscariello et al. konnten durch RNA-Interferenz und den NHEJ-Reporter EJ5-GFP eine Herabregulation des NHEJ-Wegs um 20% aufzeigen (Moscariello et al. 2015). Kurosawa et al. konnten in Artemis-Knockout Zelllinien eine Steigerung der HR-Effizienz feststellen. Hier wurde also nicht direkt die NHEJ-Aktivität gemessen, jedoch ist von einer Herabregulation des NHEJ-Reparaturwegs, gefolgt von einer gesteigerten HR-Effizienz, auszugehen (Kurosawa et al. 2013).

Das Abweichen der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse kann durch Unterschiede in der Erstellung der Artemis Knockout/Knockdown Zellen sowie in der NHEJ-Messmethodik begründet sein.

## 4.2 Erstellen von Artemis-defizienten Zellen

Um einen CRISPR-Cas9 vermittelten Artemis-Knockout in den murinen Zelllinien C2C12 und NIH 3T3 zu erzielen, sollten zunächst die gRNA/Cas9 Konstrukte auf ihre Aktivität getestet werden. Hierzu wurden 7 verschiedene im Dclre1c Gen enthaltene Target-Sequenzen über das Online-tool [www.atum.bio](http://www.atum.bio) generiert. Die dazu komplementären Guide- sowie Target-Sequenzen konnten erfolgreich in die jeweiligen Plasmide integriert werden (s. Kapitel 3.1.1). Die darauffolgende Aktivitätstestung in den humanen HEK 293T Zellen zeigte, dass 4 der 7 Konstrukte eine signifikante Schneideaktivität ( $p < 0,001$ ) aufwiesen. Trotz korrekter Target- und Guide-Sequenzen und erfolgreicher Integration

in die Plasmide zeigten die gRNA/Cas9 Konstrukte 2,3 und 6 keine signifikante Schneideaktivität auf. Ein Grund hierfür könnte das Auftreten von Sekundärstrukturen innerhalb der Guide-RNA nach Transkription sein. Diese Hypothese wurde auch von anderen Arbeitsgruppen in vergleichbaren Versuchen aufgestellt (Ma et al. 2014). Durch diesen Test erfolgte die Identifizierung von im murinen Genom potenziell aktiven gRNA/Cas9 Konstrukten. Eine Überprüfung, ob die Konstrukte tatsächlich die Target-Sequenzen im murinen Dclre1c Gen erkennen und schneiden würden, konnte durch das T7 Endonuklease I Assay erfolgen. Hierbei zeigte sich, dass die potenziell aktiven gRNA/Cas9 Konstrukte 5 und 7 auch im murinen Genom schneiden würden. Eine Limitierung dieser Arbeit besteht darin, dass das in den Zellen vorhandene Artemis-Proteinlevel nicht durch einen Test, beispielsweise Western Blot, verifiziert wurde. Durch die beschriebenen vorangegangenen Testungen ging man aber davon aus, dass die Expression Artemis' erfolgreich herabreguliert werden konnte.

Die verwendete siRNA wurde von der externen Firma Life Technologies/Thermo Fisher Scientific bezogen. Die siRNA wurde vom Hersteller validiert und kann die Ziel-mRNA um 70% oder mehr reduzieren (<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/rnai/synthetic-rnai-analysis/sirna-efficacy.html>, 06.2019). Verschiedene Faktoren beeinflussen die Effizienz von siRNAs. Zunächst sollte die genaue Targetregion des Zielgens bewertet werden. Hierbei zeigen Regionen, die 50-100 Nukleotide downstream des Startcodon lokalisiert sind, die beste Silencing-Effizienz. Weitere Faktoren sind die Wahrscheinlichkeit, dass die Ziel-mRNA Sekundärstrukturen ausbildet sowie der Anteil an GC Basenpaaren. Die Arbeitsgruppe um Reynolds erzielte mit einem GC Basenanteil zwischen 36% und 52% die höchste Effizienz, währenddessen Amarzguioui, Prydz et al. einen GC Anteil zwischen 31,6% und 57,9% als besonders effizient erachteten (Reynolds et al. 2004; Amarzguioui und Prydz 2004). Des Weiteren hat die Länge der siRNA einen Einfluss auf einen erfolgreichen Knockdown eines Genprodukts. Die siRNA sollte aus 19-29 Nukleotiden bestehen, wobei längere siRNAs eine Immunreaktion hervorrufen können (Fakhr et al. 2016). Die in dieser Arbeit verwendete siRNA hat laut Herstellerangaben eine Länge von 21 Nukleotidpaaren sowie einen GC Anteil von 33% und entspricht somit den in der Literatur beschriebenen Anforderungen.

Die Transfektion der siRNA in die murinen NIH 3T3 Zellen wurde mit Hilfe des Transfektionsmediums PEI durchgeführt. Das Transfektionsprotokoll wurde hierbei angelehnt an die Arbeit von Wirth et al. durchgeführt. Die Arbeitsgruppe verwendete PEI zur Transfektion von siRNA in humane und murine Pankreaskrebs Zelllinien. Hierbei

wurden Transfektionseffizienzen von 83 % bis zu 98 % erreicht, wobei die Toxizität vernachlässigbar war. Nach dem siRNA vermittelten Knockdown wurde das Proteinlevel mittels Western Blot bestimmt. Wirth et al. konnten in dieser Arbeit zeigen, dass der Proteinknockdown bei PEI vermittelter Transfektion vergleichbar mit den kommerziell verfügbaren Transfektionsreagenzien ist (Wirth et al. 2011).

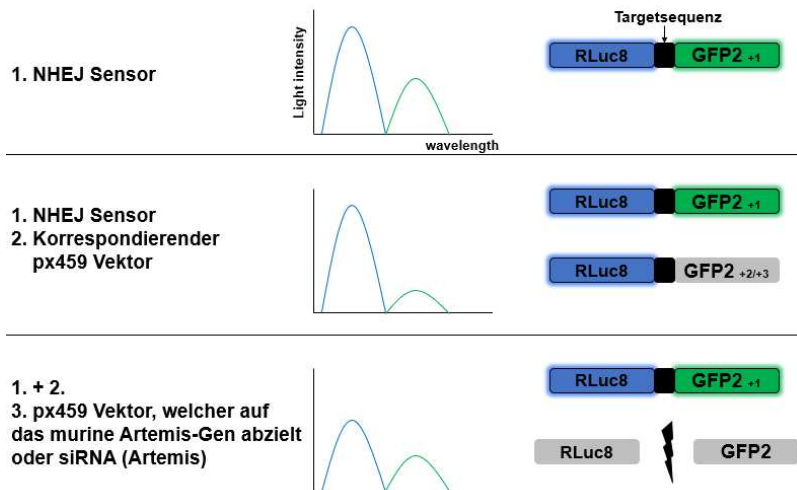
In dieser Arbeit wurde aus Effizienzgründen das PEI vermittelte Transfektionsverfahren der siRNA durchgeführt, da ein ähnliches Verfahren bereits bei den Knockout Experimenten verwendet wurde und somit die Fehleranfälligkeit verringert werden konnte. Ein weiterer wichtiger Faktor waren hierbei die deutlich niedrigeren Kosten im Vergleich zu anderen für die siRNA geeigneten Transfektionsreagenzien.

Eine Limitierung der erzeugten Ergebnisse war, dass in dieser Arbeit eine andere Zelllinie, als bei Wirth et al. beschrieben, benutzt wurde. Wie bei den Knockout-Ansätzen wurde auch hier kein Western Blot durchgeführt. Wir können demnach also nicht mit voller Sicherheit einen Artemis-Knockdown nachweisen. Da die verwendete siRNA jedoch durch den Hersteller validiert wurde, gehen wir stark von einem erfolgreichen Knockdown aus. Das BRET-basierte NHEJ-Reportersystem zeigte auch bei der Verwendung von siRNA keine Herabregulation des NHEJ-Reparaturwegs.

### 4.3 Das NHEJ-Reportersystem

Für die Messung der NHEJ-Aktivität wurde ein BRET basiertes Reportersystem verwendet. Hier ist somit ein Unterschied zu den Arbeiten, welche eine Erhöhung der HR-Effizienz, bzw. eine Herabregulation des NHEJ-Wegs zeigen konnten (s. Kapitel 4.1). Die theoretischen Grundlagen des BRET Assay wurden bereits in Kapitel 2.2.3.2 erläutert. Abbildung 4.1 zeigt die Funktionsweise des BRET Assay, um die NHEJ-Aktivität nach dem Artemis Knockout/Knockdown zu messen. Zunächst wurden die Zellen mit dem NHEJ Sensorplasmid (1.) sowie mit dem NHEJ Sensorplasmid und dem korrespondierenden px459 Vektor (1. + 2.) transfiziert. Durch den Vergleich der gemessenen BRET Ratios kann man auf die NHEJ-Aktivität schließen. Falls der Artemis Knockout/Knockdown (3.) eine Herabregulation des NHEJ-Reparaturwegs bewirkt, nähert sich die BRET Ratio wieder dem Wert an, welcher bei der Monotransfektion des NHEJ-Sensorplasmids gemessen wird. Da das gRNA/Cas9 Konstrukt nicht in allen Zellen einer Zellpopulation die Target-Sequenz erfolgreich schneidet, wird eine gewisse Lichtemission von GFP2 und RLuc8 gemessen (s. 2. und 3. Zeile Abbildung 4.1). In

einigen Zellen sind die gRNA/Cas9 Konstrukte aktiv und erzeugen einen DSB in der Target-Sequenz, was einen Frameshift der GFP2-Sequenz verursacht. Hier wird eine geringere BRET Ratio gemessen (s. Zeile 2 Abbildung 4.1). Falls ein Artemis Knockout/Knockdown eine Herabregulation des NHEJ bewirkt, steigt die BRET Ratio wieder. Bei zu geringer NHEJ-Aktivität wird der erzeugte DSB der das Reportersystem tragenden Plasmide nicht repariert. Die Plasmide werden also linearisiert, wodurch die RLuc8- und GFP2-Sequenzen nicht mehr exprimiert werden (s. Zeile 3 Abbildung 4.1). Da in einigen Zellen das Reporterplasmid nicht geschnitten wurde, nähert sich die BRET Ratio wieder dem Wert an, der bei Transfektion nur mit dem NHEJ-Sensorplasmid gemessen wurde (1.). Hier kommt es also nicht zu einer verringerten GFP2 Lichtemission, verglichen zur RLuc8 Lichtemission (s. Zeile 2 Abbildung 4.1). Eine Einschränkung der BRET basierten NHEJ-Aktivitätsmessung ist, dass maximal 66,6% der NHEJ-Events detektiert werden können. Insertionen oder Deletion, welche ein Vielfaches von drei sind, erzeugen keinen Frameshift in der GFP2-Sequenz und können durch dieses System nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.1: NHEJ-Aktivitätsmessung nach Artemis Knockout/Knockdown**

Die murinen Zelllinien wurden mit den beschriebenen Konstrukten transfiziert. In der mittleren Spalte ist die Intensität der Lichtemission der RLuc8 (blau) bzw. des GFP2 (grün) in ein Diagramm aufgetragen. Die BRET Ratio berechnet sich durch den Quotient von GFP2 zu RLuc8 und beschreibt somit die Relationen der beiden Proteine. Nach Induktion eines DSB und bei vorhandener NHEJ-Aktivität nimmt die Lichtemission des GFP2 verhältnismäßig ab (Zeile 2). Bei Herabregulation des NHEJ-Wegs wird der DSB nicht mehr repariert und das Plasmid wird linearisiert, wodurch die beiden Proteine nicht mehr exprimiert werden können (Zeile 3). Da das

NHEJ Sensorplasmid jedoch nicht in allen Zellen einer Zellpopulation erfolgreich geschnitten wird, werden GFP2 und RLuc8 zum Teil immer noch exprimiert (s. Zeile 2 und 3, rechte Spalte, jeweils oberes Bild). Bei fehlendem NHEJ ist das Verhältnis von exprimierten GFP2 zur exprimierten RLuc8 ähnlich wie bei Monotransfektion nur mit dem NHEJ Sensorplasmid (s. Zeile 1 und 3).

Die in Zeile 3 (Abbildung 4.1) beschriebene Herabregulation des NHEJ-Reparaturwegs konnte durch diese Arbeit nicht reproduzierbar bestätigt werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass Artemis nicht den erwarteten Einfluss auf die DSB Reparatur hat und somit verzichtbar ist.

In dem Review von Chang et al. wird beschrieben, dass bei der Reparatur eines durch blunt-ends charakterisierten Doppelstrangbruchs möglicherweise keine Endprozessierung stattfindet. An diese blunt-ends bindet zunächst das Ku Heterodimer. Anschließend werden die freien DNA-Enden jedoch nicht durch Nukleasen oder Polymerasen prozessiert, sondern durch den Komplex aus XRCC4, XLF und Ligase 4 direkt ligiert. Das Vorhandensein von DNA-PKcs, Artemis und der Polymerase  $\mu$  scheint hierbei die Ligation von blunt-ends nicht zu stimulieren (Chang et al. 2017). Dieser Review beschreibt somit eine vorhandene NHEJ-Aktivität auch ohne die Aktivität von Artemis.

In dieser Arbeit wurde die Nuklease Cas9 zur Erzeugung von Doppelstrangbrüchen in der Target-Sequenz der NHEJ-Reporterplasmide verwendet. Cas9 induziert hierbei Doppelstrangbrüche, die durch blunt-ends charakterisiert sind (Jinek et al. 2012). Durch die BRET-basierte NHEJ-Aktivitätsmessung wurde in dieser Arbeit jedoch ein Frameshift in der GFP2-Sequenz des Reporterplasmids erzeugt. Somit ist hier von einer DNA-Endprozessierung nach Induktion des Doppelstrangbruchs auszugehen (s. Kapitel 3.1.2). Diese Beobachtung wird dadurch gestützt, dass Artemis grundsätzlich auch bei blunt-ends eine Endonukleasaktivität aufweisen kann (Chang und Lieber 2016).

Ein weiterer Ansatz, weshalb in dieser Arbeit nach einem Artemis Knockout/Knockdown keine Herabregulation des NHEJ-Reparaturwegs gezeigt werden konnte, könnte die mögliche Beteiligung weiterer Nukleasen an der Endprozessierung sein. Nukleasen, die zur NHEJ-Reparatur beitragen können, umfassen beispielsweise den MRN Komplex, CTIP, die Werner syndrome ATP-dependent helicase (WRN), die Flap endonuclease 1 oder die Exonuclease 1 (Chang et al. 2017). Eine weitere wichtige Rolle scheint die Nuklease PALF einzunehmen. Möglicherweise wird die DNA-Endprozessierung durch Artemis in Zusammenarbeit mit PALF durchgeführt. Die aufgestellte Hypothese besagt, dass Artemis für die frühe endonukleolytische Aktivität verantwortlich ist und der Prozess durch PALF abgeschlossen wird (Pannunzio et al. 2014).

Es ist also durchaus vorstellbar, dass der Verlust von Artemis durch die Aktivität weiterer Nukleasen kompensiert wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der Doppelstrangbruch primär durch das Hinzufügen von Nukleotiden wieder repariert wird und somit eine Nukleaseaktivität zweitrangig wird. Diese Hypothese könnte dadurch gestützt werden, dass die Polymerase  $\mu$  Nukleotide template-unabhängig polymerisieren und somit Mikrohomologien schaffen kann (Chang et al. 2017).

## 4.4 Ausblick

Das Therapeutische *Genome Editing* zielt darauf ab, krankheitsauslösende Mutationen direkt im Genom zu reparieren (Yanik et al. 2017). Die genaue Erforschung der zelleigenen Reparaturmechanismen ist hierbei unerlässlich. Diverse Arbeitsgruppen haben sich bisher mit den Funktionen der in den verschiedenen Reparaturwegen beteiligten Proteine befasst. Diese Arbeit sollte die Rolle der Nuklease Artemis bezüglich des NHEJ-Reparaturwegs untersuchen. Die aufgestellte Hypothese, dass ein Knockout/Knockdown Artemis' eine NHEJ Herabregulation bewirken würde, konnte nicht bestätigt werden. Um eine effiziente Therapiestrategie entwickeln zu können, wird es in Zukunft wichtig sein, die Funktionen von Schlüsselproteinen und deren Einfluss auf die jeweiligen DNA-Reparaturwege, beispielsweise durch Knockout-Zelllinien, intensiv zu studieren. Ein Ansatz, die Rolle Artemis' auf den NHEJ-Weg weiter zu erforschen, wäre eine NHEJ-Aktivitätstestung nach Knockout mehrerer Nukleasen.

Um zukünftig eine Therapiestrategie gegen krankheitsauslösende Mutationen zu entwickeln, wird es also weiterhin wichtig sein, die Funktionsweisen und die Wechselwirkungen der DNA-Reparaturwege zu untersuchen, um diese gezielt ausnutzen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Erbliche Netzhautdefekte werden durch zahlreiche krankheitsauslösende Mutationen verursacht. Das therapeutische *Genome Editing* zielt darauf ab, diese Mutationen direkt im Genom des Patienten zu therapieren. Das Prinzip beruht hierbei auf programmierbaren Endonukleasen, mit denen man einen künstlichen Doppelstrangbruch erzeugen kann, welcher anschließend durch zelleigene Mechanismen repariert wird.

Durch Reparatur des DSB mittels des fehleranfälligen NHEJ-Wegs kommt es zur Ausbildung von Insertionen und Deletionen und somit zur Genveränderung. Beim HDR-Reparaturweg kann ein DNA-Template durch homologe Sequenzen in das Genom eingebracht werden. Je nach Gestaltung des Templates kommt es zur Genkorrektur, -modifikation oder -addition. Der HDR-Reparaturweg ist in den postmitotischen Photorezeptor- und RPE-Zellen jedoch ineffizient.

Ziel dieser Arbeit war es, die NHEJ-Aktivität herab zu regulieren, sodass der HDR-Reparaturweg effizienter wird. Hierzu wurde die Expression der im NHEJ-Weg involvierten Nuklease Artemis in murinen Zelllinien durch zwei verschiedene Methoden inhibiert. Artemis ist bei der Endprozessierung der freien DNA-Enden eines DSB beteiligt.

Zunächst wurde ein CRISPR/Cas9 vermittelter Knockout des murinen Artemis-Gens in den C2C12 und NIH 3T3 Zelllinien durchgeführt. Zuvor wurden die gRNA/Cas9 Konstrukte erfolgreich auf ihre Schneideeffizienz geprüft.

Der zweite Ansatz war ein siRNA-vermittelter Artemis-Knockdown in den murinen NIH 3T3 Zellen.

Die NHEJ-Aktivität nach einem Artemis Knockout/Knockdown wurde durch eine BRET-basierte Methodik gemessen. Hierbei ergab sich keine reproduzierbare Herabregulation der NHEJ-Events.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse weisen auf keinen oder beschränkten Einfluss eines Artemis Knockout/Knockdown auf die NHEJ-Aktivität hin. Dies kann unter anderem darin begründet sein, dass die DNA-Endprozessierung nach einem Artemis Knockout/Knockdown von anderen Nukleasen übernommen wird.

In Zukunft sollten die Funktionsweisen der in den Reparaturwegen involvierten Proteine weiterhin genau erforscht werden, um eine bestmögliche Therapiestrategie zu entwickeln.

## 6. Summary

Inherited retinal dystrophies are caused by multiple disease causing mutations. The therapeutic genome editing aims to correct these mutations within the genome of a patient. The principle of this approach is based on programmable endonucleases by which one can artificially induce double strand breaks which are then repaired by the cell's own DNA repair mechanisms.

The repair of a double strand break via the error-prone NHEJ-pathway leads to the formation of insertions and deletions which is consequently followed by a gene mutation. In case of occurrence of the HDR-pathway a DNA-Template can be integrated into the genome via homologous sequences. Depending on the design of the template one can achieve a gene correction, modification or addition. However, in the postmitotic photoreceptor and RPE cells the HDR-pathway is rather inefficient.

The aim of this project was to downregulate the NHEJ-activity in order to increase the efficiency of the HDR-pathway. For this purpose, the expression of the nuclease Artemis which is involved in the NHEJ-pathway was inhibited by two different methods in murine cell lines. Artemis is involved in the end-processing of the free DNA ends of a DSB. Initially, a CRISPR/Cas9 mediated knockout of the murine Artemis gene in the C2C12 and NIH 3T3 cell lines was performed. Previously, the cleavage activity of the gRNA/Cas9 constructs had been successfully examined. The second approach was a siRNA-mediated Artemis knockdown in the murine NIH 3T3 cells.

The NHEJ-activity after an Artemis knockout/knockdown was measured by a BRET-based methodology. These experiments showed no reproducible downregulation of the NHEJ-events.

The achieved results of this project indicate no or limited impact of an Artemis knockout/knockdown on the NHEJ-activity. A possible reason is that the DNA end-processing after an Artemis knockout/knockdown is assumed by other nucleases. In future, the functions of the proteins which are involved in the DNA repair mechanisms should be furthermore investigated to develop appropriate therapy strategies.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

AAV	<i>Adeno-associated virus</i>
Ago2	<i>Argonaute 2</i>
a-NHEJ	<i>Alternatives NHEJ</i>
AS	<i>Aminosäuren</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
B.mori	<i>Bombyx mori</i>
bp	<i>Basenpaare</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
BRET	<i>Bioluminescence resonance energy transfer</i>
BU	<i>BRET Unit</i>
Cas	<i>CRISPR-associated</i>
CBA	<i>Chicken <math>\beta</math>-actin</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
CNV	<i>Choroidaler Neovaskularisation</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
crRNA	<i>CRISPR RNA</i>
Cys	<i>Cystein</i>
Dclre1c	<i>DNA Cross-Link Repair 1C</i>
ddH <sub>2</sub> O	<i>bi-destilliertes Wasser</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome chromosomal region 8</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
DNA2	<i>DNA replication helicase 2 homolog</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i>
DT-A	Diphtherietoxin A
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EXO1	Exonuklease 1
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FKS	Fetales Kälberserum
G	<i>Guide</i>
g	Gramm
GC	Guanin/Cytosin
GFP2	<i>Green fluorescent protein 2</i>
gRNA	<i>Guide RNA</i>
h	<i>hours</i>
HDR	<i>Homology directed repair</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
His	Histidin
HR	Homologe Rekombination
HSV-TK	Herpes Simplex Virus Thymidinkinase
Hyg	Hygromycin
Indels	Insertionen und Deletionen
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
kb	Kilo-Basenpaare
L/l	Liter
LB	Luria Broth
LCA	Lebersche kongenitale Amaurose
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
m	Milli
M	Molare Masse (mol/L)

min	Minuten
miRNA	<i>Micro-RNA</i>
MMEJ	<i>Microhomology-mediated end joining</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
ng	Nanogramm
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
nm	Nanometer
OD	<i>Optical density</i>
p	Pico
pA	Polyadenylierungssignal
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
PARP1	<i>Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
Pen	Penicillin
pmol	Picomol
Pol $\mu$	Polymerase $\mu$
Pol $\lambda$	Polymerase $\lambda$
PR	Photorezeptor
pre-miRNA	<i>Precursor miRNA</i>
pri-miRNA	<i>Primary miRNA</i>
Puro	Puromycin
RAP80	<i>Receptor-associated protein 80</i>
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RLuc8	<i>Renilla Luciferase 8</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RNF8	<i>Ring finger protein 8</i>
RNF168	<i>Ring finger protein 168</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

RP	Retinitis Pigmentosa
RPA	<i>Replication Protein A</i>
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RS-1	Retinoschisin 1
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RVD	<i>Repeat variable diresidues</i>
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
s	Sekunden
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering-RNA</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with catabolite repression</i>
Strep	Streptomycin
SV40	Simian-Virus 40
T	<i>Target</i>
TALEN	<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>
tracrRNA	<i>Trans-activating crRNA</i>
TRBP	<i>Human immunodeficiency trans activating response RNA-binding protein</i>
T7EI	T7 Endonuklease I
UTR	<i>Untranslated region</i>
W	Watt
WRN	<i>Werner syndrome ATP-dependent helicase</i>
w/v	<i>Weight/volume</i>
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XRCC4	<i>X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 4</i>
53BP1	<i>p53 binding protein 1</i>
°C	Grad Celsius
μ	Mikro

---

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Therapeutisches Genome Editing .....	3
Abbildung 1.2: Ex vivo / in vivo Genome Editing in der Retina.....	4
Abbildung 1.3: Darstellung der Zinkfinger-Nukleasen, Meganukleasen und TALEN .....	7
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung von CRISPR/Cas9 .....	9
Abbildung 1.5: Erkennung eines Doppelstrangbruchs .....	10
Abbildung 1.6: Darstellung von NHEJ und HDR .....	13
Abbildung 1.7: Wirkweise der siRNA und beteiligte Proteine .....	18
Abbildung 1.8: CRISPR/Cas9 vermittelter Gen-Knockout.....	19
Abbildung 1.9: Schematische Darstellung des Projekts .....	21
Abbildung 2.1: Vektorkarte des px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9).....	29
Abbildung 2.2: Vektorkarte des pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 .....	30
Abbildung 2.3: Vektorkarte des In6G2 Plasmids.....	30
Abbildung 2.4: Vektorkarte des NHEJ Sensorplasmids (In6T2).....	31
Abbildung 2.5: Vektorkarte des pTagGFP2-N.....	32
Abbildung 2.6: Prinzip des BRET Assays .....	55
Abbildung 2.7: Darstellung der NHEJ-Aktivität.....	56
Abbildung 3.1: Integration der Target- und Guide-Sequenzen in die Vektoren .....	60
Abbildung 3.2: Kontrollverdau des px459 Vektors mit integrierten Guide-Sequenzen 1,5,7.....	61
Abbildung 3.3: Identifizierung potenziell aktiver gRNA/Cas9 Konstrukte.....	63
Abbildung 3.4: Bestätigung potenziell aktiver gRNA/Cas9 Konstrukte in NIH 3T3 Zellen .....	64
Abbildung 3.5: Aktivität der gRNA/Cas9 Konstrukte im murinen Genom .....	66
Abbildung 3.6: Schema zur Messung der NHEJ-Aktivität nach dem Artemis Knockout .....	67
Abbildung 3.7: BRET Assay nach Transfektion der C2C12 Zellen mit Guide 1 (100- 2000 ng).....	69
Abbildung 3.8: BRET Assay nach Transfektion der C2C12 Zellen mit Guide 1,5,7 (500/2000 ng) .....	70
Abbildung 3.9: BRET Assay nach Transfektion der C2C12 Zellen mit Guide 1,5,7 (500/2000 ng) .....	71

Abbildung 3.10: BRET Assay nach Transfektion der C2C12 Zellen mit Guide 1,5,7 (1000 ng) .....	72
Abbildung 3.11: BRET Assay nach Transfektion der NIH 3T3 Zellen mit Guide 1,5,7 (2000 ng) .....	73
Abbildung 3.12: BRET Assay nach Transfektion der NIH 3T3 Zellen mit Guide 5 (3000/4000 ng).....	74
Abbildung 3.13: Schema zur Messung der NHEJ-Aktivität nach Verwendung von RNA- Interferenz.....	75
Abbildung 3.14: BRET Assay nach Transfektion der NIH 3T3 Zellen mit der siRNA (0,5- 5,0 pmol).....	76
Abbildung 4.1: NHEJ-Aktivitätsmessung nach Artemis Knockout/Knockdown .....	84

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Wirkung verschiedener Moleküle auf Reparaturwegproteine .....	16
Tabelle 2.1: Verwendete Geräte .....	22
Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	23
Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien .....	24
Tabelle 2.4: Weitere verwendete Puffer und Lösungen .....	26
Tabelle 2.5: Verwendete Antibiotika .....	26
Tabelle 2.6: Verwendete DNA Größenstandards.....	27
Tabelle 2.7: Verwendete Software.....	27
Tabelle 2.8: Verwendete Restriktionsenzyme .....	27
Tabelle 2.9: Weitere verwendete Enzyme .....	28
Tabelle 2.10: Verwendete Plasmide .....	28
Tabelle 2.11: Verwendete PCR Primer.....	33
Tabelle 2.12: Weitere verwendete Primer.....	33
Tabelle 2.13: Verwendete siRNA.....	33
Tabelle 2.14: Verwendete Bakterienstämme .....	35
Tabelle 2.15: Verwendete Zelllinien.....	35
Tabelle 2.16: Verwendete Kits.....	36
Tabelle 2.17: Reaktionsansatz für die Linearisierung von pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2..	38

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 2.18: Reaktionsansatz für die Linearisierung von px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9) .....	38
Tabelle 2.19: Reaktionsansatz für den Nachverdau von pRLuc8-AvrII/target1-7/BsiWI-GFP2 .....	38
Tabelle 2.20: Reaktionsansatz für den Kontrollverdau von px459 (pU6-BbsI/guide1,5,7/BbsI-CBA-Cas9) .....	38
Tabelle 2.21: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für Target- bzw. Guide-Hybridisierung .....	39
Tabelle 2.22: Zusammensetzung des Ligationsansatzes .....	39
Tabelle 2.23: Ansatz für die Sequenzierungen der rekombinanten Plasmide pRLuc8-AvrII/target1-7/BsiWI-GFP2 bzw. px459 (pU6-BbsI/guide1-7/BbsI-CBA-Cas9) .....	43
Tabelle 2.24: Transfektionsansatz zur Identifizierung potenziell aktiver gRNA/Cas9 Konstrukte in den humanen HEK 293T Zellen .....	51
Tabelle 2.25: Transfektionsansatz zur Bestätigung aktiver gRNA/Cas9 Konstrukte in den murinen NIH 3T3 Zellen .....	51
Tabelle 2.26: Transfektionsansatz zur Messung der NHEJ-Aktivität vor und nach einem Artemis-Knockout in den murinen C2C12- und NIH 3T3 Zellen .....	52
Tabelle 2.27: Transfektionsansatz zur Isolation genomischer DNA für das T7EI Assay .....	52
Tabelle 2.28: Transfektionsansatz zur Messung der NHEJ-Aktivität vor und nach einem Artemis-Knockdown in den murinen NIH 3T3 Zellen nach Transfektion mit siRNA .....	53
Tabelle 3.1: Verwendete Target- und Guide- Oligonukleotidsequenzen .....	59

## 10. Literaturverzeichnis

- Amarzguioi, Mohammed; Prydz, Hans (2004): An algorithm for selection of functional siRNA sequences. In: *Biochemical and biophysical research communications* 316 (4), S. 1050–1058. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.02.157.
- Arnould, Sylvain; Perez, Christophe; Cabaniols, Jean-Pierre; Smith, Julianne; Gouble, Agnès; Grizot, Sylvestre et al. (2007): Engineered I-Crel derivatives cleaving sequences from the human XPC gene can induce highly efficient gene correction in mammalian cells. In: *Journal of molecular biology* 371 (1), S. 49–65. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.04.079.
- Bennardo, Nicole; Cheng, Anita; Huang, Nick; Stark, Jeremy M. (2008): Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. In: *PLoS genetics* 4 (6), e1000110. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000110.
- Bennett, Jean (2017): Taking Stock of Retinal Gene Therapy: Looking Back and Moving Forward. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 25 (5), S. 1076–1094. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.03.008.
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic acids research* 7 (6), S. 1513–1523.
- Bitinaite, J.; Wah, D. A.; Aggarwal, A. K.; Schildkraut, I. (1998): FokI dimerization is required for DNA cleavage. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (18), S. 10570–10575.
- Blau, H. M.; Pavlath, G. K.; Hardeman, E. C.; Chiu, C. P.; Silberstein, L.; Webster, S. G. et al. (1985): Plasticity of the differentiated state. In: *Science (New York, N.Y.)* 230 (4727), S. 758–766.
- Brandtsma, Inger; Gent, Dik C. (2012): Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. In: *Genome integrity* 3 (1), S. 9. DOI: 10.1186/2041-9414-3-9.
- Cai, Bincui; Sun, Shuo; Li, Zhiqing; Zhang, Xiaomin; Ke, Yifeng; Yang, Jin; Li, Xiaorong (2018): Application of CRISPR/Cas9 technologies combined with iPSCs in the study and treatment of retinal degenerative diseases. In: *Human genetics* 137 (9), S. 679–688. DOI: 10.1007/s00439-018-1933-9.
- Carroll, Dana (2011): Genome engineering with zinc-finger nucleases. In: *Genetics* 188 (4), S. 773–782. DOI: 10.1534/genetics.111.131433.
- Chan, Lawrence; Mahajan, Vinit B.; Tsang, Stephen H. (2017): Genome Surgery and Gene Therapy in Retinal Disorders. In: *The Yale Journal of Biology and Medicine* 90 (4), S. 523–532.
-

- Chang, Howard H. Y.; Lieber, Michael R. (2016): Structure-Specific nuclease activities of Artemis and the Artemis: DNA-PKcs complex. In: *Nucleic acids research* 44 (11), S. 4991–4997. DOI: 10.1093/nar/gkw456.
- Chang, Howard H. Y.; Pannunzio, Nicholas R.; Adachi, Noritaka; Lieber, Michael R. (2017): Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 18 (8), S. 495–506. DOI: 10.1038/nrm.2017.48.
- Chen, Fuqiang; Pruetz-Miller, Shondra M.; Huang, Yuping; Gjoka, Monika; Duda, Katarzyna; Taunton, Jack et al. (2011): High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. In: *Nature methods* 8 (9), S. 753–755. DOI: 10.1038/nmeth.1653.
- Cho, Seung Woo; Kim, Sojung; Kim, Jong Min; Kim, Jin-Soo (2013): Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. In: *Nature Biotechnology* 31 (3), S. 230. DOI: 10.1038/nbt.2507.
- Choulika, A.; Perrin, A.; Dujon, B.; Nicolas, J. F. (1995): Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular and Cellular Biology* 15 (4), S. 1968–1973.
- Chuang, Katherine; Fields, Mark A.; Del Priore, Lucian V. (2017): Potential of Gene Editing and Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) in Treatment of Retinal Diseases. In: *The Yale Journal of Biology and Medicine* 90 (4), S. 635–642.
- Copeland, Neal G.; Cooper, Geoffrey M. (1979): Transfection by exogenous and endogenous murine retrovirus DNAs. In: *Cell* 16 (2), S. 347–356. DOI: 10.1016/0092-8674(79)90011-4.
- Cox, David Benjamin Turitz; Platt, Randall Jeffrey; Zhang, Feng (2015): Therapeutic genome editing: prospects and challenges. In: *Nature medicine* 21 (2), S. 121–131. DOI: 10.1038/nm.3793.
- Cubbon, Andrew; Ivancic-Bace, Ivana; Bolt, Edward L. (2018): CRISPR-Cas immunity, DNA repair and genome stability. In: *Bioscience reports* 38 (5). DOI: 10.1042/BSR20180457.
- Daiger, S. P.; Sullivan, L. S.; Bowne, S. J. (2013): Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. In: *Clinical genetics* 84 (2), S. 132–141. DOI: 10.1111/cge.12203.
- De, Abhijit; Loening, Andreas Markus; Gambhir, Sanjiv Sam (2007): An improved bioluminescence resonance energy transfer strategy for imaging intracellular events in single cells and living subjects. In: *Cancer research* 67 (15), S. 7175–7183. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4623.

- Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. In: *Nature* 411 (6836), S. 494–498. DOI: 10.1038/35078107.
- Fakhr, E.; Zare, F.; Teimoori-Toolabi, L. (2016): Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing. In: *Cancer gene therapy* 23 (4), S. 73–82. DOI: 10.1038/cgt.2016.4.
- Fell, Victoria L.; Schild-Poulter, Caroline (2015): The Ku heterodimer: function in DNA repair and beyond. In: *Mutation research. Reviews in mutation research* 763, S. 15–29. DOI: 10.1016/j.mrrev.2014.06.002.
- Fernández, Almudena; Josa, Santiago; Montoliu, Lluís (2017): A history of genome editing in mammals. In: *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 28 (7-8), S. 237–246. DOI: 10.1007/s00335-017-9699-2.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 391 (6669), S. 806–811. DOI: 10.1038/35888.
- Gaj, Thomas; Gersbach, Charles A.; Barbas, Carlos F. (2013): ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. In: *Trends in biotechnology* 31 (7), S. 397–405. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
- Gavrilov, Kseniya; Saltzman, W. Mark (2012): Therapeutic siRNA: Principles, Challenges, and Strategies. In: *The Yale Journal of Biology and Medicine* 85 (2), S. 187–200.
- Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. In: *The Journal of general virology* 36 (1), S. 59–74. DOI: 10.1099/0022-1317-36-1-59.
- Grizot, Sylvestre; Smith, Julianne; Daboussi, Fayza; Prieto, Jesús; Redondo, Pilar; Merino, Nekane et al. (2009): Efficient targeting of a SCID gene by an engineered single-chain homing endonuclease. In: *Nucleic acids research* 37 (16), S. 5405–5419. DOI: 10.1093/nar/gkp548.
- Guha, Tuhin K.; Edgell, David R. (2017): Applications of Alternative Nucleases in the Age of CRISPR/Cas9. In: *International journal of molecular sciences* 18 (12). DOI: 10.3390/ijms18122565.

- Hauk, Andrea (2013): Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. In: *Biologie in unserer Zeit* 43 (5), S. 278. DOI: 10.1002/biuz.201390093.
- Hermey, Guido (2011): Der Experimentator: Neurowissenschaften. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag (Experimentator). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-8274-2369-6>.
- Hu, Bo; Weng, Yuhua; Xia, Xin-Hua; Liang, Xing-Jie; Huang, Yuanyu (2019): Clinical advances of siRNA therapeutics. In: *The journal of gene medicine*, e3097. DOI: 10.1002/jgm.3097.
- Huang, Jiaojiao; Wang, Yanfang; Zhao, Jianguo (2018): CRISPR editing in biological and biomedical investigation. In: *Journal of cellular physiology* 233 (5), S. 3875–3891. DOI: 10.1002/jcp.26141.
- Hung, Sandy S. C.; McCaughey, Tristan; Swann, Olivia; Pébay, Alice; Hewitt, Alex W. (2016): Genome engineering in ophthalmology: Application of CRISPR/Cas to the treatment of eye disease. In: *Progress in retinal and eye research* 53, S. 1–20. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2016.05.001.
- Iizumi, Susumu; Kurosawa, Aya; So, Sairei; Ishii, Yasuyuki; Chikaraishi, Yuichi; Ishii, Ayako et al. (2008): Impact of non-homologous end-joining deficiency on random and targeted DNA integration: implications for gene targeting. In: *Nucleic acids research* 36 (19), S. 6333–6342. DOI: 10.1093/nar/gkn649.
- Ipsaro, Jonathan J.; Joshua-Tor, Leemor (2015): From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. In: *Nature structural & molecular biology* 22 (1), S. 20–28. DOI: 10.1038/nsmb.2931.
- Jayathilaka, Krishanthi; Sheridan, Sean D.; Bold, Tyler D.; Bochenska, Katarzyna; Logan, Hillary L.; Weichselbaum, Ralph R. et al. (2008): A chemical compound that stimulates the human homologous recombination protein RAD51. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (41), S. 15848–15853. DOI: 10.1073/pnas.0808046105.
- Jinek, Martin; Chylinski, Krzysztof; Fonfara, Ines; Hauer, Michael; Doudna, Jennifer A.; Charpentier, Emmanuelle (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096), S. 816–821. DOI: 10.1126/science.1225829.
- Jinek, Martin; East, Alexandra; Cheng, Aaron; Lin, Steven; Ma, Enbo; Doudna, Jennifer (2013): RNA-programmed genome editing in human cells. In: *eLife* 2. DOI: 10.7554/eLife.00471.

- Joung, J. Keith; Sander, Jeffrey D. (2013): TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (1), S. 49–55. DOI: 10.1038/nrm3486.
- Kakarougkas, A.; Jeggo, P. A. (2014): DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. In: *The British journal of radiology* 87 (1035), S. 20130685. DOI: 10.1259/bjr.20130685.
- Kim, Eunji; Koo, Taeyoung; Park, Sung Wook; Kim, Daesik; Kim, Kyoungmi; Cho, Hee-Yeon et al. (2017): In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. In: *Nature Communications* 8, S. 14500. DOI: 10.1038/ncomms14500.
- Kim, Y. G.; Cha, J.; Chandrasegaran, S. (1996): Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. In: *PNAS* 93 (3), S. 1156–1160. DOI: 10.1073/pnas.93.3.1156.
- Kühn, R.; Schwenk, F. (1997): Advances in gene targeting methods. In: *Current Opinion in Immunology* 9 (2), S. 183–188.
- Kurosawa, Aya; Koyama, Hideki; Takayama, Shinichi; Miki, Kensuke; Ayusawa, Dai; Fujii, Michihiko et al. (2008): The requirement of Artemis in double-strand break repair depends on the type of DNA damage. In: *DNA and cell biology* 27 (1), S. 55–61. DOI: 10.1089/dna.2007.0649.
- Kurosawa, Aya; Saito, Shinta; So, Sairei; Hashimoto, Mitsumasa; Iwabuchi, Kuniyoshi; Watabe, Haruka; Adachi, Noritaka (2013): DNA ligase IV and artemis act cooperatively to suppress homologous recombination in human cells: implications for DNA double-strand break repair. In: *PLoS one* 8 (8), e72253. DOI: 10.1371/journal.pone.0072253.
- Lee, Yoontae; Ahn, Chiyoung; Han, Jinju; Choi, Hyounjeong; Kim, Jaekwang; Yim, Jeongbin et al. (2003): The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. In: *Nature* 425 (6956), S. 415–419. DOI: 10.1038/nature01957.
- Li, Guoling; Liu, Dewu; Zhang, Xianwei; Quan, Rong; Zhong, Cuili; Mo, Jianxin et al. (2018): Suppressing Ku70/Ku80 expression elevates homology-directed repair efficiency in primary fibroblasts. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 99, S. 154–160. DOI: 10.1016/j.biocel.2018.04.011.
- Li, Guoling; Zhang, Xianwei; Zhong, Cuili; Mo, Jianxin; Quan, Rong; Yang, Jie et al. (2017): Small molecules enhance CRISPR/Cas9-mediated homology-directed genome editing in primary cells. In: *Scientific Reports* 7 (1), S. 8943. DOI: 10.1038/s41598-017-09306-x.

- Lieber, Michael R. (2008): The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (1), S. 1–5. DOI: 10.1074/jbc.R700039200.
- Lieber, Michael R. (2010): The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. In: *Annual review of biochemistry* 79, S. 181–211. DOI: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.
- Loening, Andreas Markus; Fenn, Timothy David; Wu, Anna M.; Gambhir, Sanjiv Sam (2006): Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. In: *Protein engineering, design & selection : PEDS* 19 (9), S. 391–400. DOI: 10.1093/protein/gzl023.
- Low, Benjamin E.; Krebs, Mark P.; Joung, J. Keith; Tsai, Shengdar Q.; Nishina, Patsy M.; Wiles, Michael V. (2014): Correction of the Crb1rd8 allele and retinal phenotype in C57BL/6N mice via TALEN-mediated homology-directed repair. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 55 (1), S. 387–395. DOI: 10.1167/iovs.13-13278.
- Ma, Sanyuan; Chang, Jiasong; Wang, Xiaogang; Liu, Yuanyuan; Zhang, Jianduo; Lu, Wei et al. (2014): CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of BmKu70 in Bombyx mori. In: *Scientific Reports* 4, S. 4489. DOI: 10.1038/srep04489.
- Maeder, Morgan L.; Gersbach, Charles A. (2016): Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 24 (3), S. 430–446. DOI: 10.1038/mt.2016.10.
- Maruyama, Takeshi; Dougan, Stephanie K.; Truttmann, Matthias C.; Bilate, Angelina M.; Ingram, Jessica R.; Ploegh, Hidde L. (2015): Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. In: *Nature Biotechnology* 33 (5), S. 538–542. DOI: 10.1038/nbt.3190.
- Mashal, R. D.; Koontz, J.; Sklar, J. (1995): Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases. In: *Nature genetics* 9 (2), S. 177–183.
- Moscariello, Mario; Wieloch, Radi; Kurosawa, Aya; Li, Fanghua; Adachi, Noritaka; Mladenov, Emil; Iliakis, George (2015): Role for Artemis nuclease in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks by alternative end joining. In: *DNA repair* 31, S. 29–40. DOI: 10.1016/j.dnarep.2015.04.004.
- Moshous, Despina; Callebaut, Isabelle; Chasseval, Régina de; Corneo, Barbara; Cavazzana-Calvo, Marina; Le Deist, Françoise et al. (2001): Artemis, a Novel DNA Double-Strand Break Repair/V(D)J Recombination Protein, Is Mutated in
-

- Human Severe Combined Immune Deficiency. In: *Cell* 105 (2), S. 177–186. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00309-9.
- Mülhardt, Cornel (2013): *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S.21 und S.82 ff.
- Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y.; Hofschneider, P. H. (1982): Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. In: *The EMBO Journal* 1 (7), S. 841–845. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x.
- Ozcan, Gulnihal; Ozpolat, Bulent; Coleman, Robert L.; Sood, Anil K.; Lopez-Berestein, Gabriel (2015): Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. In: *Advanced drug delivery reviews* 87, S. 108–119. DOI: 10.1016/j.addr.2015.01.007.
- Pannunzio, Nicholas R.; Li, Sicong; Watanabe, Go; Lieber, Michael R. (2014): Non-homologous end joining often uses microhomology: implications for alternative end joining. In: *DNA repair* 17, S. 74–80. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.02.006.
- Peddle, Caroline F.; MacLaren, Robert E. (2017): The Application of CRISPR/Cas9 for the Treatment of Retinal Diseases. In: *The Yale Journal of Biology and Medicine* 90 (4), S. 533–541.
- Pfleger, Kevin D. G.; Eidne, Karin A. (2006): Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). In: *Nat Methods* 3 (3), S. 165–174. DOI: 10.1038/nmeth841.
- Pinder, Jordan; Salsman, Jayme; Dellaire, Graham (2015): Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. In: *Nucleic acids research* 43 (19), S. 9379–9392. DOI: 10.1093/nar/gkv993.
- Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Wright, Jason; Agarwala, Vineeta; Scott, David A.; Zhang, Feng (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. In: *Nature protocols* 8 (11), S. 2281–2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143.
- Rassow, Joachim; Hauser, Karin; Netzker, Roland; Deutzmann, Rainer (2016): *Biochemie*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S.484-485.
- Reynolds, Angela; Leake, Devin; Boese, Queta; Scaringe, Stephen; Marshall, William S.; Khvorova, Anastasia (2004): Rational siRNA design for RNA interference. In: *Nature Biotechnology* 22 (3), S. 326–330. DOI: 10.1038/nbt936.
- Robert, Francis; Barbeau, Mathilde; Éthier, Sylvain; Dostie, Josée; Pelletier, Jerry (2015): Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. In: *Genome medicine* 7, S. 93. DOI: 10.1186/s13073-015-0215-6.

- Saito, Shinta; Adachi, Noritaka (2016): Advances in the Development of Gene-Targeting Vectors to Increase the Efficiency of Genetic Modification. In: *Biological & pharmaceutical bulletin* 39 (1), S. 25–32. DOI: 10.1248/bpb.b15-00701.
- Sanjurjo-Soriano, Carla; Kalatzis, Vasiliki (2018): Guiding Lights in Genome Editing for Inherited Retinal Disorders: Implications for Gene and Cell Therapy. In: *Neural plasticity* 2018, S. 5056279. DOI: 10.1155/2018/5056279.
- Schlegel, J.; Hoffmann, J.; Röhl, D.; Müller, B.; Günther, S.; Zhang, W. et al. (2019): Toward genome editing in X-linked RP-development of a mouse model with specific treatment relevant features. In: *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 203, S. 57–72. DOI: 10.1016/j.trsl.2018.08.006.
- Seol, Ja-Hwan; Shim, Eun Yong; Lee, Sang Eun (2018): Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. In: *Mutation research* 809, S. 81–87. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2017.07.002.
- Sfeir, Agnel; Symington, Lorraine S. (2015): Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? In: *Trends in biochemical sciences* 40 (11), S. 701–714. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.08.006.
- Shalem, Ophir; Sanjana, Neville E.; Hartenian, Ella; Shi, Xi; Scott, David A.; Mikkelsen, Tarjei et al. (2014): Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 343 (6166), S. 84–87. DOI: 10.1126/science.1247005.
- Silva, George; Poirot, Laurent; Galetto, Roman; Smith, Julianne; Montoya, Guillermo; Duchateau, Philippe; Paques, Frederic (2011): Meganucleases and Other Tools for Targeted Genome Engineering: Perspectives and Challenges for Gene Therapy. In: *CGT* 11 (1), S. 11–27. DOI: 10.2174/156652311794520111.
- Simunovic, M. P.; Shen, W.; Lin, J. Y.; Protti, D. A.; Lisowski, L.; Gillies, M. C. (2019): Optogenetic approaches to vision restoration. In: *Experimental eye research* 178, S. 15–26. DOI: 10.1016/j.exer.2018.09.003.
- Smirnikhina, Svetlana A.; Anuchina, Arina A.; Lavrov, Alexander V. (2019): Ways of improving precise knock-in by genome-editing technologies. In: *Human genetics* 138 (1), S. 1–19. DOI: 10.1007/s00439-018-1953-5.
- Sonawane, N. D.; Szoka, Francis C.; Verkman, A. S. (2003): Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (45), S. 44826–44831. DOI: 10.1074/jbc.M308643200.

- Song, Jun; Yang, Dongshan; Xu, Jie; Zhu, Tianqing; Chen, Y. Eugene; Zhang, Jifeng (2016): RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. In: *Nature Communications* 7, S. 10548. DOI: 10.1038/ncomms10548.
- Stoddard, Barry L. (2014): Homing endonucleases from mobile group I introns: discovery to genome engineering. In: *Mobile DNA* 5 (1), S. 7. DOI: 10.1186/1759-8753-5-7.
- Symington, Lorraine S.; Gautier, Jean (2011): Double-strand break end resection and repair pathway choice. In: *Annual review of genetics* 45, S. 247–271. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132435.
- Tebas, Pablo; Stein, David; Tang, Winson W.; Frank, Ian; Wang, Shelley Q.; Lee, Gary et al. (2014): Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. In: *The New England journal of medicine* 370 (10), S. 901–910. DOI: 10.1056/NEJMoa1300662.
- Todaro, George J.; Green, Howard (1963): QUANTITATIVE STUDIES OF THE GROWTH OF MOUSE EMBRYO CELLS IN CULTURE AND THEIR DEVELOPMENT INTO ESTABLISHED LINES. In: *The Journal of Cell Biology* 17 (2), S. 299–313.
- Tokunaga, Akinori; Anai, Hirofumi; Hanada, Katsuhiko (2016): Mechanisms of gene targeting in higher eukaryotes. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73 (3), S. 523–533. DOI: 10.1007/s00018-015-2073-1.
- van Chu, Trung; Weber, Timm; Wefers, Benedikt; Wurst, Wolfgang; Sander, Sandrine; Rajewsky, Klaus; Kühn, Ralf (2015): Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. In: *Nature Biotechnology* 33 (5), S. 543–548. DOI: 10.1038/nbt.3198.
- Verbakel, Sanne K.; van Huet, Ramon A. C.; Boon, Camiel J. F.; den Hollander, Anneke I.; Collin, Rob W. J.; Klaver, Caroline C. W. et al. (2018): Non-syndromic retinitis pigmentosa. In: *Progress in retinal and eye research* 66, S. 157–186. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2018.03.005.
- Vouillot, Léna; Thélie, Aurore; Pollet, Nicolas (2015): Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. In: *G3 (Bethesda, Md.)* 5 (3), S. 407–415. DOI: 10.1534/g3.114.015834.
- Wilson, Ross C.; Doudna, Jennifer A. (2013): Molecular mechanisms of RNA interference. In: *Annual review of biophysics* 42, S. 217–239. DOI: 10.1146/annurev-biophys-083012-130404.

- Wimmer, T.; Lorenz, B.; Stieger, K. (2016): Quantification of the vascular endothelial growth factor with a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) based single molecule biosensor. In: *Biosensors & bioelectronics* 86, S. 609–615. DOI: 10.1016/j.bios.2016.07.058.
- Wirth, Matthias; Fritsche, Petra; Stojanovic, Natasa; Brandl, Martina; Jaeckel, Stephanie; Schmid, Roland M. et al. (2011): A simple and cost-effective method to transfect small interfering RNAs into pancreatic cancer cell lines using polyethylenimine. In: *Pancreas* 40 (1), S. 144–150. DOI: 10.1097/MPA.0b013e3181f7e41c.
- Yaffe, D.; Saxel, O. (1977): Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. In: *Nature* 270 (5639), S. 725–727.
- Yang, Diane; Scavuzzo, Marissa A.; Chmielowiec, Jolanta; Sharp, Robert; Bajic, Aleksandar; Borowiak, Malgorzata (2016): Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. In: *Scientific Reports* 6, S. 21264. DOI: 10.1038/srep21264.
- Yanik, Mert; Müller, Brigitte; Song, Fei; Gall, Jacqueline; Wagner, Franziska; Wende, Wolfgang et al. (2017): In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies. In: *Progress in retinal and eye research* 56, S. 1–18. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2016.09.001.
- Yi, Rui; Qin, Yi; Macara, Ian G.; Cullen, Bryan R. (2003): Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. In: *Genes & development* 17 (24), S. 3011–3016. DOI: 10.1101/gad.1158803.
- Yin, Hao; Kauffman, Kevin J.; Anderson, Daniel G. (2017): Delivery technologies for genome editing. In: *Nature reviews. Drug discovery* 16 (6), S. 387–399. DOI: 10.1038/nrd.2016.280.
- Yu, Chen; Liu, Yanxia; Ma, Tianhua; Liu, Kai; Xu, Shaohua; Zhang, Yu et al. (2015): Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. In: *Cell stem cell* 16 (2), S. 142–147. DOI: 10.1016/j.stem.2015.01.003.
- Yuan, Jingsong; Adamski, Rachel; Chen, Junjie (2010): Focus on histone variant H2AX: to be or not to be. In: *FEBS letters* 584 (17), S. 3717–3724. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.05.021.
- Zhang, Jian-Ping; Li, Xiao-Lan; Li, Guo-Hua; Chen, Wanqiu; Arakaki, Cameron; Botimer, Gary D. et al. (2017): Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. In: *Genome biology* 18 (1), S. 35. DOI: 10.1186/s13059-017-1164-8.

Zhu, Li; Mon, Hiroaki; Xu, Jian; Lee, Jae Man; Kusakabe, Takahiro (2015): CRISPR/Cas9-mediated knockout of factors in non-homologous end joining pathway enhances gene targeting in silkworm cells. In: *Scientific Reports* 5, S. 18103. DOI: 10.1038/srep18103.

---

# 11. Erklärung zur Dissertation

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 nicht veröffentlichten 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.

Gießen, 29.09.2020

---

Ort, Datum



---

Unterschrift

---

## 12. Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger für die Bereitstellung des Themas, die umfangreiche Betreuung, den stetigen wissenschaftlichen Austausch und das Korrekturlesen der Dissertation bedanken.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Herrn Dr. Tobias Wimmer für die Einführung in die Laborarbeit, sowie für die Hilfestellung bei den zahlreichen Versuchen und das Korrekturlesen der Dissertation. Insbesondere möchte ich mich für die gute Betreuung und die stets positive Zusammenarbeit bedanken.

Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz danke ich für die Bereitstellung der Laborräume und für die Ermöglichung dieses Projekts.

Herrn PD Dr. Markus Preising und Frau Dr. Brigitte Müller danke ich für die wissenschaftliche Diskussion sowie für zahlreiche dieses Projekt betreffende Anregungen.

Weiterhin möchte ich Frau Annabella Janise für die Hilfestellung bei der Laborarbeit sowie die stetige Ansprechbarkeit bei Unklarheiten danken.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Experimentelle Ophthalmologie für die angenehme Atmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

Schließlich bedanke ich mich herzlichst bei meinen Eltern für die stetige Unterstützung und das Ermöglichen des Studiums und der Promotion.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6888-2



9 783835 196888 2