

# Die Rolle der humanen RNase H2 bei der Mobilisierung von non-LTR-Retrotransposonen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

am Biochemischen Institut

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Katharina Knittler

Kiel, 2017



Erstgutachter: Prof. Dr. Stefan Rose-John

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2017

Zum Druck genehmigt: 04.07.2017

gez. Prof. Dr. Natascha Oppelt, Dekanin

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Das Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS).....	1
1.2	Endogene Retroelemente .....	3
1.3	Die Ribonuklease H2 .....	9
1.4	Weitere mit AGS assoziierte Gene .....	13
1.5	Die Genom-Editierungstechnik CRISPR-Cas9.....	15
1.6	Zielsetzung dieser Dissertation .....	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1	Material.....	19
2.1.1	Geräte .....	19
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	20
2.1.3	Chemikalien.....	21
2.1.4	Antibiotika.....	22
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	22
2.1.6	<i>Kits</i> .....	24
2.1.7	Enzyme .....	24
2.1.8	Antikörper .....	25
2.1.9	Größenstandards .....	26
2.1.10	Oligonukleotide.....	26
2.1.11	Plasmide .....	29
2.1.12	Zellkulturmedien .....	33
2.1.13	Organismen.....	33
2.2	Methoden.....	36
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.1.1	Isolierung von genomischer DNA .....	36
2.2.1.2	Plasmid-DNA-Präparation.....	36

2.2.1.3	Nachweis von Ribonukleotid-Insertionen in genomischer DNA ( <i>nick-translation assay</i> ).....	37
2.2.1.4	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	38
2.2.1.5	Natriumacetat-Fällung von DNA .....	40
2.2.1.6	Säulenbasierte Aufreinigung von DNA .....	40
2.2.1.7	Enzymatische Hydrolyse von DNA.....	41
2.2.1.8	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	41
2.2.1.9	Phosphorylierung und Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	42
2.2.1.10	Ligation .....	42
2.2.1.11	Agarose-Gelelektrophorese.....	43
2.2.1.12	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....	43
2.2.1.13	Transformation von chemisch-kompetenten <i>Escherichia coli</i> Bakterien.....	43
2.2.1.14	Isolierung von RNA .....	44
2.2.1.15	cDNA-Synthese .....	45
2.2.1.16	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) .....	45
2.2.1.17	Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen.....	47
2.2.1.18	Sequenzierung von DNA.....	47
2.2.2	Immunologische Methoden.....	47
2.2.2.1	Zelllyse zur Gewinnung von Gesamtproteinextrakten für die SDS-PAGE .....	47
2.2.2.2	Zelllyse zur Gewinnung von Gesamtproteinextrakten für RNASEH1/2-Aktivitätstests .....	47
2.2.2.3	Quantitative Proteinbestimmung.....	48
2.2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	48
2.2.2.5	Immunoblot ( <i>western blot</i> ) .....	49
2.2.2.6	Rehybridisierung von PVDF-Membranen.....	50
2.2.2.7	RNASEH1/2-Aktivitätstest.....	50
2.2.2.8	Immuncytochemischer Nachweis von Mikronuklei .....	52
2.2.3	Zellbiologische Methoden .....	53
2.2.3.1	Kultivierung von adhärenenten Zellen .....	53
2.2.3.2	Kryokonservierung von Zellen .....	53
2.2.3.3	Erstellung von Wachstumskurven .....	53
2.2.3.4	Zellproliferationsmessung .....	54

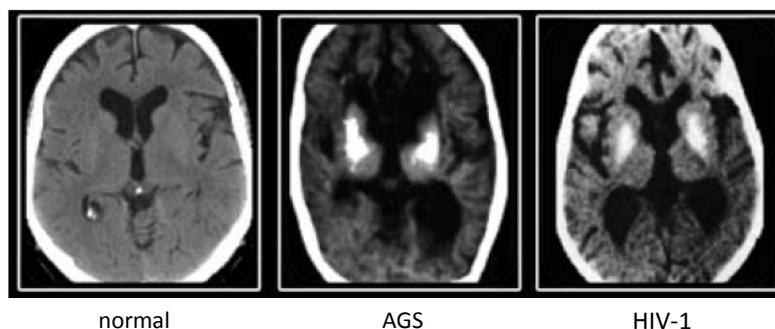
2.2.3.5	Erstellung von Antibiotika-Dosis-Wirkungs-Kurven .....	54
2.2.3.6	Transfektion.....	54
2.2.3.7	Lentivirale Transduktion .....	55
2.2.3.8	Erzeugung von RNASEH2A-defizienten Zellen.....	56
2.2.3.9	Luciferasebasierter Nachweis von genomischen LINE-1-Integrationen .....	57
2.2.3.10	eGFP-basierter Nachweis von genomischen LINE-1-Integrationen .....	60
2.2.3.11	Neomycinresistenzgen-basierter Nachweis von genomischen Alu-Integrationen .....	61
2.2.4	Statistische Auswertung .....	62
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
3.1	Generierung von RNASEH2A-defizienten Zelllinien.....	63
3.1.1	Klonierung von Plasmiden für die humane Genom-Editierung.....	64
3.1.1.1	Generelle Erwägungen zur Auswahl der Zielsequenz .....	64
3.1.1.2	CRISPR-Cas9-Genom-Editierungsplasmide.....	66
3.1.2	RNASEH2A-Indikator-Zelllinie .....	68
3.1.2.1	Erzeugung einer murinen Indikator-Zelllinie.....	69
3.1.2.2	Identifizierung von Editierungs-Plasmiden mit höchster Effizienz.....	70
3.1.3	CRISPR-Cas9-vermittelte Genom-Editierung humaner Zellen.....	72
3.2	Charakterisierung der RNASEH2A-defizienten Zelllinien.....	74
3.2.1	Allgemeine Charakterisierung.....	74
3.2.1.1	Die RNase H2-Expression in Parental- und <i>knockout</i> -Zellen.....	75
3.2.1.2	Die RNASEH2A-Defizienz hat Einfluss auf die Zellproliferation.....	78
3.2.1.3	Akkumulieren RNASEH2A-defiziente Zellen mehr DNA-Schäden? .....	80
3.2.1.4	RNASEH2A-defiziente HeLa-Zellen weisen eine ISG-Signatur auf.....	88
3.2.2	Charakterisierung von Retroelementexpression und -aktivität .....	90
3.2.2.1	Die Expression von Retroelementen ist nicht signifikant verändert in <i>knockout</i> -Zelllinien.....	90
3.2.2.2	RNASEH2A-defiziente 293T-Zellen zeigen eine verminderte LINE-1-Retrotranspositionsaktivität .....	91

3.2.2.3	RNASEH2A-defiziente HeLa-Zellen weisen eine verminderte Alu-Retrotranspositionsaktivität auf .....	92
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>94</b>
4.1	Das CRISPR-Cas9-System ist geeignet für die Generierung RNASEH2A-defizienter Zelllinien .....	94
4.2	Die humane RNase H2 ist als essentielles Enzym an der Beseitigung von DNA-Schäden beteiligt.....	97
4.2.1	RNASEH2A-defiziente Zellen weisen vermehrte DNA-Schäden auf.....	100
4.2.2	Gibt es alternative Reparaturprozesse in RNase H2-defizienten Zellen?.....	102
4.2.3	Die AGS-typische Interferonsignatur lässt sich nur teilweise nachweisen.....	105
4.3	Die RNase H2 wirkt sich fördernd auf die Retrotransposition von LINE-1- und Alu-Elementen aus.....	106
4.4	Ausblick .....	111
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>115</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>124</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
<b>11</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>147</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>155</b>
<b>13</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>156</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Das Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS)

Anfang der 1980er Jahre beschrieben die Ärzte Jean François Aicardi und Françoise Goutières erstmalig eine seltene, frühkindliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, die später unter dem Namen Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS) bekannt wurde (Aicardi und Goutières, 1984). Ihr Phänotyp zeigt klinische und biochemische Überlappungen mit einer intra-uterin erworbenen Virusinfektion, obgleich keine Viren nachweisbar sind. So enthalten beispielsweise sowohl das Serum als auch die Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit (*‘cerebrospinal fluid‘*, CSF) vieler Patienten das Cytokin Interferon- (IFN)  $\alpha$  (Lebon *et al.*, 1988). Außerdem lässt sich in 90 % der Betroffenen eine sog. ISG-Signatur feststellen, d.h. eine erhöhte Expression von Interferon-stimulierten Genen (ISGs) in peripherem Blut (Rice *et al.*, 2013). Hohe IFN- $\alpha$ -Spiegel finden sich auch in Patienten mit einer intra-uterin erworbenen HIV-1- (humanes Immundefizienz-Virus 1) Infektion, ebenso wie Kalkansammlungen im Gehirn sowie eine Verminderung der weißen Substanz (DeCarli *et al.*, 1993; Francis *et al.*, 1992; Kauffman *et al.*, 1992), Symptome, die ebenfalls bei AGS zutage treten (siehe Abbildung 1). Daneben führt AGS bei 40 % der Betroffenen zur Bildung entzündlicher Haut-Läsionen, die sich als Ausschlag am ganzen Körper oder als Frostbeulen (*‘chilblains‘*) besonders an Händen, Füßen und Ohren manifestieren (Crow, 1993; Tolmie *et al.*, 1995). Auch für die gleichzeitige Ausprägung sowie immunologische Überlappungen von AGS mit einer weiteren Autoimmun-Erkrankung, dem systemischen *Lupus erythematoses* (SLE), gibt es belegte Fälle (Dale *et al.*, 2000; Ramantani *et al.*, 2010).



**Abbildung 1: Horizontale computertomografische Aufnahmen des Großhirns gesunder, an AGS- sowie an intra-uterin erworbener HIV-1-Infektion erkrankter Individuen (aus Reijns und Jackson (2014)).** Erkennbar sind Kalkansammlungen (weiß) sowie Atrophie der weißen Substanz (schwarz).

Meist lassen sich AGS-Patienten einem von zwei klinischen Profilen zuordnen: bei ca. 23 % entwickeln sich deutliche Defekte bereits während der Embryonalentwicklung in der maternalen Gebärmutter, wohingegen die überwiegende Mehrheit (ca. 69 %) einen postnatalen Krankheitsbeginn zeigt, der häufig innerhalb des ersten Lebensjahres eintritt. Je nach Schweregrad der Erkrankung zeigen die Betroffenen starke Behinderungen in ihren Bewegungs-, Sprach- und intellektuellen Funktionen bis hin zum frühzeitigen Tod (Crow *et al.*, 2015).

Ausgelöst wird AGS durch monogene Mutationen in Genen, die mit dem Nukleinsäure-Metabolismus oder der -Signaltransduktion in Verbindung stehen. Derzeit bekannt sind sieben betroffene Gene, am häufigsten finden sich AGS-auslösende Mutationen jedoch in den für die drei Untereinheiten der Ribonuklease H2 codierenden Genen *RNASEH2A*, *RNASEH2B* und *RNASEH2C* (Crow *et al.*, 2015; Crow *et al.*, 2006b). Darüber hinaus betroffen sind die Desoxyribonuklease TREX1 (*,three prime repair exonuclease 1'*) (Crow *et al.*, 2006a), die Desoxynukleosid-Triphosphat-Triphosphohydrolase und Ribonuklease SAMHD1 (*,SAM domain and HD domain 1'*) (Rice *et al.*, 2009), die Adenosin-Deaminase ADAR1 (*,adenosine deaminase acting on RNA 1'*) (Rice *et al.*, 2012) sowie der Rezeptor für doppelsträngige RNA MDA5 (*,melanoma differentiation-associated protein 5'*), der auch unter dem Namen IFIH1 (*,IFN-induced helicase C domain containing protein 1'*) geführt wird (Rice *et al.*, 2014).

Für gewöhnlich handelt es sich bei AGS um eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit, die bis auf wenige Ausnahmen durch einen Verlust bzw. die Einschränkung der Proteinfunktion ausgelöst wird. Die AGS-relevanten *IFIH1*-Mutationen hingegen stellen ausnahmslos *,gain-of-function'*-Mutationen dar, also Veränderungen des Erbguts, die zu einer Aktivitätsverstärkung des Proteins führen. Einhergehend mit der Vielzahl beschriebener Mutationen in den oben genannten Genen zeigen die auftretenden klinischen Symptome eine solche Bandbreite, dass inzwischen auch der Begriff *,Typ-I-Interferonopathie'* geläufig ist. Er beschreibt eben solche monogenen Erkrankungen, bei welchen eine konstitutive Aktivierung des Typ-I-Interferon-Signalweges als ursächlich für die Krankheitsentwicklung angesehen wird (Crow, 2011; Crow und Manel, 2015).

IFN- $\alpha$  ist als pro-inflammatorisches Cytokin ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunabwehr zum Schutz vor Viren. Als Quelle der IFN-Produktion wurde bei AGS-Patienten das Gehirn, genauer gesagt die Astrocyten, identifiziert, was sich mit der Erkennt-

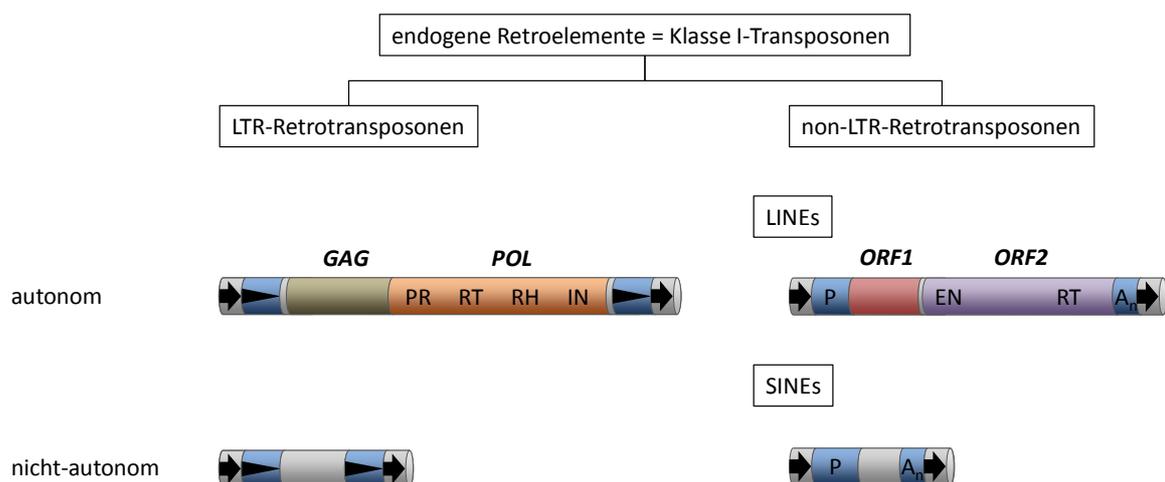
nis deckt, dass die IFN- $\alpha$ -Spiegel im CSF höher sind als im Serum der Betroffenen (Crow *et al.*, 2015; Van Heteren *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von IFN- $\alpha$  in Astrocyten transgener Mäuse zu einer voranschreitenden, entzündlichen Enzephalopathie mit Übereinstimmungen im Krankheitsbild zu AGS führt, was für IFN- $\alpha$  als auslösenden Faktor bei der Entstehung des Aicardi-Goutières-Syndroms spricht (Akwa *et al.*, 1998). Gebildet wird es nach der Erkennung viraler Nukleinsäuren, die als sog. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) von Mustererkennungsrezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRRs) gebunden werden und so eine Signalkaskade auslösen. Die Aktivierung dieser Signalkaskade mündet in der Expression virusresponsiver Gene und Cytokine, die die Virus-Replikation inhibieren oder die Immunabwehr stimulieren sollen. Wie eingehend erwähnt zeigen AGS-Patienten jedoch keine Virus-Infektion, was die Frage nahelegt, wodurch eine Immunantwort ausgelöst wird.

Mit der Entschlüsselung der ersten genetischen AGS-auslösenden Faktoren kam die Vermutung auf, dass die Akkumulation endogener Nukleinsäuren entscheidend für die Ausbildung der Erkrankung sein könnte. Uneins ist man sich über den Ursprung dieser Nukleinsäuren. Einerseits gibt es aus Experimenten an Mäusen gewonnene Belege, dass es sich um geschädigte DNA handelt, die im Zellinneren akkumuliert und die Expression proinflammatorischer Cytokine auslöst (Bartsch, 2016; Mackenzie *et al.*, 2016; Pokatayev *et al.*, 2016). Andererseits könnte es sich auch um die Prozessierungsprodukte aktiver endogener Retroelemente bzw. Retroviren handeln (Crow und Manel, 2015). Da jedoch keines der bisher etablierten Mausmodelle den neuroinflammatorischen AGS-Phänotyp wieder spiegelt, bleibt deren Relevanz für die Entstehung der humanen Autoimmun-Erkrankung zu bestätigen (Mackenzie *et al.*, 2016).

## 1.2 Endogene Retroelemente

Endogene Retroelemente (REs), auch genannt Retrotransposonen, bilden eine Klasse mobiler genetischer Elemente, die in allen eukaryotischen Genomen in variabler Häufigkeit und Diversität vorliegt (Hancks und Kazazian, 2012). Sie zeichnet sich dadurch aus, dass sie sich über einen *copy-and-paste*-Mechanismus im Genom verbreiten und dabei ein RNA-Intermediat entsteht, welches revers transkribiert und als cDNA in das Genom der

Wirtszelle integriert wird. Demzufolge wird nicht das Retroelement selbst transponiert, sondern die von dem jeweiligen Element codierte RNA (Hancks und Kazazian, 2016). Innerhalb der Gruppe der Retroelemente werden zwei Subklassen voneinander abgegrenzt (siehe Abbildung 2), die durch das Vorliegen („LTR-Retrotransposonen“) bzw. Fehlen („non-LTR-Retrotransposonen“) zweier sich 5′- und 3′-befindlicher identischer Sequenzabschnitte, den sog. ‚*long terminal repeats*‘ (LTRs), unterschieden werden (Thompson *et al.*, 2016). Des Weiteren klassifiziert man die Retroelemente, welche für die reverse Transkription erforderliche Proteine codieren, als autonome Elemente und trennt diese von den nicht-autonomen, denen jegliche signifikante Codierungskapazität fehlt. Nicht-autonome Elemente können sich folglich keineswegs selbstständig im Genom mobilisieren, dennoch ist ihre Retrotransposition auf Grund der ihnen verbliebenen *cis*-Sequenzen bei Aktivität anderer Retroelemente möglich (Feschotte *et al.*, 2002; Mita und Boeke, 2016).



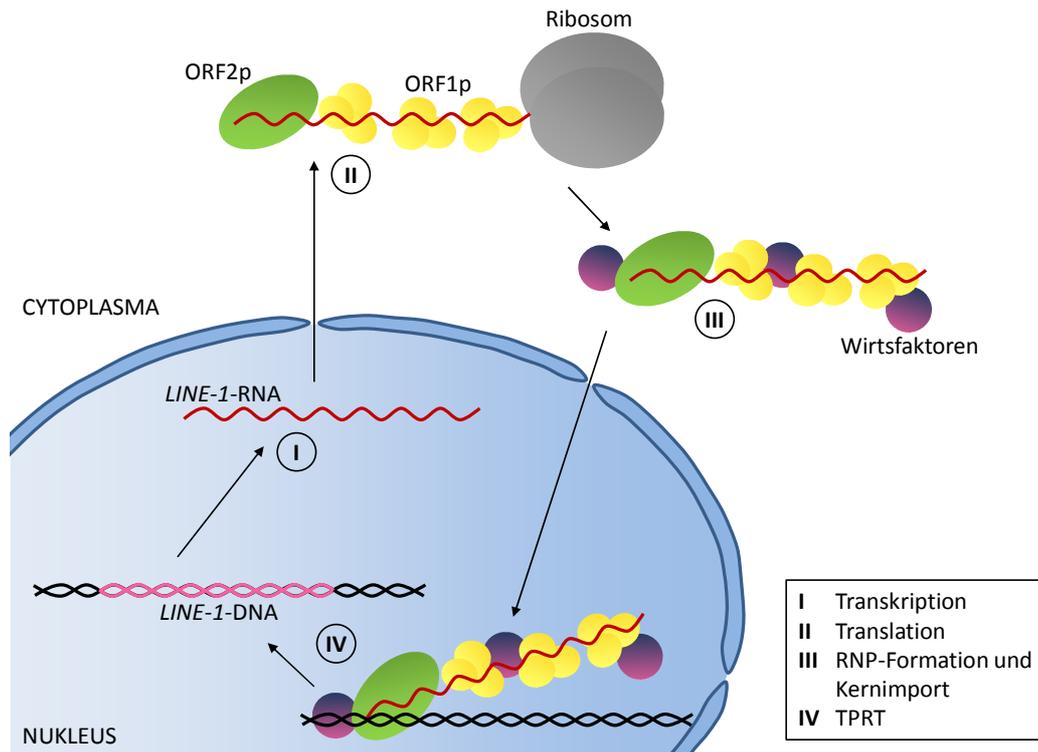
**Abbildung 2: Die genomische Struktur endogener Retroelemente (verändert nach Feschotte *et al.* (2002)).** Endogene REs werden in LTR- und non-LTR-Retrotransposonen unterschieden. Beiden gemeinsam ist das Vorliegen kurzer Duplikationsstellen, die aus der Integration resultieren („*target-site duplications*“, dargestellt als grau hinterlegte Pfeile). LTR-Retrotransposonen besitzen zusätzlich flankierende LTRs (blau hinterlegte Pfeilspitzen), die Promotor- bzw. polyA-Signale enthalten. Autonome LTR-REs codieren für zwei Gene, *GAG* (braun) und *POL* (orange). Das *GAG*-Gen codiert für ein Polyprotein, welches die viralen Matrix-, Capid- und Nukleocapsid-Komponenten stellt. Das Genprodukt von *POL* hingegen liefert Protease- (PR), reverse Transkriptase- (RT), RNase H- (RH) und Integrase- (IN) Aktivitäten. Nicht-autonomen LTR-REs fehlt die Codierungskapazität. Bei den non-LTR-Retrotransposonen unterscheidet man die autonomen LINEs von den nicht-autonomen SINEs. Beide besitzen einen internen Promotor innerhalb der 5′-UTR (blau), der im Falle der LINEs die Expression zweier ORFs reguliert: *ORF1* (rot) und *ORF2* (violett), bei den SINEs hingegen nicht zu einem proteincodierenden Genprodukt führt. Das von *ORF2* codierte Protein verfügt über Endonuklease- (EN) sowie reverse Transkriptase- (RT) Aktivität. Die 3′-Enden (blau) enthalten ein internes polyA-Signal ( $A_n$ ).

Im humanen Genom machen Retroelemente über 40 % des Basengehalts aus, wobei die non-LTR-Retrotransposonen mit etwa 34 % den größten Anteil bilden (Lander *et al.*, 2001). Innerhalb dieser Gruppe besteht eine große Diversität bezüglich Sequenzlänge und -zusammensetzung der REs: vollständige ‚*long interspersed nuclear elements*‘ (LINEs) umfassen ca. 6.000 bp, wohingegen die deutlich kürzeren und daher auch nicht-autonomen ‚*short interspersed nuclear elements*‘ (SINEs) i.d.R. weniger als 300 bp lang sind.

Es gibt drei entfernt verwandte LINE-Familien, von denen allein die LINE-1-Elemente bis zum heutigen Tage im humanen Genom retrotranspositions-kompetente, also aktive, Vertreter stellen. Mit einer Kopienzahl von über 500.000 besäßen sie ein gewaltiges Potential zur Gestaltung der genomischen Landschaft (Lander *et al.*, 2001), wäre nicht der Hauptanteil (mehr als 99,8 %) durch Trunkierungen, Punktmutationen oder interne Reorganisationen im Laufe der Entwicklungsgeschichte inaktiviert worden (Brouha *et al.*, 2003). Datenbankanalysen zufolge existieren heute lediglich 146 vollständige, potentiell aktive LINE-1-Elemente (Penzkofer *et al.*, 2016).

Retrotranspositions-kompetente LINE-1-Elemente besitzen einen internen *sense*-Promotor, der innerhalb ihres 5'-untranslatierten Bereichs (‚*untranslated region*‘, UTR) lokalisiert ist und die RNA-Polymerase II-abhängige Transkription initiiert (Kroutter *et al.*, 2009; Swergold, 1990). Ferner enthalten sie zwei proteincodierende offene Leserahmen (‚*open reading frames*‘, ORFs), die für die LINE-1-Retrotransposition unerlässlich sind, sowie eine polyA-Sequenz, welche für die korrekte Positionierung der RNA während der Retrotransposition sorgt (Cost *et al.*, 2002). LINE-1-Elemente enthalten außerdem einen *antisense*-Promotor, der die Expression eines weiteren, erst kürzlich identifizierten ORFs mit bisher ungeklärter Funktion reguliert, *ORF0* (Denli *et al.*, 2015; Speek, 2001).

Die beiden LINE-1-Proteine ORF1p und ORF2p werden von den Genen *ORF1* bzw. *ORF2* codiert (siehe Abbildung 3, Seite 6). Bei ORF1p handelt es sich um ein 40 kDa großes RNA-bindendes Protein, welches zu einem Homotrimer geformt von der *LINE-1*-RNA umwickelt wird (Khazina *et al.*, 2011). Durch die Interaktion mit ORF2p, einem 150 kDa großen Enzym mit Endonuklease- und reverser Transkriptase-Aktivität, sowie weiteren Wirtsfaktoren bildet sich so ein Ribonukleoprotein- (RNP) Komplex im Cytoplasma der Zelle (Feng *et al.*, 1996; Hohjoh und Singer, 1996; Mathias *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 2013). Der RNP-Komplex gelangt vermutlich über die Kernporen in den Nukleus, wo die reverse Transkription am bevorzugten Integrationsort initiiert wird (Luan *et al.*, 1993).



**Abbildung 3: Der LINE-1-Lebenszyklus (verändern nach Viollet *et al.* (2014)).** Die LINE-1-Replikation startet mit der Transkription der *LINE-1*-RNA (I). Diese wird in das Cytoplasma exportiert und an den Ribosomen translatiert (II). Die von dem Element codierten Proteine ORF1p und ORF2p binden in *cis* an die RNA und bilden zusammen mit weiteren Wirtsfaktoren einen RNP-Komplex (III). Der LINE-1-RNP-Komplex wird in den Nukleus importiert, wo im Zuge des als TPRT bekannten Mechanismus die reverse Transkription sowie die Integration des LINE-1-Elements erfolgen (IV). Dieser Prozess ist abhängig von weiteren, noch nicht gänzlich identifizierten Proteinfaktoren der Wirtszelle.

Dieser konservierte Mechanismus, den man ‚*target-primed reverse transcription*‘ (TPRT) nennt, ist in seiner Komplexität bis heute noch nicht vollständig entschlüsselt. Er beginnt vermutlich mit der Einführung eines Einzelstrangbruches („*nick*“) in die genomische DNA durch die Endonuklease-Domäne des ORF2p. Am 3‘-Ende des einzelsträngigen Bereichs startet die nun folgende reverse Transkription der Retroelement-RNA (Luan *et al.*, 1993). Der reverse Transkriptase-Anteil des ORF2p-Enzyms verlängert dabei die freiliegende 3‘-Hydroxygruppe, indem er die *LINE-1*-RNA als Matrize benutzt (Cost *et al.*, 2002). Ergänzend beschrieben ist ein endonukleaseunabhängiger Insertionsmechanismus, bei dem bereits bestehende Strangbrüche genutzt werden (Morrish *et al.*, 2002). Beide Mechanismen führen letztlich zur Entstehung einer neuen, doppelsträngigen Kopie des LINE-1-Elements, welche im Falle der TPRT-Retrotransposition von zwei kurzen Duplikationsstellen (*target site duplications*, TSDs) flankiert wird. Unklar bleibt dabei, wie die Zweit-

strangsynthese sowie die Reparatur des Einzelstrangbruches vonstattengeht sowie welche Wirtsfaktoren daran beteiligt sind (Viollet *et al.*, 2014).

ORF1p und ORF2p weisen eine *cis*-Präferenz aus, d.h. sie binden bevorzugt an die RNA, anhand derer sie translatiert wurden (Wei *et al.*, 2001). Darüber hinaus sind sie jedoch auch in der Lage, in *trans* andere Retroelemente oder sogar proteincodierende mRNAs mittels reverser Transkription in das Genom zu integrieren (zusammengefasst in Hancks und Kazazian (2012)). Aus diesem Grund kommen im menschlichen Genom neben LINE-1-Neuintegrationen auch einige *de novo*-Integrationen von Alu-Elementen vor (Roy *et al.*, 1999; Wimmer *et al.*, 2011), einer primatenspezifischen Gruppe der SINE-Familie (Deininger, 2011).

SINEs codieren nicht für Proteine und zählen daher zu den nicht-autonomen Retrotransposonen. Ihre 100-400 bp langen Sequenzen enthalten einen internen Polymerase III-Promotor, der die Expression der Elemente steuert. Für die Retrotransposition sind sie auf Teile der LINE-1-Maschinerie angewiesen, insbesondere auf ORF2p, wohingegen ORF1p verzichtbar zu sein scheint (Dewannieux *et al.*, 2003). Damit stehen aktuellen Zahlen zufolge neben den 146 vollständigen LINE-1-Elementen 107 weitere mit zerstörtem *ORF1*, aber intaktem *ORF2* für die Retrotransposition von Alu-Elementen zur Verfügung (Penzkofer *et al.*, 2016). Der genaue Insertionsmechanismus ist auch in diesem Fall noch unklar (Daniel *et al.*, 2015), führte jedoch im Laufe der Evolution zu über einer Million Alu-Elementen innerhalb der chromosomalen DNA, womit sie mehr als 10 % des menschlichen Genoms ausmachen (Lander *et al.*, 2001).

Die zweite Subklasse der REs, die LTR-Retrotransposonen, ist mit den exogenen Retroviren verwandt und daher in der Literatur auch als endogene Retroviren (ERVs) geläufig. Sie besitzen im Gegensatz zu ihren viralen Gegenstücken jedoch nicht die Fähigkeit zur extrazellulären Verbreitung und sind aktuellen Annahmen zufolge im humanen Genom inaktiv (Hancks und Kazazian, 2016). Ihre Codierungskapazität reicht von fast intakten Elementen mit mindestens zwei ORFs bis hin zu sog. ‚solo-LTRs‘, Elementen, denen jegliche Geninformation verloren gegangen ist (Wildschutte *et al.*, 2016).

Bedingt durch ihre retroviralen Charakteristika besitzen sowohl Zwischen- als auch Endprodukte endogener Retroelemente das Potential zur Stimulation des Immunsystems und tragen daher möglicherweise wesentlich zur Entstehung von Autoimmun-Erkrankungen

---

wie SLE oder AGS bei (Kassiotis und Stoye, 2016). Dies betrifft sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem und ist neben der Ausprägung von Autoimmunität zudem für chronische Infektionen und Krebserkrankungen relevant (Kassiotis und Stoye, 2016). Derzeit sind mindestens 96 Retrotranspositionseignisse bekannt, die zu monogenen Erkrankungen geführt haben (Hancks und Kazazian, 2012). Aus diesem Grund unterliegt die Aktivität endogener Retroelemente strenger Regularien. Die Regulation kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen und beeinflusst Transkription, Translation und posttranslationale Prozesse.

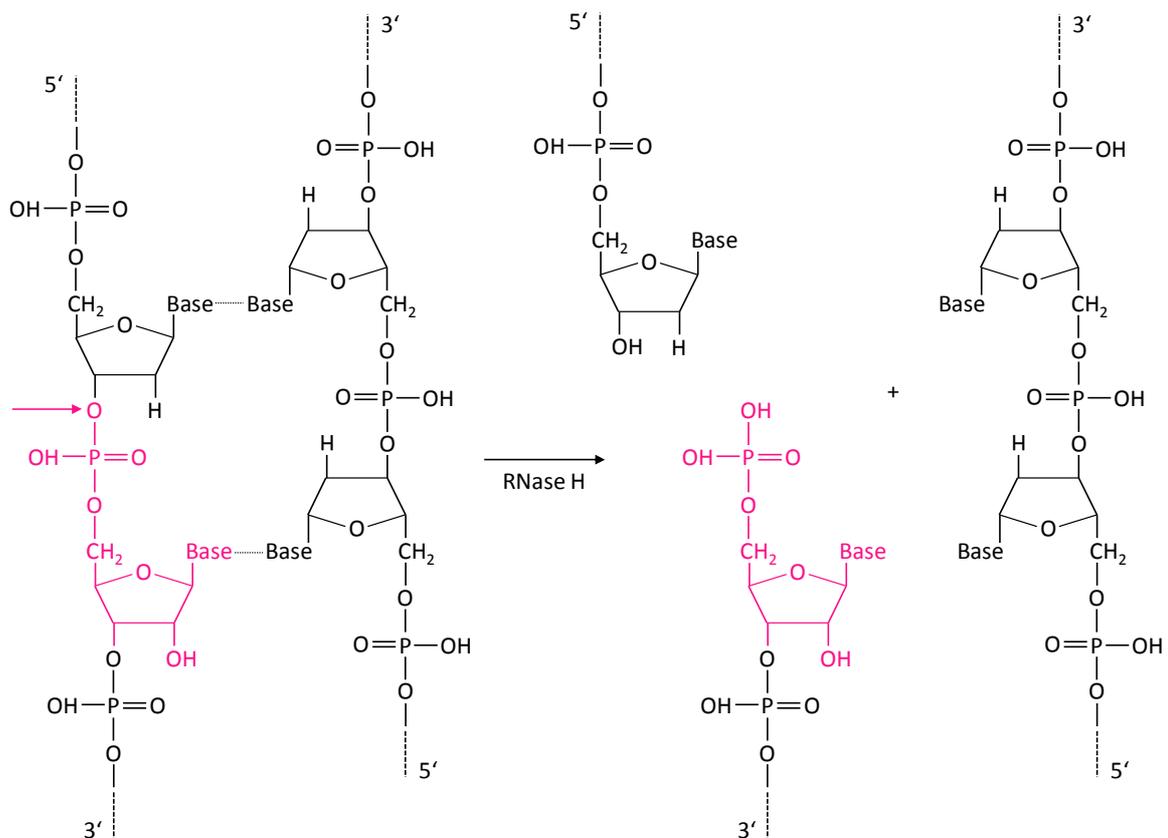
Einer der zentralen Mechanismen stellt hierbei die epigenetische Kontrolle der Genexpression durch die Cytosin-Methylierung von Promotorsequenzen dar. Retroelemente sind wie die Centromere eukaryotischer Genome reich an CpG-Inseln, Bereichen mit statistisch erhöhter Dichte des Dinukleotids Desoxycytidin-Phosphatidyl-Desoxyguanosin (Yoder *et al.*, 1997). CpG-Inseln in Promotorregionen liegen i.d.R. unmethyliert vor; kommt es aber zur Übertragung von Methylgruppen auf die Cytosine der Dinukleotide, so wird die Transkription des Gens verhindert, da Transkriptionsfaktoren nicht mehr an die regulatorischen Sequenzabschnitte binden können. Die Expression endogener Retroelemente in somatischen Zellen wird durch eben solche umfassenden Methylierungen der Promotoren inhibiert, wie Untersuchungen an LINE-1-Promotoren gezeigt haben (Hancks und Kazazian, 2012; Hata und Sakaki, 1997).

In der Keimbahn ist zudem eine Klasse von spezialisierten, kleinen RNAs, den ‚*piwi-interacting RNAs*‘ (piRNAs), sowie piRNA-interagierenden Proteinen für die Repression von REs verantwortlich. Sie agieren sowohl auf transkriptioneller Ebene durch die Spaltung der Retrotransposon-RNA als auch epigenetisch durch die Rekrutierung der *de novo*-DNA-Methylierungsmaschinerie (Aravin *et al.*, 2008; Brennecke *et al.*, 2007). Ferner wurde durch Arbeiten von Sheehy *et al.* (2002) erstmalig gezeigt, dass eine Familie von wirbeltierspezifischen Cytidin-Deaminasen existiert, die als Restriktionsfaktoren die Aktivität von Retroelementen und -viren vermindert: die APOBEC3- (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3*) und AID- (*activation-induced cytidine deaminase*) Proteine. Sie katalysieren die Deaminierung von Cytidin zu Uracil in der RE-cDNA, was zu einer Akkumulation von Mutationen und damit zu einer Stilllegung des mobilen Elements führen kann (Goodier, 2016).

Anti-retrovirale Eigenschaften schreibt man weiterhin den mit AGS assoziierten Proteinen TREX1 und SAMHD1 zu. Sie restringieren die Replikation von LINE-1-Elementen und Retroviren, indem sie Einfluss auf die reverse Transkription nehmen. Diskutiert wird in der Literatur außerdem, ob auch die Ribonuklease H2 als Restriktionsfaktor für endogene Retroelemente dienen könnte (Bhoj und Chen, 2008; Volkman und Stetson, 2014).

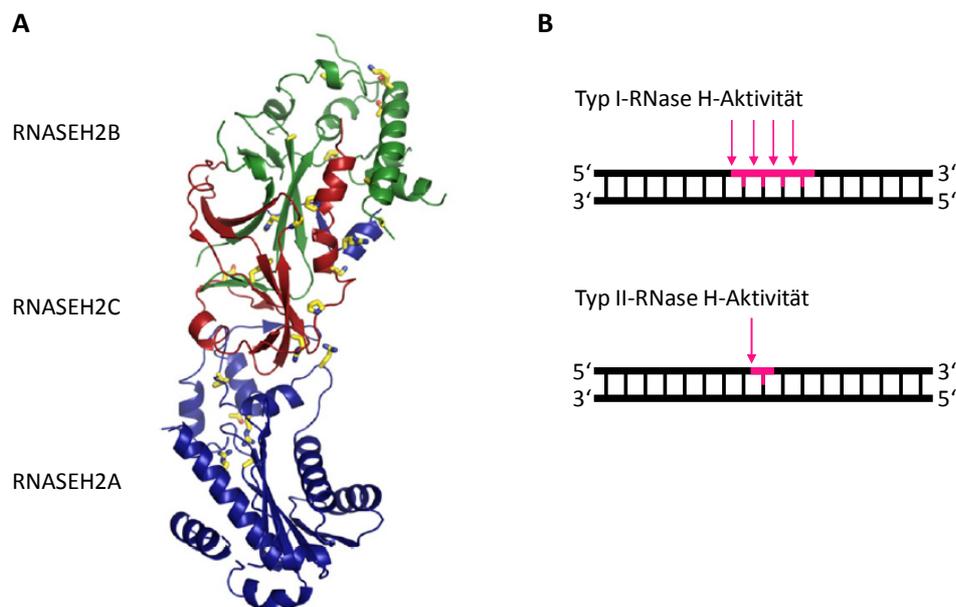
### 1.3 Die Ribonuklease H2

Ribonukleasen (RNasen) H sind eine seit dem Jahre 1969 bekannte Enzymfamilie, welche die Spaltung des RNA-Anteils eines RNA:DNA-Hybrids katalysieren und ubiquitär in Organismen von Bakterien bis hin zu den Säugetieren vorkommen (Huet *et al.*, 1976; Miller *et al.*, 1973; Stein und Hausen, 1969). Die Hydrolyse erfolgt am 5'-Phosphat des Ribonukleotids (siehe Abbildung 4) und resultiert in einer freien 3'-Hydroxygruppe sowie einer freien 5'-Phosphatgruppe (Eder *et al.*, 1993).



**Abbildung 4: Die RNase H-vermittelte Spaltung.** Die Hydrolyse (pinkfarbener Pfeil) erfolgt an der 5'-Phosphatgruppe des Ribonukleotids (pink).

Es existieren zwei Typen von RNase H-Enzymen, die evolutionär nicht verwandt sind und sich u.a. in ihrer Aminosäuresequenz, ihrer zellulären Lokalisation und ihrer Substratspezifität unterscheiden (Ohtani *et al.*, 1999): die Ribonuklease H2, die auch als Typ II-RNase H bezeichnet wird, und die RNase H1 oder Typ I-RNase H. Während die RNase H1 nur RNA:DNA-Hybride mit mindestens vier konsekutiven Ribonukleotiden spaltet (siehe Abbildung 5B), ist die RNase H2 auch zur Hydrolyse einzelner in einen DNA-Duplex eingebetteter Ribonukleotide befähigt (Eder und Walder, 1991). Für die Substraterkennung ist offenbar lediglich das Vorhandensein einer 2'-Hydroxygruppe vonnöten, da das Enzym hinsichtlich der Art des Ribonukleotids keine relevanten Präferenzen zeigt und somit alle vier Ribonukleotide gleichermaßen prozessiert. Weiterhin ist die Ausbildung einer Basenpaarung zwischen dem RNA- und dem DNA-Anteil des Duplex nicht erforderlich, denn die Hydrolyse kann auch innerhalb einer Nichtübereinstimmung (*'mismatch'*) bzw. einer RNA:RNA-Paarung erfolgen, solange sich entweder am 3'- oder am 5'-Ende des prozessierten Ribonukleotids ein DNA:DNA-Duplex ausbildet (Eder *et al.*, 1993).



**Abbildung 5: Struktur und Funktionsweise der RNase H2.** **A:** Röntgenkristallographische Struktur des humanen RNase H2-Komplexes (aus Reijns *et al.* (2011)). Das trimere Enzym setzt sich aus den drei Untereinheiten A (blau), B (grün) und C (rot) zusammen. Mit dem Aicardi-Goutières-Syndrom assoziierte Mutationen sind als gelbe Stifte hervorgehoben und kommen in allen drei Untereinheiten vor. **B:** Die RNase H2 prozessiert sowohl RNA:DNA-Hybride (Typ I-RNase H-Aktivität) als auch einzelne, in den DNA-Duplex inkorporierte Ribonukleotide (Typ II-RNase H-Aktivität). Die Hydrolyse (Pfeil) erfolgt dabei am 5'-Phosphat des Ribonukleotids (pink).

Die abweichende Substratspezifität beider Enzyme bedingt neben den oben genannten Charakteristika auch unterschiedliche zelluläre Funktionen. Interessanterweise scheint es außerdem speziesspezifische Diskrepanzen zu geben, da Ribonuklease H-Enzyme in einzelligen Organismen wie Bakterien oder der Hefe unter normalen Bedingungen nicht erforderlich für deren Wachstum sind, wohingegen Säugetiere auf die für sie essentiellen Enzyme angewiesen sind (Arudchandran *et al.*, 2000; Reijns *et al.*, 2012; Rychlik *et al.*, 2010). Der Großteil der RNase H-Aktivität geht in Säugern und dem Menschen jedoch von der RNase H2 aus (Frank *et al.*, 1998).

Von der RNase H1 existieren zwei Isoformen, eine nukleäre mit bisher unbekannter Funktion sowie eine in den Mitochondrien lokalisierte, die für die mitochondriale Replikation unerlässlich ist (Cerritelli und Crouch, 2009; Cerritelli *et al.*, 2003). Die RNase H2 hingegen ist ausschließlich nukleär lokalisiert und übt dort verschiedenste Funktionen aus, die bis heute nicht vollständig verstanden sind (Feng und Cao, 2016; Kind *et al.*, 2014).

Im Gegensatz zu ihren monomeren prokaryotischen Pendanten ist das Enzym bei Säugtieren aus drei Untereinheiten (A, B und C, siehe Abbildung 5A, Seite 10) zusammengesetzt, die nur als Heterotrimer enzymatische Funktion besitzen (Crow *et al.*, 2006b; Reijns *et al.*, 2011). Im Zentrum des linear angeordneten Komplexes befindet sich die C-Untereinheit, deren C-terminaler Part mit der B-Untereinheit sowie dem C-Terminus der A-Untereinheit verwoben ist (Figiel *et al.*, 2011; Reijns *et al.*, 2011). Der Import des Komplexes in den Zellkern wird durch das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) der RNASEH2B determiniert (Kind *et al.*, 2014). Das hoch konservierte katalytische Zentrum befindet sich hingegen in der A-Untereinheit, die homolog zu der prokaryotischen RNase HII ist (Chon *et al.*, 2009).

Neben dem aktiven Zentrum besitzt die RNASEH2A außerdem einen exponierten N-Terminus, der als mögliche Protein-Protein-Interaktionsschnittstelle diskutiert wird (Feng und Cao, 2016). Durch *in vivo*-Daten belegt ist die Protein-Interaktionsstelle in der auxilliären Untereinheit B: RNASEH2B interagiert mit dem Ringklemmenprotein PCNA („*proliferating cell nuclear antigen*“) über eine C-terminale PIP- („*PCNA-interacting protein*“) Box-Sequenz. Interessanterweise lässt sich die PCNA-Bindung sowohl für den aktiven RNase H2-Komplex nachweisen als auch für den löslichen, aber enzymatisch inaktiven RNASEH2B/C-Komplex (Chon *et al.*, 2009). PCNA agiert als Rekrutierungsplattform für zahlreiche

DNA-modifizierende Proteine und spielt damit eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen wie u.a. der DNA-Replikation, -Reparatur und -Methylierung (Maga und Hubscher, 2003).

Bedingt durch ihre Fähigkeit, verschiedenste RNA:DNA-Hybride zu akzeptieren, ihre Prozessivität sowie die bekannte Interaktion mit PCNA wird vermutet, dass die RNase H2 an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt ist (Chon *et al.*, 2009; Feng und Cao, 2016). Ihre Hauptaufgabe scheint die Erhaltung der Genom-Integrität zu sein. Wie bereits dargelegt besitzt nur die Typ II-RNase H die Fähigkeit zur Prozessierung einzelner Ribonukleotide in einem DNA-Duplex. Entgegen ursprünglicher Annahmen kommt es unter physiologischen Bedingungen während der Neusynthese der genomischen DNA durch die Replikations-Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$  mit einer Häufigkeit von einem pro 720 (Pol.  $\delta$ ) bzw. pro 640 Nukleotiden (Pol.  $\epsilon$ ) zur Inkorporation von Ribonukleotiden (Sparks *et al.*, 2012). Deren vollständige Entfernung trägt entscheidend zur Stabilität und Funktionalität des Genoms bei (Kim *et al.*, 2011). *In vitro*- und *in vivo*-Studien konnten belegen, dass die RNase H2 das Enzym ist, welches für die Entfernung der eingebetteten Ribonukleotide verantwortlich ist (Eder und Walder, 1991; Nick McElhinny *et al.*, 2010a; Rydberg und Game, 2002).

Daher ist es nicht verwunderlich, dass es bei einem Verlust des Enzyms in Mäusen wie auch in der Hefe zu einer Akkumulation fälschlicherweise inkorporierter Ribonukleotide in der genomischen DNA kommt (Hiller *et al.*, 2012; Nick McElhinny *et al.*, 2010a; Reijns *et al.*, 2012). Durch deren Ansammlung ist die DNA einem erhöhten Risiko von Strangbrüchen und damit genomischer Instabilität ausgesetzt (Pizzi *et al.*, 2015), da die 2'-Hydroxygruppe der Ribose RNA-Nukleotide unter physiologischen Bedingungen bis zu 100.000-fach anfälliger für spontane Hydrolyse macht (Li und Breaker, 1999).

An der Spaltung und Entfernung der Ribonukleotide sind neben der RNase H2 auch eine Reihe weiterer Enzyme beteiligt. Der Prozess, der den Namen ‚*ribonucleotide excision repair*‘ (RER) trägt, beginnt mit der 5'-terminalen Inzision des Ribonukleotids durch die RNase H2. Ausgehend von dem resultierenden Einzelstrangbruch kommt es zu einer Verdrängung des ribonukleotidhaltigen Strangs durch die von Polymerase  $\delta$  und PCNA vermittelte Neusynthese, der endgültigen Entfernung des Nukleotids durch FEN1 (*flap endonuclease 1*) und der Ligation des Strangs durch die DNA-Ligase 1 (Sparks *et al.*, 2012).

Daneben soll die RNase H2 einen wesentlichen Anteil an der Auflösung von ‚*R-loops*‘ haben, RNA:DNA-Hybriden, die während der Transkription bedingt durch das Voranschrei-

ten der Transkriptionsblase und der damit verbundenen Verdrillung der DNA (*„supercoiling“*) entstehen können (El Hage *et al.*, 2010). Es handelt sich dabei um ein Hybridisierungsprodukt aus der entstehenden mRNA und dem transkribierten DNA-Strang, welches unbesiegt zu genomischer Instabilität führt (Li und Manley, 2005). Ursprünglichen Vermutungen zufolge sollte die RNase H2 außerdem in Kombination mit der Nuklease FEN1 an der Entfernung des RNA-Oligonukleotids beteiligt sein, das im Zuge der Okazaki-Fragment-Synthese des diskontinuierlichen Strangs (*„lagging-strand“*) während der DNA-Replikation aufgebaut wird (Goulian *et al.*, 1990). Mittlerweile geht man jedoch eher davon aus, dass dieser Vorgang von den beiden Enzymen FEN1 und DNA2 (*„DNA replication helicase/nuclease 2“*) katalysiert wird und die RNase H2 nicht daran beteiligt ist (Rossi und Bambara, 2006).

Die enzymatische Aktivität der RNase H2 spielt jedoch nicht allein eine Rolle bei der Erhaltung ihrer essentiellen zellulären Funktion. Biallelische Mutationen in einem der drei für die jeweiligen Untereinheiten codierenden Gene *RNASEH2A*, *RNASEH2B* und *RNASEH2C* führen wie in Kapitel 1.1, Seite 1, beschrieben zur Ausprägung des Aicardi-Goutières-Syndroms (Crow *et al.*, 2015; Crow *et al.*, 2006b). Die zum gegenwärtigen Zeitpunkt beschriebenen Erbgutveränderungen lassen sich je nach Art der mutationsbedingten Einschränkung in drei Kategorien einteilen: Behinderung der (I) Substrat-Bindung/-Hydrolyse, (II) Quartärstruktur des Enzyms oder (III) Interaktion mit weiteren Proteinfaktoren (Figiel *et al.*, 2011). Keine dieser bislang identifizierten Mutationen hat jedoch einen kompletten Verlust der Proteinaktivität zur Folge, was die Vermutung nahelegt, dass solche Veränderungen auch für Menschen nicht mit dem Leben vereinbar sind (Crow *et al.*, 2015).

#### 1.4 Weitere mit AGS assoziierte Gene

Neben den für die RNase H2 codierenden Genen sind vier weitere an der Ausprägung des Aicardi-Goutières-Syndroms beteiligt. *TREX1* und *SAMHD1* sind bei AGS häufig von Null-Mutationen betroffen, die einen vollständigen Funktionsverlust des jeweiligen Proteins mit sich bringen (Crow *et al.*, 2015).

*TREX1* stellt die hauptsächlich agierende 3'-5'-DNA-Exonuklease in Säugern dar (Rice *et al.*, 2015). Das Enzym hydrolysiert präferenziell einzelsträngige DNA, zeigt aber auch Aktivität bei doppelsträngiger DNA mit einem einzelsträngigen Überhang, einzelsträngiger

RNA sowie dem RNA-Anteil von RNA:DNA-Hybriden (Mazur und Perrino, 1999; Yuan *et al.*, 2015). Bei einem Verlust der Enzymaktivität kommt es zur Akkumulation cytoplasmatischer DNA, die als Ursache für die Ausbildung des Aicardi-Goutières-Syndroms angesehen wird. Diese intrazelluläre DNA aktiviert das Immunsystem in Typ I-IFN-abhängiger Weise (Gall *et al.*, 2012; Stetson *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2007) und rührt zumindest teilweise von endogenen Retroelementen her (Stetson *et al.*, 2008). TREX1 ist außerdem für die Unterdrückung einer Immunantwort bei Infektion mit Retroviren wie beispielsweise HIV-1 verantwortlich, indem das Enzym die nicht-integrierte virale cDNA prozessiert, welche nicht in den Nukleus transportiert wurde und damit immunstimulatorische Eigenschaften besitzt (Yan *et al.*, 2010).

SAMHD1 hingegen ist ein wichtiger Restriktionsfaktor gegen Retroviren, der zwei distinkte enzymatische Funktionen besitzt. Zum einen stellt SAMHD1 eine Triphosphohydrolase (dNTPase) dar, die zelluläre Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) in die entsprechenden Desoxyribonukleoside und Triphosphate konvertiert (Ballana und Este, 2015). Daneben besitzt das Protein *in vitro* enzymatische 3'-5'-Exonuklease-Aktivität gegenüber einzelsträngiger RNA und möglicherweise auch einzelsträngiger DNA bzw. dem RNA-Anteil von RNA:DNA-Hybriden (Beloglazova *et al.*, 2013), wobei letztere Substrate kontrovers diskutiert werden. Arbeiten von Ryoo *et al.* (2014) zufolge ist für die anti-retrovirale Wirkung die Ribonuklease- und nicht die dNTPase-Aktivität des Enzyms verantwortlich, indem SAMHD1 die virale RNA im Cytoplasma bindet und unabhängig von der reversen Transkription abbaut. Auch bei bekannten, AGS-auslösenden Mutationen nimmt die RNase-Aktivität des Enzyms einen entscheidenden Faktor ein, da diese zu einer gestörten Substratbindung und somit zu einer distributiven statt prozessiven Nuklease-Tätigkeit führen (Beloglazova *et al.*, 2013).

Die ebenfalls mit AGS assoziierte Adenosin-Deaminase ADAR1 spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der normalen zellulären Homöostase. Einschränkungen in der Aktivität des Enzyms, das die Deaminierung von Adenosin zu Inosin in doppelsträngiger RNA katalysiert, führen zu einer Aktivierung der angeborenen Immunabwehr (Liddicoat *et al.*, 2016). Vermutlich ist die Editierung entscheidend für die Diskriminierung zwischen eigener und fremder Ribonukleinsäure und verhindert so die Stimulation des MDA5/MAVS- (*mitochondrial antiviral signaling protein'*) Signalweges. Es wird angenommen, dass die Deaminierung Duplex-Strukturen innerhalb von RNA-Molekülen destabilisiert, die auf

Grund von gegenläufigen Sequenzwiederholungen (*inverted repeats*) entstehen können und von der Zelle als virusähnlich erkannt werden (Heraud-Farlow und Walkley, 2016). Interessanterweise besitzt ADAR1 sowohl anti- als auch provirale Eigenschaften. Neuesten Erkenntnissen zufolge stellt das Protein außerdem einen Restriktionsfaktor für die Replikation von LINE-1-Elementen dar, obgleich dessen Deaminase-Funktion dafür nicht entscheidend zu sein scheint (Orecchini *et al.*, 2017).

Eine Funktionseinschränkung von ADAR1 kann über die Aktivierung des Mustererkennungsrezeptors MDA5 zur Ausprägung einer IFN-Signatur und letztlich zu AGS führen. *Gain-of-function*-Mutationen in dem für MDA5 codierenden *IFIH1*-Gen führen ebenfalls zur Ausprägung des Aicardi-Goutières-Syndroms. MDA5 bindet vorzugsweise lange (>500 bp), doppelsträngige RNA-Moleküle und aktiviert bei Oligomerisierung das Adapterprotein MAVS, wodurch wiederum die Expression von Typ I-Interferonen und proinflammatorischen Cytokinen ausgelöst wird. Damit spielt das Protein eine wichtige Rolle für die Erkennung von RNA-Viren wie beispielsweise des Hepatitis C-Virus (Cao *et al.*, 2015). Bei mutationsbedingter Hyperaktivierung wird das Protein stabilisiert, was für erhöhte Typ I-IFN-Spiegel sorgt (Buers *et al.*, 2016).

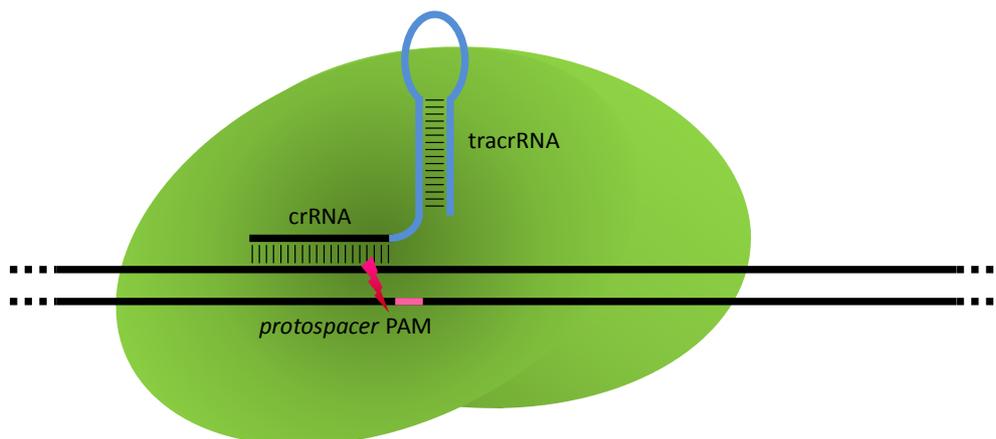
Alle bisher bekannten AGS-assozierten Enzyme üben somit distinkte Funktionen im Metabolismus bzw. der Perzeption von Nukleinsäuren aus. Die genauen Mechanismen sind zum jetzigen Zeitpunkt noch größtenteils ungeklärt. Um diese näher zu beleuchten, bedienen sich Wissenschaftler häufig verschiedener Genom-Editierungstechniken, da sich durch das gezielte Ausschalten eines Gens Näheres über dessen Funktion erfahren lässt (Boettcher und McManus, 2015).

## 1.5 Die Genom-Editierungstechnik CRISPR-Cas9

In den vergangenen Jahren haben sich einige Kern-Technologien für die Genom-Editierung herauskristallisiert, die mittlerweile für eine Vielzahl von Applikationen und Organismen eingesetzt wurden. Die vier meist-genutzten Techniken sind (I) CRISPR- (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) Cas9 (*CRISPR-associated protein 9*), (II) TALE-Nukleasen (TALENs, *transcription activator-like effector nucleases*), (III) Zinkfinger-Nukleasen (ZFNs) und (IV) *homing*-Endonukleasen. Allen gemeinsam ist ihre Fähigkeit zur Induktion gezielter DNA-Doppelstrangbrüche, welche durch intrinsische Reparaturmecha-

nismen zur Erzielung einer Genom-Modifikation genutzt werden können. Da insbesondere das CRISPR-Cas9-System sehr einfach zu konfigurieren ist und seit seiner Einführung stetig weiterentwickelt wurde, sind dessen Anwendungsmöglichkeiten immens gestiegen und ermöglichen inzwischen den Einsatz in verschiedensten Disziplinen wie der humanen Gentherapie, Tiermodellen oder den Agrarwissenschaften (Gaj *et al.*, 2016). Derzeit stellt es die neueste Genom-Editierungsstrategie dar und setzt sich seit seiner Erstanwendung im Jahre 2013 kontinuierlich durch (Cho *et al.*, 2013; Cong *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013).

Seinen Ursprung findet das CRISPR-Cas9-System in der erworbenen Immunabwehr von Bakterien und Archaeen gegen eindringende Viren und Plasmide (Wiedenheft *et al.*, 2012). Kernstück der Methode ist die aus *Streptococcus pyogenes* stammende Endonuklease Cas9, die durch zwei nicht-codierende RNA-Moleküle zu ihrer Zielsequenz gesteuert wird: die CRISPR-RNA (crRNA) und die *trans-activating crRNA* (tracrRNA) (siehe Abbildung 6). Zur Vereinfachung des Systems wird inzwischen statt der dualen RNAs eine einzelne, chimäre guideRNA eingesetzt, die beide Funktionen kombiniert (de la Fuente-Nunez und Lu, 2017). Die ersten 20 Nukleotide der guideRNA bedingen dabei die Erkennung des angestrebten genomischen DNA-Abschnitts („*protospacer*“), während der tracrRNA-Anteil über die Ausbildung einer charakteristischen Sekundärstruktur die Rekrutierung der Cas9-Nuklease ermöglicht (Jinek *et al.*, 2012; Kunin *et al.*, 2007).



**Abbildung 6: Die Genom-Editierungstechnologie CRISPR-Cas9.** CRISPR-Cas9-Erkennungsprinzip (verändert nach Jinek *et al.* (2012)). Die Endonuklease Cas9 (grün) wird über die chimäre guideRNA bestehend aus crRNA- und tracrRNA-Anteil zur Zielsequenz dirigiert. Cas9 bindet die tracrRNA, die ihrerseits eine charakteristische Sekundärstruktur ausbildet. Über die Basenpaarung der crRNA mit dem *protospacer* wird die Spezifität der Nuklease erreicht. Für die Bindung und Spaltung der DNA (Pfeil) ist die Erkennung einer unmittelbar an den *protospacer* angrenzenden PAM-Sequenz erforderlich.

Von entscheidender Bedeutung für die Aktivität der Nuklease ist zudem das Vorhandensein einer kurzen, unmittelbar an den *protospacer* angrenzenden Sequenz, die ‚*protospacer-adjacent motif*‘ (PAM) genannt wird (Sternberg *et al.*, 2014). Die PAM-Sequenz stellt die einzige vorliegende Einschränkung des ansonsten universell einsetzbaren CRISPR-Cas9-Systems dar (Gaj *et al.*, 2016). Die genaue Sequenzabfolge ist abhängig von der verwendeten Nuklease, im Falle der Cas9-Nuklease aus *Streptococcus pyogenes* handelt es sich um ein beliebiges Nukleosid gefolgt von zwei Desoxyguanosin-Nukleosiden (Hsu *et al.*, 2013).

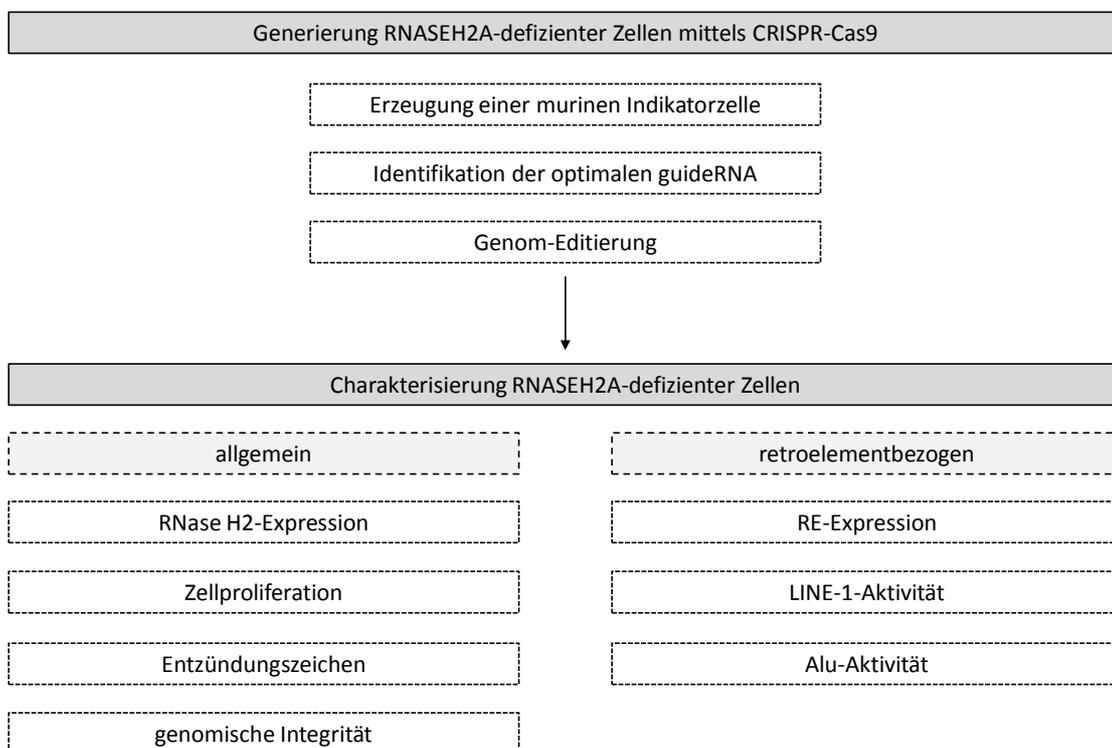
Unabhängig von der verwendeten Genom-Editierungstechnik werden die entstandenen DNA-Doppelstrangbrüche vornehmlich durch einen von zwei Reparaturmechanismen repariert: ‚*non-homologous end joining*‘ (NHEJ) oder ‚*homology-directed repair*‘ (HDR). Bei dem fehleranfälligen NHEJ-Mechanismus werden für gewöhnlich kurze, undefinierte Insertionen oder Deletionen (*InDels*) nahe der Stelle des Doppelstrangbruchs generiert (Pardo *et al.*, 2009). Diese Mutationen führen häufig zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zur Entstehung vorzeitiger Stopp-Codons bzw. Gen-‚*knockouts*‘ (de la Fuente-Nunez und Lu, 2017). Der HDR-Mechanismus hingegen nutzt die homologe Rekombination und erfordert daher eine Donor-Matrize mit Sequenzüberlappungen zu der angesteuerten genomischen DNA-Sequenz, wodurch der gezielte Austausch einzelner Nucleotide oder sogar ganzer Gene ermöglicht wird (Gaj *et al.*, 2016).

## 1.6 Zielsetzung dieser Dissertation

Die RNase H2 stellt im murinen Organismus ein essentielles Enzym zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität dar (Rabe, 2013). Studien konnten belegen, dass beim Menschen die Verminderung ihrer enzymatischen Aktivität mit der Entwicklung des Autoimmun-Defekts Aicardi-Goutières-Syndrom einhergeht (Crow *et al.*, 2006b). AGS ist eine erblich bedingte, frühkindliche Erkrankung des zentralen Nervensystems sowie der Haut, die mit pathologischen Entzündungszeichen einhergeht und je nach Art der vorliegenden Mutation schwere Komplikationen bis hin zum frühzeitigen Tode der Betroffenen hervorrufen kann. Sie gilt außerdem als Modell-Erkrankung für systemische Autoimmunität, die durch die Falschinterpretation endogener Nucleinsäurederivate als Fremdmoleküle indu-

ziert wird, was der Erforschung von AGS auch im Hinblick auf andere Autoimmun-Defekte wie beispielsweise SLE größte Bedeutung verleiht (Lee-Kirsch *et al.*, 2014).

Da die exakten Mechanismen der Krankheitsausprägung bis heute größtenteils unverstanden sind, sollten im Rahmen dieser Dissertation monoklonale RNase H2-defiziente, humane Zelllinien generiert und diese molekularbiologisch, immunologisch und zellbiologisch charakterisiert werden. Zunächst sollten allgemeine Merkmale der Zellen erfasst werden wie deren Wachstumsverhalten, ihre genomische Integrität und inflammatorische Marker. Ein besonderes Augenmerk galt darüber hinaus der möglichen Involvierung des Enzyms in den Metabolismus endogener Retroelemente, da einerseits insbesondere die non-LTR-Retrotransposonen auf Grund ihres Transpositionsmechanismus als Substrate für die RNase H2 in Frage kämen und andererseits für die Mehrheit der anderen mit AGS assoziierten Proteine ein solcher Einfluss aufgezeigt werden konnte. Zur Generierung der RNase H2-defizienten Zellen sollte mit dem CRISPR-Cas9-System die am einfachsten zu konfigurierende Genom-Editierungstechnik herangezogen werden (Boettcher und McManus, 2015). Mit Hilfe einer murinen Indikator-Zelllinie sollte die optimale guide-RNA identifiziert und anschließend eingesetzt werden. Eine Übersicht der in dieser Dissertation angewendeten experimentellen Vorgehensweise ist Abbildung 7 zu entnehmen.



**Abbildung 7: Schema zur Zusammenfassung der experimentellen Vorgehensweise in dieser Dissertation.**

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

CO <sub>2</sub> -Inkubator	<i>HERAcell 150</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
Durchflusszytometer	<i>FACSCANTO I</i> BD Biosciences (Heidelberg, DE)
Elektrophoresekammern	<i>Mini-PROTEAN Tetra Cell</i> Bio-Rad Laboratories GmbH (München, DE)  <i>Mini-sub Cell GT</i> Bio-Rad Laboratories GmbH (München, DE)
Inkubator	<i>Serie B Inkubatoren Classic.Line</i> Binder GmbH (Tuttlingen, DE)
Kühlzentrifuge	<i>Centrifuge 5417R</i> Eppendorf AG (Hamburg, DE)
<i>LightCycler</i>	<i>LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II</i> Roche Life Science GmbH (Penzberg, DE)
Luminometer	<i>GloMax<sup>®</sup> 96 Microplate Luminometer w/Dual Injectors</i> Promega GmbH (Mannheim, DE)
Mikrotiterplatten reader	<i>Tecan Infinite 200Pro</i> Tecan Group Ltd. (Männedorf, CH)  <i>Tecan Spectra Rainbow</i> Tecan Group Ltd. (Männedorf, CH)
<i>semi-dry</i> Transfer-System	<i>Trans-Blot Turbo Transfer System</i> Bio-Rad Laboratories GmbH (München, DE)
Spektralphotometer	<i>NanoDrop™ ND-1000</i> VWR International GmbH (Darmstadt, DE)

---

Sterilbank	<i>Heraeus® HERAsafe® KS</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
Thermoblock	<i>Thermomixer 5436</i> Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Thermocycler	<i>peqSTAR 96X Universal Gradient</i> VWR International GmbH (Darmstadt, DE)
Western Blot imager	<i>FluorChem Q Multimage III</i> Proteinsimple (San José, CA, US)

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Filterpapier	<i>Whatman 3 mm Gel-Blotting Papiere</i> Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)
Kryoröhrchen	<i>1,6 ml CryoPure Gefäße</i> Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE)
Mikrotiterplatten	<i>96 well Mikrotiterplatten, schwarz, PS, F-Boden</i> Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, DE) <i>96 well Mikrotiterplatten, weiß, PS, F-Boden</i> Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, DE) <i>F96 Cert. MaxiSorp Nunc-immuno plate</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
PVDF-Membran	<i>0,45 µm Immobilon-P PVDF Membran</i> Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, DE)
qRT-PCR-Platten	<i>96 / 384 well LC 480 PCR Platten, weiß</i> Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, DE)
selbstklebender Film	<i>BZO Adhesive Optical Seal Film</i> Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, DE)
Spritzenvorsatzfilter	<i>Minisart® High Flow 0,22 µm</i> Sartorius AG (Göttingen, DE)

---

Zellkulturflaschen	<i>TC-Flaschen</i> (verschiedene) Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE)
Zellkulturmultiwellplatten	<i>Cellstar® Multiwellplatten</i> (verschiedene) Greiner Bio-One GmbH( Frickenhausen, DE)  <i>CellCarrier-384 Ultra Microplates, black</i> PerkinElmer Cellular Tech. Germany GmbH (Hamburg, DE)
Zellkulturplatten	<i>TC-Schalen</i> (verschiedene) Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE)
Zentrifugenröhrchen	<i>15 / 50 ml Schraubröhren</i> Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE)

### 2.1.3 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Grundchemikalien in analysenreiner Qualität von folgenden Herstellern bezogen: Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, DE), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE), Roche Life Science GmbH (Penzberg, DE), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, DE).

Acrylamid-Bisacrylamid	<i>Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)</i> Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)
dNTPs	<i>dATP/dCTP/dGTP/dTTP Solution 100 mM</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
dUTP*	<i>Aminoallyl-dUTP-XX-ATTO-488</i> Jena Bioscience GmbH (Jena, DE)
ECL-Lösung	<i>SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
Ethidiumbromid	<i>Ethidiumbromidlösung 0,5 % i. d. Tropfflasche</i> Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)
Milchpulver	<i>Milchpulver Blotting-Grade</i> Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)
Proteaseinhibitor	<i>cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail</i> Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, DE)

---

qRT-PCR-Oligonukleotide	<i>Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)  <i>Random Hexamer Primer</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
RNase-Inhibitor	<i>RiboLock RNase Inhibitor</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
Stripping-Puffer	<i>Restore Western Blot Stripping-Puffer</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
SYBR Green	<i>Maxima SYBR Green qPCR Master Mix</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
SYTOX® AADvanced™	<i>SYTOX® AADvanced™ Dead Cell Stain Kit</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
Trypanblau	<i>Gibco® Trypan Blue Stain 0.4 %</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)

#### 2.1.4 Antibiotika

Ampicillin	<i>D-α-Aminobenzylpenicillin Natriumsalz</i> Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE) Endkonzentration: 50-100 µg/ml
G418	<i>Geneticindisulfat-Lösung 50 mg/ml</i> Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE) Endkonzentration: 700 µg/ml
Puromycin	<i>Puromycin Dihydrochlorid</i> Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE) Endkonzentration: 1000 µg/ml

#### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Anoden-Transferpuffer	300 mM TRIS-HCl (pH 10,4), 20 % (v/v) Ethanol absolut
Blockierpuffer	1 x TBST, 5 % (w/v) Milchpulver

DNA-Ladepuffer [6 x]	10 mM TRIS-HCl (pH 7,5), 50 mM EDTA, 15 % (w/v) Ficoll 400, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, 0,03 % (w/v) Xylencyanol FF, 0,4 % (w/v) Orange G
Fixierlösung (Alu)	50 % (v/v) Methanol, 50 % (v/v) Aceton
Fixierlösung (Mikronuklei)	100 mM K-PIPES (pH 6,8), 10 mM EGTA, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1 % (v/v) Tween 20, 3,7 % (v/v) Formaldehyd
Kathoden-Transferpuffer	25 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 40 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 20 % (v/v) Ethanol absolut
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH auf 7,0 justieren, [1,5 % (w/v) Agar-Agar für Festmedien]
Lysis-Puffer 1	50 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 280 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 % (v/v) NP-40, 10 % (v/v) Glycerin, 0,1 mM Natriumvanadat, 1 mM DTT
Lysis-Puffer 2	20 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 0,1 mM Natriumvanadat, 1 mM DTT
Poly-L-Lysin	0,1 mg/ml Poly-L-Lysin, 100 mM Borsäure, 75 mM NaCl, 25 mM Natriummetaborat
Protein-Ladepuffer [5 x]	250 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 50 % (v/v) Glycerin, 15 % (w/v) SDS, 25 % (v/v) beta-Mercaptoethanol, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
Reaktionspuffer	50 mM TRIS-HCl (pH 8), 60 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,01 % (w/v) BSA, 0,01 % (v/v) TritonX-100
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM TRIS-HCl (pH 8,3), 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
SDS-PAGE-Lysis-Puffer	50 mM TRIS-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % (v/v) NP-40, 1 % (v/v) TritonX-100, 1 Proteaseinhibitor-tablette je 50 ml
SDS-PAGE-Sammelgel	125 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 0,1 % (w/v) SDS, 5 % (w/v) Rotiphorese® Gel 30, 0,01 % (v/v) TEMED, 0,1 % (w/v) APS
SDS-PAGE-Trenngel	375 mM TRIS-HCl (pH 8,8), 0,1 % (w/v) SDS, 8 bis 12 % (w/v) Rotiphorese® Gel 30, 0,04 % (v/v) TEMED, 0,1 % (w/v) APS

---

TAE	40 mM TRIS, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA (pH 8,0)
TBS	20 mM TRIS-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl
TBST (Immunoblot)	20 mM TRIS-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20
TBST (Mikronuklei)	10 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20

### 2.1.6 Kits

BCA-Bestimmung	<i>Pierce™ BCA Protein Assay Kit</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
DNA-(Gel-)Extraktion	<i>GeneJET Gel Extraction Kit</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
DNA-Isolierung	<i>GeneJET Genomic DNA Purification Kit</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
dualer Luciferase-assay	<i>Dual-Luciferase® Reporter Assay System</i> Promega GmbH (Mannheim, DE)
EdU-assay	<i>Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry Assay Kit</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
Plasmid-Präparation	<i>GeneJET Plasmid Miniprep Kit</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)  <i>NucleoBond® Xtra Midi Kit</i> Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, DE)
RNA-Isolierung	<i>GeneJET RNA Purification Kit</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)

### 2.1.7 Enzyme

alkalische Phosphatase	<i>FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
------------------------	---

---

DNA-Polymerasen	<i>DNA Polymerase I (E. coli)</i> New England Biolabs Inc. (Ipswich, MA, US) <i>DreamTaq DNA Polymerase</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US) <i>Phusion High-Fidelity DNA Polymerase</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
Kinase	<i>T4 Polynukleotid Kinase</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
Ligase	<i>T4 DNA Ligase</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
Restriktionsendonukleasen	<i>EcoRI, HindIII, MscI (Mlsl), NotI, SapI (Lgul)</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
reverse Transkriptase	<i>RevertAid Reverse Transcriptase (RT)</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
Ribonuklease	<i>RNase A, DNase and protease-free (10 mg/mL)</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US) <i>RNase HII (E. coli)</i> New England Biolabs Inc. (Ipswich, MA, US)

## 2.1.8 Antikörper

### 2.1.8.1 Primärantikörper

$\alpha$ - $\beta$ -Actin	<i>monoclonal anti-<math>\beta</math>-Actin antibody produced in mouse</i> Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, DE) Produktnr. #A5441, Anwendung: 1:10.000
$\alpha$ -flag M2	<i>monoclonal anti-FLAG<sup>®</sup> M2 antibody produced in mouse</i> Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, DE) Produktnr. #F1804, Anwendung: 1:1.000

$\alpha$ -RNASEH2A      *rabbit polyclonal RNase H2A antibody*  
 OriGene Technologies, Inc. (Rockville, MD, US)  
 Produktnr. #TA306706, Anwendung: 1:1.000

$\alpha$ -RNASEH2B      *rabbit polyclonal anti-RNASEH2B antibody*  
 Abcam plc (Cambridge, UK)  
 Produktnr. #ab122619, Anwendung: 1:1.000

#### 2.1.8.2 Sekundärantikörper

$\alpha$ -Maus      *Ziege IgG anti-Maus IgG (H+L)-HRPO*  
 Dianova GmbH (Hamburg, DE)  
 Produktnr. #115-035-146, Anwendung: 1:5.000

$\alpha$ -Kaninchen      *Ziege IgG anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRPO*  
 Dianova GmbH (Hamburg, DE)  
 Produktnr. #111-035-144, Anwendung: 1:5.000

#### 2.1.9 Größenstandards

DNA-Gelelektrophorese      *GeneRuler 100 bp DNA Ladder*  
 Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)  
  
*GeneRuler 1kb DNA Ladder*  
 Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)

Protein-Gelelektrophorese      *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*  
 Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)

#### 2.1.10 Oligonukleotide

Für das Design der nachfolgend aufgelisteten Oligonukleotide wurde die Software ‚*Primer3web*‘ verwendet, die über die Website <http://primer3.ut.ee/> zur Verfügung gestellt wird. Alle DNA-Oligonukleotide wurden ausnahmslos über die Firma Metabion International AG (Planegg, DE) bezogen. Angegeben sind die Sequenzen in 5′-3′-Richtung soweit nicht anders vermerkt.

## 2.1.10.1 für Klonierungen

CflagSTOP-EcoRI-R	CGATGAATTCTTAAACGGGCCCTTGTC
EcoRI-RNaseH1-F	ATCGGAATTCATGTTCTATGCCGTGAGGAG
guide#1F	ACCGGACACGGACTTTGTCGGCT
guide#1R	AACAGCCGACAAAGTCCGTGTCC
guide#3F	ACCGCGTTCAGGAAATATCGGT
guide#3R	AACACCGATATTCCTGGAACGC
guide#4F	ACCGGCTCCTTGCGGCACACCGC
guide#4R	AACGCGGTGTGCCGCAAGGAGCC
H2A-EcoRI-F	ATCGGAATTCATGGATCTCAGCGAGCTG
H2Astop-EcoRI-R1	CGATGAATTCCTAGAGGCTGGTTGCTGA
HindIII-RNaseH1-F	ATCGAAGCTTATGTTCTATGCCGTGAGGAG
RNaseH1-NotI-R	CGATGCGGCCGCCCGTCTCCGATTGTTTAGCTC
Ind_H2A-F	CGATGCGGCCGCATGGATCTCAGCGAGCTG
Ind_H2A-R2	CGATTGGCCAGGCTGGTTGCTGACTCCA

## 2.1.10.2 für qRT-PCRs

ALU-F	GAGGCTGAGGCAGGAGAATCG
ALU-R	GTCGCCCAGGCTGGAGTG
GAPDH-F	GATCATCAGCAATGCCTCCT
GAPDH-R	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA
HERV-K_pro-F	GCCGATGAAAAGCCCGTAAGG
HERV-K_pro-R	TTGACACTCAGGATTGGCGTTTTTC
HERV-K_rec-F	AGTTGCCATCCACCAAGAAG
HERV-K_rec-R	CGATGGTTGCTGTCTCTTCA
IFI27-F	TGCTCTCACCTCATCAGCAGT
IFI27-R	CACAACCTCCAATCACAAC
IFI44-F	CTGGGGCTGAGTGAGAAAGA
IFI44-R	AGCGATGGGGAATCAATGTA

---

IFN- $\alpha$ (1,13)-F	GCAAGCCCAGAAGTATCTGC
IFN- $\alpha$ (1,13)-R	ACTGGTTGCCATCAAACCTCC
IFN- $\beta$ -F	AAACTCATGAGCAGTCTGCA
IFN- $\beta$ -R	AGGAGATCTTCAGTTTCGGAGG
ISG15-F	GAGAGGCAGCGAACTCATCT
ISG15-R	CTTCAGCTCTGACACCGACA
LINE-1-ORF1-F	GGTACCCTCAAAGGAAAGCC
LINE-1-ORF1-R	GCCTGGTGGTGACAAAATCTC

### 2.1.10.3 für Sequenzierungen

Crispr_Seq-F	GCCCGCTCTAGATTTCCCAT
Ef1a_Seq-F	TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC
MS-F	TATGGTAATTGTATCTCAGCGAGCTGGAGAGA
MS-index	GCGGTGGTACGGAGGATGGGCTGACTGACT
MS-R	AGTCAGTCAGCCATCCTCCGTACCACGCC
NGS-F1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAACCGCATTATGGTA ATTGTATCTCAGCGAGCTGGAGAGA
NGS-F2	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAAGGCCTTTATGGTA ATTGTATCTCAGCGAGCTGGAGAGA
NGS-F3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGAGTGTGTATGGT AATTGTATCTCAGCGAGCTGGAGAGA
NGS-F4	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCACAAGTCTATGGTA ATTGTATCTCAGCGAGCTGGAGAGA
NGS-F5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGTTCCTATATGGTA ATTGTATCTCAGCGAGCTGGAGAGA
NGS-F6	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTGGATTATGGTA ATTGTATCTCAGCGAGCTGGAGAGA
NGS-R1	CAAGCAGAAGACGGCATAACCGGAAAGTCAGTCAGC CCATCCTCCGTACCACGCC

## 2.1.10.4 für RNASEH1/2-Aktivitätstests

Angegeben sind die Sequenzen der doppelsträngigen Substrate für den RNASEH1/2-Aktivitätstest inkl. ihrer Modifikationen. Desoxyribonukleotide sind in Großbuchstaben angeführt, Ribonukleotide in Kleinbuchstaben. Die verwendeten Oligonukleotide wurden zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Andrew Jackson (University of Edinburgh, MRC Human Genetics Unit).

DNA-R-DNA:DNA	GATCTGAGCCTGGgAGCT-3'-Fluorescein CTAGACTCGGACCCTCGA-5'-DABCYL
RNA:DNA	gaucugagccugggagct-3'-Fluorescein CTAGACTCGGACCCTCGA-5'-DABCYL
DNA:DNA	GATCTGAGCCTGGGAGCT-3'-Fluorescein CTAGACTCGGACCCTCGA-5'-DABCYL

## 2.1.11 Plasmide

## 2.1.11.1 für die Genexpression

Ef1 $\alpha$ -H2A-IRES-puro	lentiviral nutzbarer Säugetier-Expressionsvektor für die humane RNASEH2A inkl. Puromycin-Resistenzgen, wurde für die Rekonstituierung von RNASEH2A-defizienten Zellen verwendet diese Arbeit
Ef1 $\alpha$ -RNaseH1-3xflag(C)	lentiviral nutzbarer Säugetier-Expressionsvektor für die nukleäre Isoform der humanen RNASEH1 mit C-terminalem 3x <i>flag-tag</i> inkl. Puromycin-Resistenzgen, wurde für die Rekonstituierung von RNASEH2A-defizienten Zellen verwendet diese Arbeit
LeGO-H2A-eGFP	lentiviral nutzbarer Säugetier-Expressionsvektor für die humane RNASEH2A mit C-terminalem <i>eGFP-tag</i> , wurde für die Generierung einer murinen RNASEH2A-Indikator-Zelllinie verwendet diese Arbeit

pCMV-dR8.2-dvpr      Verpackungsplasmid für die lentivirale Transduktion von Säugetier-Zellen  
zur Verfügung gestellt von Dr. Dirk Schmidt-Arras (Universität Kiel, Institut für Biochemie)

pCMV-VSV-G      Hüllplasmid für die lentivirale Transduktion von Säugetier-Zellen  
zur Verfügung gestellt von Dr. Dirk Schmidt-Arras (Universität Kiel, Institut für Biochemie)

#### 2.1.11.2 für die Genom-Editierung

LeGO-Cas9-guide#1      Säugetier-Expressionsvektor für Cas9 sowie die guideRNA#1 für die Genom-Editierung der humanen RNASEH2A  
diese Arbeit

LeGO-Cas9-guide#3      Säugetier-Expressionsvektor für Cas9 sowie die guideRNA#3 für die Genom-Editierung der humanen RNASEH2A  
diese Arbeit

LeGO-Cas9-guide#4      Säugetier-Expressionsvektor für Cas9 sowie die guideRNA#4 für die Genom-Editierung der humanen RNASEH2A  
diese Arbeit

#### 2.1.11.3 für Klonierungen

Ef1 $\alpha$ \_Large T-antigen\_  
Ires\_Puro      lentiviral nutzbarer Säugetier-Expressionsvektor für die SV40 *large T-antigen*-vermittelte Immortalisierung  
Mali *et al.* (2008)  
addgene #18922

LeGO-Cas9      lentiviral nutzbarer Zielvektor für die Klonierung einer guide-RNA und die Expression von Cas9  
zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Boris Fehse (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Abteilung Zell- und Gen-therapie)

---

LeGO-iG2	<p>lentiviral nutzbarer Säugetier-Expressionsvektor für Zielgen-IRES-eGFP Konstrukte, wurde für die Klonierung der A-Untereinheit verwendet</p> <p>zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Boris Fehse (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Abteilung Zell- und Gentherapie)</p>
pcDNA4TO-H2A-3xflag	<p>Säugetier-Expressionsvektor für die humane RNASEH2A mit C-terminalem 3x <i>flag-tag</i>, wurde für die Amplifikation der A-Untereinheit verwendet</p> <p>zur Verfügung gestellt von Jessica Schneider (Universität Kiel, Institut für Biochemie)</p>
pcDNA4TO-RNase H1-3xflag	<p>Säugetier-Expressionsvektor für die nukleäre Isoform der humanen RNASEH1 mit C-terminalem 3x <i>flag-tag</i>, wurde für die Amplifikation des Enzyms verwendet</p> <p>diese Arbeit</p>
2.1.11.4 für Retrotranspositionsnachweise	
99PUR-JM111-EGFP	<p>inaktives Reporterplasmid zum Nachweis von LINE-1-Neuintegrationen mittels eGFP-Fluoreszenz (Negativkontrolle)</p> <p>zur Verfügung gestellt von Dr. John Goodier (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, US, McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine)</p>
99PUR-RPS-EGFP	<p>Reporterplasmid zum Nachweis von LINE-1-Neuintegrationen mittels eGFP-Fluoreszenz</p> <p>zur Verfügung gestellt von Dr. John Goodier (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, US, McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine)</p>

---

Heidman ALU neo tet	<p>Reporterplasmid zum Nachweis von Alu-Neuintegrationen mittels G418-Selektion</p> <p>zur Verfügung gestellt von Dr. John Goodier (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, US, McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine)</p>
pcDNA4TO-3xflag(N)	<p>Säugetier-Expressionsvektor, wurde als Negativkontrolle zum Nachweis von Alu-Neuintegrationen mittels G418-Selektion verwendet</p> <p>zur Verfügung gestellt von Dr. Athena Chalaris-Rißmann (Universität Kiel, Institut für Biochemie)</p>
pcORF2	<p>Expressionsplasmid für ORF2p des humanen LINE-1-Konstrukts, wurde für die Mobilisierung von Alu-Elementen beim Nachweis von Alu-Neuintegrationen mittels G418-Selektion verwendet</p> <p>zur Verfügung gestellt von Dr. John Goodier (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, US, McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine)</p>
pEGFP-N1	<p>Expressionsplasmid für eGFP, wurde zur Feststellung der Transfektionseffizienz beim Nachweis von LINE-1-Neuintegrationen mittels eGFP-Fluoreszenz verwendet</p> <p>zur Verfügung gestellt von Dr. Athena Chalaris-Rißmann (Universität Kiel, Institut für Biochemie)</p>
pYX015	<p>inaktives Reporterplasmid zum Nachweis von LINE-1-Neuintegrationen mittels Luciferaseaktivität (Negativkontrolle)</p> <p>zur Verfügung gestellt von Dr. Wenfeng An (South Dakota State University, Markl Faculty Scholar in Cancer Research)</p>
pYX017	<p>Reporterplasmid zum Nachweis von LINE-1-Neuintegrationen mittels Luciferaseaktivität</p> <p>zur Verfügung gestellt von Dr. Wenfeng An (South Dakota State University, Markl Faculty Scholar in Cancer Research)</p>

### 2.1.12 Zellkulturmedien

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose, with 4500 mg/l glucose, L-glutamine, sodium pyruvate, and sodium bicarbonate</i> Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, DE)
FCS	<i>Fetal Bovine Serum, South America origin</i> PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, DE)
<i>Opti-MEM</i>	<i>Gibco® Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, GlutaMAX™ Supplement</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
Penicillin-Streptomycin	<i>Penicillin-Streptomycin with 10.000 units penicillin and 10 mg streptomycin per ml in 0,9 % NaCl</i> Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, DE)
Polybren	<i>1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylene polymethobromide, hexadimethrine bromide</i> Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, DE)
Trypsin/EDTA	<i>Trypsin-EDTA solution</i> Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, DE)
<i>TurboFect</i>	<i>TurboFect Transfection Reagent</i> Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, US)
Einfriermedium	70 % (v/v) DMEM, 20 % (v/v) FCS, 10 % (v/v) DMSO

### 2.1.13 Organismen

#### 2.1.13.1 *Escherichia coli*

XL-1 Blue	kompetenter Abkömmling des <i>E. coli</i> K12-Stammes, der die Blau-Weiß-Selektion rekombinanter Plasmide erlaubt Stratagene (San Diego, CA, US)
-----------	---

2.1.13.2 *Homo sapiens*

293T	embryonale Nierenzelllinie, die das ‚SV40 large T-antigen‘ beinhaltet zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Boris Fehse (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Abteilung Zell- und Gentherapie)
293T_KO1 bis 4	RNASEH2A-defiziente 293T-Klone 1 bis 4 diese Arbeit
293T_KO1/2+H2A	mit dem <i>RNASEH2A</i> -Gen rekonstituierter RNASEH2A-defizienter 293T-Klon 1 oder 2 diese Arbeit
293T_KO1/2+H1	mit dem <i>RNASEH1</i> -Gen rekonstituierter RNASEH2A-defizienter 293T-Klon 1 oder 2 diese Arbeit
HeLa HA	Cervixkarzinom-Zelllinie, die eine hohe Retrotranspositionsaktivität aufweist zur Verfügung gestellt von Dr. John Goodier (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, US, McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine)
HeLa_KO1 bis 2	RNASEH2A-defiziente HeLa HA-Klone 1 bis 2 diese Arbeit

2.1.13.2 *Mus musculus*

H2B+/+	p53-defiziente embryonale Fibroblasten (Reijns <i>et al.</i> , 2012) zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Andrew Jackson (University of Edinburgh, MRC Human Genetics Unit)
H2B-/-	RNaseH2B- und p53-defiziente embryonale Fibroblasten (Reijns <i>et al.</i> , 2012) zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Andrew Jackson (University of Edinburgh, MRC Human Genetics Unit)

NIH/3T3	embryonale Fibroblastenzelllinie zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Boris Fehse (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Abteilung Zell- und Gentherapie)
NIH/3T3-RNASEH2A-eGFP	das <i>RNASEH2A-eGFP</i> -Fusionsgen stabil exprimierende NIH/3T3-Indikatorzelllinie diese Arbeit

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA

Die genomische DNA von kultivierten Säugerzellen wurde mit Hilfe des *GeneJET Genomic DNA Purification Kits* entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Diese Technologie beruht auf der enzymatischen Lyse des Zellmaterials und der anschließenden Reinigung der in Lösung gebrachten DNA mittels Silicagel-Membran-Säulen. Die Kultivierung der verwendeten Zellen folgte den Standard-Kulturbedingungen (siehe Kapitel 2.2.3.1, Seite 53). Die Konzentration der isolierten genomischen DNA wurde photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1.17, Seite 47).

#### 2.2.1.2 Plasmid-DNA-Präparation

Bei dieser Präparationstechnik wird die bakterielle Plasmid-DNA durch die von Birnboim und Doly (1979) etablierte alkalische Lyse von der genomischen DNA separiert. Ausschlaggebend hierbei ist die Permeabilisierung der Zellmembran durch Natriumdodecylsulfat sowie die Denaturierung der DNA durch Natriumhydroxid. Bei der anschließenden Neutralisierung der Lösung kann die einzelsträngige Plasmid-DNA auf Grund ihrer Zirkularität und der geringen Größe wieder zu doppelsträngigen Molekülen renaturieren, wohingegen die genomische DNA nicht zu hybridisieren vermag.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten *Escherichia coli* Bakterien im kleinen Maßstab („Minipräparation“) wurde das *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Anzucht der Bakterien erfolgte durch Inokulation von 1,8 ml antibiotikahaltigem LB-Medium mit einer singulären Kolonie und anschließender Kultivierung bei 37 °C und 900 rpm für 16 bis 18 h im Thermoblock.

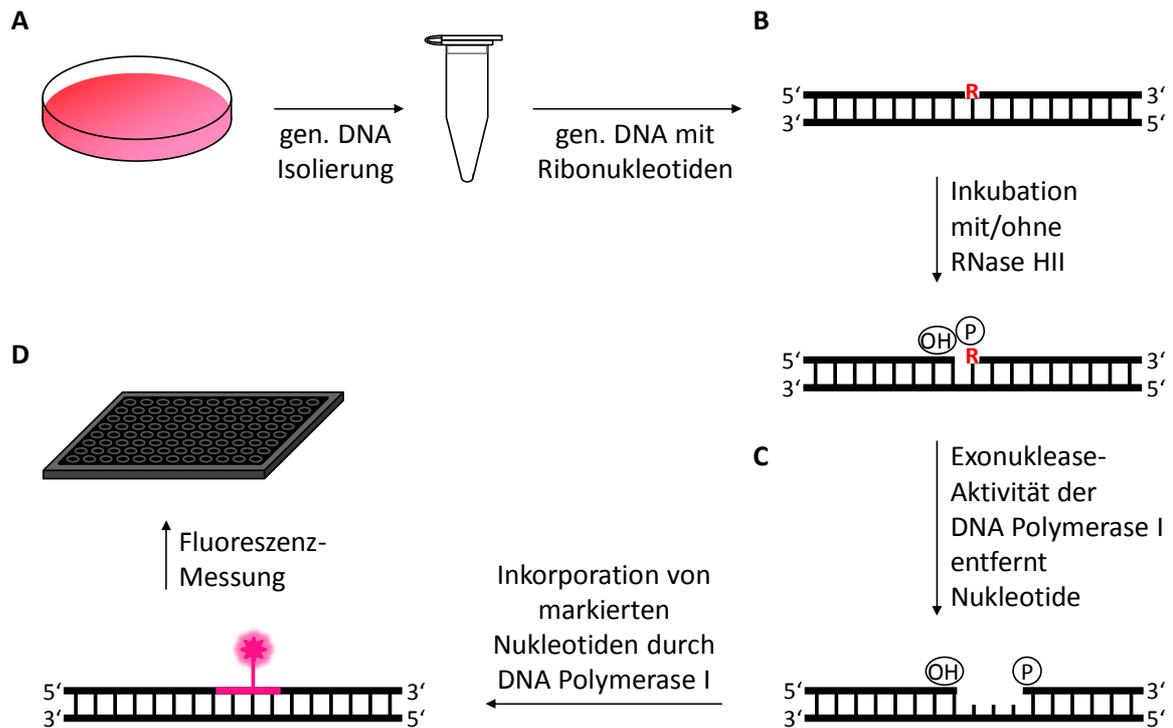
Die Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab („Midipräparation“) erfolgte unter Verwendung des *NucleoBond® Xtra Midi Kits* aus 100 ml Bakteriensuspension zu den oben genannten Kulturbedingungen. Im Anschluss an die Plasmid-Präparation wurde die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1.17, Seite 47).

### 2.2.1.3 Nachweis von Ribonukleotid-Insertionen in genomischer DNA (*„nick-translation assay“*)

Zur Ermessung der genetischen Integrität von Zelllinien hinsichtlich des irrtümlichen Einbaus von Ribonukleotiden in deren genomische DNA wurde eine fluoreszenzbasierte Abwandlung des in Hiller *et al.* (2012) beschriebenen *nick-translation assays* verwendet. Diese Methode ermöglicht die gezielte Spaltung von ribonukleotidhaltiger DNA mittels RNase H2-Hydrolyse und die anschließende Markierung von so entstandenen Einzelstrangbrüchen über den Einbau von fluorophorgekoppelten Nukleotiden.

Das Zellmaterial aus jeweils einer konfluenten T-75 Zellkulturflasche diente zur Isolation der genomischen DNA (siehe Abbildung 8A, Seite 38; zur Methode der genomischen DNA Isolierung siehe Kapitel 2.2.1.1, Seite 36). Nach deren Anreicherung mittels Natriumacetat-Fällung (siehe Kapitel 2.2.1.5, Seite 40) sowie einer Konzentrationsbestimmung (siehe Kapitel 2.2.1.17, Seite 47) erfolgte die Inkubation von je 1 µg genomischer DNA pro Ansatz mit 5 U bzw. ohne *RNase HII*-Enzym bei 37 °C für 16 bis 18 h (siehe Abbildung 8B). Der Versuch wurde in technischen Triplikaten mit je 50 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Anschließend wurde jeder Ansatz separat durch Natriumacetat-Fällung von Enzymen und Salzen gereinigt.

Für die Markierung der durch die Hydrolyse erfolgten Einzelstrangbrüche mit fluorescein-gekoppeltem dUTP (*Aminoallyl-dUTP-XX-ATTO-488*, dUTP\*) wurde jeder Ansatz mit jeweils 5 U *DNA Polymerase I*, je 20 µM dATP, dGTP, dCTP und je 10 µM dTTP sowie dUTP\* in 1 x *DNA Polymerase I* Puffer im 20 µl Gesamtvolumen inkubiert (siehe Abbildung 8C). Die Inkubation fand bei 15 °C für 2 h im Thermocycler statt. Danach wurden die Proben von nicht-inkorporierten Nukleotiden unter Verwendung des *GeneJET Gel Extraction Kits* über eine Silicagel-Membran-Säule bereinigt und in 60 µl Elutionspuffer eluiert (siehe Kapitel 2.2.1.6, Seite 40). Die Messung der Fluoreszenz des Eluats erfolgte in *96 well Mikrotiterplatten (schwarz, PS, F-Boden)* unter Benutzung eines *Tecan Infinite 200Pro* Mikrotiterplatten *readers* mit einem 485 nm Exzitationsfilter und einem 535 nm Emissionsfilter (siehe Abbildung 8D). Nach der Ermittlung der Mittelwerte aus den technischen Triplikaten wurden die Werte um die Hintergrundfluoreszenz, d. h. die ohne *RNase HII*-Enzym inkubierten Proben, korrigiert.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des *nick-translation assays*.** Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde auf eine Darstellung der Reinigungsschritte verzichtet. **A:** Aus Zellmaterial wird die genomische DNA isoliert. **B:** Die isolierte genomische DNA wird mit bzw. ohne *RNase HIII*-Enzym inkubiert. Bei Inkubation mit dem Enzym kommt es zur Hydrolyse des Doppelstrangabschnitts, in den ein Ribonukleotid (dargestellt als rotes R) inkorporiert ist. Dadurch entsteht ein Einzelstrangbruch mit einer freien 3'-OH-Gruppe, ein sog. ‚*nick*‘, der 5' vom Ribonukleotid positioniert ist (Eder *et al.*, 1993; Haruki *et al.*, 2002). **C:** Ausgehend von dieser OH-Gruppe werden durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *DNA Polymerase I* ein bis mehrere Nukleotide entfernt und simultan die entstehende Lücke mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden aufgefüllt (Kelly *et al.*, 1970; Klett *et al.*, 1968). **D:** Das Signal der inkorporierten Nukleotide wird mittels Fluoreszenz-Messung photometrisch erfasst.

#### 2.2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die exponentielle Amplifikation von DNA-Abschnitten *in vitro* wurde die von Mullis *et al.* (1986) entwickelte Methode der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) verwendet. Dabei katalysieren thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerasen ausgehend von einem Oligonukleotid als Startmolekül die Zweitstrangsynthese an einer Matrize. Jede PCR beinhaltet den zyklischen Ablauf von drei Schritten: die Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, die Bindung der Oligonukleotide an die Einzelstränge sowie deren Elongation durch die DNA-Polymerase. Je nach Art der Applikation kamen verschiedene DNA-Polymerasen mit bzw. ohne Korrekturlese-Funktion (*proofreading*) zum Einsatz.

Zum Nachweis spezifischer DNA-Fragmente in einem Plasmid bzw. in genomischer DNA mit einer Maximalgröße von bis zu 3 kb pro Fragment erfolgte die Amplifikation mittels *DreamTaq DNA Polymerase*. Jeder Reaktionsansatz enthielt 1 bis 10 ng Plasmid-DNA bzw. 10 bis 200 ng genomische DNA als Matrize sowie Enzymlösung, Puffer, dNTPs und Oligonukleotide in der den Herstellerangaben entsprechenden Konzentration. Der Reaktionsablauf erfolgte im Thermocycler mit einem Endvolumen von 30 bis 50 µl je Ansatz, wobei die Hybridisierungstemperatur in Abhängigkeit zum verwendeten Oligonukleotidpaar gewählt wurde:

initiale Denaturierung	3 min	95 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	} 35 x
Hybridisierung	30 s	variabel	
Elongation	1 kb/min	72 °C	
finale Elongation	10 min	72 °C	

Für den Sonderfall der sog. *colony-PCR* wurde ebenfalls die *DreamTaq DNA Polymerase* verwendet. Diese Technik kommt im Zuge einer Klonierung zum Einsatz, da sie es ermöglicht, schnell den korrekten Einbau von DNA-Fragmenten in ein Vektor-Grundgerüst zu überprüfen. Es kann dabei auf eine vorherige Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den transformierten *E. coli* Bakterien verzichtet werden und als Matrize für die PCR stattdessen direkt Bakterienzellmaterial eingesetzt werden. Dafür wurde jeweils eine singuläre Kolonie mit einer autoklavierten Pipettenspitze auf einer frischen Platte mit LB-Selektivmedium ausgestrichen und der Rest des anhaftenden Zellmaterials im jeweiligen Reaktionsansatz resuspendiert. Anschließend erfolgte der Reaktionsablauf wie oben beschrieben. Die Platte wurde für 16 bis 18 h bei 37 °C im Inkubator bebrütet.

Für die sequenzgenaue Amplifikation von DNA-Fragmenten zu Klonierungszwecken kam die *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* mit Korrekturlese-Funktion zum Einsatz. Jeder Reaktionsansatz enthielt 0,1 bis 10 ng Plasmid-DNA, 50 bis 250 ng genomische DNA bzw. max. 10 % (v/v) cDNA als Matrize sowie Enzymlösung, Puffer, dNTPs und Oligonukleotide in der den Herstellerangaben entsprechenden Konzentration. Der Reaktionsablauf erfolgte im Thermocycler mit einem Endvolumen von 50 µl je Ansatz. Die verwendeten Oligonukleotide verfügten neben der für das jeweilige Fragment spezifischen Sequenz über zusätzliche Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen. Auf Grund der daraus resultierenden hohen Schmelztemperatur der Oligonukleotide wurde ein zweipha-

siger Amplifikationsablauf gewählt, bei dessen erster Phase sich die Hybridisierungstemperatur nach dem Oligonukleotidpaar abzüglich der Restriktionsendonuklease-Sequenzen berechnete und in dessen zweiter Phase zu der Elongationszeit 30 s für die Hybridisierung addiert wurden:

initiale Denaturierung	30 s	98 °C	
Denaturierung	10 s	98 °C	} 5 x
Hybridisierung	30 s	variabel	
Elongation	15 bis 40 s/kb	72 °C	
Denaturierung	10 s	98 °C	} 35 x
Elongation	15 bis 40 s/kb + 30 s	72 °C	
finale Elongation	10 min	72 °C	

#### 2.2.1.5 Natriumacetat-Fällung von DNA

Die Natriumacetat-Fällung nach Sambrook *et al.* (1989) kann sowohl zur Konzentrierung von DNA-Lösungen eingesetzt werden als auch zur Reinigung von in der Lösung befindlichen Enzymen, Salzen, inhibitorischen Substanzen etc. Auf Grund ihres negativ geladenen Phosphat-Grundgerüsts ist DNA als polares Molekül gut wasserlöslich. Um die Wasserlöslichkeit herabzusetzen, wird ihre Hydrathülle in Anwesenheit von positiv geladenen Ionen und einem Überschuss an Ethanol verdrängt; die DNA kann somit pelletiert werden. Die DNA-Lösung wurde dazu mit  $\frac{1}{10}$  Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Vol. Ethanol absolut für 30 min bei -80 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 20 min bei maximaler Umdrehung und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das verbleibende Präzipitat mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Präzipitat getrocknet und die DNA in einem geeigneten Volumen sterilem zweifach destillierten Wasser wieder in Lösung gebracht. Die Konzentration der DNA wurde abschließend photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1.17, Seite 47).

#### 2.2.1.6 Säulenbasierte Aufreinigung von DNA

Neben der Natriumacetat-Fällung (siehe Kapitel 2.2.1.5, Seite 40) kann DNA auch unter Zuhilfenahme des *GeneJET Gel Extraction Kits* über eine säulenbasierte Technologie gereinigt werden. Dabei bindet die DNA in Anwesenheit von chaotropen Salzen und Ethanol an

eine Silicagel-Membran, während Proteine, Polysaccharide usw. die Membran ohne Bindung passieren. Für die Aufreinigung wurde das Volumen der DNA-Lösung zunächst mit sterilem zweifach destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 200 µl gebracht. Danach wurde die Lösung mit 100 µl Bindepuffer durch Pipettieren vermenget, 300 µl Ethanol absolut hinzugefügt und die Lösung anschließend auf die Säule aufgetragen. Nach einem Zentrifugationsschritt für 1 min bei 14.000 x g wurde der Durchfluss verworfen, die an die Membran gebundene DNA zweifach mit 700 µl Waschpuffer gewaschen und jeweils durch Zentrifugation mit den oben genannten Einstellungen von den Pufferresten befreit. Zur Elution der DNA wurde die Membran für 1 min mit einem geeigneten Volumen sterilem zweifach destilliertem Wasser inkubiert und zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1.17, Seite 47).

#### 2.2.1.7 Enzymatische Hydrolyse von DNA

Für die enzymatische Hydrolyse von Plasmid-DNA sowie der mittels PCR amplifizierten Fragmente wurden Restriktionsendonukleasen sowie die dazugehörigen Puffer gemäß den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte im Thermoblock mit der für das jeweilige Enzym empfohlenen Temperatureinstellung. Typ II-Restriktionsendonukleasen erkennen und hydrolysieren kurze Sequenzmuster und generieren so spezifische DNA-Enden, die für Klonierungsreaktionen genutzt werden können.

#### 2.2.1.8 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Zur Vermeidung von Rezirkularisierungen eines linearisierten Vektorgrundgerüsts während einer Ligation wurden die 5'-Enden des Plasmids in einigen Fällen simultan zur enzymatischen Hydrolyse dephosphoryliert. Dazu wurde die *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* nach Herstellerangaben in dem jeweiligen Restriktionsendonuklease-Puffer verwendet. Diese Vorgehensweise ist besonders dann ratsam, wenn für die Linearisierung eine einzelne Restriktionsendonuklease genutzt wird, oder aber die beiden verwendeten Enzyme kompatible Enden generieren.

### 2.2.1.9 Phosphorylierung und Hybridisierung von Oligonukleotiden

Sollten synthetisch erzeugte einzelsträngige Oligonukleotide direkt für eine Klonierungsreaktion verwendet werden, so mussten diese zunächst unter Verwendung der *T4 Polynukleotid Kinase* an ihren 5'-OH-Gruppen phosphoryliert werden. Das Enzym wurde nach Herstellerangaben in einem 10 µl Gesamtansatz mit je 1 µl *sense*- und *antisense*-Oligonukleotid (100 µM) eingesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C erfolgte die Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide durch die Denaturierung und anschließende Renaturierung im Thermocycler gemäß folgendem Temperaturverlauf:

**Tabelle 1: Temperatureinstellungen für die Hybridisierung von einzelsträngigen, komplementären Oligonukleotiden.**

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Temperaturänderung [°C/s]
95	10	
95-85		-2,0
85	1	
85-75		-0,3
75	1	
75-65		-0,3
65	1	
65-55		-0,3
55	1	
55-45		-0,3
45	1	
45-35		-0,3
35	1	
35-25		-0,3
25	1	
4	unbegrenzt	

### 2.2.1.10 Ligation

Zur Verknüpfung von linearisierten DNA-Enden wurde die *T4 DNA Ligase* nach Herstellerangaben eingesetzt. Das Enzym katalysiert die beschleunigte Ausbildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen einem 5'-Phosphat-Ende und einem 3'-Hydroxy-Ende eines

DNA-Duplex. Standardmäßig wurden 50 ng Plasmid-DNA und ein dreifacher molarer Überschuss an Transgen-DNA (*,insert'*) je Reaktionsansatz eingesetzt. Für die Berechnung der benötigten Transgen-Menge wurde folgende Gleichung verwendet:

$$\text{Masse Transgen [ng]} = \frac{50 \text{ ng Plasmid} * \text{Länge Transgen [kb]}}{\text{Länge Plasmid [kb]}} * 3$$

#### 2.2.1.11 Agarose-Gelelektrophorese

Desoxyribonukleinsäuren besitzen auf Grund ihres Ribose-Phosphat-Grundgerüsts eine negative Nettoladung und migrieren daher in einem elektrischen Feld durch ein viskoses Medium zur Anode. Durch die Verwendung von porenbildenden Agarose-Gelen als Medium können DNA-Fragmente so ihrer Länge nach separiert werden. Dazu wurde die Agarose in einer Endkonzentration von 0,5 bis 2 % (w/v) mit 1 x TAE-Puffer bis zur vollständigen Lösung aufgekocht, mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und anschließend in einer *Mini-sub cell GT* Kammer zu einem Gel erstarren lassen. Die mit DNA-Ladepuffer in einfacher Endkonzentration versetzten DNA-Proben wurden auf das mit 1 x TAE-Puffer geflutete Agarose-Gel aufgetragen und die Gelelektrophorese bei einer Spannung von 110 V durchgeführt.

#### 2.2.1.12 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Soll aus einem Gemisch von DNA-Fragmenten ein spezifisches Produkt isoliert werden, so eignet sich die Gelextraktion als Purifikationsmethode. Dafür wurden die DNA-Proben zunächst gelelektrophoretisch separiert (siehe Kapitel 2.2.1.11, Seite 43), um anschließend die DNA-Banden von Interesse mit einer Klinge aus dem Gel herauszuschneiden. Zur Minimierung von DNA-Schäden wurde die UV-Exposition während der Visualisierung der Fragmente so gering wie möglich gehalten. Anschließend wurden die ausgeschnittenen Fragmente über Silicagel-Membran-Säulen aufgereinigt. Hierfür wurde das *GeneJET Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben verwendet.

#### 2.2.1.13 Transformation von chemisch-kompetenten *Escherichia coli* Bakterien

Unter Transformation wird die Aufnahme und Inkorporation von exogenen DNA-Molekülen in eine Zelle und damit die Veränderung deren genetischer Ausstattung verstanden. Diese Form des prokaryotischen Gentransfers wurde zuerst 1944 beschrieben (Avery et

al.) und von Mandel und Higa (1970) mit chemisch-kompetenten Bakterien experimentell etabliert. Die Kompetenz, d. h. die Fähigkeit der Bakterien zur Aufnahme von frei im Medium vorliegender DNA, wird durch Calciumchlorid-Behandlung und einen kurzen Hitzeschock artifiziell herbeigeführt. Dadurch wird die bakterielle Zellmembran temporär für die die Zelle umgebende DNA permeabel.

Die in dieser Arbeit genutzten chemisch-kompetenten *E. coli* Bakterien wurden freundlicherweise vom technischen Personal des Biochemischen Instituts gemäß dem von Mandel und Higa (1970) nachempfundenen Protokoll generiert und zur Verfügung gestellt. Die Bakterien wurden mit 1 µl Ligationsansatz (siehe Kapitel 2.2.1.10, Seite 42) bzw. 10 ng gereinigter Plasmid-DNA vermengt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 1 min wurde die Bakteriensuspension kurz auf Eis abgekühlt, mit 200 µl antibiotikafreiem LB-Medium versetzt und anschließend für bis zu 60 min bei 37 °C und 900 rpm im Thermoblock kultiviert. Daraufhin wurde jeder Ansatz auf einer gesonderten Platte mit LB-Selektivmedium unter sterilen Bedingungen ausplattiert und für 16 bis 18 h bei 37 °C im Inkubator bebrütet. Als Negativkontrolle wurde stets ein mit Wasser statt DNA-Lösung behandelter Ansatz verwendet.

#### 2.2.1.14 Isolierung von RNA

Die RNA von kultivierten Säugerzellen wurde mit Hilfe des *GeneJET RNA Purification Kits* entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Diese Technologie beruht auf der Zerstörung der genomischen DNA durch Scherkräfte während der Lyse des Zellmaterials und der anschließenden Reinigung der in Lösung gebrachten RNA mittels Silicagel-Membransäulen. Zur Vermeidung der RNA-Degradation ist der Lysispuffer mit Guanidiniumthiocyanat und beta-Mercaptoethanol versetzt, wodurch ubiquitär vorkommende Ribonukleasen inaktiviert und degradiert werden.

Die Kultivierung der verwendeten Zellen folgte den Standard-Kulturbedingungen (siehe Kapitel 2.2.3.1, Seite 53) in *6-well Cellstar® Multiwellplatten* für 3 d bis zum Erreichen einer Konfluenz von 80-90 %. Im Anschluss an die RNA-Isolierung wurde die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1.17, Seite 47).

### 2.2.1.15 cDNA-Synthese

Die Generierung von doppelsträngiger cDNA (*complementary DNA*) ausgehend von einer einzelsträngigen RNA-Matrize wird als reverse Transkription bezeichnet. Das dafür verwendete Enzym, die reverse Transkriptase, verfügt über eine RNA- sowie DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität mit zusätzlicher RNase H-Aktivität und kann so die Information der RNA in DNA umschreiben und damit für PCR-Reaktionen zugänglich machen.

Für die cDNA-Synthese wurden 2 µg isolierte RNA (siehe Kapitel 2.2.1.14, Seite 44) mit 1 µl *Oligo(dT)<sub>18</sub>* und 1 µl *Random Hexamer* Oligonukleotiden in einem Gesamtvolumen von 12,5 µl vermengt und 5 min bei 70 °C zum Aufbrechen der Sekundärstrukturen erhitzt. Anschließend wurde das Gemisch für 2 min auf Eis abgekühlt und mit *RevertAid Reverse Transcriptase*, dNTPs, *RiboLock RNase Inhibitor* sowie Puffer nach Herstellerangaben in einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt. Der Reaktionsablauf erfolgte im Thermocycler:

Hybridisierung	10 min	25 °C
Elongation	60 min	42 °C
Denaturierung	10 min	70 °C

Für die Verwendung in der quantitativen Echtzeit-PCR wurde die synthetisierte cDNA anschließend in einem Verhältnis von 1:10 mit sterilem zweifach destillierten Wasser verdünnt.

### 2.2.1.16 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR (*quantitative real-time PCR*, qRT-PCR) handelt es sich um eine Methode, welche anhand der Lichtemission eines Fluoreszenzfarbstoffes die direkte Quantifizierung der Menge des gebildeten PCR-Produktes im Verlauf der Reaktion erlaubt. Als Farbstoff dient hierbei *SYBR Green*, welches mit der neusynthetisierten DNA interkaliert und so den Anstieg der Produktmenge durch die Zunahme des Fluoreszenzsignals von Zyklus zu Zyklus anzeigt. Durch die Nutzung von aus RNA generierter cDNA als Matrize kann somit eine Aussage über die Transkriptmenge eines untersuchten Gens getroffen werden.

Je 2 µl der verdünnten cDNA (siehe Kapitel 2.2.1.15, Seite 45) wurden dazu in 96- bzw. 384-well qRT-PCR-Platten vorgelegt und mit jeweils 8 µl eines *Master Mix* bestehend aus

1 x *SYBR Green Master Mix*, sterilem zweifach destillierten Wasser sowie den genspezifischen *forward*- und *reverse*-Oligonukleotiden (Endkonzentration 0,25 pmol/ $\mu$ l) vermischt. Sämtliche Reaktionsansätze wurden in technischen Duplikaten ausgelesen und deren Mittelwert für die spätere Auswertung herangezogen. Die beschickten qRT-PCR-Platten wurden luftdicht mit einem selbstklebenden Film verschlossen und die Fluoreszenzemission der Proben in einem *LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II* analysiert. Entsprechend dem Grundprinzip der Standard-PCR erfolgte der Reaktionsablauf zu den folgenden Bedingungen:

initiale Denaturierung	10 min	95 °C	
Denaturierung	10 s	95 °C	} 45 x
Hybridisierung	20 s	60 °C	
Elongation	20 s	72 °C	

Schmelzkurve

Für die Quantifizierung der relativen Genexpressionsrate (*fold change*) wurde die  $\Delta\Delta C_T$  Methode angewendet. Hier wird zunächst die Expression eines Zielgens zu der eines Referenzgens in Beziehung gesetzt, wobei gilt:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{Referenzgen})$$

Der  $C_T$  (*cycle threshold*) Wert eines jeden untersuchten Gens beschreibt dabei den Schwellenwert, bei dem dessen Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, also wenn die Reaktionskurve in die exponentielle Phase übergeht. Das bedeutet, dass der  $C_T$ -Wert mit der Kopienzahl des Transkripts korreliert: ein niedriger  $C_T$ -Wert kommt bei einer hohen Transkriptmenge zustande, während ein hoher  $C_T$ -Wert für eine geringe Menge an Zielnukleinsäuren spricht.

Nach der Berechnung der  $\Delta C_T$ -Werte für alle analysierten Gene erfolgt die Normierung der zu untersuchenden Proben (*knockout*-Zellen) auf die Kontrollprobe (Wildtyp):

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Testprobe}) - \Delta C_T (\text{Kontrollprobe})$$

Der relative Expressionsunterschied ergibt sich schließlich nach Livak und Schmittgen (2001) aus der Formel:

$$\text{relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

#### 2.2.1.17 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Zur photometrischen Quantifizierung von Nukleinsäure-Konzentrationen wurde ein *Nano-Drop™ ND-1000* Mikrovolumen-Spektralphotometer gemäß den Herstellerempfehlungen verwendet. Diese Methode basiert auf dem Grundprinzip, dass Nukleinsäuren Licht einer definierten Wellenlänge (260 nm) absorbieren, somit weniger Licht den Photodetektor erreicht und dies zu einer Erhöhung der optischen Dichte führt.

#### 2.2.1.18 Sequenzierung von DNA

Sämtliche DNA-Sequenzierungen zur Verifizierung von Klonierungsreaktionen wurden von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, DE) nach der von Sanger *et al.* (1977) entwickelten Didesoxymethode durchgeführt. Die auch als Kettenabbruch-Methode bekannte Technik nutzt neben herkömmlichen dNTPs zudem vier verschiedene Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs), welchen die 3'-OH-Gruppe fehlt und die somit beim Einbau in den entstehenden Zweitstrang zu einem Kettenabbruch führen. Daraus resultieren DNA-Moleküle variabler Länge, anhand derer die Sequenzabfolge durch die Zuordnung zu dem jeweilig eingesetzten ddNTP bestimmt werden kann.

### 2.2.2 Immunologische Methoden

#### 2.2.2.1 Zellyse zur Gewinnung von Gesamtproteinextrakten für die SDS-PAGE

Für die Gewinnung von Gesamtproteinextrakten zum Einsatz für die gelelektrophoretische Separation mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.2.2.4, Seite 48) wurden sedimentierte Zellen (siehe Kapitel 2.2.3.1, Seite 53) in einem geeigneten Volumen SDS-PAGE-Lysis-Puffer resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 bis 20 min bei maximaler Umdrehung und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration kalorimetrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.2.3, Seite 48).

#### 2.2.2.2 Zellyse zur Gewinnung von Gesamtproteinextrakten für RNASEH1/2-Aktivitätstests

Für die Gewinnung von Gesamtproteinextrakten zum Einsatz in RNASEH1/2-Aktivitätstests nach Reijns *et al.* (2011) (siehe Kapitel 2.2.2.7, Seite 50) wurden sedimentierte Zel-

len (siehe Kapitel 2.2.3.1, Seite 53) zunächst in einem geeigneten Volumen Lysis-Puffer 1 resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit dem äquivalenten Volumen Lysis-Puffer 2 versetzt und abermals für 20 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde dann für 15 min bei maximaler Umdrehung und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration kalorimetrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.2.3, Seite 48).

#### 2.2.2.3 Quantitative Proteinbestimmung

Zur kalorimetrischen Quantifizierung von Protein-Konzentrationen wurde das *Pierce BCA Protein Assay Kit* gemäß den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Die Methode basiert auf der Reduktion von Kupfer-Kationen durch in der Lösung befindliche Proteine und deren Nachweis mittels Bicinchoninsäure (BCA), was zur Entstehung eines intensiv violett gefärbten Reaktionsprodukts führt. Die Messung der Extinktion der Lösung bei einer Wellenlänge von 562 nm ermöglicht die Bestimmung der Protein-Konzentration im Vergleich zu einem Protein-Standard. Für die Quantifizierung in *F96 Cert. MaxiSorp Nunc-immuno* Mikrotiterplatten wurde ein *Tecan Spectra Rainbow* Mikrotiterplatten reader verwendet.

#### 2.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Natriumdodecylsulfat- (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um ein analytisches Verfahren zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld (Laemmli, 1970). Dabei dient ein diskontinuierliches Polyacrylamid-Gel als Matrix, in der sich die denaturierten Proteine bewegen. Um eine Auftrennung anhand des Protein-Molekulargewichts zu ermöglichen, ist es erforderlich die Tertiärstruktur der Proteine zu zerstören und sie damit zu ihrer linearen Grundform zu reduzieren. Des Weiteren muss ihre intrinsische Nettoladung maskiert werden. Neben der Einwirkung von Hitze und Reduktionsmitteln wie beta-Mercaptoethanol ist hierfür die Bindung des SDS an das linearisierte Protein entscheidend, da es dem Protein eine uniforme negative Ladung verleiht, welche proportional zu dessen Molekulargewicht ist.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter Verwendung von 8 bis 12 % Polyacrylamid-Gelen in einem *Mini-PROTEAN Tetra Cell* Elektrophorese System bei 140 V. Im Vorfeld der Gelelektrophorese wurden die Proteine mit Protein-Ladepuffer in einfacher Endkonzentration

tration versetzt, 10 min bei 95 °C im Thermoblock denaturiert und auf Eis abgekühlt. Um die Vergleichbarkeit der Proben eines Gels garantieren zu können, wurden stets gleiche Proteinmengen eingesetzt.

#### 2.2.2.5 Immunoblot („western blot“)

Die Methode des Immunoblots eignet sich zur Detektion spezifischer Proteine in einem Proteingemisch. Dabei werden die mittels SDS-PAGE entsprechend ihres Molekulargewichts separierten Proteine von einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch auf eine Membran übertragen, um anschließend die Proteine von Interesse mit Hilfe von Antikörpern gezielt nachzuweisen (Towbin *et al.*, 1979). Ein Primärantikörper erkennt und bindet in einer Antigen-Antikörper-Reaktion eine bestimmte Aminosäuresequenzabfolge des Zielproteins, sein sog. Epitop. Der Nachweis dieses Immunkomplexes wird durch die Bindung des Sekundärantikörpers ermöglicht, da dieser an ein Reporterenzym, ein Fluorophor oder ein anderes Detektionssystem gekoppelt ist. Bei meerrettich-peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelten Sekundärantikörpern setzt das Enzym sein Substrat Luminol um, was von einer Lichtemission begleitet wird. Diese als verstärkte Chemilumineszenz (*enhanced chemiluminescence*, ECL) bekannte Reaktion kann in einem Western Blot *imager* detektiert werden.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst lysiert (siehe Kapitel 2.2.2.1, Seite 47) und die Konzentration des Gesamtproteinextraktes kalorimetrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.2.3, Seite 48). Anschließend wurden die Proben denaturiert und mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel 2.2.2.4, Seite 48). Der Transfer der denaturierten Polypeptide auf eine PVDF-Membran erfolgte *semi-dry* unter Verwendung eines *Trans-Blot Turbo Transfer Systems*. Dazu wurden je drei Filterpapierzuschnitte für einige Minuten in Anoden- bzw. Kathoden-Transferpuffer bis zur vollständigen Befeuchtung inkubiert. Die PVDF-Membran wurde für ca. 10 s in Ethanol absolut äquilibriert und das Proteingel mit destilliertem Wasser gespült. Der Aufbau erfolgte anodenseitig mit den in Anoden-Transferpuffer getränkten Filterpapieren, auf welche die äquilibrierte Membran, das Trenngel sowie die in Kathoden-Transferpuffer getränkten Filterpapiere gestapelt wurden und schloss mit der Kathode ab. Eventuell vorhandene Lufteinschlüsse wurden durch Walzen der einzelnen Lagen entfernt. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 25 V und einer maximalen Stromstärke von 1,0 A für 30 bis 40 min.

An den Transfer der Proteine anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur bzw. für 18 h bei 4 °C in Blockierpuffer gerollt. Nach vier hintereinander folgenden Waschschritten für je 2 min mit TBST erfolgte die Inkubation mit dem in Blockierpuffer gelösten Primärantikörper für 3 bis 18 h bei 4 °C. Einem erneuten Waschzyklus folgend wurde die Membran dann für 1 h bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen in Blockierpuffer gelösten Sekundärantikörper inkubiert. Abschließend wurde die Membran zweimal für je 2 min mit TBST und zweimal für je 2 min mit TBS gewaschen, mit ECL-Lösung nach Angaben des Herstellers benetzt und das Signal in einem *FluorChem Q Multimage III* Western Blot *imager* detektiert.

#### 2.2.2.6 Rehybridisierung von PVDF-Membranen

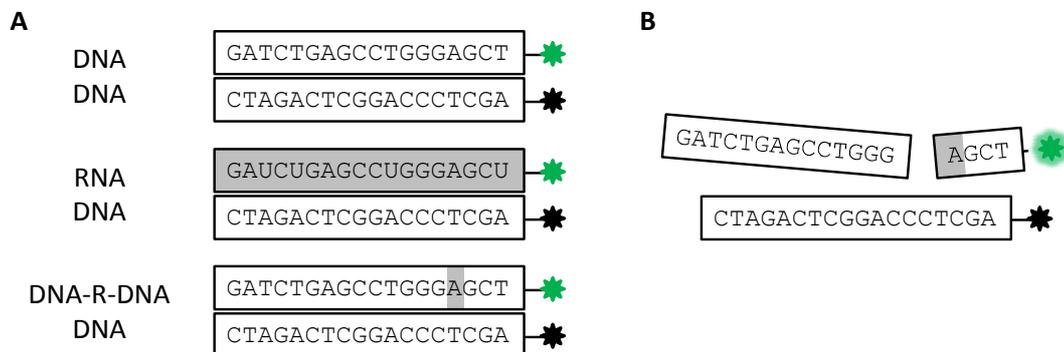
Das auch als ‚*stripping*‘ bezeichnete Ablösen von primären und sekundären Antikörpern von einer Membran nach Durchführung eines Immunoblots ermöglicht eine Rehybridisierung der Membran und somit die Untersuchung weiterer Zielstrukturen auf demselben Blot. Die bereits analysierte PVDF-Membran wurde dafür nach Abschluss des Immunoblots (siehe Kapitel 2.2.2.5, Seite 49) mit *Stripping*-Puffer entsprechend den Herstellerangaben behandelt und anschließend erneut mit Antikörpern hybridisiert.

#### 2.2.2.7 RNASEH1/2-Aktivitätstest

Bei dem RNASEH1/H2-Aktivitätstest handelt es sich um eine fluorimetrische Analyse-methode zur Bestimmung der enzymatischen Nuklease-Aktivität in einem gegebenen Zell-lysat (Crow *et al.*, 2006b). Als Substrate finden kurze doppelsträngige Oligonukleotide Verwendung, die entweder rein aus Desoxyribonukleotiden bestehen (DNA:DNA), aus einem RNA:DNA-Hybrid oder aus einem DNA:DNA-Hybrid mit einem einzelnen Ribonukleo-tid (DNA-R-DNA:DNA, siehe Abbildung 9A, Seite 51). Ein Strang des Oligonukleotids ist an seinem 3'-Ende an den grün-fluoreszierenden Farbstoff *Fluorescein* gekoppelt, während der andere Strang des Hybrids an seinem 5'-Ende mit dem nicht-fluoreszenten Farbstoff *DABCYL* (Methyl-Orange) verknüpft ist (Crow *et al.*, 2006b). Durch die enge räumliche Nähe der beiden Farbstoffe kann *DABCYL* zur Fluoreszenzlöschung von *Fluorescein* sorgen und somit als sog. ‚*quencher*‘ fungieren. Erst bei einer Spaltung des Hybrids wird das fluo-resceingekoppelte Fragment freigesetzt, was zu einem detektierbaren Anstieg des Fluoreszenzsignals führt (siehe Abbildung 9B). Durch die Nutzung von drei unterschiedlichen

Substraten kann dabei zwischen den verschiedenen Nuklease-Aktivitäten einer Zelle differenziert werden: der Desoxyribonuklease-Aktivität (DNA:DNA), der Typ I-RNase H-Aktivität (RNA:DNA) sowie der Typ II-RNase H-Aktivität (DNA-R-DNA:DNA nach Abzug der DNA:DNA-Aktivität).

Die Durchführung erfolgte wie in Reijns *et al.* (2011) beschrieben unter Verwendung von Gesamtproteinextrakten (siehe Kapitel 2.2.2.2, Seite 47) sowie den oben beschriebenen Oligonukleotiden, die freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden von Prof. Dr. Andrew Jackson, University of Edinburgh, MRC Human Genetics Unit. Für die Ausführung der Reaktion wurden die zu analysierenden Lysate in einer Endkonzentration von 100 ng/μl mit je 250 nM Substrat in Reaktionspuffer verdünnt (Gesamtvolumen 100 μl) und die Fluoreszenz in 96 well Mikrotiterplatten (schwarz, PS, F-Boden) unter Benutzung eines Tecan Infinite 200Pro Mikrotiterplatten readers mit einem 485 nm Exzitationsfilter und einem 535 nm Emissionsfilter bei 24 °C für 90 min detektiert. Alle Reaktionen wurden in technischen Triplikaten ausgeführt, deren Mittelwerte für die Bestimmung der einzelnen Enzymaktivitäten herangezogen wurde.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung des RNASEH1/2-Aktivitätstests (verändert nach Crow *et al.* (2006b)).** **A:** Die Substrate für die Bestimmung der enzymatischen Nuklease-Aktivität bestehen aus kurzen (18 Nucleotide), doppelsträngigen Oligonukleotiden, die einseitig mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Fluorescein* (grün) sowie dem *quencher DABCYL* (schwarz) markiert sind. Für die Ermessung der spezifischen Aktivitäten stehen drei Substrate zur Verfügung: ein DNA:DNA-Hybrid, das von allen Enzymen mit Desoxyribonuklease-Aktivität gespalten werden kann, ein RNA:DNA-Hybrid, Substrat aller Ribonuklease H-Enzyme, sowie ein DNA-R-DNA:DNA-Hybrid, ein Heteroduplex bestehend aus DNA mit einem singulären Ribonucleotid in dem mit *Fluorescein* gekoppelten Strang, welches von Enzymen mit Typ II-RNase H- oder Desoxyribonuklease-Aktivität gespalten werden kann. Ribonucleotide sind in der Grafik grau hinterlegt. **B:** Kommt es zu einer Spaltung des Substrats, so wird der mit *Fluorescein* markierte Strangabschnitt freigesetzt und die fluoreszenzlöschende Wirkung des *quenchers DABCYL* damit aufgehoben. Das Fluoreszenzsignal wird damit detektierbar.

Für deren Berechnung wurde zunächst die Hintergrundfluoreszenz der jeweiligen Oligonukleotide von den kalkulierten Mittelwerten subtrahiert. Anschließend wurde die Desoxyribonuklease-Aktivität (DNA:DNA-Substrat) von der mit dem DNA-R-DNA:DNA-Substrat gemessenen abgezogen. Dadurch konnte eine Aussage über die Enzymaktivität getroffen werden, die für die Spaltung von einzelnen Ribonukleotiden in einem DNA-Strang verantwortlich ist (Typ II-RNase H-Aktivität).

Zur Einschätzung der gelieferten Messwerte wurden neben den Test- und Referenzproben außerdem Positiv- und Negativkontrolllysate analysiert, die ebenfalls freundlicherweise von Prof. Dr. Andrew Jackson bereitgestellt wurden. Dabei handelte es um Proteinextrakte von RNase H2-defizienten HeLa-Zellen (Negativkontrolle) sowie von entsprechenden Wildtyp-Zellen (Positivkontrolle).

#### 2.2.2.8 Immuncytochemischer Nachweis von Mikronuklei

Für die Durchführung der immuncytochemischen Zweifach-Färbungen zum Nachweis von Mikronuklei wurden je 3.000 293T-Parentalzellen sowie je 6.000 293T-*knockout*- bzw. je 6.000 mit Typ I/II-RNase H-Aktivität rekonstituierte Zellen pro *384-well* Zellkulturmultiwellplatte ausgesät und für 2 d kultiviert. Der Plattenboden war zuvor mit Poly-L-Lysin wie in Bartsch (2016) beschrieben beschichtet worden. Für die anschließende Fixierung der Zellen wurden diese einmal mit 1 x PBS gewaschen, für 25 min in Fixierlösung inkubiert und anschließend zweifach für 7 min in TBST inkubiert.

Die Fluoreszenzfärbungen wurden von Dr. Bernhard Ellinger, Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie IME Hamburg, Bereich ScreeningPort, durchgeführt, wobei der blau-fluoreszierende Nukleinsäure-Farbstoff *Hoechst 33258* in einer Konzentration von 0,5 µg/ml sowie der die gesamte Zelle anfärbende Fluoreszenzfarbstoff *HCS CellMask™ Deep Red* in einer Konzentration von 2 µg/ml (beide von Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US) in TBST für 1 h verwendet wurden. Nach der Färbung wurden die Zellen dreimal für 7 min mit TBST gewaschen und anschließend unter Verwendung eines konfokalen *laser-scanning*-Mikroskops analysiert.

### 2.2.3 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.3.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Die humanen Zelllinien 293T und HeLa HA ebenso wie die murinen Fibroblasten wurden in dem Basismedium DMEM versetzt mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) als Wachstumsfaktor-Quelle sowie 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen in einem *HERAcell 150* CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in sterilen Zellkulturflaschen bzw. -platten. Bei Erreichen von 80-90 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert und in neue Kulturgefäße überführt. Die Zellverbände der stark adhärenenten Zelllinien HeLa HA sowie der murinen Fibroblasten mussten proteolytisch gelöst werden, daher wurden sie zunächst mit 1 x PBS gewaschen, einige Minuten mit Trypsin/EDTA inkubiert und anschließend mit Medium abgespült. Die weniger stark adhärenenten 293T-Zellen konnten ohne enzymatische Behandlung direkt mit Medium von ihrem Kulturgefäß gelöst werden. Zum Sedimentieren wurden die Zellen bei 1300 x g für 3 bis 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, ggf. Medienreste mit 1 x PBS fortgespült und die Zellen erneut sedimentiert.

#### 2.2.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen sedimentiert (siehe Kapitel 2.2.3.1, Seite 53) und das Sediment in 500 bis 1000 µl Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in sterile Kryoröhrchen überführt, diese in einige Lagen Zellstoff gewickelt und bei -80 °C eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -150 °C. Durch die Lagerung bei extrem niedrigen Temperaturen wird jegliche enzymatische oder chemische Aktivität, die den Zellen Schaden zufügen könnte, gestoppt. Um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern, wird dem Einfriermedium das Kälteschutzmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) beigegeben. Dadurch kann die Vitalität des biologischen Materials aufrechterhalten werden.

#### 2.2.3.3 Erstellung von Wachstumskurven

Für die Beurteilung des differenziellen Wachstumsverhaltens von Parental- und *knockout*-Zellen wurden Wachstumskurven erstellt. Dazu wurden jeweils 50.000 293T- bzw. 20.000 HeLa-Zellen pro *24-well* Zellkulturmultiwellplatte ausgesät und entsprechend der Stan-

Standardkulturbedingungen kultiviert (siehe Kapitel 2.2.3.1, Seite 53). Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte an Tag 2, 4 und 7 nach der Aussaat. Sie wurde aus drei *wells* je Zelllinie separat in Doppelbestimmung ermittelt, aus den sechs resultierenden Einzelwerten wurde der Mittelwert sowie der Standardfehler errechnet und die Daten grafisch ausgewertet.

#### 2.2.3.4 Zellproliferationsmessung

Neben der sequenziellen Bestimmung der Zellzahl zur Erstellung von Wachstumskurven (siehe Kapitel 2.2.3.3, Seite 53) kann die Analyse der Proliferation einer Zelllinie auch über die Inkorporation von fluorophorgekoppelten Nukleotid-Analoga in die neusynthetisierte DNA der Zellen erfolgen. Ein Beispiel hierfür ist das Thymidin-Analogon *5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin* (EdU), welches in Folge einer Klick-Reaktion zwischen dem Alkin und einem mit dem Farbstoff *Alexa Fluor® 488* verknüpften Azid nachweisbar gemacht wird. Für die Proliferationsanalyse wurde das *Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry Assay Kit* in Verbindung mit RNase A und dem Nukleinsäurefarbstoff *SYTOX® AADvanced™* nach Herstellerangaben verwendet. Die Analyse der Färbung erfolgte mit Hilfe eines *FACSCANTO I* Durchflusszytometers unter Verwendung eines 480 nm Exzitationsfilters und eines 530/30 (EdU) bzw. 695/40 (*SYTOX® AADvanced™*) Bandpass Emissionsfilters.

#### 2.2.3.5 Erstellung von Antibiotika-Dosis-Wirkungs-Kurven

Dosis-Wirkungs-Kurven dienen der Ermittlung der optimalen Antibiotika-Konzentration in einem Kulturmedium einer gegebenen Zelllinie. Für die Erstellung wurden jeweils 500.000 293T- bzw. 150.000 HeLa-Zellen pro *6-well* Zellkulturmultiwellplatte ausgesät und entsprechend der Standardkulturbedingungen kultiviert (siehe Kapitel 2.2.3.1, Seite 53). Einen Tag nach der Aussaat wurde das Medium gewechselt und mit aufsteigenden Konzentrationen des zu testenden Antibiotikums versetzt. Im Folgenden wurde das Wachstumsverhalten der Zellen täglich überprüft und die ideale Dosis als die Konzentration festgesetzt, bei der min. 90 % der Zellen des jeweiligen *wells* nach 3-4 d abgestorben waren.

#### 2.2.3.6 Transfektion

Unter dem Begriff Transfektion wird das nicht-virale Einbringen von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen verstanden. Es existieren viele unterschiedliche Verfahren, darunter

physikalische als auch chemische. In dieser Arbeit wurde das kationische Polymer *TurboFect* zusammen mit sterilem *Opti-MEM*<sup>®</sup> als Transfektionsmedium nach Herstellerangaben eingesetzt. *TurboFect* bildet mit der zu transfizierenden DNA stabile Komplexe, welche über Endocytose in das Cytoplasma der Zelle gelangen. Dort zerfällt der Komplex und erlaubt so die Translokation der DNA in den Nukleus.

#### 2.2.3.7 Lentivirale Transduktion

Die Transduktion ist eine Methode zur viralen Transferierung genetischen Materials in eukaryotische Zellen, die seit den 1970er Jahren bekannt und weiterentwickelt wurde (Goff und Berg, 1976). Dabei wird die virale RNA nach der Infektion der Wirtszelle mittels reverser Transkription in DNA umgeschrieben und anschließend in das Wirtsgenom integriert. Durch die Nutzung einer bestimmten Subklasse von Retroviren, den Lentiviren, können selbst nicht-teilungsfähige Zellen erreicht werden, indem lentivirale Proteine mit der Kernimportmaschinerie interagieren und so den aktiven Transport des Prä-Integrationskomplexes durch die Kernporen ermöglichen (Naldini *et al.*, 1996).

Für die Anwendung dieser Technik bedarf es einer sog. Verpackungszelllinie, die zur Produktion der Viruspartikel befähigt ist, i.d.R. 293T-Zellen. Diese werden mit mehreren Plasmiden transfiziert, auf welchen das virale Genom verteilt ist: den Transfer-, Hüll- und Verpackungsplasmiden. Transferplasmide enthalten die Sequenz von Interesse, die in das Wirtsgenom integriert werden soll, flankiert von den viralen *long terminal repeats* (LTRs) und dem Psi-Element als Verpackungssignal. Ein Beispiel für ein solches Transferplasmid ist in Abbildung 14, Seite 70, zu finden. Das Hüllplasmid codiert für ein Glykoprotein, welches die Viruspartikel umgibt und somit deren Bindung an Rezeptoren der Wirtszellmembran sowie die Membranfusion ermöglicht. Weiterhin für die Transduktion erforderlich sind die viralen Gene *gag*, *pol*, *rev* und *tat*, die auf dem Verpackungsplasmid codiert sind und für die Expression von Strukturproteinen, reverser Transkriptase, Integrase sowie Transaktivatoren verantwortlich sind.

Für die Virusproduktion wurden  $3,5 \times 10^6$  293T-Zellen in 10 cm TC-Schalen in DMEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 20 mM HEPES-Puffer ausgesät und für 18 h entsprechend den Standardkulturbedingungen kultiviert (siehe Kapitel 2.2.3.1, Seite 53). Die Zellen wurden anschließend mit den in Tabelle 2, Seite 56, angegebenen Plasmiden transfiziert (siehe Kapitel 2.2.3.6, Seite 54).

**Tabelle 2: Transfektionsschema zur Lentiviren-Produktion.** Die Mengen- und Volumenangaben beziehen sich jeweils auf eine 10 cm TC-Schale.

Beschreibung der Komponenten	Plasmide/Reagenzien	Menge/Vol.
Transferplasmid	variabel	10 µg
Hüllplasmid	pCMV-VSV-G	2 µg
Verpackungsplasmid	pCMV-dR8.2-dvpr	10 µg
Medium	<i>Opti-MEM</i> <sup>®</sup>	450 µl
Transfektionsreagenz	<i>TurboFect</i>	40 µl

8-12 h nach der Transfektion wurde das Medium ausgetauscht, wobei 8 ml Medium mit der oben beschriebenen Zusammensetzung verwendet wurden. Die in den Überstand abgegebenen Viren wurden für 24 h gesammelt, dann durch einen 20 µm Membranfilter sterilfiltriert, aliquotiert und bei -80 °C bis zur Benutzung gelagert. Diese Prozedur wurde ein weiteres Mal für 24 h wiederholt.

Der virenhaltige Überstand konnte sodann für die Infektion von Wirtszellen eingesetzt werden. Dafür wurden entsprechend viele Zellen in *12-well Cellstar*<sup>®</sup> Multiwellplatten ausgesät und kultiviert, dass diese nach 1-2 d eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten. Am Tag der Transduktion wurde das Medium erneuert und diesem das kationische Polymer Polybren zur Verbesserung der Transduktionseffizienz zugesetzt (Endkonzentration 8 µg/ml). Das eingesetzte Volumen des virenhaltigen Überstands variierte in Abhängigkeit der Viruskonzentration zwischen  $\frac{1}{10}$  und  $\frac{1}{2}$  des Gesamtvolumens. Nach Zugabe der Viren wurden die Multiwellplatten für 1 h bei 1000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und für 12-24 h kultiviert. Anschließend erfolgte ein Austausch des Mediums zu Standardkulturmedium und 2 d nach der Transduktion ggf. die Zugabe eines Antibiotikums zur Selektion erfolgreich transduzierter Zellen.

#### 2.2.3.8 Erzeugung von RNASEH2A-defizienten Zellen

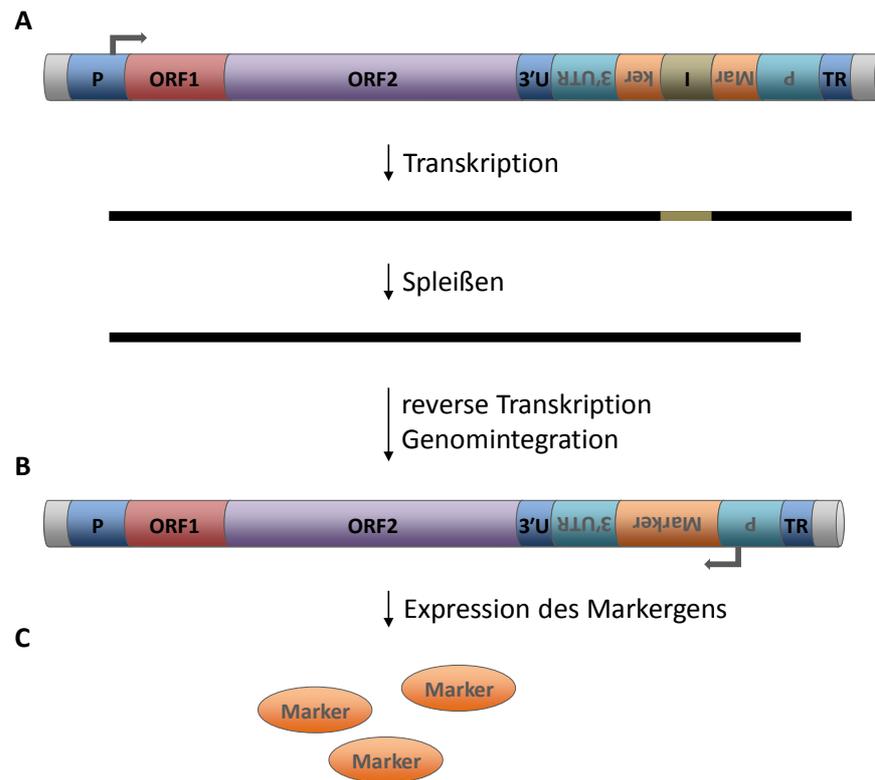
Je 500.000 293T-Zellen und je 100.000 HeLa Ha-Zellen wurden im *6-well* Format mit 2 µg LeGO-Cas9-guide#4 Plasmid-DNA transfiziert (siehe Kapitel 2.2.3.6, Seite 54). Erfolgreich transfizierte Zellen wurden mittels Puromycin-Selektion angereichert, die optimale Antibiotika-Konzentration war zuvor im Zuge einer Dosis-Wirkungs-Kurve ermittelt worden (siehe Kapitel 2.2.3.5, Seite 54). Da für spätere Analysen die Verwendung von monoklonalen RNASEH2A-*knockout*-Zelllinien erwünscht war, wurde die Suspension von Zellen

in sequenziellen Verdünnungsstufen so weit verdünnt, dass schließlich eine minimale Anzahl von Zellen gemeinsam weiterkultiviert wurde. Für jede 100 x 20 mm Zellkulturschale bedeutete dies die Vereinzelnung und Kultivierung von ca. 100 Zellen. 12 d nach der Vereinzelnung wurde die Anhaftung der individuellen Zellkolonien an den Gefäßboden durch kurzzeitige Inkubation mit wenigen Mikrolitern Trypsin/EDTA gelockert und der jeweilige Klon mit einer sterilen Pipettenspitze von dem Schalenboden gelöst, aufgenommen und in eine 96-well Multiwellplatte überführt. Darin wurden die Klone bis zum Erreichen einer Konfluenz von etwa 80 % unter regelmäßigem Kulturmediumwechsel kultiviert, um sie sodann in die nächstgrößere Multiwellplatte zu passagieren (siehe Kapitel 2.2.3.1, Seite 53).

#### 2.2.3.9 Luciferasebasierter Nachweis von genomischen LINE-1-Integrationen

Für die Detektion von *de novo*-Integrationen genomischer non-LTR Retroelemente gibt es verschiedene funktionelle Untersuchungsmethoden, die alle auf demselben Grundprinzip beruhen: in die 3'-UTR des Retroelements wird eine Reporter-Gen-Expressionskassette in *antisense*-Orientierung, also in entgegengesetzter Leserichtung bezogen auf das Retroelement, eingebaut. Diese Kassette wird von einem Intron unterbrochen, welches eine *sense*-Orientierung aufweist (siehe Abbildung 10A, Seite 58), und das damit die Inaktivierung des Reporters sicherstellt. Nach dem Einbringen des Plasmides wird die Retroelement-Markergen-Kassette transkribiert und die mRNA prozessiert, wobei u.a. das Intron durch Spleißen entfernt wird. Kommt es anschließend zur reversen Transkription der mRNA und der Integration der Retroelement-Markergen-cDNA in die genomische DNA der Zelle (siehe Abbildung 10B), so liegt daraufhin das Reporter-Gen als funktionelle Expressionskassette vor und kann durch deren endogenen Promotor exprimiert werden (siehe Abbildung 10C).

In dieser Arbeit kamen drei verschiedene Reportersysteme zum Einsatz: das duale Luciferase-System sowie das eGFP-basierte Reportersystem (siehe Kapitel 2.2.3.10, Seite 60) zur Detektion von genomischen LINE-1-Integrationen und das antibiotikaresistenzgen-basierte System zum Nachweis genomischer Alu-Integrationen (siehe Kapitel 2.2.3.11, Seite 61). In den beiden zuerst genannten Fällen gibt es neben einem retrotranspositionsaktiven auch einen retrotranspositions-inaktiven Ansatz, welcher die Fähigkeit zur Mobilisierung des Retroelements durch Mutationen in *ORF1* verloren hat (Xie *et al.*, 2011).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des markergenbasierten Nachweises von genomischen LINE-1-Integrationen (verändert nach Zhao *et al.* (2013), Xie *et al.* (2011)).** **A:** Das LINE-1-Konstrukt enthält die beiden offenen Leserahmen ORF1 (rot) und ORF2 (violett), deren Expression durch einen Promotor (dunkelblau) gesteuert wird. In die LINE-1-3'UTR (dunkelblau) ist eine Reporter-Gen-Expressionskassette in *anti-sense*-Orientierung (dargestellt durch die kopfstehende, graue Schrift) integriert, welche durch ein Intron in *sense*-Orientierung (braun) unterbrochen wird. Im Zuge der der Transkription nachfolgenden Prozessierung der mRNA wird das Intron mittels Spleißens entfernt. **B und C:** Kommt es zur reversen Transkription der mRNA und der Integration der LINE-1-Markergen-cDNA in die genomische DNA der Zelle, so kann daraufhin die Expression des Markergens (orange) durch dessen endogenen Promotor (hellblau) initiiert werden.

Das duale Luciferase-Reportersystem nach Xie *et al.* (2011) basiert auf der Messung der Leuchtkäfer Luciferase (*firefly luciferase*, *Fluc*) als Retrotranspositionsindikator sowie der auf demselben Plasmid codierten Renilla Luciferase (*Rluc*) zur Normierung auf die Transfektionseffizienz. Dafür wurden 50.000 (293T) bzw. 70.000 (293T\_KOs) Zellen je *well* in einer 24-*well Cellstar*® Multiwellplatte ausgesät und für 2 d kultiviert. Anschließend erfolgte deren Transfektion (siehe Kapitel 2.2.3.6, Seite 54) in technischen Triplikaten mit insgesamt je 500 ng Plasmid-DNA nach dem in Tabelle 3, Seite 59, angegebenen Transfektionsschema.

**Tabelle 3: Transfektionsschema des luciferasebasierten LINE-1-Reportersystems.** Die Mengen- und Volumenangaben beziehen sich jeweils auf ein *well* einer 24-*well* Multiwellplatte.

Beschreibung des Transfektionsansatzes	Plasmide/Reagenzien	Menge/Vol.
retrotranspositions-inaktives <i>LINE-1-Fluc-Rluc</i> -Konstrukt	pYX015	500 ng
	<i>Opti-MEM</i> <sup>®</sup>	50 µl
	<i>TurboFect</i>	1 µl
retrotranspositions-aktives <i>LINE-1-Fluc-Rluc</i> -Konstrukt	pYX017	500 ng
	<i>Opti-MEM</i> <sup>®</sup>	50 µl
	<i>TurboFect</i>	1 µl
untransfizierter Ansatz	-----	-----

Die Zellen wurden für weitere 4 d kultiviert, geerntet und die Sedimente in 1 x PLB (*passive lysis buffer*) aus dem *Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System* für 1 h bei Raumtemperatur lysiert. Die duale Luciferase-Aktivität der Lysate wurde gemäß den Angaben des Herstellers in 96 *well* Mikrotiterplatten (*weiß, PS, F-Boden*) in einem *GloMax<sup>®</sup>* Luminometer bestimmt. Für die Messung wurden jeweils 20 µl Lysat und je 50 µl Substrat verwendet.

Zur Normierung der Daten wurde zunächst die Hintergrund-Lumineszenz des untransfizierten Ansatzes von den Einzelmesswerten abgezogen und anschließend das Verhältnis von *Fluc*- und *Rluc*-Lumineszenz für jedes *well* gebildet. Die Einzelwerte der Triplikatmessungen wurden gemittelt und die LINE-1-Aktivität einer jeden untersuchten Zelllinie durch die Division des Wertes des retrotranspositions-aktiven Plasmids (pYX017) und des Wertes des retrotranspositions-inaktiven Plasmids (pYX015) bestimmt (NLR, *normalized luminescence ratio*):

$$\text{NLR} = \frac{\text{Fluc}_{\text{pYX017}}}{\text{Rluc}_{\text{pYX017}}} \bigg/ \frac{\text{Fluc}_{\text{pYX015}}}{\text{Rluc}_{\text{pYX015}}}$$

Der relative Fehler der Messwerte wurde durch die Bildung des Quotienten von Standardabweichung (*SD*) und Mittelwert (*M*) bestimmt. Der absolute Fehler des so ermittelten Quotienten ergab sich aus der Addition der relativen Fehler von pYX015 und pYX017 und der Multiplikation dieser Summe mit dem Quotienten:

$$\text{absoluter Fehler} = \left( \frac{\text{SD}_{\text{pYX015}}}{M_{\text{pYX015}}} + \frac{\text{SD}_{\text{pYX017}}}{M_{\text{pYX017}}} \right) * \text{NLR}$$

2.2.3.10 eGFP-basierter Nachweis von genomischen LINE-1-Integrationen

Ein weiteres System zur Detektion genomischer LINE-1-Integrationen nutzt die Fluoreszenz des grün-fluoreszierenden Proteins (eGFP) als Retrotranspositionsindikator. Der bereits ausführlich in Kapitel 2.2.3.9, Seite 57, beschriebene grundlegende Mechanismus ist in Abbildung 10, Seite 58, bildlich dargestellt.

Für die Durchführung der von Ostertag *et al.* (2000) entwickelten Methode wurden 50.000 (293T) bzw. 70.000 (293T\_KOs) Zellen je *well* in einer 24 *well Cellstar*<sup>®</sup> Multiwellplatte ausgesät und für 2 d kultiviert. Anschließend erfolgte deren Transfektion (siehe Kapitel 2.2.3.6, Seite 54) in technischen Triplikaten mit insgesamt je 500 ng Plasmid-DNA nach dem in Tabelle 4 angegebenen Transfektionsschema. Neben dem retrotranspositions-aktiven *LINE-1-eGFP*-Konstrukt 99PUR-RPS-EGFP wurde außerdem das retrotranspositions-inaktive Plasmid 99PUR-JM111-EGFP sowie ein eGFP-Expressionsplasmid (pEGFP-N1) zur Feststellung der Transfektionseffizienz verwendet.

Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen für weitere 3 d kultiviert, in 1 x PBS aufgenommen und die Emission des eGFPs mit Hilfe eines *FACSCANTO* / Durchflusszytometers unter Verwendung eines 480 nm Exzitationsfilters und eines 530/30 Bandpass Emissionsfilters analysiert. Als Negativkontrolle diente ein untransfizierter Ansatz.

**Tabelle 4: Transfektionsschema des eGFP-basierten LINE-1-Reportersystems.** Die Mengen- und Volumenangaben beziehen sich jeweils auf ein *well* einer 24-*well* Multiwellplatte.

Beschreibung des Transfektionsansatzes	Plasmide/Reagenzien	Menge/Vol.
retrotranspositions-inaktives <i>LINE-1-eGFP</i> -Konstrukt	99PUR-JM111-EGFP <i>Opti-MEM</i> <sup>®</sup> <i>TurboFect</i>	500 ng 50 µl 1 µl
retrotranspositions-aktives <i>LINE-1-eGFP</i> -Konstrukt	99PUR-RPS-EGFP <i>Opti-MEM</i> <sup>®</sup> <i>TurboFect</i>	500 ng 50 µl 1 µl
<i>eGFP</i> exprimierendes Plasmid zur Feststellung der Transfektionseffizienz	pEGFP-N1 <i>Opti-MEM</i> <sup>®</sup> <i>TurboFect</i>	500 ng 50 µl 1 µl
untransfizierter Ansatz	-----	-----

Zur Bestimmung des retrotranspositions-aktiven Anteils innerhalb der Zellpopulationen wurden die Werte aus vier unabhängigen Experimenten gemittelt, wobei die Daten der *knockout*-Zellen KO1 und KO2 zusammengefasst wurden. Anschließend wurde der eGFP-positive Anteil der mit dem retrotranspositions-inaktiven *LINE-1-eGFP*-Konstrukt transfizierten Zellen von dem Anteil der retrotranspositions-aktiven Zellen abgezogen.

$$\text{retrotranspositions-aktive Zellen} = (99\text{PUR-RPS-EGFP}) - (99\text{PUR-JM111-EGFP})$$

Der absolute Fehler der retrotranspositions-aktiven Zellen ergab sich aus der Addition der Standardabweichungen der gemittelten Werte von 99PUR-RPS-EGFP und 99PUR-JM111-EGFP.

$$\text{absoluter Fehler} = SD_{99\text{PUR-RPS-EGFP}} + SD_{99\text{PUR-JM111-EGFP}}$$

#### 2.2.3.11 Neomycinresistenzgen-basierter Nachweis von genomischen Alu-Integrationen

Für die Detektion genomischer Alu-Integrationen wurde das von Dewannieux *et al.* (2003) publizierte Reportersystem verwendet, welches auf der Verwendung des Antibiotika-Resistenzgens Neomycin als Retrotranspositionsindikator basiert. Dieses vermittelt die Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticindisulfat (G418) in retrotranspositions-aktiven Zellen.

Alu-Elemente sind als nicht-autonome non-LTR-Retrotransposonen von der Aktivität anderer Elemente für ihre Transposition abhängig. Aus diesem Grund muss bei der Verwendung dieses Systems ein funktionales LINE-1-Konstrukt zusammen mit der Alu-Markergeng-Kassette co-transfiziert werden. Dafür wurden 500.000 HeLa- bzw. HeLa\_KO-Zellen je 6 cm TC-Schale ausgesät und für 1 d kultiviert. Daraufhin erfolgte deren Transfektion (siehe Kapitel 2.2.3.6, Seite 54) in technischen Triplikaten mit insgesamt je 4 µg Plasmid-DNA nach dem in Tabelle 5, Seite 62, angegebenen Transfektionsschema.

Die transfizierten Zellen wurden für 7 d kultiviert und dann mit einer Zelldichte von 500.000 Zellen je 10 cm TC-Schale ausgesät. Dem Standardmedium wurde dabei G418 in einer Endkonzentration von 700 µg/ml beigelegt und das Selektionsmedium regelmäßig alle 3 d erneuert. 14 d nach Beginn der Selektion wurden die verbliebenen Kolonien mit 1 x PBS gespült, 10 min mit 2 ml Methanol-Aceton fixiert und erneut mit 1 x PBS gespült. Anschließend wurden die fixierten Zellen für 10 min mit 2 ml 0,04% Trypanblau gefärbt, abermals mit 1 x PBS gespült und die Kolonien mit einer Größe >1 mm ausgezählt.

**Tabelle 5: Transfektionsschema des neomycinresistenzgen-basierten Alu-Reportersystems.** Die Mengen- und Volumenangaben beziehen sich jeweils auf eine 6 cm TC-Schale.

Beschreibung des Transfektionsansatzes	Plasmide/Reagenzien	Menge/Vol.
retrotranspositions-inaktiver Ansatz	pcORF2	2 µg
	pcDNA4TO-3xflag(N)	2 µg
	<i>Opti-MEM</i> <sup>®</sup>	100 µl
	<i>TurboFect</i>	8 µl
retrotranspositions-aktives <i>Alu-Neomycin</i> -Konstrukt	pcORF2	2 µg
	Heidman ALU neo tet	2 µg
	<i>Opti-MEM</i> <sup>®</sup>	100 µl
	<i>TurboFect</i>	8 µl

#### 2.2.4 Statistische Auswertung

Im Zuge der statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurden für den Vergleich von zwei Stichproben der ungepaarte t-Test angewendet, für die Auswertung von größeren Stichproben hingegen wurde eine ein- oder zwei-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur gebraucht. Dabei wurden Werte kleiner oder gleich 0,05 als signifikant bezeichnet und mit einem Stern (\*) versehen. Werte kleiner oder gleich 0,01 wurden mit zwei Sternen (\*\*), Werte kleiner oder gleich 0,001 mit drei Sternen (\*\*\*) angegeben. Nicht signifikante Werte erhielten keine Kennzeichnung.

## 3 Ergebnisse

Die RNase H2 ist ein ubiquitär verbreitetes Enzym, das in Säugetieren essentielle Aufgaben zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität und zur Vermeidung von DNA-Schäden ausübt (Reijns *et al.*, 2012). Mutationen in einer ihrer drei Untereinheiten führen zur Ausbildung des Aicardi-Goutières-Syndroms (AGS), einer seltenen, frühkindlichen Autoimmun-Erkrankung mit klinischen und biochemischen Überlappungen zu intra-uterin erworbenen Virusinfektionen (Crow *et al.*, 2006b). Bislang wurden für die Funktionsanalysen des Enzyms v.a. Mausmodelle herangezogen, doch da sich diese auf Grund des ihnen fehlenden AGS-typischen neuroinflammatorischen Phänotyps nur bedingt zur Aufklärung der Krankheit eignen (Mackenzie *et al.*, 2016), sollten in dieser Dissertation humane RNase H2-defiziente (*knockout*) Zelllinien etabliert werden.

Dank dem Fortschritt der letzten Jahre im Bereich der Genom-Editierungsstrategien stand mit dem CRISPR-Cas9-System nach Cong *et al.* (2013) eine sehr unkomplizierte und leicht zu konfigurierende Technik zur Verfügung. Diese wurde für die Generierung RNASEH2A-defizienter Zellen herangezogen und die generierten Zellen sodann unter Betrachtung verschiedener Fragestellungen charakterisiert. Neben allgemeinen, den Phänotyp betreffenden Beurteilungen stand v.a. die Untersuchung eines möglichen Einflusses der RNase H2 auf die Expression oder Aktivität von endogenen Retroelementen im Zentrum der Analysen.

### 3.1 Generierung von RNASEH2A-defizienten Zelllinien

CRISPR-Cas9 bietet erhebliche Vorteile gegenüber anderen molekularen Instrumenten zur Untersuchung von *loss-of-function*-Experimenten. Im Gegensatz zu hypomorphen Veränderungen wie der RNA-Interferenz (RNAi) erzielt die Technik ein permanentes Resultat und liefert damit gleichbleibende, stabile Bedingungen für die nachfolgende Charakterisierung (Boettcher und McManus, 2015). Die Kernkomponenten werden i.d.R. transient in die Zelle eingebracht, wodurch das Risiko von *off-target*-Effekten verursacht durch eine konstitutive Expression und Aktivierung der Transgene reduziert wird. Unter *off-target*-Effekten werden dabei unspezifische Veränderungen verstanden, die nicht den Zielbereich betreffen. Verglichen mit anderen Genom-Editierungsstrategien sind Design und

---

Produktion der Kernkomponenten dank des geringen Klonierungsaufwands sehr simpel (Doudna und Charpentier, 2014). Aus diesem Grund schien das CRISPR-Cas9-System sehr für die Generierung RNASEH2A-defizienter humaner Zellen geeignet.

Im Vorfeld der eigentlichen Genom-Editierung mussten zunächst die angesteuerte Zielsequenz festgelegt und entsprechende CRISPR-Cas9-Plasmide kloniert werden. Anschließend wurden diese hinsichtlich ihrer Genom-Editierungsaktivität untersucht und das effektivste System in den zwei ausgewählten humanen Zelllinien HEK293T (293T) und HeLa HA angewendet.

### 3.1.1 Klonierung von Plasmiden für die humane Genom-Editierung

Inzwischen gibt es eine Vielzahl von Modifikationen des ursprünglichen CRISPR-Cas9-Systems, die eine erhöhte Effizienz, einfachere Konfiguration oder sicherere Handhabung versprechen. Für den Einsatz der Technologie konnte mit Prof. Dr. Boris Fehse, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Abteilung Zell- und Gentherapie, ein Kooperationspartner gewonnen werden, welcher dank technischer Hilfestellung und wissenschaftlicher Expertise zum Gelingen dieses Projekts beigetragen hat. Das von ihm bereitgestellte Plasmid stellt eine Modifikation des von Cong *et al.* (2013) etablierten Systems dar und erlaubt die Expression der chimären guideRNA sowie der Cas9-Nuklease anhand eines einzigen Vektors, welcher sowohl zur transienten Transfektion als auch zur stabilen Transduktion genutzt werden kann.

#### 3.1.1.1 Generelle Erwägungen zur Auswahl der Zielsequenz

Von den drei für die Genom-Editierung in Frage kommenden Zielgenen, welche für die Untereinheiten A, B und C der RNase H2 codieren, wurde für diese Arbeit das für die RNASEH2A codierende Gen ausgewählt (Ensemble Identifikationsnummer: ENST00000221486.4). Eine wesentliche Motivation für diese Auswahl stellte die kommerzielle Verfügbarkeit eines spezifischen Antikörpers gegen die A-Untereinheit des Proteinkomplexes dar, welcher essentiell für die Identifikation der RNASEH2A-defizienten Zelllinien war.

Das *RNASEH2A*-Gen besteht aus acht Exons mit einer Gesamtlänge von 1165 Nukleotiden, von denen 900 codierend sind, und sieben Introns. Der im Zuge der Genom-Editierung mittels CRISPR-Cas9 erzeugte Doppelstrangbruch sollte idealerweise innerhalb des codierenden Bereichs des Gens liegen, daher wurden Intronsequenzen sowie 5'- und 3'-UTR

nicht für die Identifizierung der Zielsequenzen berücksichtigt (siehe Abbildung 11). Grundsätzlichen Erwägungen zufolge ist es vorteilhaft ein Exon für die Genom-Editierung auszuwählen, welches sich nahe am N-Terminus des Proteins befindet. Somit wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass eine Rasterschub-Mutation zu einem Abbau der entsprechenden mRNA über den als ‚*nonsense-mediated mRNA decay*‘ bekannten Kontrollmechanismus führt und nicht zu einem verkürzten Protein mit enzymatischer Restaktivität. Daneben sollten bei der Auswahl der Zielsequenz solche Bereiche vermieden werden, die beim Vorkommen von alternativen Spleißprozessen nicht ubiquitär exprimiert werden. Damit kann gewährleistet werden, dass die klonierten Plasmide universell einsetzbar sind. Außerdem sollten Bereiche mit einem hohen Aufkommen von Einzelnukleotid-Polymorphismen (‚*single nucleotide polymorphisms*‘, SNPs) nach Möglichkeit ausgespart werden, um die Bindung der guideRNA an die genomische Sequenz nicht zu erschweren. Um letztlich zwischen mehreren Optionen diejenige mit der höchsten Genom-Editierungseffizienz auswählen zu können, wurden insgesamt drei funktionelle guideRNA-Sequenzen identifiziert (siehe Abbildung 11).

```

ATG GATCTCA GCGAGCTGGA GAGAGACAAT ACAGGCCGCT GTCGCCTGAG TTCGCCTGTG
  ▼ g#4
CCC GCGGTGT GCCGCAAGGA GCC TTGCGTC CTGGGCGTCG ATGAGGCGGG CAGGGGCCCC
GTGCTGGGCC CCATGGTCTA CGCCATCTGT TATTGTCCCC TGCCTCGCCT GGCAGATCTG
GAGGCGCTGA AAGTGGCAGA CTCAAAGACC CTATTGGAGA GCGAGCGGGA AAGGCTGTTT
  g#1 ▼
GCGAAAATGG A GGACACGGA CTTTGTGCGC T GCG CGCTGG ATGTGCTGTC TCCAAACCTC
ATCTCTACCA GCATGCTTGG GCGGGTCAAA TACAACCTGA ACTCCCTGTC ACATGATACA
GCCACTGGGC TTATACAGTA TGCATTGGAC CAGGGCGTGA ACGTCACCCA GGTATTTCGTG
GACACCGTAG GGATGCCAGA GACATACCAG GCGCGGCTGC AGCAAAGTTT TCCCGGGATT
GAGGTGACGG TCAAGGCCAA AGCAGATGCC CTCTACCCGG TGGTTAGTGC TGCCAGCATC
TGTGCCAAGG TGGCCCGGGA CCAGGCCGTG AAGAAATGGC AGTTCGTGGA GAAACTGCAG
GACTTGATA CTGATTATGG CTCAGGCTAC CCCAATGATC CCAAGACAAA AGCGTGTTG
AAGGAGCAG TGGAGCCTGT GTTCGGCTTC CCCCAGTTTG TCCGGTTCAG CTGGCGCAGC
GCCAGACCA TCCTGGAGAA AGAGGCGGAA GATGTTATAT GGGAGGACTC AGCATCCGAG
AATCAGGAG GACTCAGGAA GATCACATCC TACTTCCTCA ATGAAGGGTC CCAAGCCCGT
  ▼ g#3
CCCCGTTCCT ACCGATA TTTCTGGAA CGCGGCCTGG AGTCAGCAAC CAGCCTC TAG

```

**Abbildung 11: CRISPR-Cas9-Erkennungssequenzen innerhalb des humanen *RNASEH2A*-Gens.** Dargestellt ist der codierende Bereich der humanen genomischen *RNASEH2A*-Sequenz (Ensemble Identifikationsnummer: ENST00000221486.4). Die acht Exons sind farblich durch schwarze bzw. graue Schrift der Nukleotide voneinander abgegrenzt. Start-Codon (grüne Box) sowie Stopp-Codon (orange Box) sind farblich hervorgehoben. Die CRISPR-Cas9-Zielsequenzen sind durch Boxen dargestellt, bei denen die PAM-Sequenz pink unterlegt ist. Ein farbiges Dreieck markiert die angenommene Position des induzierten Doppelstrangbruchs.

### 3.1.1.2 CRISPR-Cas9-Genom-Editierungsplasmide

Für die Konstruktion der CRISPR-Cas9-Plasmide wurden zunächst geeignete Zielsequenzen innerhalb der humanen genomischen *RNASEH2A*-Sequenz identifiziert, sog. *protospacer*. Dazu wurde die Website <http://crispr.mit.edu/> verwendet, die basierend auf einem vom Feng Zhang Labor (Broad Institute, Massachusetts Institute of Technology, USA) entwickelten Algorithmus eine Liste möglicher Sequenzen ausgibt, die als Kandidaten für die Klonierung der guideRNAs in Frage kommen. Diese Sequenzen sind ihrer Bindespezifität für die Zielsequenz folgend (*on-target*-Aktivität') mit einer Bewertungsziffer versehen und entsprechend sortiert, in der zudem auch die Bindewahrscheinlichkeit für andere Sequenzbereiche (*off-target*-Aktivität') ihren Niederschlag findet. Neben der exakten Sequenzabfolge der *protospacer* sind der Liste außerdem die 3'-befindlichen PAM-Sequenzen zu entnehmen, die jedoch nicht Bestandteil der zu klonierenden Sequenz sind, sondern auf genomischer Ebene vorliegen müssen (Ran *et al.* (2013), siehe Abbildung 6, Seite 16). Darüber hinaus finden sich auch Angaben zu den genomischen Loci möglicher *off-target*-Aktivitäten der jeweilig eingesetzten guideRNA.

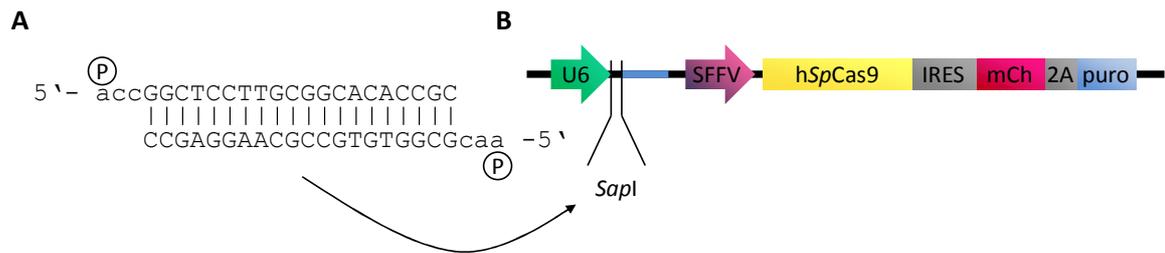
Die Suchmaschine der oben genannten Website wurde mit dem codierenden Sequenzbereich des *RNASEH2A*-Gens (Ensemble Identifikationsnummer: ENST00000221486.4) gespeist und die ersten vier Kandidaten mit einer möglichst hohen Bewertungsziffer sowie der Nukleobase Guanin am Sequenzstart ausgewählt (siehe Abbildung 11, Seite 65). Grund für diese Einschränkung der Auswahl ist die Präferenz des humanen U6-Promotors, der die Expression der chimären guideRNAs steuert (siehe Abbildung 12B, Seite 68), für Guanin am Transkriptionsstart (Dykxhoorn *et al.*, 2003), wodurch eine stärkere Transkriptionsaktivität erzielt wird. Der Kandidat für den zweiten *protospacer* musste jedoch verworfen werden, da der Erkennungsbereich der guideRNA Exongrenzen umspannte und daher in der genomischen DNA seine Zielsequenz nicht finden könnte.

Für die Klonierung wurden an die drei ausgewählten *protospacer*-Sequenzen die Nukleotide 5'-ACC an den *sense*-Strang bzw. 5'-AAC an den *antisense*-Strang angehängt. Die Oligonukleotide guide#1F bis guide#4R wurden wie in Kapitel 2.2.1.9, Seite 42, beschrieben phosphoryliert und hybridisiert (siehe Abbildung 12A). Der zur Klonierung verwendete lentiviral nutzbare LeGO-Cas9-Vektor (siehe Abbildung 12B) wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Boris Fehse, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Abteilung Zell- und Gentherapie, und stellt eine Modifikation des pX330-Konstrukts aus

dem Feng Zhang Labor dar (Cong *et al.*, 2013). Dieses Plasmid codiert für eine codon-optimierte *Streptococcus pyogenes* Cas9-Nuklease, deren Basentriplets auf den humanen Proteinbiosynthese-Apparat abgestimmt ist. Um eine nukleäre Lokalisation in Säuger-Zellen gewährleisten zu können, wurden außerdem zwei Kernlokalisierungssignale (*‘nuclear localisation signals’, NLS*) an den N- sowie den C-Terminus der Nuklease angefügt (Cong *et al.*, 2013). Überprüft werden kann die Cas9-Expression mit Hilfe des rot-fluoreszierenden Reporterproteins mCherry, welches dank einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (*‘internal ribosomal entry site’, IRES*) mit der Nuklease co-exprimiert wird. Die Antibiotikaresistenz gegen Puromycin wird ebenfalls wie das *Cas9-IRES-mCherry*-Konstrukt über den *‘spleen focus-forming virus’*- (SFFV) Promotor gesteuert, separiert von dem *mCherry*-Gen durch eine 2A-Sequenz, welche die Ausbildung einer Peptidbindung verhindert und so die Translation diskontinuierlicher Proteine ermöglicht.

Die Expression der chimären guideRNAs bestehend aus der kurzen, 20 Nukleotide langen Zielsequenz, dem *protospacer*, und der nicht-codierenden, 89 Nukleotide langen tracrRNA wird von dem RNA Polymerase III-abhängigen humanen U6-Promotor getrieben. Dieses von Cong *et al.* (2013) etablierte Konstrukt wurde an die Verwendung in den lentiviralen LeGO-Vektoren angepasst und die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *SapI* eingefügt (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Boris Fehse). Durch deren Verwendung können somit Zielsequenz und tracrRNA als Fusionskonstrukt kloniert werden (siehe Abbildung 12B).

Der enzymatisch hydrolysierte Basisvektor LeGO-Cas9 wurde mit den phosphorylierten und hybridisierten Oligonukleotiden ligiert und der Erfolg der Klonierungsreaktion mittels Sanger-Sequenzierung unter Verwendung des Oligonukleotids Crispr\_Seq-F nachgewiesen (siehe Kapitel 2.2.1.18, Seite 47, Daten siehe Anhang). Die resultierenden Vektoren wurden nach ihrem verwendeten *protospacer* in LeGO-Cas9-guide#1 bis #4 benannt. Die guideRNA aus LeGO-Cas9-guide#1 bindet den *sense*-Strang des dritten Exons und fügt einen Doppelstrangbruch an Position 268 des codierenden Bereichs ein. Die guideRNA#3 bindet den *antisense*-Strang des achten Exons, der Doppelstrangbruch erfolgt an Position 856 des codierenden Bereichs. Die guideRNA#4 bindet ebenfalls den *antisense*-Strang der *RNASEH2A*-Sequenz, der Doppelstrangbruch wird an Position 66 des ersten Exons erzeugt (siehe Abbildung 11, Seite 65).



**Abbildung 12: Klonierungsschema der LeGO-Cas9-guideRNA-Vektoren.** **A:** Die zueinander komplementären *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide, welche die Zielsequenz der CRISPR-Cas9-vermittelten Genom-Editierung festlegen, wurden an ihren 5'-Enden phosphoryliert und anschließend hybridisiert, sodass daraus ein doppelsträngiges Molekül mit 5'-Überhängen resultierte. Diese Überhänge sind mit dem mittels *Sapl* hydrolysierten LeGO-Cas9-Basisvektor kompatibel. **B:** Ausschnitt aus dem LeGO-Cas9-Basisvektor, verändert nach Cong *et al.* (2013). Der humane U6-Promotor (grüner Pfeil) kontrolliert die Expression der chimären guideRNA bestehend aus *protospacer* (wird über die *Sapl*-vermittelte Hydrolyse in den Vektor eingebracht) und *tracrRNA* (blau gekennzeichnet). Dahinter geschaltet befindet sich eine Expressionskassette aus dem Gen für die codonoptimierte *Streptococcus pyogenes* Cas9-Nuklease (*hSpCas9*, gelbe Box), einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES, graue Box), dem Gen für das fluoreszierende Reporterprotein mCherry (*mCh*, rote Box), einer 2A-Sequenz (graue Box) sowie dem Resistenzgen gegen das Antibiotikum Puromycin (*puro*, blaue Box). Gesteuert wird die Expression über den *spleen focus-forming virus*-Promotor (SFFV, violetter Pfeil).

### 3.1.2 RNASEH2A-Indikator-Zelllinie

An die Konstruktion der Genom-Editierungs-Plasmide anschließend sollten jene Vektoren identifiziert werden, welche die höchste Effizienz bei der Einfügung von *InDel*-Mutationen in die genomische DNA aufwiesen. Da zu Beginn des Projekts nicht klar war, ob humane Zellen überhaupt einen Verlust der RNASEH2A-Untereinheit überleben können, wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Boris Fehse eine Strategie entwickelt, die die Einschätzung der Effizienz selbst bei einem letalen *knockout* ermöglichen würde. Die Grundidee beinhaltete, dass ein Fusionskonstrukt aus dem humanen *RNASEH2A*- und dem *eGFP*-Gen in murine Zellen stabil eingebracht werden sollte. Die Genom-Editierungseffizienz könnte somit anhand der Abnahme des eGFP-Fluoreszenzsignals ermessen werden. Gleichzeitig wäre selbst bei höchster Effektivität der Plasmide keine Letalität der Zellen zu befürchten, da diese mit hoher Wahrscheinlichkeit ihre endogene, murine *RNASEH2A*-Sequenz behielten. Grund für diese Annahme lieferte der Sequenzvergleich von Teilabschnitten des humanen und des murinen *RNASEH2A*-Gens (siehe Abbildung 13, Seite 69).

		Identität 107/125(86%)			
human	1	ATGGATCTCAGCGAGCTGGAGAGAGACAATACAGGCCGCTGTGCGCCTGAGTTCGCCTGTG	60		
murin	1	ATGGATCTCAGCGAGCTGGAGAGGGACAATACGGGTCGTTGTCGTCTGAGTTCTCCTGTA	60		
human	61	CCC GCGGTGTGCCGCAAGGAGCC TTGCGTCCTGGGCGTCGATGAGGCGGGCAGGGGCCCC	120		
murin	61	CCT GCTGTGTCTCAAGGAGCCGTGCGTCTGCGGTCGGATGAAGCGGGCCAGGCCCT	120		
human	121	GTGCT	125		
murin	121	GTGCT	125		

**Abbildung 13: Sequenzvergleich zwischen Teilen der humanen und der murinen *RNASEH2A*-Sequenz.** Der Vergleich wurde mit Hilfe der Website <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> unter Verwendung der ersten 125 Nukleotide des codierenden Bereichs beider Gene erstellt, beginnend mit dem Start-Codon. Dafür wurden das erste Exon des humanen *RNASEH2A*-Gens sowie das dritte Exon des murinen *RNASEH2A*-Gens herangezogen. Sequenzübereinstimmungen sind durch vertikale Striche angegeben; die Identität der beiden Sequenzen beträgt 86 %. Außerdem dargestellt ist der *protospacer* der *guideRNA#4* (schwarze Box), dessen PAM-Sequenz ist rosa hinterlegt.

Bei diesem Vergleich ergaben sich deutliche Sequenzvariationen, wie am Beispiel der ersten 125 Nukleotide des codierenden Bereichs beider Gene gezeigt. Die untersuchten Sequenzen weisen lediglich eine Übereinstimmung von 86 % auf, was sich in einer Vielzahl von Nichtübereinstimmungen äußert. Für die CRISPR-Cas9-vermittelte Genom-Editierung konnten Anderson *et al.* (2015) zeigen, dass bereits beim Auftreten von zwei Nichtübereinstimmungen zwischen *guideRNA* und Zielsequenz die Effektivität der von ihnen untersuchten *guideRNAs* auf 5-10 % sank. Je näher diese der PAM-Sequenz waren, desto stärker fiel die Nichtübereinstimmung ins Gewicht. Im Bereich des *guideRNA#4 protospacers* fallen drei Nichtübereinstimmungen ins Auge sowie eine weitere Nichtübereinstimmung innerhalb der PAM-Sequenz (siehe Abbildung 13). Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass die verwendete *guideRNA* nur die humane Kopie des *RNASEH2A*-Gens zerstören würde und nicht die murine.

### 3.1.2.1 Erzeugung einer murinen Indikator-Zelllinie

Die humane Kopie des *RNASEH2A*-Gens sollte mittels lentiviraler Transduktion in die murine Zelllinie NIH/3T3 eingebracht werden. Zu diesem Zweck musste zunächst ein lentiviral nutzbarer Vektor generiert werden, der die Expression des *RNASEH2A-eGFP*-Fusionskonstrukts erlaubt (siehe Anhang).



**Abbildung 14: Ausschnitt aus der Plasmidkarte von LeGO-H2A-eGFP (verändert nach Weber *et al.* (2008)).**

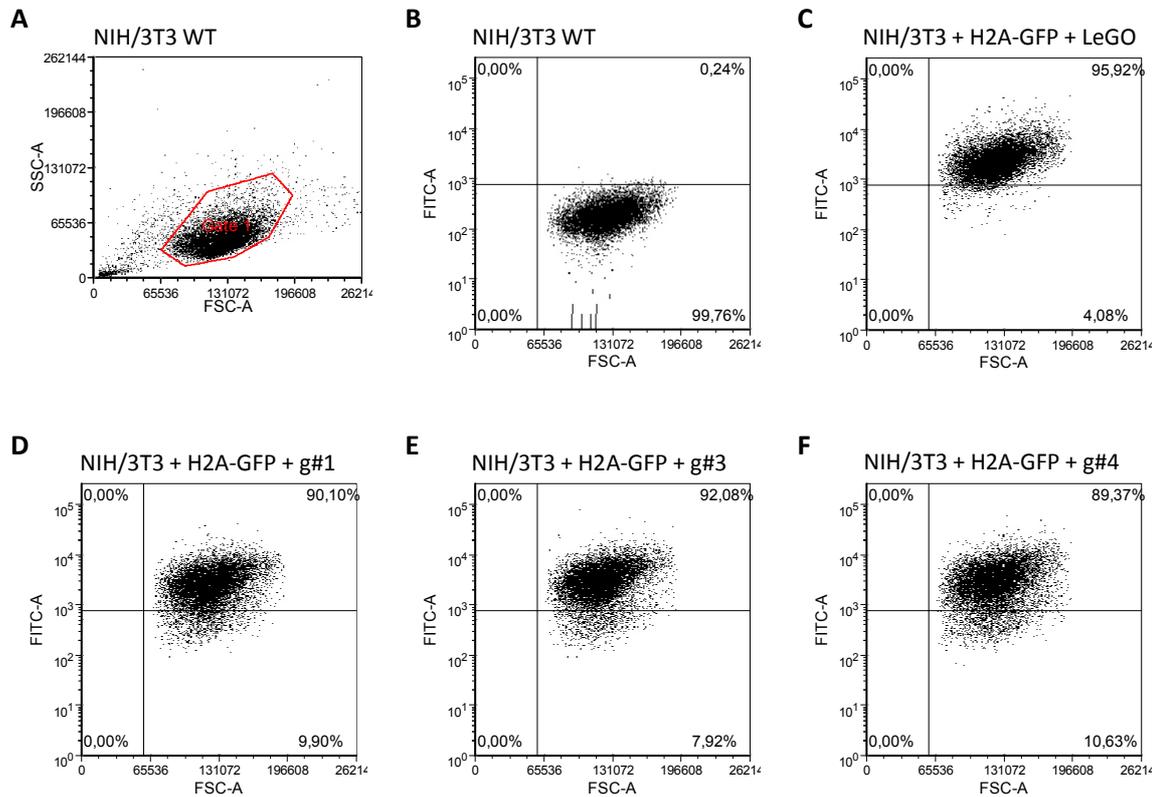
Die humane *RNASEH2A*-Sequenz (gelbe Box) ist mit dem *eGFP*-Gen (grüne Box) fusioniert. Die Expression des Konstrukts wird über den *spleen focus-forming virus*-Promotor (SFFV, violetter Pfeil) gesteuert. Weiterhin dargestellt sind Elemente, die für die lentivirale Transduktion erforderlich sind (graue Boxen): ‚long terminal repeat‘ (LTR), ‚Psi-Element‘ ( $\Psi$ ), ‚Rev response element‘ (RRE), ‚central polypurine tract‘ (cPPT) und ‚Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element‘ (wPRE).

Dieser Vektor besitzt neben dem durch den SFFV-Promotor gesteuerten *RNASEH2A-eGFP*-Fusionsgen weitere, für die lentivirale Transduktion erforderliche genetische Elemente (siehe Abbildung 14). Die lentivirale Transduktion der NIH/3T3-Zellen mit LeGO-H2A-eGFP wurde in Kooperation mit Dr. Ulrike Mock aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Boris Fehse am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Abteilung Zell- und Gentherapie, durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.3.7, Seite 55). Zur Ermittlung des optimalen Titers wurden verschiedene Volumina des viruspartikelhaltigen Überstands für die Transduktion eingesetzt. Der Erfolg dessen wurde via Durchflusszytometrie ermittelt und von der Population, bei welcher etwa 5 % der Zellen ein eGFP-Fluoreszenzsignal aufwiesen, wurde eine Einzelzell-Ablage gemacht. Erfahrungsgemäß zeigen NIH/3T3-Zellen bei einer Rate von 5 bis 10 % transduzierten Zellen nur eine singuläre Integration der lentiviralen DNA in ihr Genom (persönliche Mitteilung Dr. Ulrike Mock) und eignen sich daher gut für die gewünschte Nutzung als Indikator-Zelllinie.

### 3.1.2.2 Identifizierung von Editierungs-Plasmiden mit höchster Effizienz

Für die Genom-Editierung standen mit den drei generierten CRISPR-Cas9-Plasmiden verschiedene Optionen für den gezielten *knockout* der humanen *RNASEH2A*-Sequenz zur Verfügung (siehe Kapitel 3.1.1.2, Seite 66). Aus diesen musste diejenige identifiziert werden, welche die höchste Editierungseffizienz mitbrachte. Dafür wurden die erzeugten murinen *RNASEH2A*-Indikator-Zellen verwendet. Die das Fusionsgen *RNASEH2A-eGFP* exprimierenden NIH/3T3-Zellen wurden mit der CRISPR-Cas9-Plasmid-DNA transfiziert und erfolgreich transfizierte Zellen durch Antibiotika-Selektion angereichert. Anschließend wurde die eGFP-Fluoreszenz der Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Abbildung 15, Seite 71). Als eGFP-Negativkontrolle dienten hierbei NIH/3T3-Wildtyp Zellen, als Positivkontrolle wurden nicht-transfizierte Indikator-Zellen verwendet. Die Effi-

izienz des erzielten *knockouts* wurde über die Reduktion des Fluoreszenzsignals in den transfizierten Zellproben im Vergleich zu den Kontrollen ermessen. Bei den Analysen erwiesen sich die mit dem Vektor LeGO-Cas9-guide#4 transfizierten Zellen als diejenigen mit der höchsten Genom-Editierungseffizienz, woraufhin dieser für die Genom-Editierung ausgewählt wurde.

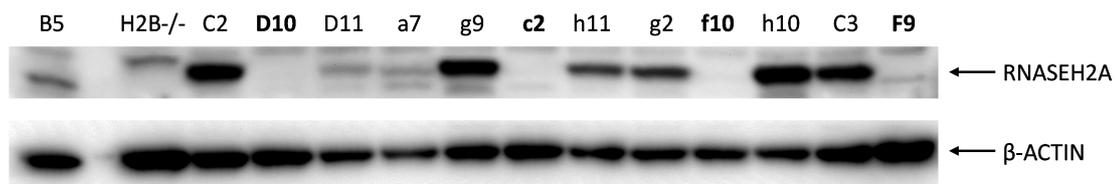


**Abbildung 15: Durchflusszytometrische Auswertung der mit den CRISPR-Cas9-Plasmiden transfizierten murinen Indikator-Zellen.** *RNASEH2A-eGFP* stabil exprimierende NIH/3T3-Zellen wurden mit den zur Verfügung stehenden Plasmiden transfiziert (je 2 µg der jeweiligen LeGO-Cas9-Plasmide). Nach 3 d Selektion mit antibiotikahaltigem Medium wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf ihre eGFP-Fluoreszenz hin analysiert. **A:** Für die Vorauswahl der Rohdaten diente ein *Dot Plot* (Vorwärtsstreulicht (FSC) versus Seitenstreulicht (SSC)) mit NIH/3T3-Wildtyp- (WT) Zellen und einem *scatter gate* (Gate 1), welches Zelltrümmer ebenso wie Zellaggregate aus der weiteren Analyse ausschloss. **B:** Für die Festlegung der Grenze zwischen einer eGFP-negativen und einer eGFP-positiven Population wurden die in Gate 1 befindlichen WT-Zellen in einer FSC versus FITC *Dot Plot*-Darstellung analysiert. Entscheidend für die Beurteilung waren der obere und der untere rechte Quadrant, wobei die Population im unteren rechten Quadranten den eGFP-negativen Zellen entsprach (99,76 %) und die im oberen rechten Quadranten den eGFP-positiven Zellen. **C-F:** Gezeigt werden die FSC versus FITC *Dot Plot*-Darstellungen der mit den verschiedenen CRISPR-Cas9-Plasmiden transfizierten Zellen. Die Beurteilung der Genom-Editierungseffizienz ergab sich über die Subtraktion des FITC-negativen Anteils der mit dem Basisvektor transfizierten Indikator-Zellen (**C**) von den FITC-negativen Anteilen der mit den jeweiligen Genom-Editierungsplasmiden transfizierten Zellen (**D-F**).

### 3.1.3 CRISPR-Cas9-vermittelte Genom-Editierung humaner Zellen

Nachdem das ideale Genom-Editierungsplasmid identifiziert worden war, galt es, eine geeignete Zelllinie für den RNASEH2A-*knockout* auszuwählen. Initiale Versuche ließen vermuten, dass nicht jeder Zelltyp mit einer RNASEH2A-Defizienz lebensfähig sein würde, da es trotz intensiver Bemühungen weder in eigener Regie noch in Kooperation mit der Firma ‚*horizon*‘ (Cambridge, UK) gelang, HEK293- bzw. HAP1-RNASEH2A-*knockout*-Zellen zu generieren (Daten nicht gezeigt). Dies steht im Einklang mit Erkenntnissen aus Genom-Editierungsexperimenten an Mäusen, die bei RNase H2-Defizienz einen embryonalen Phänotyp zeigen und nur beim Vorliegen eines P53-inaktiven Hintergrunds zur Generierung proliferativer muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs) genutzt werden können (Rabe, 2013; Reijns *et al.*, 2012). Offensichtlich ist also der P53-Status von entscheidender Bedeutung für das Überleben der RNase H2-Defizienz. Aus diesem Grund wurden mit der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293T sowie der menschliche Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa HA zwei Linien ausgesucht, welche ebenfalls einen P53-inaktiven Hintergrund aufweisen.

Zur Erzeugung der RNASEH2A-defizienten Zellen wurden die ausgewählten Linien mit dem Plasmid LeGO-Cas9-guide#4 transfiziert und von den die Antibiotikaselektion überlebenden Zellen monoklonale Linien etabliert (siehe Kapitel 2.2.3.8, Seite 56). Anschließend mussten die tatsächlich RNASEH2A-defizienten Zellklone identifiziert werden. Die für die Genom-Editierung verwendeten Zellen zählen zu den hypo- (293T, Bylund *et al.* (2004), Lin *et al.* (2014)) bzw. hypertriploiden Zelllinien (HeLa HA, Bottomley *et al.* (1969), Adey *et al.* (2013)). Hypotriploid bedeutet, dass einige Chromosomen in drei- statt in zweifacher Ausführung vorliegen, wohingegen ein hypertriploider Chromosomensatz durch einen teilweise drei- bis vierfachen Chromosomensatz gekennzeichnet ist. Auf Grund des Vorhandenseins multipler Allele war davon auszugehen, dass bei einer Genom-Editierung nicht zwingend alle existierenden Kopien des Allels in den resultierenden Zellklonen verändert würden. So wurde beispielsweise für die TALEN-vermittelte Genom-Editierung muriner H2.35 Hepatozyten gezeigt, dass nur 13,9 % der Klone homozygot und 50 % heterozygot für die angestrebte *Apc*-Mutation waren (Zhang *et al.*, 2014). Des Weiteren ist auch die bloße Expression der Cas9-Nuklease, die mit Hilfe der Puromycin-Selektion sichergestellt wird, noch kein Garant für eine erfolgreiche Genom-Editierung.



**Abbildung 16: Beispielhafte Darstellung der immunoblotbasierten Identifikationsstrategie RNASEH2A-defizienter Klone.** Aus den monoklonalen, putativ RNASEH2A-defizienten Zellklonen wurde das Gesamtprotein extrahiert und je 30 µg des Lysats gelelektrophoretisch via SDS-PAGE separiert. Die Nummerierung der Klone ist von den verwendeten *96-well* Multiwellplatten abgeleitet. Zur Größenbestimmung wurde neben den Proteinproben ein Standard mit aufgetragen (hier nicht sichtbar). Die A-Untereinheit wurde mittels Immunoblot unter Verwendung des RNASEH2A-Antikörpers detektiert, wobei das aus RNASEH2B-defizienten murinen Fibroblasten gewonnene Lysat (H2B<sup>-/-</sup>) als Negativkontrolle diente. Putative RNASEH2A-defiziente Klone sind durch Fettschrift hervorgehoben. Nach der Detektion der A-Untereinheit wurden die gebundenen Antikörper abgelöst und die Membran mit einem β-Actin Antikörper als Ladekontrolle rehybridisiert.

Daher mussten aus der Vielzahl der putativen *knockout*-Klone diejenigen identifiziert werden, welche eine vollständige RNASEH2A-Defizienz aufwiesen. Die Identifizierung der RNASEH2A-defizienten Zellklone erfolgte mittels Immunoblot (siehe Abbildung 16). Dafür wurde der Gesamtproteinextrakt der jeweiligen Klone gelelektrophoretisch mittels SDS-PAGE separiert (siehe Kapitel 2.2.2.4, Seite 48) und die RNASEH2A unter Verwendung eines spezifisch gegen die A-Untereinheit gerichteten Antikörpers detektiert (siehe Kapitel 2.2.2.5, Seite 49), welcher speziesübergreifende Kreuzreaktivität aufweist. Als Negativkontrolle konnte somit der Proteinextrakt aus RNASEH2B-defizienten murinen Fibroblasten verwendet werden, da in Abwesenheit der B-Untereinheit auch die Expression der A-Untereinheit inhibiert wird (Reijns *et al.*, 2012).

## 3.2 Charakterisierung der RNASEH2A-defizienten Zelllinien

Die Etablierung und Beschreibung humaner RNase H2-*knockout*-Zellen ist für die Beurteilung der dem Aicardi-Goutières-Syndrom oder ähnlicher Interferonopathien zugrunde liegenden Krankheitsmechanismen von großem Belang. Obwohl an Mäusen oder eukaryotischen Einzellern wie der Hefe durchgeführte Studien bereits einige Fragen haben beantworten können, so verbleiben dennoch viele Unklarheiten zur umfassenden zellulären Bedeutung des Enzyms, beispielsweise in Bezug auf mögliche über die rein enzymatischen Eigenschaften hinausgehende Funktionen des humanen Proteinkomplexes (Feng und Cao, 2016). Insbesondere die Ursache für die beobachteten phänotypischen Unterschiede zwischen Mensch und Maus gibt Forschern seit Jahren Rätsel auf und lässt sie die Übertragbarkeit der außerhalb des humanen Systems erzielten Forschungsergebnisse anzweifeln (Mackenzie *et al.*, 2016). Daher sollten die in dieser Dissertation generierten 293T- und HeLa HA-*knockout*-Zellen grundlegend unter Berücksichtigung verschiedener Fragestellungen untersucht werden. Zum einen galt es, bereits für andere Organismen belegte allgemeine Charakteristika auf das humane System auszuweiten und zum anderen sollte ein spezielles Augenmerk auf die mögliche Involvierung der RNase H2 in den Metabolismus endogener Retroelemente gelegt werden. Damit sollten generelle Rückschlüsse auf die Entstehung von Autoimmunität durch eine potentielle Akkumulierung RE-abgeleiteter Nukleinsäurederivate ermöglicht werden.

### 3.2.1 Allgemeine Charakterisierung

Im Zuge der allgemeinen Charakterisierung RNASEH2A-defizienter Zellen sollte zunächst die Abwesenheit der A-Untereinheit und die damit einhergehende enzymatische Inaktivität des Proteinkomplexes belegt werden. Studien konnten ein durch den Enzymverlust bedingtes vermindertes Wachstum in murinen Zellen aufzeigen, das sich als Konsequenz einer p53-abhängigen DNA-Schadenantwort einstellte und von massiven Ribonukleotid-Anreicherungen in der genomischen DNA begleitet wurde (Reijns und Jackson, 2014; Reijns *et al.*, 2012). Ein weiteres Ziel war es daher, eine Beeinflussung der Proliferationseigenschaften sowie die Entstehung von DNA-Schäden durch die RNASEH2A-Defizienz auch für menschliche Zellen zu belegen. Darüber hinaus wurden die Zellen hinsichtlich der

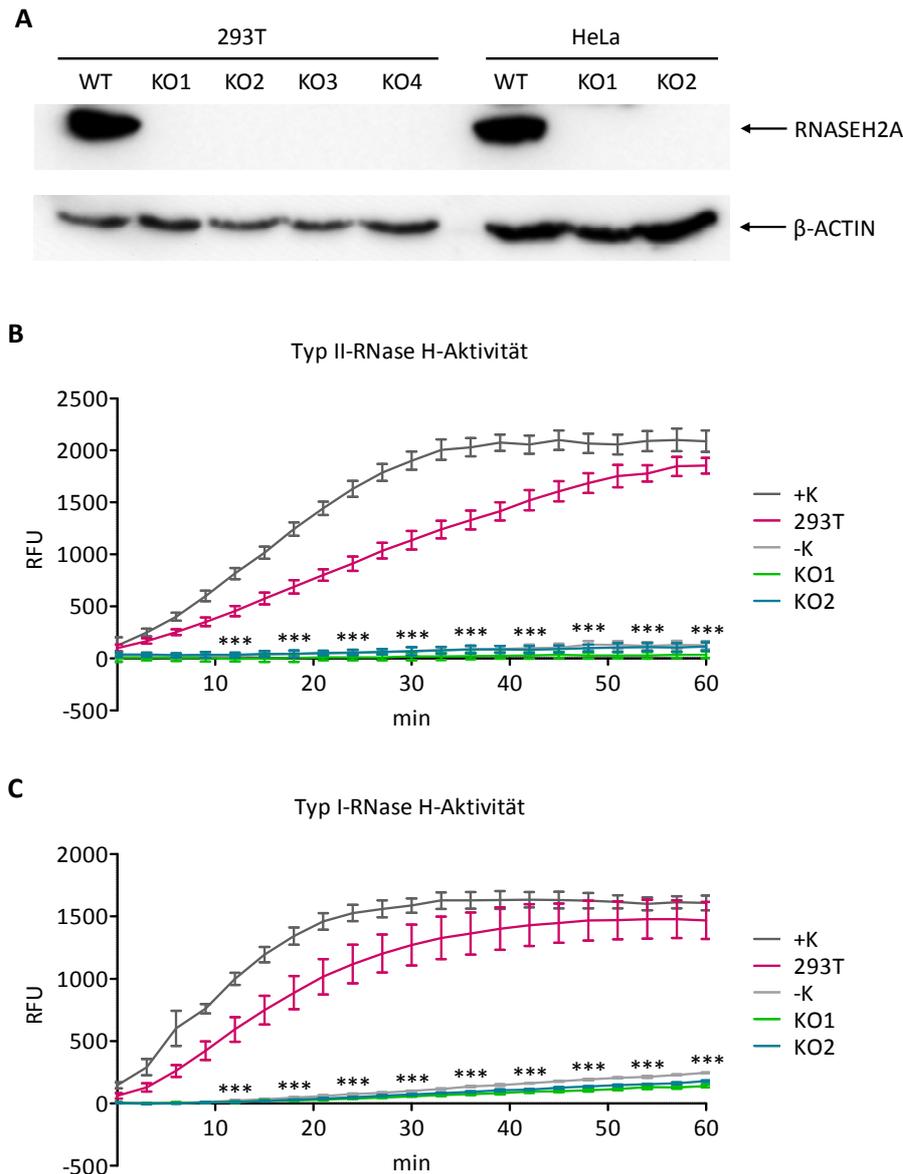
für AGS-Patienten charakteristischen IFN- bzw. ISG-Signatur analysiert, die eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems anzeigt.

### 3.2.1.1 Die RNase H2-Expression in Parental- und *knockout*-Zellen

Im Zuge der CRISPR-Cas9-vermittelten Genom-Editierung zur Erzeugung RNASEH2A-defizienter humaner Zellen konnten vier monoklonale 293T- und zwei monoklonale HeLa HA-Klone etabliert werden. Die RNASEH2A-Defizienz der Zellklone und der damit einhergehende Verlust der enzymatischen Aktivität wurde auf drei verschiedene Weisen verifiziert: proteinbiochemisch mittels Immunoblot und RNASEH1/H2-Aktivitätstest sowie molekularbiologisch über ‚*next generation sequencing*‘ (NGS).

Für den Nachweis des RNASEH2A-*knockouts* via Immunoblot wurde in drei unabhängigen Experimenten der jeweilige Gesamtproteinextrakt der Klone gelelektrophoretisch via SDS-PAGE separiert (siehe Kapitel 2.2.2.4, Seite 48) und die RNASEH2A unter Verwendung eines spezifisch gegen die A-Untereinheit gerichteten Antikörpers detektiert (siehe Kapitel 2.2.2.5, Seite 49). Wie in Abbildung 17A, Seite 76, exemplarisch dargestellt zeigte nachweislich keiner der identifizierten *knockout*-Klone ein spezifisches Signal des RNASEH2A-Antikörpers, das der Untereinheit zuzuordnen wäre.

Zusätzlich wurde der Verlust der Typ I- und Typ II-RNase H-Aktivität in zwei beispielhaft ausgewählten 293T-*knockout*-Klonen mit Hilfe des RNASEH1/H2-Aktivitätstests belegt. Für dessen Durchführung wurde die enzymatische Nuklease-Aktivität der Gesamtproteinextrakte aus RNASEH2A-defizienten und Parentalzellen zusammen mit den von Prof. Dr. Andrew Jackson, University of Edinburgh, MRC Human Genetics Unit, zur Verfügung gestellten Positiv- und Negativkontrolllysaten fluorimetrisch analysiert (siehe Kapitel 2.2.2.7, Seite 50). Die Typ II-RNase H-Aktivität, also die enzymatische Aktivität gegen einzelne in einen DNA-Duplex eingebettete Ribonukleotide, wurde dabei durch die Verwendung zweier Substrate (DNA:DNA sowie DNA-R-DNA:DNA) ermittelt, um eine Aussage über die Prozessierung des singulären Ribonukleotids unabhängig von der eventuell vorhandenen Desoxyribonukleaseaktivität treffen zu können (siehe Abbildung 9, Seite 51). Für die Bestimmung der Typ I-RNase H-Aktivität wurde das Substrat RNA:DNA verwendet. Es zeigte sich, dass die RNASEH2A-defizienten Klone wie auch die Negativkontrolle weder messbare Typ II- noch Typ I-RNase H-Aktivität aufwiesen, wohingegen die Aktivitäten der Parentalzellen mit denen der Positivkontrolle vergleichbar waren (siehe Abbildung 17B und C).



**Abbildung 17: RNase H2-Expression und -Aktivität in (ausgewählten) RNASEH2A-defizienten Zellklonen.**

**A:** Beispielhafte Darstellung eines Immunoblots zum Nachweis der RNASEH2A-Defizienz in allen generierten 293T- und HeLa-*knockout*-Klonen (n=3). Verwendet wurden je 30 µg (293T) bzw. 50 µg (HeLa) Lysat sowie ein Standard zur Größenbestimmung der Proteinproben (hier nicht sichtbar). Die A-Untereinheit wurde mit Hilfe des RNASEH2A-Antikörpers detektiert und die Membran anschließend mit dem β-Actin Antikörper als Ladekontrolle rehybridisiert. **B und C:** RNASEH1/H2-Aktivitätstest von zwei ausgewählten *knockout*-Klonen, der Parentallinie sowie Positiv- und Negativkontrolle (HeLa-*knockout*- und Parentallinie generiert von Prof. Dr. Andrew Jackson). Für den Test wurden Gesamtproteinkonzentrationen von 100 ng/µl eingesetzt. Aufgetragen wurde die Fluoreszenzsignalstärke gegen die Zeit. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus technischen Triplikaten, Signifikanzen wurden mittels zwei-faktorieller Varianzanalyse errechnet (n=1). Gezeigt ist die Typ II-RNase H-Aktivität (**B**), also die enzymatische Aktivität gegen einzelne in einen DNA-Duplex eingebettete Ribonukleotide (gemessen über die Umsetzung der Substrate DNA:DNA sowie DNA-R-DNA:DNA) bzw. die Typ I-RNase H-Aktivität (**C**), also die enzymatische Aktivität gegen RNA:DNA-Hybride (gemessen über die Umsetzung des Substrats RNA:DNA).

Um die exakten *InDel*-Mutationen der RNASEH2A-defizienten Zellen bestimmen zu können, wurde diese via ‚Illumina MiSeq‘ next generation sequencing genotypisiert. Diese Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethode ermöglicht die massive parallele Analyse von Millionen DNA-Fragmenten in einem einzigen Sequenzierlauf. Für die Analyse wurden zunächst nach den Vorgaben von Kozich *et al.* (2013) spezielle Oligonukleotide synthetisiert, welche eine Länge von 69 bp haben und sowohl die analytisch relevanten Komponenten vereinen als auch den genspezifischen Sequenzabschnitt. Diese umspannen den von der guideRNA angesteuerten Zielbereich und damit die Position des Doppelstrangbruchs in einem Umfang von insgesamt 131 bp. Dabei wurde eine sog. ‚paired-end‘-Sequenzierung durchgeführt, bei der von beiden Enden des Fragments ausgehend je 75 bp sequenziert wurden und es in der Mitte einen Überlappungsbereich von 19 bp gab. Jeder Klon konnte anhand eines individuellen, acht Nukleotide langen Sequenzabschnitts (‚barcode‘) eindeutig zugeordnet werden.

Für die Probenvorbereitung wurde unter Verwendung der gereinigten, konzentrierten genomischen DNA der RNASEH2A-defizienten Klone der Abschnitt von Interesse mittels PCR amplifiziert (siehe Kapitel 2.2.1.4, Seite 38). Dabei wurden die *forward*-Oligonukleotide NGS-F1 bis -F4 für die Klone 293T\_KO1 bis \_KO4 und die Oligonukleotide NGS-F5 bis -F6 für die Linien HeLa\_KO1 bis \_KO2 sowie das *reverse*-Oligonukleotid NGS-R1 für alle Linien verwendet. Anschließend wurden die gereinigten Amplifikate auf eine einheitliche Konzentration gebracht und vereinigt. Die NGS-Analyse wurde von Dr. Britt-Sabina Petersen, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Kiel, Institut für klinische Molekularbiologie, durchgeführt. Die Auswertung der NGS-Daten erfolgte unter Verwendung der vom Broad Institute (Cambridge, MA, US) bereitgestellten Software ‚Integrative Genomics Viewer‘ (Robinson *et al.*, 2011). Das Programm ermöglicht den Vergleich der aus der Sequenzierung erhaltenen Sequenzen mit einem Referenzgenom und stellt diese zudem grafisch dar (siehe Anhang). Die identifizierten *InDel*-Mutationen variierten je nach Klon von 1 bis 26 bp-Deletionen über eine ein Nukleotid betreffende Insertion (siehe Abbildung 18, Seite 78). Allen Mutationen war gemeinsam, dass sie eine Verschiebung des Leserasters zur Folge hatten und sämtliche Allele der RNASEH2A betroffen waren. Keine der *knockout*-Linien zeigte somit ein Wildtyp-Allel. Vier der etablierten Zellklone waren homozygot für das RNASEH2A-Nullallel, in zwei der sechs untersuchten Klone konnten hingegen mehrere verschiedene *InDels* identifiziert werden (‚komplexe Heterozygotie‘).

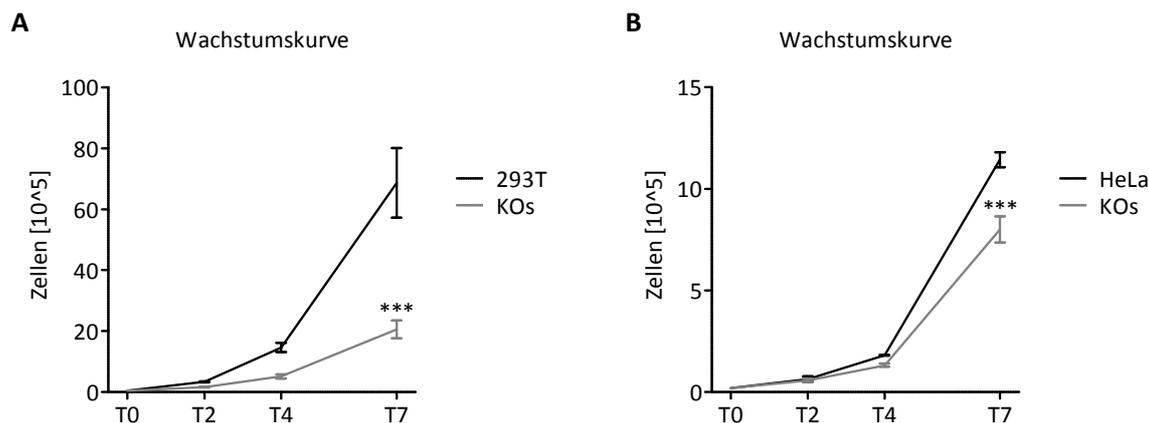
Aminosäuren	S	P	V	P	A	V	C	R	K	E	P	C	V	L	G	V	
Referenz	TCGCCTGTGCCCCGCGGTGTGCCGCAAGGAGCCTTGCCTCCTGGGCGTC																
293T_KO1	TCGCCTG → TGCCTCCTGGGCGTC																26 bp Del
	TCGCCTGTGCCCCG → GAGCCTTGCCTCCTGGGCGTC																13 bp Del
293T_KO2	TCGCCTG → TGCCTCCTGGGCGTC																26 bp Del
	TCGCC → TGTGCCGCAAGGAGCCTTGCCTCCTGGGCGTC																11 bp Del
	TCGCCT → GGTGTGCCGCAAGGAGCCTTGCCTCCTGGGCGTC																8 bp Del
293T_KO3	TCGCCTGTGC → GTGTGCCGCAAGGAGCCTTGCCTCCTGGGCGTC																5 bp Del
293T_KO4	TCGCCTGTGCCCCGCGcGTGTGCCGCAAGGAGCCTTGCCTCCTGGGCGT																1 bp In
HeLa_KO1	TCGCCTGTGCCCCG → GTGTGCCGCAAGGAGCCTTGCCTCCTGGGCGTC																1 bp Del
HeLa_KO2	TCGCCTGTGCCCCG → GTGTGCCGCAAGGAGCCTTGCCTCCTGGGCGTC																1 bp Del

**Abbildung 18: NGS-Analyse der RNASEH2A-defizienten Linien.** Dargestellt ist der Sequenzvergleich des humanen Referenzgenoms (dunkelgrau hinterlegt) mit den RNASEH2A-*knockout*-Klonen (der Übersichtlichkeit halber im Wechsel weiß/hellgrau hinterlegt). Die Position des eingefügten Doppelstrangbruchs ist durch ein rosa Dreieck markiert. Ferner ist die Aminosäuresequenz des Abschnitts angegeben, um Auswirkungen auf das Leseraster aufzuzeigen. Deletionen sind durch fehlende Nukleotide und schwarze Linien verdeutlicht, Insertionen durch zusätzliche Nukleotide mit roter Schriftfarbe und Kleinschreibung.

### 3.2.1.2 Die RNASEH2A-Defizienz hat Einfluss auf die Zellproliferation

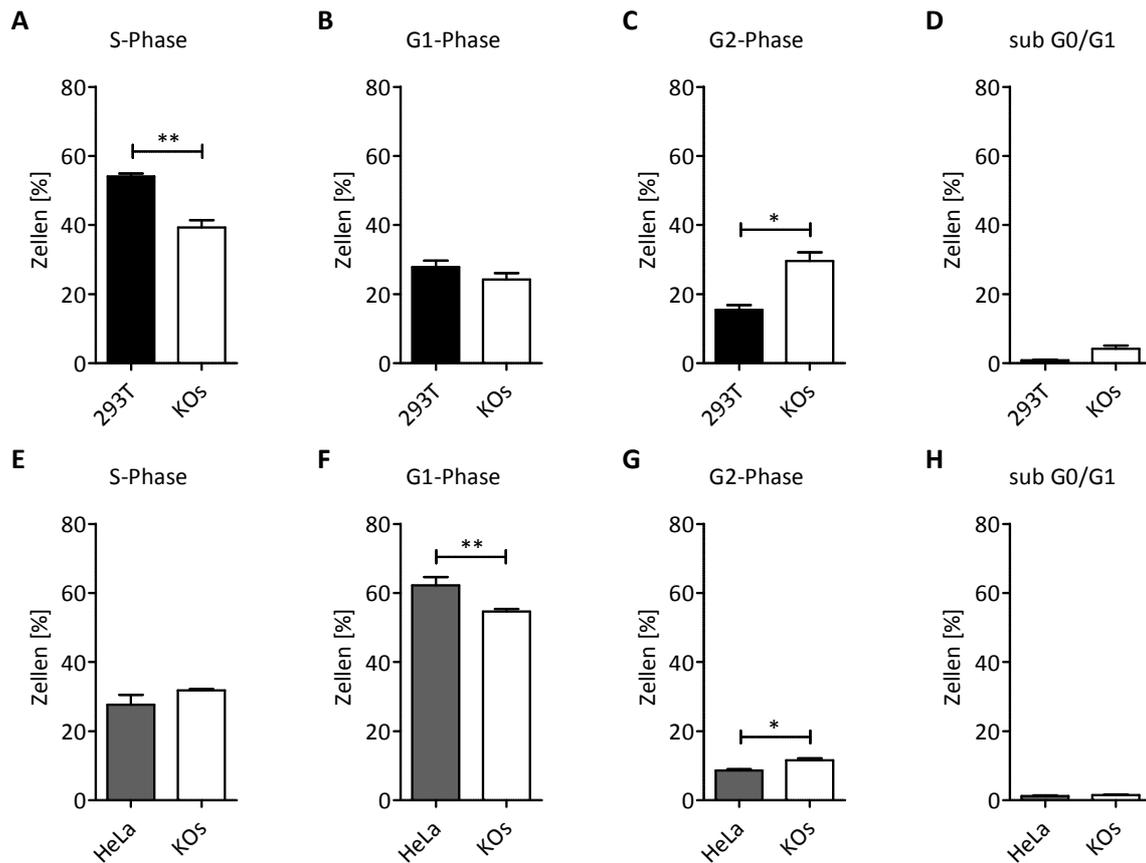
Bereits bei der Etablierung der RNASEH2A-defizienten Linien fiel auf, dass insbesondere die 293T-*knockout*-Klone einen starken Proliferationsnachteil gegenüber ihrer Parentalzelllinie aufwiesen. Dies sollte experimentell unter Zuhilfenahme zweier Strategien belegt werden: der sukzessiven Zellzahlbestimmung zur Erstellung von Wachstumskurven sowie der EdU-basierten Zellproliferationsmessung.

Für die Erstellung der Wachstumskurven wurde die Zellzahl an drei festgelegten Zeitpunkten in mehreren unabhängigen Einzelexperimenten ermittelt und anhand der gemittelten Daten ein Kurvenverlauf erstellt (siehe Kapitel 2.2.3.3, Seite 53). Wie in Abbildung 19, Seite 79, ersichtlich konnte belegt werden, dass die RNASEH2A-defizienten 293T-Klone ein signifikantes Proliferationsdefizit aufwiesen, welches sich nach sieben Tagen bereits deutlich manifestierte und schlussfolgern ließ, dass die Parentalzellen etwa dreimal schneller proliferierten. Die HeLa-*knockout*-Zellen teilten sich ebenfalls langsamer als ihre Parentallinie, wobei die Unterschiede im Wachstumsverhalten jedoch weniger stark ausfielen als bei den 293T-Zellen und sich außerdem erst bei mehrtägiger Beobachtung signifikant ausprägten.



**Abbildung 19: Wachstumskurven.** Aufgetragen wurde die Zellzahl gegen die zur Zellzahlbestimmung herangezogenen Zeitpunkte. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, Signifikanzen wurden mittels zwei-faktorieller Varianzanalyse errechnet. **A:** Vergleich zwischen der 293T-Parentalzelllinie und allen vier RNASEH2A-defizienten Klonen (Werte der KOs zusammengefasst,  $n=3$ ). **B:** Vergleich zwischen der HeLa-Parentalzelllinie und beiden RNASEH2A-defizienten Klonen (Werte der KOs zusammengefasst,  $n=2$ ).

Eine differenziertere Beurteilung des Wachstumsverhaltens von Parental- und *knockout*-Zellen erfolgte anschließend mit Hilfe einer Doppelfärbung von neusynthetisierter DNA und Gesamt-DNA der Zellen in einer EdU-basierten Zellproliferationsmessung (siehe Kapitel 2.2.3.4, Seite 54). EdU ist ein Thymidin-Analogon, welches während der S-Phase in die neusynthetisierte DNA inkorporiert und durch die Kopplung an ein Fluorophor nachgewiesen werden kann, womit die Analyse der Proliferation einer Zelllinie ermöglicht wird. In je drei unabhängigen Einzelmessungen wurden so die Anteile der Zellen in den jeweiligen Zellzyklus-Phasen bestimmt. Die Versuchsergebnisse der 293T-Zellen spiegelten dabei die mit Hilfe der Wachstumskurven gewonnenen Erkenntnisse wider und belegten ebenfalls einen signifikanten Rückgang der Proliferationsrate in den RNASEH2A-defizienten Zellklonen. Des Weiteren zeigten sie einen deutlichen Anstieg von in der G2-Phase des Zellzyklus befindlichen *knockout*-Zellen, wohingegen sich bezüglich der Zellen in der G1-Phase allenfalls eine leichte Tendenz erahnen ließ, signifikante Unterschiede jedoch nicht feststellbar waren (siehe Abbildung 20A-C, Seite 80). Bei den untersuchten HeLa-Zellen ließen sich im EdU-Zellproliferationstest keine signifikanten Diskrepanzen in Bezug auf die Teilungsrate der Zellklone ableiten, wohl aber konnte eine signifikante Verringerung von RNASEH2A-defizienten Zellen in der G1-Phase sowie eine Zunahme von in der G2-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen festgestellt werden (siehe Abbildung 20E-G). Die beobachteten Beeinträchtigungen des Zellzyklus in beiden untersuchten Zelllinien gingen nicht mit einer erhöhten Apoptoserate einher (siehe Abbildung 20D und H).



**Abbildung 20: EdU-basierte Zellproliferationsmessung.** Darstellung der jeweiligen Phasen des Zellzyklus als Mittelwerte  $\pm$  SEM, die Signifikanzen wurden mittels ungepaartem t-Test errechnet ( $n=3$ ). **A-D:** Vergleich zwischen der 293T-Parentalzelllinie und allen vier RNASEH2A-defizienten Linien (Daten der KOs zusammengefasst). **E-H:** Vergleich zwischen der HeLa-Parentalzelllinie und beiden RNASEH2A-defizienten Linien (Daten der KOs zusammengefasst).

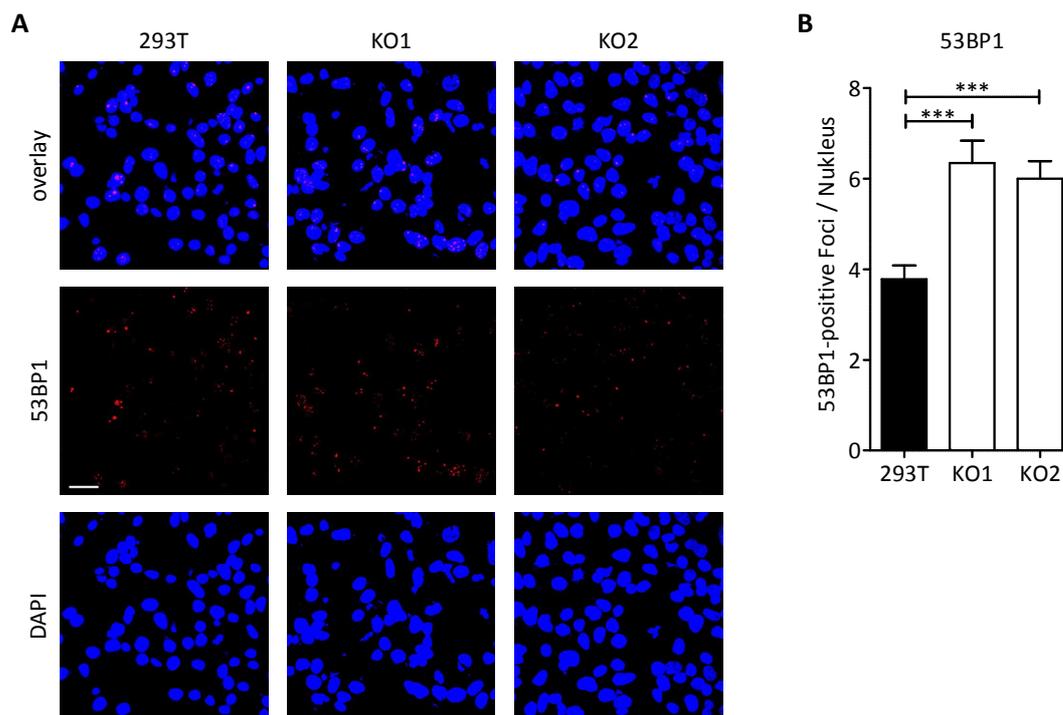
### 3.2.1.3 Akkumulieren RNASEH2A-defiziente Zellen mehr DNA-Schäden?

Eine Behinderung des normalen Zellzyklus-Ablaufes kann ein Hinweis für das Vorliegen von genomischen DNA-Schäden sein. Die in dieser Dissertation untersuchten RNASEH2A-defizienten Klone zeigten eine signifikante Akkumulation von Zellen in der G2-Phase, der post-synthetischen Phase des Zellzyklus, im Zuge derer die replizierte DNA auf eventuell entstandene Schäden untersucht wird. Werden solche Schäden von der Zelle wahrgenommen, so wird das Voranschreiten des Zellzyklus aufgehalten und die betroffenen Zellen werden in G2 arretiert, bis die zuvor detektierten Schäden von der Zelle repariert worden sind.

Zur Bewertung der Genom-Integrität sollten die generierten RNASEH2A-defizienten 293T-Zellen unter anderem mittels immunocytochemischer Färbungen auf 53BP1- (*p53-binding*

*protein 1'*) positive Foci untersucht werden. 53BP1 ist ein Protein, welches in distinkten Bereichen des Nukleus akkumuliert und als Mediator für die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur gilt (Lukas *et al.*, 2011). Färbungen zweier 293T-*knockout*-Klone sowie der Parentalzelllinie wurden in drei unabhängigen Einzelerperimenten von Dr. Kareen Bartsch, Christian-Albrechts Universität zu Kiel, Institut für Biochemie, wie in Bartsch (2016) beschrieben angefertigt. Neben einem 53BP1-spezifischen Antikörper kam außerdem der Fluoreszenzfarbstoff *'4',6-Diamidin-2-phenylindol'* (DAPI) zur Visualisierung der genomischen DNA zum Einsatz (siehe Abbildung 21A). Beide untersuchten RNASEH2A-defizienten Klone wiesen eine signifikant erhöhte Anzahl an 53BP1-positiven Foci je Zelle auf (siehe Abbildung 21B).

Zur weiteren Analyse der genomischen Integrität wurden in Kooperation mit Dr. Bernhard Ellinger, Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie IME Hamburg, Bereich ScreeningPort, Mikronuklei-Analysen an 293T-Zellen durchgeführt.



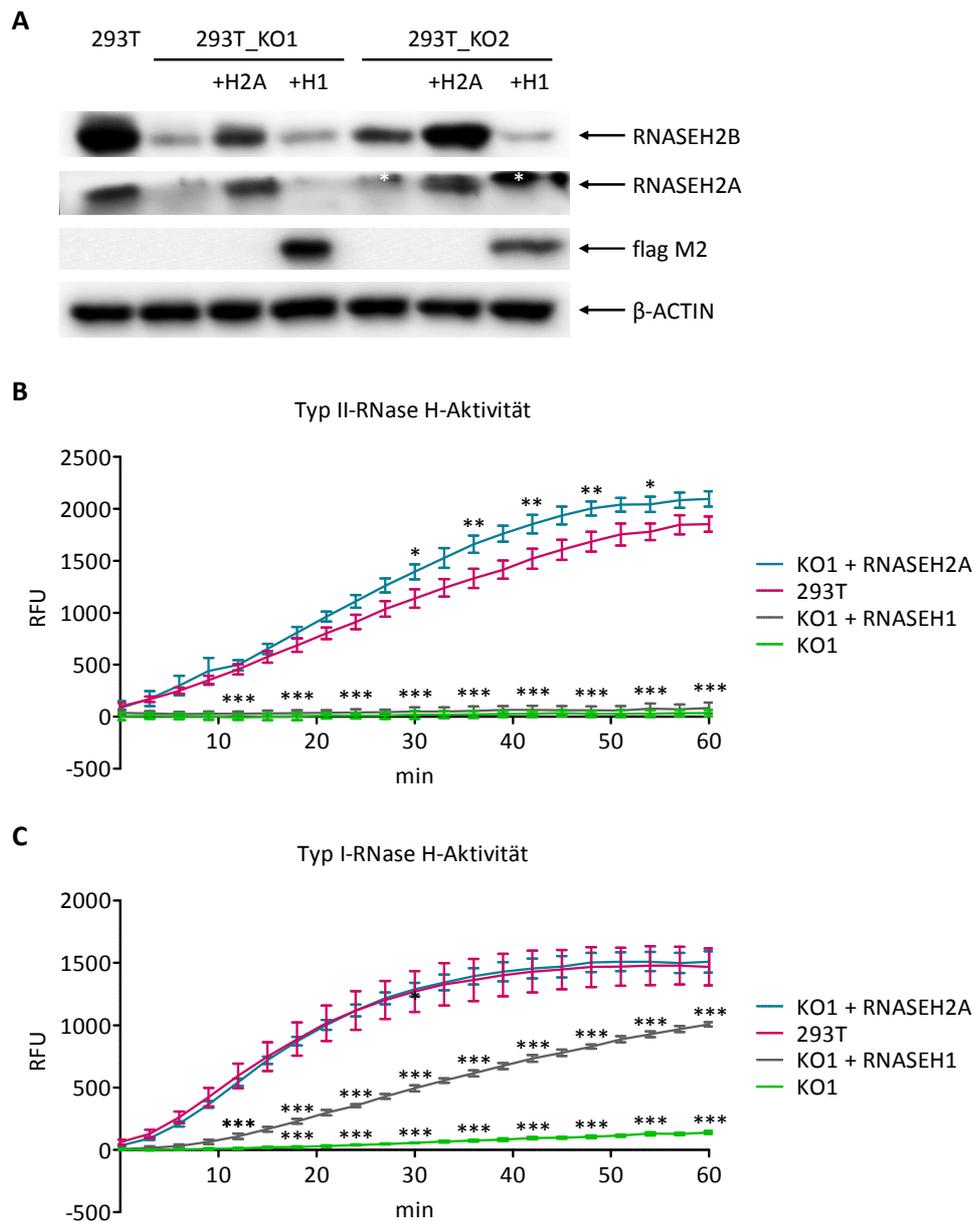
**Abbildung 21: Immuncytochemische 53BP1-Färbungen zur Ermessung der Genom-Integrität.** Zweifach-Fluoreszenzfärbung mit  $\alpha$ -53BP1 und DAPI von 293T-Parentalzellen sowie zwei *knockout*-Klonen (durchgeführt von Dr. Kareen Bartsch). **A:** Exemplarische Darstellung der Einzelfärbungen sowie der Co-Lokalisation beider Fluoreszenzsignale (*overlay*). **B:** Quantifizierung. Dargestellt ist die Anzahl der 53BP1-positiven Foci je Nukleus  $\pm$  SEM, Signifikanzen wurden mittels zwei-faktorieller Varianzanalyse errechnet (n=3).

Mikronuklei sind cytoplasmatische Chromatin-Strukturen, deren quantitative Abschätzung als Indikator für während der Mitose stattgefundenene genetische Schäden herangezogen werden kann (Sabharwal *et al.*, 2015). Neben den Parentalzellen und den beiden RNASEH2A-defizienten Klonen 293T\_KO1 und \_KO2 wurden außerdem *knockout*-Klone, die mit RNASEH2A bzw. RNASEH1 lentiviral rekonstituiert worden waren (siehe Anhang), für die Mikronuklei-Analysen verwendet.

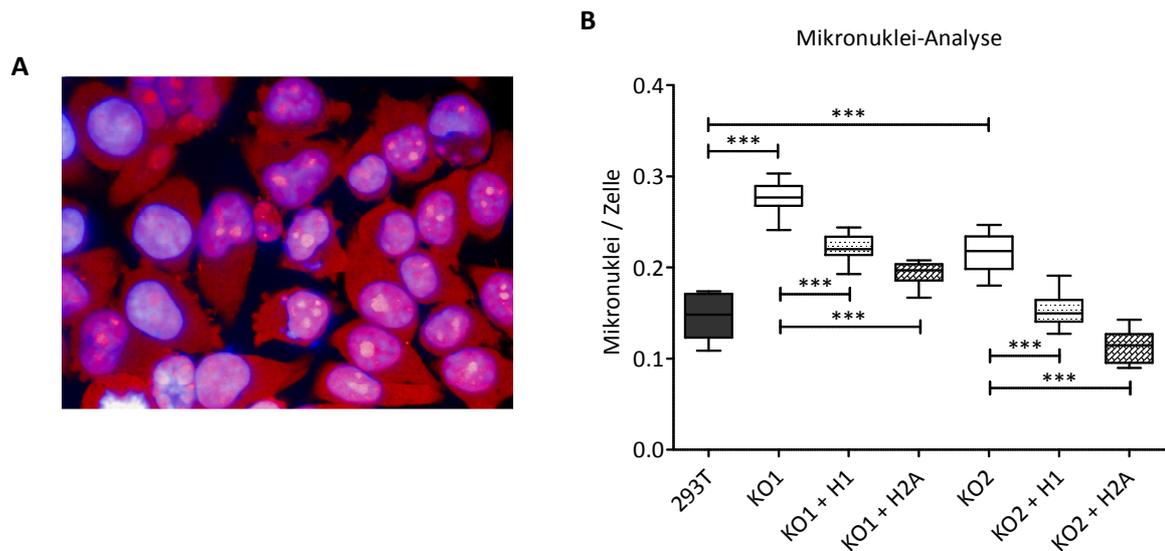
Die Expression der eingebrachten Transgene wurde via Immunoblot nachgewiesen (siehe Abbildung 22A, Seite 83), wobei die A- und B-Untereinheiten der RNase H2 sowie das C-terminale *flag*-Epitop der RNase H1 unter Verwendung spezifischer Antikörper detektiert wurden (siehe Kapitel 2.2.2.5, Seite 49). Durch die erneute Expression der A-Untereinheit in den zuvor RNASEH2A-defizienten Klonen wurde auch die Expression der übrigen Untereinheiten stimuliert und die enzymatische Aktivität des Proteinkomplexes wiederhergestellt (siehe Abbildung 22B und C). Dies wurde mit Hilfe des RNASEH1/2-Aktivitätstests belegt (siehe Kapitel 2.2.2.7, Seite 50). Der mit RNASEH2A rekonstituierte Klon zeigte sowohl Typ I- als auch Typ II-RNase H-spezifische Aktivität und war somit in der Lage, nicht nur einzelne Ribonukleotide in einem DNA-Duplex zu prozessieren, sondern auch RNA:DNA-Hybride. Der mit der RNASEH1 lentiviral rekonstituierte Klon hingegen wies lediglich Typ I-RNase H-spezifische Aktivität auf, was ihn zur Hydrolyse von RNA:DNA-Hybriden befähigte.

Die immunocytochemischen Zweifach-Färbungen von fixierten 293T-Parental-, *knockout*- und mit Typ I/II-RNase H-Aktivität rekonstituierten Zellen zum Nachweis von Mikronuklei (siehe Kapitel 2.2.2.8, Seite 52) wurden von Dr. Bernhard Ellinger unter Verwendung des blau-fluoreszierenden Nukleinsäure-Farbstoffs ‚Hoechst 33258‘ sowie des die gesamte Zelle anfärbenden Fluoreszenzfarbstoffs ‚HCS CellMask™ Deep Red‘ gefärbt und anschließend unter Verwendung eines konfokalen *laser-scanning*-Mikroskops analysiert.

Durch die Zweifach-Färbung waren cytoplasmatische DNA-haltige Strukturen von der nukleären DNA im hochauflösenden Mikroskop zu diskriminieren (siehe Abbildung 23A, Seite 84). Die Quantifizierung der Mikronuklei je Zelle ergab einen signifikanten Anstieg bei den RNASEH2A-defizienten Zellen 293T\_KO1 und \_KO2 im Vergleich zu ihrer Parentalzelllinie, welcher durch das stabile Einbringen der RNase H1 abgemildert und durch die Rekonstituierung mit dem *RNASEH2A*-Gen sogar fast auf Wildtyp-Niveau gesenkt werden konnte (siehe Abbildung 23B).



**Abbildung 22: Wiederherstellung der Typ I/II-RNase H-Aktivität in 293T-knockout-Zellen.** **A:** Immunoblot zum Nachweis der erfolgreichen Transduktion der 293T-knockout-Zellen (n=1). Verwendet wurden je 30 µg Lysat sowie ein Standard zur Größenbestimmung der Proteinproben (hier nicht sichtbar). Detektiert wurden die B- und die A-Untereinheit der RNase H2 zum Nachweis der Rekonstituierung mit RNASEH2A. Unspezifische Banden des RNASEH2A-Antikörpers knapp oberhalb der erwarteten Signale wurden mit Sternen markiert. Die Expression der RNase H1 wurde mit Hilfe des Antikörpers flag M2 detektiert und die Membran anschließend mit dem β-Actin Antikörper als Ladekontrolle rehybridisiert. **B und C:** RNASEH1/H2-Aktivitätstest von der Parentallinie, dem 293T-knockout-Klon KO1 sowie dem mit RNASEH2A bzw. RNASEH1 lentiviral rekonstituierten Klon KO1. Für den Test wurden Gesamtproteinkonzentrationen von 100 ng/µl eingesetzt. Aufgetragen wurde die Fluoreszenzsignalstärke gegen die Zeit. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus technischen Triplikaten, Signifikanzen wurden mittels zwei-faktorieller Varianzanalyse errechnet (n=1). Gezeigt ist die Typ II-RNase H-Aktivität gegen einzelne in einen DNA-Duplex eingebettete Ribonukleotide (**B**) bzw. die Typ I-RNase H-Aktivität gegen RNA:DNA-Hybride (**C**).



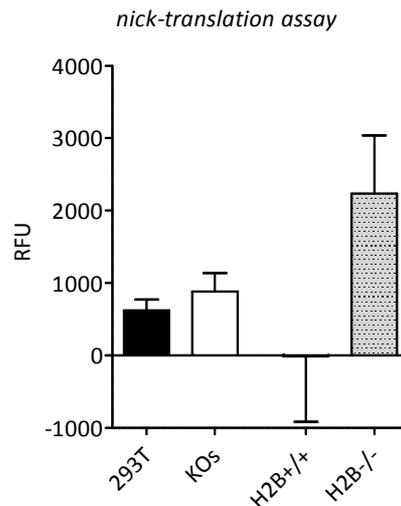
**Abbildung 23: Immuncytochemische DNA-Färbungen zur Ermessung der Genom-Integrität.** Zweifach-Fluoreszenzfärbung mit *Hoechst 33258* und *HCS CellMask™ Deep Red* von 293T-Parentalzellen sowie von (z.T. mit Typ I/II-RNase H-Aktivität rekonstituierten) *knockout*-Klonen (durchgeführt von Dr. Bernhard Ellinger, n=2). **A:** Exemplarische Darstellung der Lokalisation beider Fluoreszenzsignale (*Hoechst 33258*: blau, *HCS CellMask™ Deep Red*: rot). **B:** Exemplarische Quantifizierung eines Experiments. Dargestellt ist die Anzahl der Mikronuklei je Zelle  $\pm$  SEM von je zwölf technischen Replikaten, Signifikanzen wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse errechnet. Neben den Parental- und *knockout*-Zellen kamen stabil mit der nukleären Isoform des *RNASEH1*-Gens transduzierte Zellen (KO1/2 + H1) sowie stabil mit dem *RNASEH2A*-Gen transduzierte Zellen (KO1/2 + H2A) zum Einsatz.

Im Hinblick auf die spezialisierte Fähigkeit der RNase H2 zur Entfernung von fälschlicherweise in die genomische DNA inkorporierten Ribonukleotiden (Hiller *et al.*, 2012; Reijns *et al.*, 2012) sollten die generierten *knockout*-Zellen nachfolgend mit Hilfe zweier Techniken hinsichtlich erhöhter Ribonukleotid-Häufigkeiten analysiert werden. Zum einen wurde der fluoreszenzbasierte *nick-translation assay* angewendet, der die gezielte Markierung ribonukleotidreicher DNA-Moleküle erlaubt, zum anderen die alkalische Sensitivität der Zellen und somit indirekt die Ribonukleotid-Dichte ermessen.

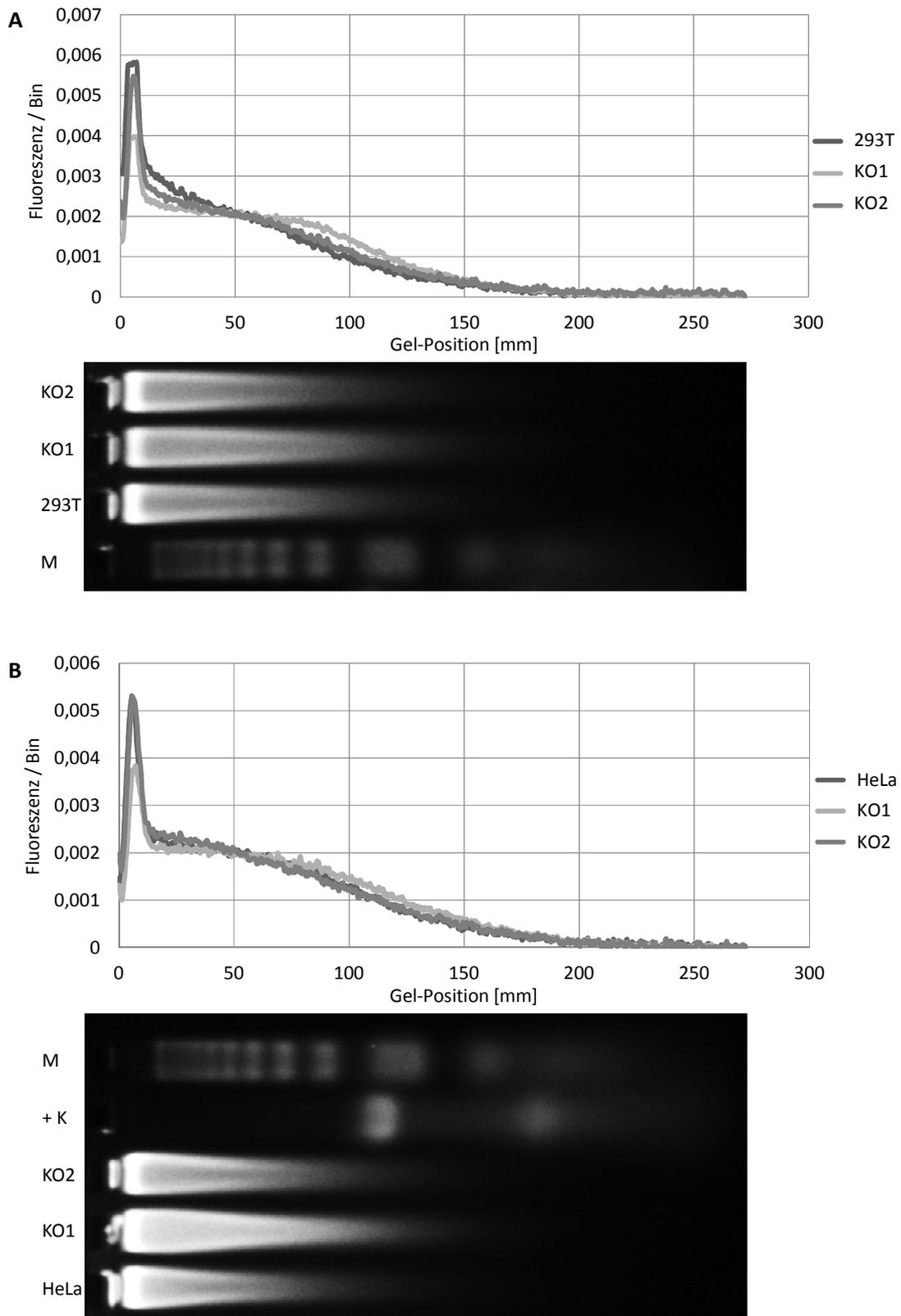
Die Analyse der genomischen DNA von 293T-Parental- und *knockout*-Zellen mit Hilfe des *nick-translation assays* (siehe Kapitel 2.2.1.3, Seite 37) ergab keine signifikanten Unterschiede, dennoch ließ sich eine leichte Tendenz hin zu einem vermehrten Ribonukleotid-Gehalt bei den untersuchten *RNASEH2A*-defizienten Klonen feststellen (siehe Abbildung 24, Seite 85). Bei der angewendeten Methode werden in die nukleäre DNA inkorporierte Ribonukleotide mittels RNase HII-Hydrolyse und anschließender Markierung von so entstandenen Einzelstrangbrüchen über den Einbau von fluorophorgekoppelten Nukleotiden

nachgewiesen. Eine erhöhte Fluoreszenzemission zeigt somit eine gesteigerte Ribonukleotidrate an.

Um diese Tendenz weiter zu untermauern wurden von Joseph Dahl aus der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Kunkel, National Institute of Environmental Health Sciences (NC, US), DNA Replication Fidelity Group, alkalisch hydrolysierte Nukleinsäuren aus den 293T- und HeLa-*knockout*- und Parentalzellen wie in Nick McElhinny *et al.* (2010a) beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Unter den angewendeten Versuchsbedingungen wird das DNA-Grundgerüst an Stellen, die ein Ribo- statt ein Desoxyribonukleotid enthalten, vollständig hydrolysiert (Nick McElhinny *et al.*, 2010b). Große Differenzen ließen sich auch bei den Untersuchungen der alkalischen Sensitivität nicht ableiten, dennoch zeigten die angefertigten Gele sowohl bei der Analyse der 293T- als auch der HeLa-DNA eine Abnahme an langen DNA-Fragmenten und eine Zunahmen an kürzeren Hydrolyse-Produkten (siehe Abbildung 25, Seite 86).

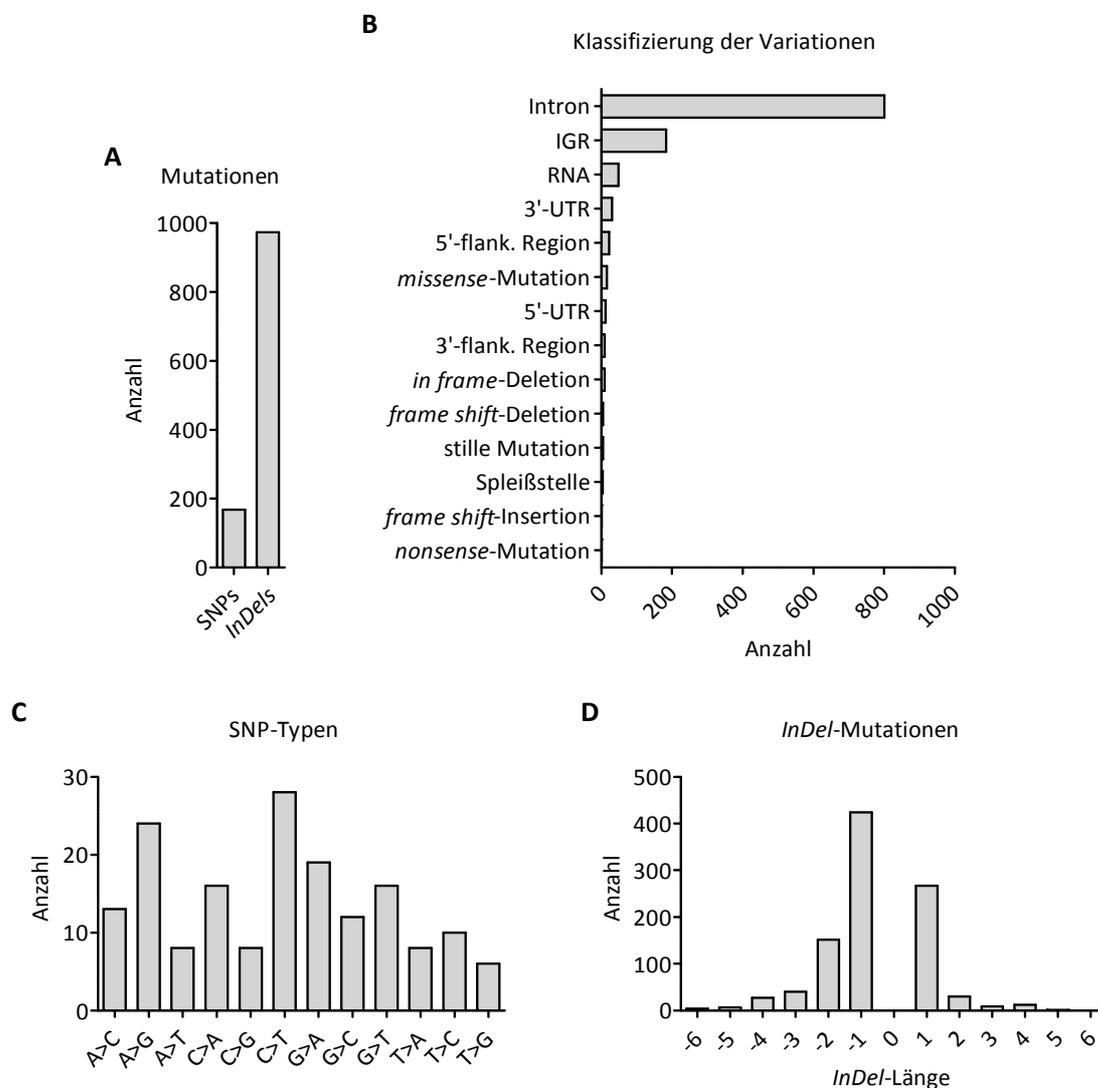


**Abbildung 24: Nick-translation assay.** Darstellung der Fluoreszenzsignalstärke nach RNase HII-Hydrolyse der ribonukleotidhaltigen genomischen DNA und anschließender Markierung von so entstandenen Einzelstrangbrüchen über den Einbau von fluorophorgekoppelten Nukleotiden. Aufgetragen wurden die Emissionswerte von 293T-Parentalzellen und allen vier RNASEH2A-defizienten 293T-Klonen (Daten der KOs zusammengefasst) als Mittelwerte  $\pm$  SEM, Signifikanzen wurden mittels ungepaartem t-Test errechnet ( $n=3$ ). Zu Kontrollzwecken wurden außerdem RNASEH2B-defiziente murine Fibroblasten (H2B<sup>-/-</sup>) sowie deren Parentalzellen (H2B<sup>+/+</sup>) verwendet.



**Abbildung 25: Gelelektrophoretische Auftrennung von alkalisensitiven Nukleinsäuren.** Exemplarisch dargestellt sind mit Kaliumhydroxyd hydrolysierte genomische DNA-Proben von RNASEH2A-defizienten Zellen und Parentalzellen im alkalischen Agarose-Gel sowie die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit zur Gel-Position (durchgeführt von Joseph Dahl, n=2). Die Quantifizierung bezieht sich auf das jeweils darunter befindliche Gel. **A:** 293T-Zellen. **B:** HeLa-Zellen.

Des Weiteren sollten die aus den akkumulierten genomischen DNA-Schäden hervorgegangenen Mutationen mittels Exom-Sequenzierung sichtbar gemacht werden. Bei dieser Technik werden gezielt die codierenden Bereiche eines Genoms sequenziert und somit genetische Variationen aufgezeigt, die eine Veränderung der Proteinsequenz nach sich ziehen können. Zu diesem Zweck wurden aus HeLa-Parentalzellen sowie dem RNASEH2A-defizienten Klon HeLa\_KO1 die genomische DNA isoliert (siehe Kapitel 2.2.1.1, Seite 36). Die Analyse der isolierten genomischen DNA sowie deren bioinformatische Auswertung wurden von Dr. Raheleh Sheibani, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Kiel, Institut für klinische Molekularbiologie, durchgeführt.



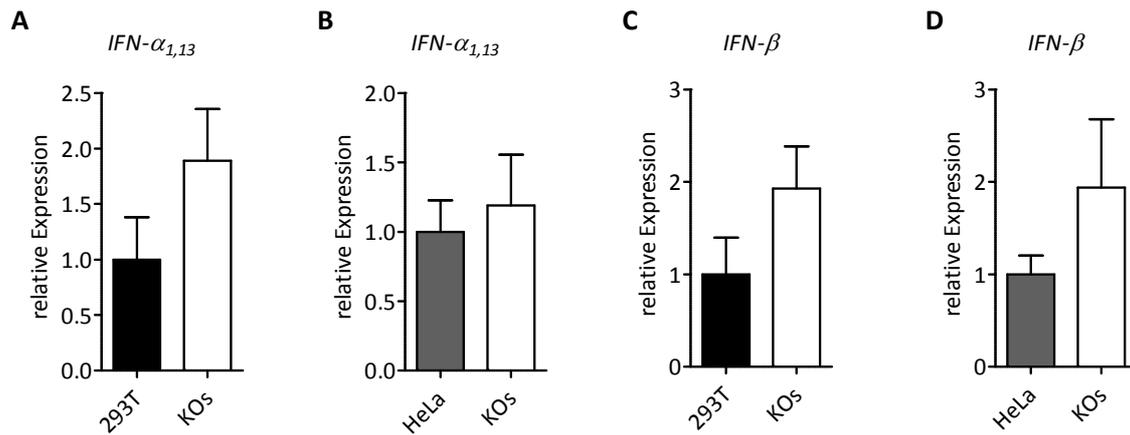
**Abbildung 26: Exom-Sequenzierung von HeLa-Parentalzellen und HeLa\_KO1.** **A:** Quantifizierung der Gesamtanzahl der im Vergleich zur Parentallinie einzigartig in HeLa\_KO1 vorkommenden Mutationen. **B:** Klassifizierung dieser Variationen. **C:** Quantifizierung der vorkommenden Basenpaarsubstitutionen. **D:** Darstellung der vorherrschenden InDel-Längen.

Im Zuge dessen wurden die Daten der Parentalzellen mit denen der HeLa\_KO1-Zellen verglichen und so die in dem RNASEH2A-defizienten Klon einzigartig vorkommenden Mutationen identifiziert. Die Analysen ergaben, dass der Großteil der spezifischen Variationen auf *InDel*-Mutationen zurückzuführen war (973 von insgesamt 1141, siehe Abbildung 26A, Seite 87). Die vorherrschende Deletionen umfassten ein bis sechs Nukleotide, Insertionen hatten eine Länge von ein bis fünf Nukleotiden, wobei die Mehrheit der *InDel*-Mutationen ein Nukleotid betraf (siehe Abbildung 26D). Eine nähere Aufschlüsselung der identifizierten Variationen zeigte, dass hauptsächlich nicht-codierende Bereiche wie Intron- oder intergenische Regionen (IGRs) betroffen waren, wohingegen nur sehr wenige Mutationen in Bereichen detektiert wurden, die sich direkt auf das Genprodukt auswirken können (siehe Abbildung 26B). Hinsichtlich der SNPs war kein deutliches Muster zu erkennen, alle möglichen Substitutionen traten auf. Transitionen waren insgesamt jedoch häufiger vertreten als Transversionen (siehe Abbildung 26C).

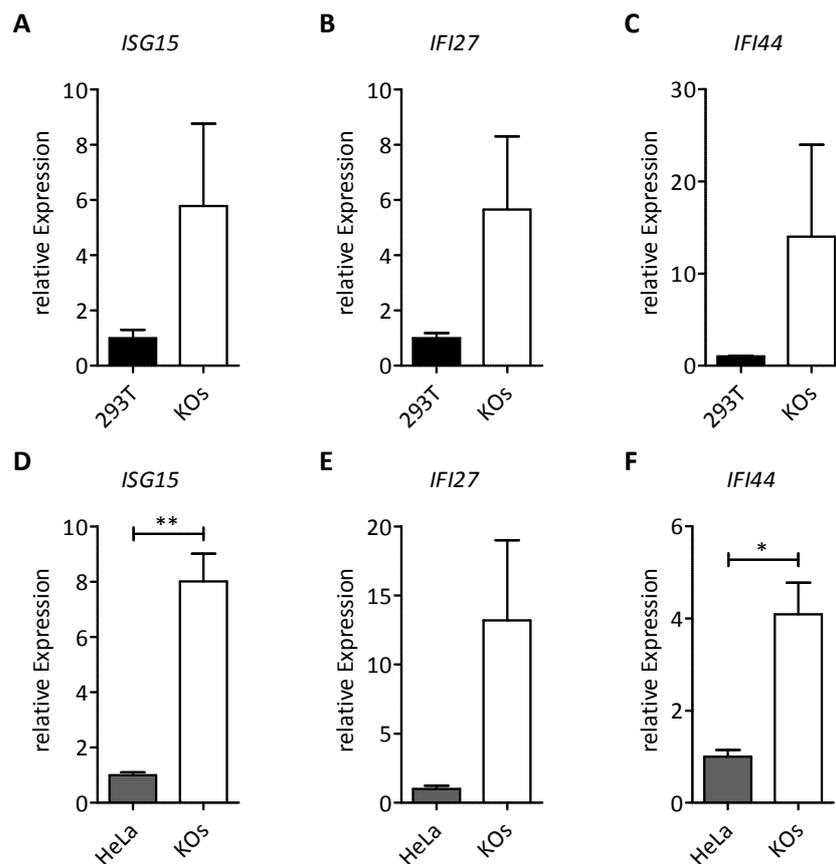
#### 3.2.1.4 RNASEH2A-defiziente HeLa-Zellen weisen eine ISG-Signatur auf

Viele AGS-Patienten weisen eine Interferon- und ISG-Signatur auf (Crow *et al.*, 2015; Lebon *et al.*, 1988; Rice *et al.*, 2013). Daher wurden auch die RNASEH2A-defizienten 293T- und HeLa-Zelllinien auf eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Cytokinen untersucht. Im Zuge dessen wurden ihre in cDNA umgeschriebenen Transkripte mittels qRT-PCR analysiert (siehe Kapitel 2.2.1.16, Seite 45). Für die Auswertung wurden die Daten aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt.

Alle RNASEH2A-defizienten Klone ließen tendenziell eine gesteigerte Expression der untersuchten Typ I-Interferone *IFN- $\alpha_{1,13}$*  und *IFN- $\beta$*  sowie der ISGs *ISG15* (*,interferon-stimulated gene 15'*), *IFI27* (*,interferon alpha inducible protein 27'*) und *IFI44* (*,interferon induced protein 44'*) erahnen, wenngleich sich diese zumeist nicht als signifikante Veränderung der relativen Expression bemerkbar machte (siehe Abbildung 27, Seite 89, und Abbildung 28, Seite 89). Lediglich in den analysierten HeLa-Zelllinien konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Diese wiesen eine ISG-Signatur mit ca. achtfach erhöhter *ISG15*- und vierfach erhöhter *IFI44*-Expression auf.



**Abbildung 27: Relative Expression der Typ I-Interferone  $IFN-\alpha_{1,13}$  und  $IFN-\beta$ .** Die Quantifizierung erfolgte über die  $\Delta\Delta C_T$  Methode mit Normierung auf  $GAPDH$ . Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM, die Signifikanzen wurden mittels ungepaartem t-Test errechnet (n=3). **A und C:** Analyse der 293T-Parentalzelllinie (x=1) und aller vier RNASEH2A-defizienter Klone (Daten der KOs zusammengefasst). **B und D:** Analyse der HeLa-Parentalzelllinie (x=1) und beider RNASEH2A-defizienter Klone (Daten der KOs zusammengefasst).



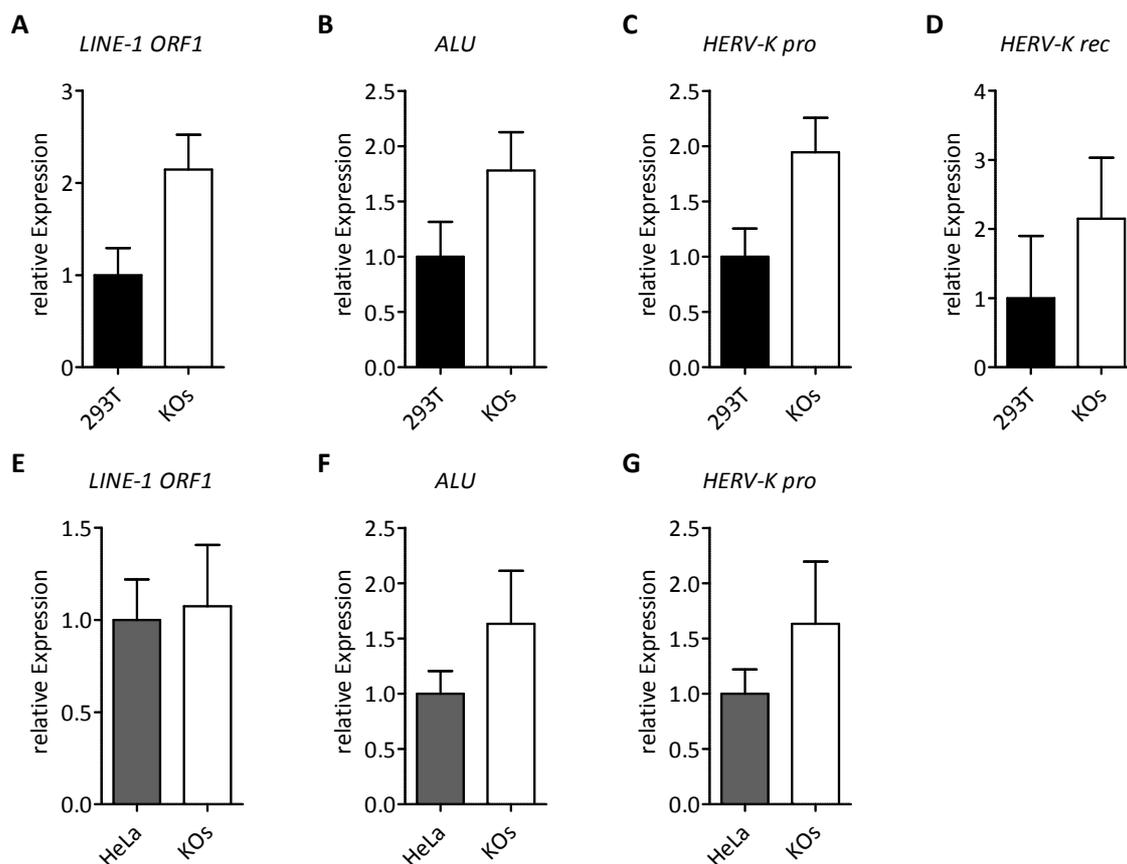
**Abbildung 28: Relative Expression der IFN-stimulierten Gene  $ISG15$ ,  $IFI27$  sowie  $IFI44$ .** Die Quantifizierung erfolgte über die  $\Delta\Delta C_T$  Methode mit Normierung auf  $GAPDH$ . Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM, die Signifikanzen wurden mittels ungepaartem t-Test errechnet (n=3). **A-C:** Analyse der 293T-Parentalzelllinie (x=1) und aller vier RNASEH2A-defizienter Klone (Daten der KOs zusammengefasst). **D-F:** Analyse der HeLa-Parentalzelllinie (x=1) und beider RNASEH2A-defizienter Klone (Daten der KOs zusammengefasst).

### 3.2.2 Charakterisierung von Retroelementexpression und -aktivität

Non-LTR-Retrotransposonen bilden während des Prozesses der reversen Transkription und Integration ein RNA:DNA-Intermediat im Nukleus der Wirtszelle. Damit liefern sie eine denkbare Substratklasse für die RNase H2, die auf Grund dessen als möglicher Faktor für die Regulation von endogenen Retroelementen postuliert wurde. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die humanen RNASEH2A-defizienten Zellen mit Hilfe von reporterbasierten Aktivitätsstudien hinsichtlich einer veränderten LINE-1- bzw. Alu-Aktivität untersucht. Darüber hinaus wurden deren Expressionsmuster analysiert.

#### 3.2.2.1 Die Expression von Retroelementen ist nicht signifikant verändert in *knockout*-Zelllinien

Um einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung endogener Retroelemente durch die RNase H2 auszuschließen, wurde die Expression verschiedener LTR- sowie non-LTR-Retrotransposon-Gene analysiert. Dafür wurde die cDNA RNASEH2A-defizienter Zellen sowie ihrer Parentalzellen mittels qRT-PCR analysiert (siehe Kapitel 2.2.1.16, Seite 45). Für die Auswertung wurden die Daten aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt. Untersucht wurden das Gen *ORF1* des LINE-1-Elements, die Expression von Alu-Elementen und zwei der intakten Gene des humanen endogenen Retrovirus K (HERV-K), *pro* und *rec*. Obwohl alle untersuchten Gene eine leicht erhöhte Transkriptmenge zeigten, ließen sich keinerlei signifikante Unterschiede feststellen (siehe Abbildung 29, Seite 91).

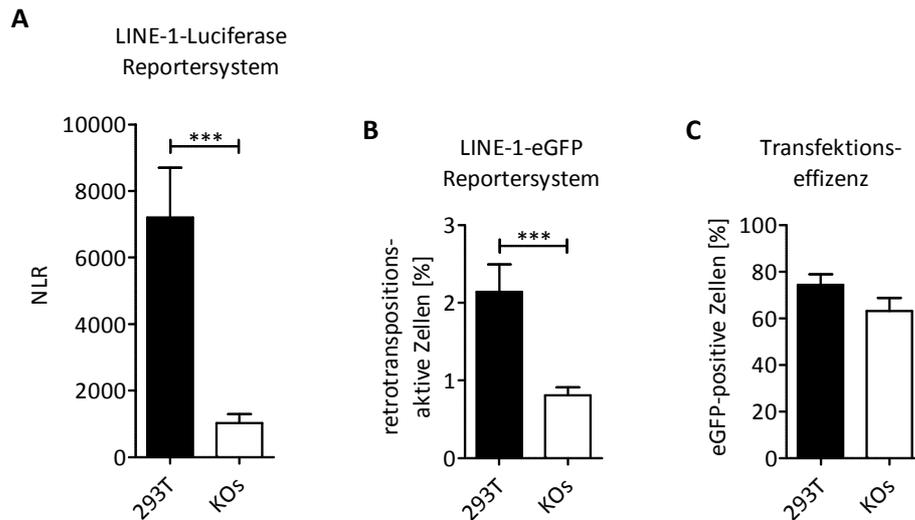


**Abbildung 29: Relative Expression der endogenen Retroelemente *LINE-1 ORF1*, *ALU*, *HERV-K pro* und *rec*.**

Die Quantifizierung erfolgte über die  $\Delta\Delta C_T$  Methode mit Normierung auf *GAPDH*. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM, die Signifikanzen wurden mittels ungepaartem t-Test errechnet (n=3). **A-D:** Analyse der 293T-Parentalzelllinie (x=1) und aller vier RNASEH2A-defizienter Klone (Daten der KOs zusammengefasst). **E-G:** Analyse der HeLa-Parentalzelllinie (x=1) und beider RNASEH2A-defizienter Klone (Daten der KOs zusammengefasst).

### 3.2.2.2 RNASEH2A-defiziente 293T-Zellen zeigen eine verminderte LINE-1-Retrotranspositionsaktivität

Bedingt durch die Vielzahl inaktiver endogener Retroelemente gestaltet sich die Detektion der vergleichsweise wenigen *de novo*-Integrationen aktiver REs sehr schwierig. Daher werden meist reportersystembasierte Nachweismethoden verwendet, um Neuinsertionen zu studieren. In dieser Arbeit kamen für die Analyse der LINE-1-Retrotranspositionsaktivität zwei verschiedene Systeme zum Einsatz, deren Funktions- und Anwendungsweise in Kapitel 2.2.3.9 und 2.2.3.10 (siehe Seite 57 bis 60) beschrieben steht. Eines der Systeme nutzt das Reporterprotein Luciferase und bietet den Vorteil, dass simultan zum Nachweis der Retrotransposition die Transfektionseffizienz ermittelt werden kann.



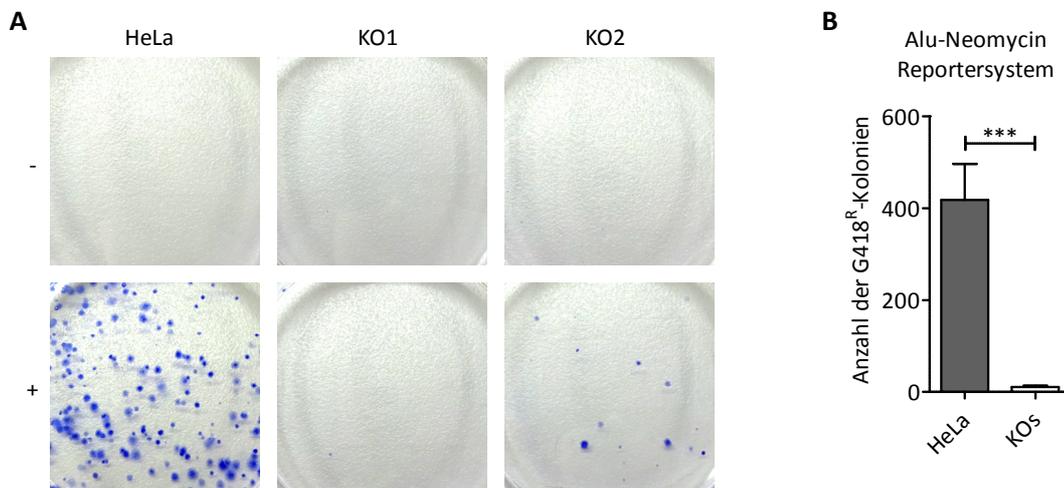
**Abbildung 30: Analyse der LINE-1-Retrotranspositionsaktivität mit Hilfe zweier Reportersysteme.** Darstellung der LINE-1-Aktivität (**A-B**) bzw. der Transfektionseffizienz (**C**) von 293T-Parentalzellen und zwei RNASEH2A-defizienten 293T-Klonen (Daten der KOs zusammengefasst) als Mittelwerte  $\pm$  SEM, Signifikanzen wurden mittels ungepaartem t-Test errechnet. **A:** LINE-1-Aktivität gemessen im luciferasebasierten Reportersystem (n=6). **B:** LINE-1-Aktivität gemessen im eGFP-basierten Reportersystem (n=4). **C:** Transfektionseffizienz gemessen im eGFP-basierten Reportersystem (n=4).

Die für die Untersuchungen eingesetzten 293T-*knockout*-Zellen erwiesen sich als deutlich weniger retrotranspositionsaktiv als die Parentalzellen (siehe Abbildung 30A). Das zweite eingesetzte Reportersystem nutzt das Fluoreszenzprotein eGFP zum Nachweis von *de novo*-Integrationen. Im Gegensatz zum Luciferase-System muss hier die Transfektionseffizienz separat ermittelt werden. Auch mit dieser Detektionsmethode zeigte sich, dass RNASEH2A-defiziente 293T-Zellen eine stark verminderte LINE-1-Aktivität aufweisen (siehe Abbildung 30B) und dass diese nicht auf eine signifikante Abnahme der Transfektionseffizienz zurückzuführen ist (siehe Abbildung 30C).

### 3.2.2.3 RNASEH2A-defiziente HeLa-Zellen weisen eine verminderte Alu-Retrotranspositionsaktivität auf

Für die Ermessung der Alu-Retrotranspositionsaktivität wurde ein neomycinresistenzgenbasiertes Reportersystem genutzt, bei dem die Anzahl der Alu-Neuintegrationen über den Nachweis von G418-resistenten Kolonien ermittelt wurde (siehe Kapitel 2.2.3.11, Seite 61). Die Mobilisierung der nicht-autonomen Alu-Elemente wurde dabei von dem LINE-1-Protein ORF2p ermöglicht, dessen Expression durch das Einbringen eines zusätzlich zum verwendeten retrotranspositionsaktiven oder -inaktiven Plasmids erlaubt wurde. Die

RNASEH2A-defizienten HeLa-Klone wiesen verglichen mit ihren Parentalzellen eine drastisch verminderte Anzahl an G418-resistenten Kolonien auf (siehe Abbildung 31).



**Abbildung 31: Analyse der Alu-Retrotranspositionsaktivität mit Hilfe des neomycinresistenzgen-basierten Reportersystems. A:** Exemplarische Darstellung der mit Trypanblau gefärbten G418-resistenten Kolonien von HeLa-Parentalzellen und den RNASEH2A-defizienten HeLa-Klonen. Transfiziert wurde ein retrotranspositionsinaktiver (-) oder ein retrotranspositionsaktiver Ansatz (+). Beide enthielten ein für das ORF2p codierendes Plasmid, doch nur der retrotranspositionsaktive Ansatz schloss außerdem den für die Alu-Reportergen-Kassette codierenden Vektor mit ein, wohingegen der inaktive Ansatz stattdessen ein Kontrollplasmid enthielt. **B:** Quantifizierung der Alu-Aktivität. Ausgezählt wurden alle Kolonien >1 mm. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, Signifikanzen wurden mittels ungepaartem t-Test errechnet (Daten der KOs zusammengefasst, n=3).

## 4 Diskussion

Das Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS) stellt eine selten auftretende Autoimmun-Erkrankung dar, die durch die Fehlinterpretation endogener Nukleinsäurederivate als Fremdmoleküle induziert wird und daher phänotypische Überlappungen zu intra-uterin erworbenen Virusinfektionen aufweist (Crow *et al.*, 2006b; Lee-Kirsch *et al.*, 2014). Mehr als die Hälfte der AGS-auslösenden Mutationen betreffen eine der drei für die RNase H2 codierenden Untereinheiten und führen zu mitunter drastischen Verminderungen der Enzymaktivität (Crow *et al.*, 2015). Immer mehr Hinweise deuten auf eine Involvierung von endogenen Retroelementen an der AGS-Entstehung hin, wobei eine solche für die RNase H2 bis heute jedoch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund wurden in dieser Dissertation RNASEH2A-defiziente humane Zellen generiert und eingehend bezüglich allgemeiner und die RE-Biologie betreffender Charakteristika analysiert.

### 4.1 Das CRISPR-Cas9-System ist geeignet für die Generierung RNASEH2A-defizienter Zelllinien

Die für die Genom-Editierung verwendete CRISPR-Cas9-Technologie bietet den Vorteil, dass durch sie binnen relativ kurzer Zeit monoklonale *knockout*-Linien generiert werden können. Auf Grund des geringen Klonierungsaufwands ist es ein leichtes, simultan multiple, für die Editierung einsetzbare Plasmide herzustellen und auf ihre Effizienz zu testen. In der vorliegenden Dissertation wurden so insgesamt drei Cas9-guideRNA-Vektoren konfiguriert. Von diesen stellte sich Cas9-guideRNA#4 als das Plasmid mit der höchsten Genom-Editierungseffizienz dar, was unter Zuhilfenahme der eigens generierten Indikator-Zelllinie gezeigt wurde (siehe Abbildung 15F, Seite 71).

Für die CRISPR-Cas9-vermittelte Genom-Editierung der RNase H2 standen auf Grund ihrer trimeren Struktur drei in Frage kommende Zielgene zur Verfügung, die für die Untereinheiten A, B und C codieren: *RNASEH2A*, *RNASEH2B* und *RNASEH2C* (Crow *et al.*, 2006b). Da für die enzymatische Funktionalität des Proteinkomplexes die stabile Interaktion aller drei Untereinheiten miteinander erforderlich ist (Chon *et al.*, 2009), wäre grundsätzlich jede der Untereinheiten ein geeigneter Kandidat für die Genom-Editierung gewesen, sofern die entstandene Mutation eine Destabilisierung oder Inaktivierung des Komplexes

hätte gewährleisten können. Doch obgleich 53 % aller AGS-relevanten Mutationen eine der drei RNase H2-Untereinheiten betrifft, sind Studien von Crow *et al.* (2015) zufolge nur ein Zehntel dieser Variationen auf die RNASEH2A zurückzuführen. Neben TREX1- oder RNASEH2C-Mutationen führen Variationen in der A-Untereinheit den schwerwiegendsten Krankheitsverlauf herbei (Crow *et al.*, 2015), was dafür spricht, dass sich Mutationen in der RNASEH2A am kritischsten auf die Funktionalität oder Stabilität des Enzymkomplexes auswirken.

Tatsächlich beinhaltet die A-Untereinheit nicht nur das katalytische Zentrum des Enzyms (Chapados *et al.*, 2001), sondern bildet zudem mit ihrem carboxyterminalen Proteinanteil eine Interaktionsschnittstelle mit den beiden auxiliären Untereinheiten B und C. Folglich wird selbst bei einer Deletion, die lediglich den C-Terminus betrifft, die Bildung des Heterotrimers komplett inhibiert (Figiel *et al.*, 2011; Reijns *et al.*, 2011). Auf Grund dieser Überlegungen wurde für die vorliegende Arbeit das *RNASEH2A*-Gen als Ziel für die Genom-Editierung ausgewählt (Ensemble Identifikationsnummer: ENST00000221486.4, siehe Abbildung 11, Seite 65). Eine weitere wesentliche Motivation für diese Auswahl stellte die kommerzielle Verfügbarkeit eines spezifisch gegen die A-Untereinheit gerichteten Antikörpers dar, wodurch die immunoblotbasierte Identifikation der *knockout*-Zelllinien ermöglicht wurde (siehe Abbildung 16, Seite 73).

Die Identifizierung putativer *knockout*-Klone via Immunoblot stellt eine recht aufwändige Strategie dar, weil jeder zu untersuchende Einzelzellklon zunächst expandiert, dann dessen Zellmaterial lysiert und letztlich via SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt werden musste, bevor die immunologische Bestätigung des Proteinverlustes erfolgen konnte. Alternative Identifizierungsstrategien wären die Nutzung einer Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenz am Ort des Doppelstrangbruchs, welche durch die Einführung einer *InDel*-Mutation zerstört würde, die PCR-basierte Amplifikation des Zielbereichs und nachfolgende Sanger-Sequenzierung oder die Durchführung eines enzymatischen Mutationsnachweis wie beispielsweise des ‚*Surveyor nuclease assay*‘ gewesen (Reljic und Stroud, 2016). Bei letzterem werden spezifisch Nichtübereinstimmungen in einem DNA-Duplex durch die *Surveyor*-Nuklease erkannt und an deren 3'-Enden ein Doppelstrangbruch induziert. Die zügigste Identifizierungstechnik wäre die durchflusszytometrische Analyse der mit dem Genom-Editierungsplasmid transfizierten Zellen und anschließende Einzelzellaufgabe gewesen, diese ist jedoch nur bei Membranproteinen anwendbar.

---

Entscheidend für die Generierung RNASEH2A-defizienter Klone waren neben der spezifischen Aktivität der Cas9-Nuklease zur Erzeugung eines DNA-Doppelstrangbruchs dessen Reparatur über den zelleigenen Reparaturmechanismus *non-homologous end joining* (NHEJ). Bei diesem werden die beiden erzeugten DNA-Doppelstrangbrüchenden durch Aneinanderlagerung, Prozessierung und Ligation wieder vereinigt, ohne dass Homologien zwischen den beiden Enden vorhanden wären und den Prozess steuerten (Chiruvella *et al.*, 2013). NHEJ gilt daher als fehleranfälliger Mechanismus, der in der Entstehung von *InDel*-Mutationen am Ort des Doppelstrangbruchs resultieren kann (Betermier *et al.*, 2014). Dies beruht auf der Erzeugung kurzer einzelsträngiger Bereiche, die entweder durch die Verlängerung oder die Verkürzung eines der beiden von dem Doppelstrangbruch betroffenen Strangs produziert werden (Yu und McVey, 2010), und welche die Aneinanderlagerung der Enden erleichtern. In der Genom-Editierungspraxis macht man sich die so erschaffenen *InDel*-Mutationen zunutze, da sie mitunter zum Verlust des von dem betroffenen Gen codierten Proteinprodukts führen.

Im Falle der vorliegenden Genom-Editierung wurde die RNASEH2A-Defizienz der generierten Klone eindeutig unter Verwendung dreier Methoden belegt. Die mittels *next generation sequencing* identifizierten *InDel*-Mutationen (siehe Abbildung 18, Seite 78) bewirkten das vollständige und dauerhafte Ausbleiben der RNASEH2A-Proteinsynthese in allen verwendeten monoklonalen *knockout*-Linien (siehe Abbildung 17A, Seite 76). Der Verlust einer der drei Untereinheiten führte zu der uneingeschränkten Inaktivierung des Enzymkomplexes, was beispielhaft an 293T-*knockout*-Klonen gezeigt wurde (siehe Abbildung 17B und C). Dies hatte nicht nur den Wegfall der Typ II-RNase H-spezifischen Aktivität zur Folge, also der Fähigkeit zur Hydrolyse einzelner in ein DNA-Substrat eingebetteter Ribonukleotide (Eder und Walder, 1991), sondern verursachte darüber hinaus die generelle Einbuße der RNA:DNA-hybridabhängigen Hydrolyse. Damit konnten Literaturangaben bestätigt werden, dass die RNase H2 die überwiegende Mehrheit der RNase H-Aktivität im Menschen ausmacht und die RNase H1 eine untergeordnete Rolle spielt (Frank *et al.*, 1998).

## 4.2 Die humane RNase H2 ist als essentielles Enzym an der Beseitigung von DNA-Schäden beteiligt

Für das murine System kann belegt werden, dass die RNase H2 ein essentielles Enzym für die Erhaltung der Genom-Integrität ist, das an der Entfernung von fälschlicherweise in die genomische DNA inkorporierten Ribonukleotiden beteiligt ist (Hiller *et al.*, 2012; Reijns *et al.*, 2012). Der Umstand, dass alle bis zum heutigen Tag identifizierten humanen, AGS-auslösenden Variationen ‚*missense*‘-Mutationen sind, lässt vermuten, dass die RNase H2 auch für den Menschen ein essentielles Protein darstellt (Chon *et al.*, 2009). *Missense*-Substitutionen führen im Gegensatz zu Null-Mutationen nicht zur Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Codons und damit zu einer verkürzten Peptidsequenz oder gar deren vollständiger Abwesenheit, sondern sind definiert als Variationen, die lediglich die Substitution einer Aminosäure für eine andere bewirken (Rice *et al.*, 2007). Alle bislang untersuchten AGS-Patienten mit Mutationen in einem der drei RNase H2-Gene weisen eine enzymatische Restaktivität auf.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Genom-Editierungsexperimente mit einer Reihe von unterschiedlichen humanen Zelltypen belegen ebenfalls die Bedeutsamkeit des Enzyms für das menschliche System. So gelang es nicht, lebensfähige RNASEH2A-defiziente HEK293- oder HAP1-Zellen zu generieren (Daten nicht gezeigt). Erst bei der Verwendung von Zelllinien mit einem P53-inaktiven Hintergrund glückte die Etablierung der RNASEH2A-*knockout*-Linien. Dies steht im Einklang mit Studien muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs), deren Proliferationsfähigkeit nur bei simultaner RNase H2- und P53-Defizienz erhalten werden kann (Rabe, 2013; Reijns *et al.*, 2012). Daher wurden die embryonale Nierenzelllinie HEK293T sowie die Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa HA für die Generierung der humanen RNASEH2A-defizienten Klone ausgewählt. Bei beiden sind P53-abhängige Signalwege inhibiert, weshalb sie trotz der durch den RNase H2-Verlust verursachten Schäden proliferieren können.

293T-Zellen zeichnen sich durch die Überexpression des Onkoproteins ‚*SV40 large T-antigen*‘ (SV40LT) aus, welches via Interaktion mit P53 dessen Rekrutierung an seine Promotoren verhindert und damit die Transkription von P53-Zielgenen inhibiert (Ahuja *et al.*, 2005; Bargonetti *et al.*, 1992; Lilyestrom *et al.*, 2006). HeLa HA-Zellen hingegen exprimieren das vom humanen Papillomvirus 18 (HPV18) stammende Onkoprotein E6

(Schwarz *et al.*, 1985), das mit Hilfe von Protein-Protein-Interaktion *in vitro*-Studien zufolge für die rasche Degradation von P53 über einen ubiquitinabhängigen Proteolyse-Prozess sorgt (Scheffner *et al.*, 1990; Werness *et al.*, 1990).

Der P53-Hintergrund der Zelllinien ist von entscheidender Bedeutung, da das Protein als Tumorsuppressor agiert und bei der Feststellung von DNA-Schäden sowohl regulatorisch als auch durch direkte Partizipation an verschiedenen DNA-Reparaturwegen beteiligt ist (Williams und Schumacher, 2016). Aus diesem Grund wird es auch als ‚Wächter des Genoms‘ bezeichnet (Lane, 1992). Bei Aktivierung initiiert P53 die Expression von Genen, die entweder die Arretierung des Zellzyklus und parallele Reparatur genomischer DNA-Schäden, den permanenten Zellzyklusarrest (‚Seneszenz‘) oder die Einleitung des Zelltods (‚Apoptose‘) steuern (Elias *et al.*, 2014). Ein möglicher Auslöser der P53-abhängigen DNA-Schadenantwort ist die intragenomische Akkumulation von Ribonukleotiden, die bei RNase H2-Defizienz ersichtlich wird und in RNASEH2B-defizienten Mausembryonen zu einem Proliferationsstopp und vorzeitiger Letalität führt (Reijns *et al.*, 2012).

Auch bei den in dieser Dissertation generierten humanen RNASEH2A-defizienten Zellen konnte ein Proliferationsdefizit im Vergleich zu den Parentalzellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19, Seite 79). Dies ging mit der Akkumulation von Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus einher (siehe Abbildung 20C und G, Seite 80), was auf eine Aktivierung des G2/M-Zellzyklus-Kontrollpunkts (‚G2/M checkpoint‘) schließen lässt. Der an die DNA-Verdopplung anknüpfende Zellzyklusarrest erlaubt die Reparatur entstandener DNA-Schäden, bevor die Zelle in die Mitose eintritt (DiPaola, 2002). Ausgelöst wird er in RNase H2-defizienten Mauszellen vermutlich über die P53-induzierte Expression des *CDKN1A* (‚cyclin dependent kinase inhibitor 1A‘) Gens (Hiller *et al.*, 2012), das für den Zellzyklusinhibitor P21 codiert, welcher nicht nur die G1/S-Transition blockieren, sondern auch den Zellzyklusarrest in der G2-Phase herbeiführen kann (Bunz *et al.*, 1998).

Diese Abhängigkeit der G2/M-Zellzyklus-Kontrollpunkt-Aktivierung von P53 steht im scheinbaren Widerspruch zur zuvor beschriebenen P53-Inaktivität der verwendeten 293T- und HeLa-Zellen. Tatsächlich konnten jedoch Arbeiten von Wang *et al.* (2015) zeigen, dass in *SV40LT*-exprimierenden humanen Epithelzellen nur bestimmte P53-Signalwege inhibiert werden und die P53-P21-Signalweg-Aktivierung für den von ihnen beobachteten mykotoxininduzierten G2-Arrest verantwortlich ist. Diese Erkenntnis deckt sich mit der Hypothese, dass *SV40LT* zwar einige P53-Funktionen blockiert, andere Aktivitäten hin-

---

gegen nicht beeinträchtigt werden (Ahuja *et al.*, 2005). Daneben wurde für HeLa-Zellen beschrieben, dass es unter DNA-Schäden provozierenden Bedingungen zu einer Aktivierung von P53 und nachgeschalteten Signalwegen kommen kann (Butz *et al.*, 1995). Somit lässt sich mutmaßen, dass im Falle der erzeugten RNASEH2A-defizienten Zelllinien wohl die temporäre Arretierung des Zellzyklus zur Reparatur genomischer DNA-Schäden vorstattenging, die P53-abhängigen Seneszenz- und Apoptosewege jedoch nicht aktiviert wurden. Diese Schlussfolgerung beruhte darauf, dass keinerlei Anzeichen für ein vermehrtes Auftreten von apoptotischen Zellen zu entdecken waren (siehe Abbildung 20D und H, Seite 80) und die Zellen darüber hinaus keine morphologischen Veränderungen aufwiesen, welche auf Seneszenz hindeuten würden.

Apoptose und Seneszenz stellen zwei der möglichen Zellantworten auf DNA-Schäden dar und gelten damit als wichtige Mechanismen für die Tumorsuppression. Diese erlauben multizellulären Organismen mit Stressbedingungen umzugehen und ihre Integrität zu bewahren, gleichzeitig fördern sie allerdings Alterungsprozesse und können damit eine schädliche Wirkung haben (Cerella *et al.*, 2016). Unter zellulärer Seneszenz wird ein permanenter Zellzyklusarrest verstanden, der mit verschiedenen Prozessen einhergeht, die in dem Verlust der Replikationsfähigkeit sowie Veränderungen des Zellmetabolismus, der epigenetischen Regulation und der Genexpression resultieren (Tan *et al.*, 2014). Senescente Zellen verändern außerdem ihre Morphologie und erscheinen größer und flacher als nicht-senescente Zellen, weisen weniger Zell-Zell-Kontakte und eine Vergrößerung des lysosomalen Kompartiments auf (Ben-Porath und Weinberg, 2005). Diese besonderen Merkmale lassen es zu, dass man senescente Zellen mikroskopisch leicht von normal proliferierenden Zellen diskriminieren kann.

Apoptose hingegen fasst man als streng reguliertes Zelltodprogramm auf, welches aktiv von der betroffenen Zelle eingeleitet und gesteuert wird. Es geht mit dem Schrumpfen der Zelle, Bläschenbildung an der Plasmamembran, der Kondensation und Fragmentierung der chromosomalen DNA sowie letztlich der Verpackung der gesamten Zelle in membranumhüllte Apoptosekörperchen (*apoptotic bodies*) einher, welche in geordneter Weise von Nachbar- oder Immunzellen entfernt werden (Ashkenazi und Salvesen, 2014). Auf Grund des Chromatinabbaus durch Endonukleasen und der damit verbundenen Reduktion des DNA-Gehalts lassen sich apoptotische Zellen über die Quantifizierung der sub-G0/G1-Population in einer EdU-basierten Zellproliferationsmessung identifizieren.

#### 4.2.1 RNASEH2A-defiziente Zellen weisen vermehrte DNA-Schäden auf

Zusammenfassend konnte also bereits durch die Analyse des Proliferationsverhaltens der generierten *knockout*-Zellen ein erster Rückschluss auf putative Beeinträchtigungen deren genomischer Integrität gezogen werden. Weitere Hinweise lieferten die immunocytochemischen Doppelfärbungen von RNASEH2A-defizienten 293T-Klonen auf 53BP1 und genomische DNA, anhand welcher eine signifikant erhöhte Anzahl an 53BP1-positiven Foci je Zelle nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 21B, Seite 81).

53BP1 zählt zu den Proteinen, die als Antwort auf die Detektion von DNA-Schäden zu chromosomalen Doppelstrangbrüchen rekrutiert werden und sich dort zu dynamischen Foci zusammensetzen, die vermutlich den NHEJ-vermittelten DNA-Reparaturmechanismus erleichtern (Hsiao und Mizzen, 2013). Da in Abwesenheit von DNA-Schäden die Assemblierung von 53BP1 verhindert wird (Malette *et al.*, 2012), wurde ein Zuwachs 53BP1-positiver Foci in RNASEH2A-*knockout*-Klonen indirekt als eine gesteigerte Häufigkeit von DNA-Schäden interpretiert.

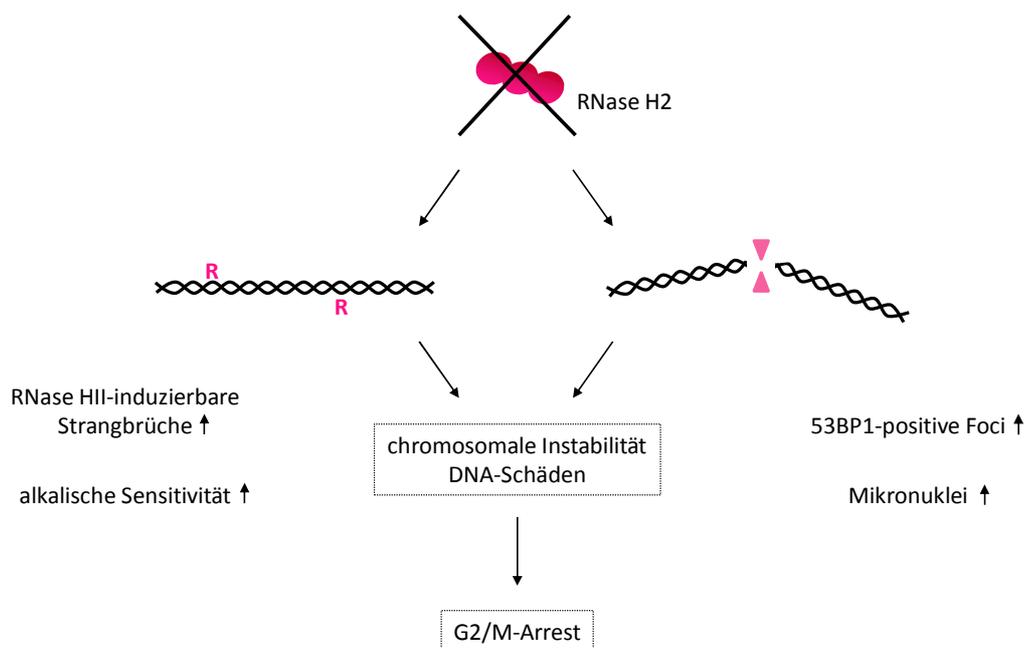
Untermuert wurde diese Hypothese durch die Feststellung cytoplasmatischer DNA-haltiger Strukturen in RNASEH2A-defizienten 293T-Zellen (siehe Abbildung 23B, Seite 84). Auf Grund ihrer Größe wurden diese Strukturen als Mikronuklei identifiziert, deren Einfluss auf die Zellhomöostase durchaus kontrovers diskutiert wird. Einig ist man sich aber über ihre Nutzbarkeit als Indikator für chromosomale Instabilität (Terradas *et al.*, 2010). Mikronuklei entstehen durch Absonderungen ganzer Chromosomen oder Chromosomenfragmente am Ende der Mitose (Utani *et al.*, 2010). In Abhängigkeit von ihrem Inhalt enthalten sie teilweise geschädigte DNA mit nicht reparierten Doppelstrangbrüchen, wobei derzeit noch unklar ist, ob diese Schäden innerhalb der Mikronuklei repariert werden können oder ob diese DNA aus der Zelle eliminiert wird und damit deren genetische Information verloren geht (Terradas *et al.*, 2009).

Bei der Quantifizierung ergab sich ein signifikanter Anstieg von Mikronuklei in den *knockout*-Zellen im Vergleich zu ihrer Parentalzelllinie, der durch die konstitutive Expression des *RNASEH1*-Gens und die damit wiederhergestellte Fähigkeit zur enzymatischen Prozessierung von RNA:DNA-Hybriden nur zu einem gewissen Anteil gesenkt werden konnte (siehe Abbildung 22B und C, Seite 83, und Abbildung 23B). Die Wiederherstellung des Wildtypzustands war erst durch das Einbringen des *RNASEH2A*-Gens möglich, was dafür spricht,

dass für die Mikronuklei-Entstehung beide Aktivitäten der RNase H2 relevant sind. Vermutlich führt die RNase H2-Defizienz in den untersuchten humanen Zellen zu einer vermehrten Einlagerung von Ribonukleotiden in deren chromosomale DNA, was wiederum mit genomischer Instabilität und Mikronukleiformation einhergeht.

Für die verstärkte Ribonukleotidinkorporation in RNase H2-defizienten Zellen gab es verschiedene Hinweise, deren Nachweis jedoch nicht als statistisch signifikant angesehen werden kann. Dennoch ließ sich festhalten, dass die 293T-*knockout*-Zellen im *nick-translation assay* eine leicht erhöhte Fluoreszenzrate verglichen mit den Parentalzellen aufwiesen, was für einen höheren Ribonukleotidgehalt in deren chromosomaler DNA spricht (siehe Abbildung 24, Seite 85). Bei dieser Nachweismethode werden in die genomische DNA inkorporierte Ribonukleotide mit Hilfe einer bakteriellen RNase HII hydrolysiert und die so entstehenden Lücken durch die Aktivität der DNA-Polymerase I mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden aufgefüllt. Da natürlich vorkommende, nicht durch die RNase HII-induzierte Strangbrüche bei der Berechnung der Fluoreszenzstärke als Hintergrund berücksichtigt wurden, kann die Nettofluoreszenzstärke somit als Maß für das Vorhandensein von RNase HII-abhängigen Einzelstrangbrüchen gesehen werden (Hiller *et al.*, 2012).

Bestätigt wurde die leicht vermehrte Inkorporation von Ribonukleotiden in die genomische DNA von RNase H2-*knockout*-Zellen durch die gelelektrophoretische Auftrennung von alkalisensitiven Nukleinsäuren. Infolge der Behandlung mit Kaliumhydroxyd wird das DNA-Grundgerüst unter definierten Bedingungen an den Positionen hydrolysiert, an denen ein Ribonukleotid statt eines Desoxyribonukleotids in den DNA-Strang eingebaut wurde (Nick McElhinny *et al.*, 2010a; Nick McElhinny *et al.*, 2010b). Eine gesteigerte Alkalisensitivität der *knockout*-DNA ließ sich anhand der Abnahme von langen Fragmenten und der Zunahme von kürzeren Hydrolyseprodukten festmachen (siehe Abbildung 25, Seite 86). Dass die DNA der RNASEH2A-defizienten Klone demzufolge anfälliger für die alkalische Hydrolyse ist, weist indirekt auf einen erhöhten Ribonukleotidgehalt hin. Abbildung 32, Seite 102, fasst alle untersuchten Folgen des RNASEH2A-*knockouts* für die genomische Integrität der verwendeten humanen Zellen zusammen.



**Abbildung 32: Folgen der RNase H2-Defizienz für humane Zellen.** Bei einem Verlust der RNase H2 (pink) kommt es zur Inkorporation von einzelnen Ribonukleotiden (R) in die genomische DNA und damit auch zu einem vermehrten Auftreten von Doppelstrangbrüchen (rosa Dreiecke). Dies führt zu chromosomaler Instabilität, die akkumulierenden DNA-Schäden verursachen einen Arrest der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus.

#### 4.2.2 Gibt es alternative Reparaturprozesse in RNase H2-defizienten Zellen?

Die Untersuchung RNase H2-defizienter Maus- und Hefezellen liefert sehr klare Ergebnisse hinsichtlich der vermehrten Ribonukleotidinkorporation und zeigt einen Zusammenhang zur Beeinträchtigung der genomischen Integrität in den defizienten Zellen auf (Hiller *et al.*, 2012; Nick McElhinny *et al.*, 2010a; Reijns *et al.*, 2012). In den in dieser Dissertation generierten 293T- und HeLa-*knockout*-Zellen fielen die Ergebnisse weniger deutlich aus, was für die Aktivität eines Reparaturmechanismus zur Beseitigung der durch den irrtümlichen Einbau von Ribonukleotiden entstandenen Schäden sprechen könnte.

Neben dem RNase H2-abhängigen, als *ribonucleotide excision repair* (RER) bezeichneten Prozess konnte in der Hefe ein alternativer Mechanismus identifiziert werden, der sich auf die Tätigkeit der Topoisomerase 1 (TOP1) stützt (Kim *et al.*, 2011). TOP1 ist ein essentielles Enzym, das an der Auflösung von Torsionsspannungen beteiligt ist, die im Zuge der DNA-Replikation, Transkription und Chromatinkondensation entstehen (Leppard und Champoux, 2005). Darüber hinaus besitzt das Protein jedoch auch Endoribonukleaseaktivität und ist somit in der Lage, misinkorporierte Ribonukleotide innerhalb der geno-

---

mischen DNA zu prozessieren (Sekiguchi und Shuman, 1997). Diese Aktivität kann von 2-bis-5-bp-Deletionen in kurzen, repetitiven Sequenzen begleitet werden, welche durch die zweimalige Hydrolyse des ribonukleotidhaltigen DNA-Abschnitts in einem Abstand von wenigen Nukleotiden entstehen und in dem Verlust dieses hydrolysierten Oligonukleotids resultieren (Cerritelli und Crouch, 2016).

In der Hefe hat eine Deletion der A-Untereinheit der RNase H2 zur Folge, dass 40 % der daraus hervorgehenden *de novo*-Mutationen auf TOP1-induzierte 2-bis-5-bp-Deletionen zurückzuführen sind (Kim *et al.*, 2011). Auch bei dem mittels Exom-Sequenzierung untersuchten RNASEH2A-defizienten HeLa-Klon konnten insgesamt 1141 neuentstandene Variationen entdeckt werden, von denen 973 auf *InDel*-Mutationen zurückzuführen waren und 168 auf SNPs beruhten (siehe Abbildung 26A, Seite 87). 71 % dieser *InDel*-Mutationen umfassten jedoch nur ein Basenpaar und nicht die TOP1-typischen 2-bis-5-bp-Deletionen (siehe Abbildung 26D), was dafür spricht, dass der TOP1-abhängige Reparaturmechanismus zwar auch im humanen System vorhanden ist, dort jedoch mit Hilfe einer möglicherweise andersgearteten Prozessierungsstrategie auch kürzere Deletionen hervorrufen kann oder aber nicht den Hauptteil der RNase H2-unabhängigen Ribonukleotidprozessierung ausmacht. Neuere Untersuchungen ergaben außerdem, dass der TOP1-abhängige Ribonukleotidprozessierungsmechanismus fast ausschließlich im kontinuierlichen Strang (*leading-strand*) aktiv ist, wohingegen bei dem normalerweise stattfindenden RER-Mechanismus sowohl Ribonukleotide aus dem kontinuierlichen als auch dem diskontinuierlichen Strang entfernt werden (Williams *et al.*, 2015). Auch dieses Erkenntnis lässt vermuten, dass es weitere, bisher nicht-identifizierte Reparaturmechanismen geben könnte, da lediglich eine leicht vermehrte Inkorporation von Ribonukleotiden in die genomische DNA von RNase H2-*knockout*-Zellen festgestellt werden konnte (siehe Abbildung 24, Seite 85, und Abbildung 25, Seite 86). Bei einer Reparatur von misinkorporierten Ribonukleotiden, die ausschließlich eine Stranghälfte des DNA-Doppelstrangs betrafen, wären sonst wohl stärkere Auswirkungen zu erwarten.

Dass es bei der Ribonukleotidprozessierung durch TOP1 jedoch nur zur Entstehung von kurzen Deletionen und nicht von Insertionen kommt (Huang *et al.*, 2015), in dem RNASEH2A-defizienten HeLa-Klon jedoch beide Mutationsformen identifiziert wurden, könnte auch dafür sprechen, dass die Ribonukleotidinkorporationen in Zellen ohne funktionale RNase H2 überwiegend oder zumindest zu einem substantiellen Anteil nicht durch TOP1

---

prozessiert werden, folglich zu Doppelstrangbrüchen führen und diese dann via NHEJ-vermittelter (und *InDel*-Mutationen erzeugender) Reparatur beseitigt werden.

Den mit Abstand größten Anteil der via Exom-Sequenzierung identifizierten Variationen in dem untersuchten HeLa\_KO1-Klon machten Mutationen in Intronsequenzen oder intergenischen Regionen aus (siehe Abbildung 26B). Dies erscheint zunächst seltsam, da im Zuge einer Exom-Sequenzierung eigentlich nur die codierenden Regionen gezielt angereichert und sequenziert werden sollen, die ca. 1 bis 1,5 % des gesamten humanen Genoms ausmachen (Samuels *et al.*, 2013). Dennoch stammen oftmals viele (50-60 %) der sequenzierten Fragmente auch von außerhalb der Zielregionen, was neben Intronsequenzen Promotoren, konservierte nicht-codierende Sequenzen, untranslatierte Bereiche und andere funktionelle Regionen mit einschließt (Guo *et al.*, 2012). Dass unter all den vorhandenen Sequenzdaten jedoch eben diese nicht-codierenden Fragmente besonders von Mutationen betroffen waren, lässt vermuten, dass die durch RNase H2-Defizienz entstandenen *de novo*-Variationen in codierenden Bereichen i.d.R. nicht mit dem Leben der betroffenen Zelle vereinbar und daher kaum nachweisbar waren.

In diesen enthalten sind sowohl ‚*missense*‘- als auch ‚*nonsense*‘-Mutationen, ‚*frame shift*‘-Deletionen oder -Insertionen, ‚*in frame*‘-Deletionen sowie die Spleißstelle verändernde Mutationen. Alle diese Variationen des entsprechenden Gens führen demnach zu einer veränderten Proteinsequenz, da sie den Aminosäurecode modifizieren oder die Entstehung vorzeitiger Stopp-Codons bewirken. Daher scheint deren letale Wirkung als die plausibelste Erklärung für die Feststellung, dass die codierenden Sequenzen nicht einmal 3 % der Mutationen beinhalteten, obwohl sie ca. die Hälfte der gesamten sequenzierten Daten ausmachen sollten, zumal Daigaku *et al.* (2015) zeigen konnten, dass gencodierende Regionen in Hefen mit einem RNase H2-defizienten Hintergrund verglichen mit 5‘- oder 3‘-untranslatierten Bereichen oder Promotorsequenzen eine leicht erhöhte Frequenz von Ribonukleotidinkorporationen, und mutmaßlich daher auch TOP1- oder doppelstrangbruchinduzierten Mutationen, zeigen. Widersprüchlich ist in diesem Zusammenhang jedoch die Erkenntnis, dass RNASEH2A-defiziente HeLa- und 293T-Zellen eben keine signifikant erhöhte Apoptoserate aufweisen, was bei einer Akkumulation letal wirkender Variationen zu antizipieren wäre.

#### 4.2.3 Die AGS-typische Interferonsignatur lässt sich nur teilweise nachweisen

Die Einschränkung der Aktivität der RNase H2 sowie der anderen mit AGS assoziierten Proteine führt beim Menschen zu einem erhöhten Typ I-Interferonspiegel (Crow *et al.*, 2015; Lebon *et al.*, 1988; Rice *et al.*, 2013). Die Expressionssteigerung dieses pro-inflammatorischen Cytokins wird als ursächlich für die Entstehung des Aicardi-Goutières-Syndroms angesehen (Akwa *et al.*, 1998) und gilt in Kombination mit einer anhaltenden ISG-Signatur als Kennzeichen der Autoimmun-Erkrankung (Rice *et al.*, 2013). Die Entzündungsantwort wird in RNase H2-defizienten Organismen über den cytoplasmatischen DNA-Sensor ‚*cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthase*‘ (cGAS) und dessen Adapterprotein STING (‚*stimulator of interferon genes*‘) vermittelt, was als abnormale Aktivierung durch zell-eigene Nukleinsäuren interpretiert wird (Bartsch, 2016; Mackenzie *et al.*, 2016; Pokatayev *et al.*, 2016). cGAS liegt in Abwesenheit von cytoplasmatischer DNA in einem autoinhibierten Zustand vor und erlangt erst bei Substratbindung enzymatische Aktivität (Li *et al.*, 2013). Durch eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum wird die Synthese des sekundären Botenstoffs cGAMP ermöglicht, welcher den an das endoplasmatische Retikulum gebundenen Adapter STING aktiviert, der dann seinerseits durch die Aktivierung von Kinasen die Induktion der IFN- und Cytokinexpression antreibt (Chen *et al.*, 2016).

In 293T-Zellen werden weder cGAS noch STING exprimiert, weshalb die Zellen unfähig sind cGAMP zu produzieren und ebenso wenig eine IFN-Antwort auf cytoplasmatische DNA induzieren können (Sun *et al.*, 2013). Aus diesem Grund waren weder statistisch signifikant erhöhte Typ I-Interferonspiegel noch eine vermehrte Expression der Interferon-stimulierten Gene *ISG15*, *IFI27* und *IFI44* detektierbar (siehe Abbildung 27A und C, Seite 89, und Abbildung 28A bis C, Seite 89), die normalerweise als AGS-Biomarker ausgelesen werden (Rice *et al.*, 2013). In HeLa-Zellen ist der cGAS-STING-Signalweg hingegen aktiv (Lam und Falck-Pedersen, 2014), was sich in einer ISG-Signatur mit signifikant erhöhten *ISG15*- und *IFI44*-Expressionsspiegeln niederschlug (siehe Abbildung 28D bis F). Daraus lässt sich ableiten, dass in Abwesenheit der RNase H2 in HeLa-Zellen und möglicherweise auch in 293T-Zellen cytoplasmatische Nukleinsäurederivate akkumulieren, welche immunstimulatorische Eigenschaften besitzen.

#### 4.3 Die RNase H2 wirkt sich fördernd auf die Retrotransposition von LINE-1- und Alu-Elementen aus

Eine Aktivierung des Immunsystems kann durch die Wahrnehmung von Replikationsintermediaten endogener Retroelemente erfolgen und zu Apoptose oder Entzündungszeichen führen (Hancks und Kazazian, 2016). Die exprimierten RE-Transkripte sind auf Grund ihrer Prozessierung, die 5'-Kappe und 3'-Polyadenylierung mit einschließt, für die Zelle *per se* nicht von den übrigen zellulären mRNAs zu unterscheiden. Dennoch kann sie vermutlich durch das Vorliegen von Hybridstrukturen Replikationsintermediate von wirtseigenen Nucleinsäuren unterscheiden (Stetson, 2012). Dies können sowohl die RNA:DNA-Hybride sein, die während der reversen Transkription entstehen, als auch doppelsträngige RNA-Strukturen, welche beispielsweise gelegentlich in den 3'-UTRs von zellulären mRNAs mit einer erhöhten Dichte von invertierten Alu-Elementpaaren vorliegen (Carmi *et al.*, 2011). Das mit der Ausprägung von AGS assoziierte Enzym ADAR1 unterdrückt durch die Editierung dieser doppelsträngigen Alu-Bereiche die Aktivierung einer IFN-Antwort, indem die ADAR1-vermittelte mRNA-Deaminierung die Rekrutierung des RNA-Sensors MDA5 verhindert (Liddicoat *et al.*, 2015). TREX1 hingegen ist an der Prozessierung der revers transkribierten cDNA endogener Retroelemente beteiligt und agiert so als wichtiger Restriktionsfaktor für die Mobilisierung von LTR-Retrotransposonen. Da sich auch für weitere AGS-relevante Proteine die Hinweise für eine Beteiligung an der Regulation der Retroelementaktivität häufen, wurde eine generelle anti-retrovirale Wirkung für AGS-assoziierte Proteine postuliert (Stetson, 2012; Stetson *et al.*, 2008). So existiert die Hypothese, dass die RNase H2 für die Prozessierung des RNA-Anteils von Retroelement-RNA:DNA-Hybriden verantwortlich sein könnte und somit deren Aktivität einschränkt (Bhoj und Chen, 2008).

Untersuchungen der in dieser Dissertation generierten RNASEH2A-defizienten humanen Zelllinien ergaben hingegen, dass von der RNase H2 keine restringierende Wirkung auf die Aktivität von Retroelementen ausgeht, sondern dass sie sich förderlich auf deren Retrotransposition auswirkt. Anhand dreier reportersystembasierter Nachweismethoden konnte die signifikant verminderte Aktivität der markierten LINE-1- und Alu-Elemente in RNASEH2A-*knockout*-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 30, Seite 92, und Abbildung 31, Seite 93). Dass dabei tatsächlich nur die *de novo*-Integration des Retroelements die Expression des Markergens ermöglichen kann, liegt in dem strukturellen Auf-

bau der Expressionskassette begründet, bei dem das durch ein Intron inaktivierte Reporter-Gen erst nach erfolgter Transkription, Prozessierung, reverser Transkription und Integration als funktionelle Einheit vorliegt (siehe Abbildung 10, Seite 58). Eine allgemein veränderte transkriptionelle Regulation der Retroelemente als Ursache für die verzeichneten Unterschiede wurde anhand der Analyse ihrer Expressionsprofile ausgeschlossen. Es zeigte sich, dass die durch Abwesenheit der RNase H2 verursachten Veränderungen der normalen Zellhomöostase weder die relative Expression von non-LTR-Retrotransposonen noch die von LTR-Retroelementen negativ beeinflusste (siehe Abbildung 29, Seite 91).

Die Bildung von RNA:DNA-Hybriden findet bei non-LTR-Retrotransposonen wie LINE-1- und Alu-Elementen im Zellkern der Wirtszelle während des als ‚*target-primed reverse transcription*‘ (TPRT) bezeichneten Mechanismus statt. Insofern könnte die RNase H2 auf Grund ihrer nukleären Lokalisation einen möglichen Hilfsfaktor dieses Prozesses darstellen. Neben der räumlichen Übereinstimmung gibt es einen weiteren Hinweis, der die vom LINE-1-Element codierten Proteine und die RNase H2 miteinander verbindet: der gemeinsame Interaktionspartner PCNA. Taylor *et al.* (2013) konnten zeigen, dass ORF2p, aber nicht ORF1p, mit PCNA interagiert und dass diese Interaktion essentiell für eine erfolgreiche Retrotransposition des LINE-1-Elements ist. Sowohl Mutationen in der ORF2-PIP-Box reduzieren die Retrotranspositionsaktivität bedingt durch eine verhinderte Bindung an PCNA als auch die Expressionssenkung („*knockdown*“) von PCNA über RNA-Interferenz. Außerdem sind beide enzymatischen ORF2p-Funktionen, also Endonuklease- und reverse Transkriptaseaktivität, für die Interaktion erforderlich (Taylor *et al.*, 2013).

Damit ergeben sich drei denkbare Interaktionsszenarien für non-LTR-Retrotransposonen und die RNase H2: I) Die RNase H2 prozessiert in ihrer Funktion als DNA-Reparaturenzym einzelne in die genomische DNA inkorporierte Ribonukleotide und liefert so zusätzlich zu den von der ORF2p-Endonukleaseaktivität erzeugten *nicks* weitere Einzelstrangbrüche, welche von der LINE-1-Maschinerie genutzt werden können und so die Initiation der reversen Transkription erleichtern. II) Die Typ II-RNase H-Aktivität ermöglicht die Entfernung von während der reversen Transkription in die RE-cDNA inkorporierten Ribonukleotiden und verhindert so die Akkumulation von Mutationen und damit verbundene Inaktivierung des Retrotransposons. III) Die RNase H2 prozessiert während des TPRT-Ablaufs die RE-RNA und ermöglicht damit die Zweitstrangsynthese und vollständige Integration des Elements.

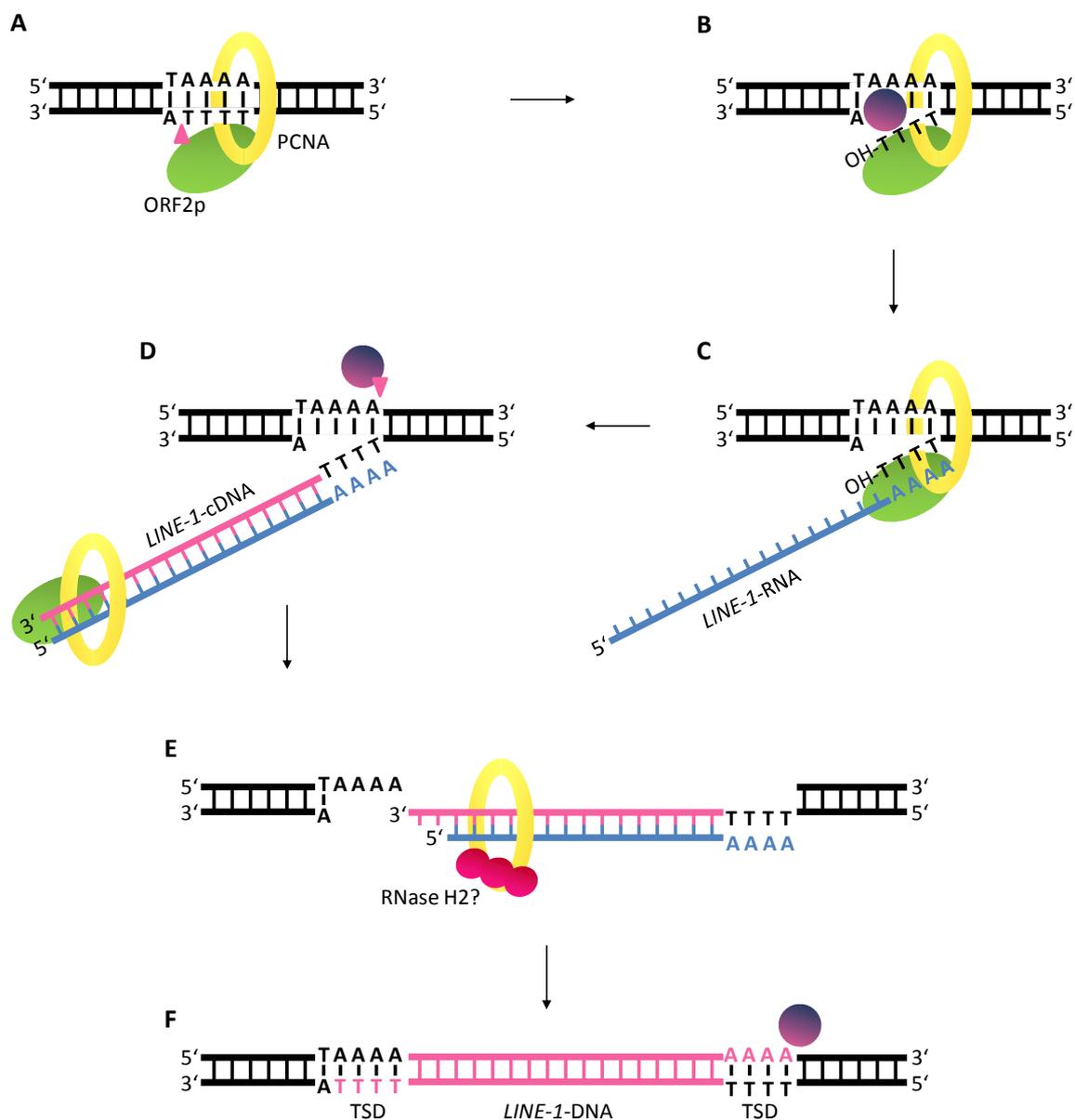
Die erste Theorie wird unterstützt von Erkenntnissen, die belegen, dass es einen endonukleaseunabhängigen Retrotranspositionsmechanismus gibt, welcher die Integration des Retroelements an bestehenden DNA-Läsionen ermöglicht. Die Einzel- oder Doppelstrangbrüche liefern eine freiliegende 3'-Hydroxygruppe, von der ausgehend die reverse Transkription initiiert werden kann (Morrish *et al.*, 2002). Strittig sind bis heute die Frequenz mit der dieser wenig untersuchte Mechanismus genutzt wird, sowie ob es sich tatsächlich, wie von Sen *et al.* (2007) postuliert, um einen alternativen DNA-Reparaturmechanismus handelt. Trotz des Wegfalls von durch die RNase H2 eingeführten Einzelstrangbrüchen wiesen die in dieser Dissertation generierten Zellen jedoch insgesamt mehr DNA-Läsionen und somit eine verminderte genomische Stabilität auf. Dies äußerte sich jedoch nicht in einer vermehrten endonukleaseunabhängigen Retrotransposition, was gegen einen starken Einfluss der Typ II-RNase H-Aktivität auf die Generierung von Einzelstrangbrüchen zur Insertion von non-LTR-Retroelementen spricht.

Das zweite Szenario wird gestützt von Belegen über einen vermehrten Einbau von Ribonukleotiden während der reversen Transkription des exogenen Retrovirus HIV-1. Die virale reverse Transkriptase erreicht in Makrophagen Inkorporationsraten von einem Ribonukleotid je 146 Nukleotiden, womit bekannte Raten der replikativen Polymerasen deutlich übertroffen werden. Die akkumulierenden Ribonukleotide führen *in vitro* zu einer Unterbrechung der reversen Transkriptaseaktivität der HIV-1 RT und besitzen mutagenes Potential (Kennedy *et al.*, 2012). Da über Ribonukleotidinkorporationsraten der LINE-1-ORF2p-reversen Transkriptase jedoch derzeit nichts bekannt ist, ist deren Einfluss auf die Retrotransposition kaum abzuschätzen.

Für die zuletzt genannte Theorie hingegen spricht, dass LINE-1-Elemente von Säugetieren keine erkennbare RNase H-Aktivität codieren (Piskareva und Schmatchenko, 2006; Taylor *et al.*, 2013). Die Entfernung der RNA-Matrize von der neusynthetisierten cDNA ist jedoch eine Voraussetzung für die Zweitstrangsynthese und wird vermutlich von wirtszelleigenen DNA-Reparaturmechanismen kontrolliert (Luan *et al.*, 1993). Dies würde zumindest auch die Tatsache erklären, dass die 5'-Enden von non-LTR-Retrotransposonen mehrheitlich trunziert sind, wohingegen die 3'-Enden präzise integriert werden (Szak *et al.*, 2002). Die Einleitung des TPRT-Prozesses erfordert die sequenzspezifische Erkennung und Hybridisierung von RE-RNA und der genomischen Ziel-DNA und generiert somit exakte 3'-cDNA-Termini (siehe Abbildung 33C, Seite 110). Nach der Initiation könnte die Integration je-

doch auch bei einem vorzeitigen Abbruch der cDNA-Synthese oder bei der Nutzung einer verkürzten RE-RNA-Matrize erfolgen, wenn die Integration des 5'-Endes unspezifische DNA-Reparaturfunktionen involviert (Luan *et al.*, 1993). Eine mögliche Annahme wäre dementsprechend, dass die RNase H2 von PCNA an den Ort der Retrotransposition rekrutiert wird und dort simultan zur oder anschließend an die reverse Transkription, die mit Unterstützung durch PCNA von ORF2p ausgeführt wird, die Prozessierung des RNA-Anteils vollzieht (siehe Abbildung 33D-E). PCNA ist auch bei anderen zellulären Prozessen wie der Replikation und DNA-Reparatur für die Rekrutierung der RNase H2 verantwortlich und verstärkt ihre enzymatischen Aktivitäten, sowohl die Typ I- als auch die Typ II-abhängige (Bubeck *et al.*, 2011), wobei es Malik (2005) zufolge eine Typ I-RNase H-Aktivität ist, die für die RE-Biologie entscheidend ist. Dass die humane RNase H2 im Gegensatz zu ihren prokaryotischen Gegenstücken in prozessiver und nicht in distributiver Weise agiert (Chon *et al.*, 2009), macht sie zu einem idealen Kandidaten für den Abbau der mehrere Kilobasen langen RNA-Matrize. Blicke der Abbau des RNA-Anteils während des TPRT-Prozesses und somit die Vollendung der Retrotransposition aus, so ließe sich damit die drastisch verminderte Retrotranspositionsrate in RNASEH2A-defizienten Zellen erklären.

Diese während der reversen Transkription gebildeten, nicht prozessierten RE-RNA:cDNA-Hybride könnten für die Auslösung einer Immunantwort und damit die Entwicklung von AGS mitverantwortlich sein. So dokumentiert eine unlängst veröffentlichte Publikation von Pokatayev *et al.* (2016) den Anstieg cytoplasmatischer *LINE-1*-DNA in Mäusen, welche Mutationen in der A-Untereinheit der RNase H2 tragen, die der AGS-auslösenden humanen Variation G37S entsprechen. Weiterhin belegt die Studie die Aktivierung des cGAS-STING-Signalweges durch die Perzeption bisher nicht näher spezifizierter Nukleinsäurederivate, möglicherweise genau dieser *LINE-1*-DNA-Moleküle. Auch in TREX1-defizienten Mäusen akkumulieren RE-abgeleitete DNA-Moleküle im Cytoplasma und sind dort vermutlich für die Ausprägung des inflammatorischen Phänotyps verantwortlich (Stetson *et al.*, 2008). Dieser kann durch die Behandlung mit nukleosidischen reverse Transkriptase-Inhibitoren unterdrückt werden, was das immunstimulatorische Potential von Retrotranspositionsintermediaten darüber hinaus untermauert (Beck-Engeser *et al.*, 2011), ebenso wie die Untersuchungen von Beck-Engeser *et al.* (2011), die einen kausalen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von *LINE-1*-Retrotransposonen und erhöhten Interferon- und ISG-Spiegeln festgestellt haben.



**Abbildung 33: RNase H2-abhängiges Modell des LINE-1-TPRT-Prozesses.** **A:** Die Endonukleaseaktivität des LINE-1-Proteins ORF2p (grün) fügt einen Einzelstrangbruch (rosa Dreieck) in der präferierten Zielsequenz (5'-TTTAA-3') der chromosomalen DNA (schwarz) ein. Das Ringklemmenprotein PCNA (gelb) unterstützt möglicherweise diesen Prozess. **B:** Bislang unidentifizierte wirtseigene Proteinfaktoren (lila) mit DNA-abhängiger Helikaseaktivität lösen die beiden DNA-Stränge in einem kurzen Abschnitt voneinander. **C:** Dadurch wird die Bindung der *LINE-1*-RNA (blau) an die Erkennungssequenz ermöglicht. **D:** Der reverse Transkriptaseanteil von ORF2p verlängert mit Hilfe von PCNA die freiliegende 3'-OH-Gruppe und generiert so die *LINE-1*-cDNA (rosa) nach dem Abbild der RNA-Matrize. Wirtsfaktoren oder ein weiteres ORF2p-Protein führen darüber hinaus einen zweiten Einzelstrangbruch in einigen Nukleotiden Entfernung vom ersten *nick* ein. **E:** Der RNA-Anteil des *LINE-1*-RNA:cDNA-Hybrids wird abgebaut, möglicherweise von der RNase H2 (pink) nach Rekrutierung durch PCNA. **F:** Die Zweitstrangsynthese sowie Ligation der Strangbrüche erfolgt auf bisher ungeklärte Weise, vermutlich unter Zuhilfenahme weiterer Wirtsfaktoren. Die doppelsträngige *LINE-1*-DNA wird beiderseits von kurzen Duplikationsstellen (TSDs) umrahmt.

---

Zusammenfassend zeigen die hier dargelegten Untersuchungsergebnisse erstmalig auf, dass die RNase H2 einen positiven Regulator der RE-Aktivität darstellt und demonstrieren so eine bisher unbekannte zusätzliche Funktion des Enzyms. Außerdem liefern sie weitere Hinweise darauf, dass endogenen Retroelementen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung des Aicardi-Goutières-Syndroms zuteilwird, da somit alle AGS-relevanten Enzyme in den RE-Metabolismus involviert sind.

#### 4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation konnte festgestellt werden, dass die RNase H2 im humanen System einen förderlichen Einfluss auf die Aktivität von konstruierten non-LTR-Retrotransposonen ausübt. Dieser Effekt wurde übereinstimmend in zwei unterschiedlichen Zelllinien, 293T und HeLa HA, verifiziert. Da es über den dahinter liegenden Mechanismus bislang jedoch noch keine Erkenntnisse gibt, sollten zukünftige Projekte sich vornehmlich auf dessen Entschlüsselung konzentrieren. Sehr interessant wäre in diesem Zusammenhang zu klären, welche der beiden Aktivitäten der RNase H2 für die positive Wirkung auf Retroelemente verantwortlich ist. Dieser Fragestellung könnte man sich durch die Kombination von reporterergenbasierten Retrotranspositionsstudien mit Rekonstituierungsexperimenten nähern, in welchen man sich die von Chon *et al.* (2013) beschriebene Mutation zunutze macht, bei der die Typ I- und die Typ II-RNase H-Aktivitäten des Enzyms voneinander getrennt werden. Sollte die RNase H2 tatsächlich der verantwortliche Wirtsfaktor für den Abbau des RE-RNA-Strangs während der reversen Transkription sein, so wären bei einer Rekonstituierung mit dieser Mutante keinerlei Unterschiede zur Parentallinie zu erwarten, da die Mutation nur die Prozessierung einzelner Ribonukleotide in einem DNA-Hybrid unterbindet. Ist hingegen die Typ II-RNase H-Aktivität der RNase H2 ausschlaggebend, so würde erst die Rekonstituierung mit der Wildtyp-RNASEH2A den Normalzustand wiederherstellen. Weiterhin interessant wäre in diesem Zusammenhang die Frage, ob auch die nukleäre Isoform der RNase H1 den Abbau der RNA-Matrize katalysieren könnte.

Für eine vertiefende Einsicht in den Mechanismus des TPRT-Prozesses wäre es zudem aufschlussreich zu erfahren, ob eine Interaktion der RNASEH2B mit PCNA für deren Einfluss auf die LINE-1- oder Alu-Aktivität entscheidend ist. Da sich der RNASEH2A-*knockout* hem-

---

mend auf die Expression der B-Untereinheit auswirkt (siehe Abbildung 22, Seite 83), könnten die in dieser Arbeit generierten Linien für initiale Versuche verwendet werden. Denkbar wäre die transiente Rekonstituierung der RNASEH2A-defizienten Zellen mit den drei Untereinheiten des Enzyms, wobei statt der Wildtyp-B-Untereinheit eine mutierte RNASEH2B mit veränderter PIP-Box und dadurch gestörter PCNA-Bindefähigkeit verwendet werden könnte.

Darüber hinaus ist die physiologische Relevanz der hier gezeigten Untersuchungsergebnisse zu ermitteln. Tragen die von Pokatayev *et al.* (2016) identifizierten cytoplasmatischen *LINE-1*-cDNAs in Mäusen mit mutierter A-Untereinheit einen Anteil an der Entstehung des Aicardi-Goutières-Syndroms? Bisweilen ist noch unklar, ob diese cDNA-Anreicherungen auch im humanen System auftreten. Daneben fehlt der zweifelsfreie Beweis, der diese mit einer Aktivierung des Immunsystems und der Auslösung von AGS in Verbindung bringen würde. Wenn auf Grund der RNase H2-Defizienz außerdem der Abbau des RNA-Anteils von retroelementabgeleiteten RNA:DNA-Hybriden verhindert würde, stellt sich die Frage, ob neben diesen DNA-Molekülen bei Beeinträchtigung der RNase H2 nicht auch RE-RNA:cDNA-Heteroduplexe im Cytoplasma der betroffenen Zelle akkumulieren müssten. Die Identifizierung sämtlicher immunstimulatorischer Nukleinsäuren in RNase H2-defizienten Zelllinien sollte daher ein weiteres Forschungsziel darstellen.

## 5 Zusammenfassung

Hypomorphe Mutationen in einer der drei Untereinheiten der humanen RNase H2 führen zur Ausprägung des Autoimmun-Defekts Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS) (Crow *et al.*, 2006b). Es handelt sich dabei um eine seltene, frühkindliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, deren Phänotyp klinische und biochemische Überlappungen mit einer intra-uterin erworbenen Virusinfektion zeigt (Aicardi und Goutières, 1984). Ursächlich für die Aktivierung der Entzündungsantwort bei AGS ist vermutlich die Akkumulation endogener Nukleinsäuren. Bei diesen könnte es sich einerseits um geschädigte DNA handeln (Bartsch, 2016; Mackenzie *et al.*, 2016; Pokatayev *et al.*, 2016), andererseits könnten es auch die Prozessierungsprodukte aktiver endogener Retroelemente bzw. Retroviren sein, die die Interferon- $\alpha$ -Produktion stimulieren (Crow und Manel, 2015).

Um ein exakteres Bild von den Mechanismen der Krankheitsausprägung zu erhalten, wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation mit Hilfe des CRISPR-Cas9-Systems monoklonale RNase H2-defiziente, humane Zelllinien generiert. Diese wiesen signifikante Proliferationsdefizite im Vergleich zu ihren Parentalzellen auf, was auf eine Arretierung des Zellzyklus in der G2-Phase zurückzuführen war. Dieses erste Anzeichen für das Vorliegen von DNA-Schäden konnte unter Verwendung verschiedener Methoden bestätigt werden. So waren RNASEH2A-defiziente Zellen von vermehrten Strangbrüchen, cytoplasmatischen DNA-haltigen Strukturen (sog. Mikronuklei) sowie höheren Mutationsraten betroffen, was als Ausdruck für genomische Instabilität gedeutet wurde. Des Weiteren gab es Hinweise auf eine leicht vermehrte Inkorporation von Ribonukleotiden in die genomische DNA der RNase H2-*knockout*-Zellen. Beim Vorliegen eines intakten cGAS-STING-Signalweges führte diese Beeinträchtigung der genomischen Integrität zu der Ausprägung einer für AGS typischen ISG-Signatur, was die Relevanz der Untersuchungsergebnisse unterstreicht.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit erstmalig festgestellt werden, dass die RNase H2 einen positiven Einfluss auf die Mobilisierung von non-LTR-Retrotransposonen ausübt. Damit rückt sie die Regulation endogener Retroelemente sowie damit einhergehende Veränderungen der Homöostase retroelementabgeleiteter Nukleinsäurederivate zunehmend in den Fokus weiterführender Analysen zur Entstehung von AGS und anderer Autoimmun-Erkrankungen.

---

## 6 Summary

Hypomorphic mutations in one of the three subunits of the human RNase H2 lead to the manifestation of the autoimmune defect Aicardi-Goutières syndrome (AGS) (Crow *et al.*, 2006b). AGS is a rare, early-onset neurodevelopmental disorder that displays clinical and biochemical overlap with an intra-uterine acquired viral infection (Aicardi and Goutières, 1984). Activation of the inflammatory response in AGS is potentially caused by the accumulation of endogenous nucleic acids. The interferon- $\alpha$  production might either be stimulated by damaged DNA (Bartsch, 2016; Mackenzie *et al.*, 2016; Pokatayev *et al.*, 2016) or by processing intermediates of active endogenous retroelements and retroviruses, respectively (Crow and Manel, 2015).

To gain a more detailed insight into the mechanisms underlying the disease's development and progression within the framework of this dissertation, monoclonal RNase H2-deficient human cell lines were generated by means of the CRISPR-Cas9 system. They featured a significant proliferative deficit compared to their parental cells that was ascribed to a G2-dependent cell cycle arrest. This first hint towards the existence of DNA-damage could subsequently be confirmed by the use of various techniques. The RNASEH2A-deficient cells were affected by increased numbers of strand breaks as well as cytoplasmic DNA-containing structures called micronuclei plus higher mutation rates, which was interpreted as a signal for elevated genomic instability. In addition to that, a lightly increased incorporation rate of ribonucleotides within the genomic DNA of RNase H2 knockout cells could be detected. In the presence of an intact cGAS-STING signalling pathway, impairment of the genomic integrity led to the development of an ISG signature, as typically seen in AGS patients, which underlines the relevance of the obtained findings.

Beyond that, it could be proved for the first time within this work that the RNase H2 exerts a positive influence on the mobilisation of non-LTR-retrotransposons. Thereby it spotlights the regulation of endogenous retroelements and the therewith accompanied alterations in the homeostasis of retroelement-derived nucleic acid derivatives for future analyses concerning the development of AGS and other autoimmune diseases.

---

## 7 Abkürzungsverzeichnis

293T	humane embryonale Nierenzelllinie
53BP1	<i>p53-binding protein 1</i>
ADAR1	<i>adenosine deaminase acting on RNA 1</i>
AGS	Aicardi-Goutières-Syndrom
AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APOBEC	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
C-	Carboxy-
Cas9	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
CDKN1A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
cGAMP	<i>cyclic GMP-AMP</i>
cGAS	<i>cGAMP synthase</i>
CpG	Desoxycytidin-Phosphatidyl-Desoxyguanosin
cPPT	<i>central polypurine tract</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR-RNA
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i> , Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit
C <sub>T</sub>	<i>cycle threshold</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat

---

dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNA2	<i>DNA replication helicase/nuclease 2</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dNTPase	Triphosphohydrolase
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
dUTP*	fluoresceingekoppeltes Desoxyuridintriphosphat
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EN	Endonuklease
ERV	endogener Retrovirus
<i>et al.</i>	<i>et alii / et aliae / et alia</i> , und andere
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FEN1	<i>flap endonuclease 1</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
flank.	flankierend

---

<i>Fluc</i>	<i>firefly luciferase</i> , Leuchtkäfer Luciferase
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
G1	<i>gap 1</i>
G2	<i>gap 2</i>
G418	Geneticindisulfat
GAG	Gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
H2B <sup>-/-</sup>	RNaseH2B- und P53-defiziente embryonale murine Fibroblastenzelllinie
H2B <sup>+/+</sup>	P53-defiziente embryonale murine Fibroblastenzelllinie
HDR	<i>homology-directed repair</i>
HeLa HA	humane Gebärmutterhals-Adenokarzinom-Zelllinie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HERV-K	humaner endogener Retrovirus K
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus 1
HPV18	humanes Papillomvirus 18
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
hSpCas9	codonoptimierte <i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9-Nuklease
IFI27	<i>interferon alpha inducible protein 27</i>
IFI44	<i>interferon induced protein 44</i>
IFIH1	<i>IFN-induced helicase C domain containing protein 1</i>
IFN	Interferon
IGR	intergenische Region
IN	Integrase
<i>InDel</i>	Insertion/Deletion
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
ISG	Interferon-stimuliertes Gen

---

ISG15	<i>interferon-stimulated gene 15</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K-PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
<i>lacZ</i>	$\beta$ -Galactosidase-Gen
LB	<i>lysogeny broth</i>
LINE	<i>long interspersed nuclear element</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Mittelwert
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling protein</i>
mCh	mCherry
MCS	<i>multiple cloning site</i> , Polylinker
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MEFs	murine embryonale Fibroblasten
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N-	Amino-
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
NIH/3T3	embryonale murine Fibroblastenzelllinie
NLR	<i>normalized luminescence ratio</i>
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NP-40	Nonidet P40
OH-Gruppe	Hydroxygruppe
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
ORF1p/ORF2p	Genprodukte von LINE-1-Retroelementen
PAM	<i>protospacer-adjacent motif</i>

---

PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
P-Gruppe	Phosphatgruppe
PIP	<i>PCNA-interacting protein</i>
piRNA	<i>piwi-interacting RNA</i>
PLB	<i>passive lysis buffer</i>
POL	Gen von LTR-Retroelementen
Pol.	Polymerase
polyA	Polyadenosin
PR	Protease
pro	Gen von HERV-K
PRR	<i>pattern-recognition receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i> , quantitative Echtzeit-PCR
RE	Retroelement
rec	Gen von HERV-K
RER	<i>ribonucleotide excision repair</i>
rev	lentivirales Gen
RH	RNase H
Rluc	Renilla Luciferase
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein

---

rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RRE	<i>Rev response element</i>
RT	reverse Transkriptase
RVD	<i>repeat-variable diresidue</i>
S	Synthese
SAMHD1	<i>SAM domain and HD domain 1</i>
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SFFV	<i>spleen focus-forming virus</i>
SINE	<i>short interspersed nuclear element</i>
SLE	systemischer <i>Lupus erythematoses</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
SSC	<i>side scatter</i> , Seitenstreulicht
STING	<i>stimulator of interferon genes</i>
SV40	<i>simian vacuolating virus 40</i> , Simian-Virus 40
SV40LT	<i>SV40 large T-antigen</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TALE	<i>transcription activator-like effector</i>
TALEN	TALE-Nukleasen
<i>tat</i>	lentivirales Gen
TBS(T)	<i>TRIS-buffered saline (with Tween20)</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TOP1	Topoisomerase 1
TPRT	<i>target-primed reverse transcription</i>

---

tracrRNA	<i>trans-activating crRNA</i>
TREX1	<i>three prime repair exonuclease 1</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSD	<i>target site duplication</i>
U	<i>unit, Einheit</i>
UTR	<i>untranslated region, untranslatierter Bereich</i>
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Masse pro Volumen
wPRE	<i>Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>
ZFN	Zinkfinger-Nuklease
Ψ	Psi-Element

---

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Horizontale computertomografische Aufnahmen des Großhirns gesunder, an AGS- sowie an intra-uterin erworbener HIV-1-Infektion erkrankter Individuen .....	1
<b>Abbildung 2:</b> Die genomische Struktur endogener Retroelemente .....	4
<b>Abbildung 3:</b> Der LINE-1-Lebenszyklus.....	6
<b>Abbildung 4:</b> Die RNase H-vermittelte Spaltung.....	9
<b>Abbildung 5:</b> Struktur und Funktionsweise der RNase H2.....	10
<b>Abbildung 6:</b> Die Genom-Editierungstechnologie CRISPR-Cas9 .....	16
<b>Abbildung 7:</b> Schema zur Zusammenfassung der experimentellen Vorgehensweise in dieser Dissertation.....	18
<b>Abbildung 8:</b> Schematische Darstellung des <i>nick-translation assays</i> .....	38
<b>Abbildung 9:</b> Schematische Darstellung des RNASEH1/2-Aktivitätstests.....	51
<b>Abbildung 10:</b> Schematische Darstellung des markergenbasierten Nachweises von genomischen LINE-1-Integrationen.....	58
<b>Abbildung 11:</b> CRISPR-Cas9-Erkennungssequenzen innerhalb des humanen <i>RNASEH2A</i> -Gens .....	65
<b>Abbildung 12:</b> Klonierungsschema der LeGO-Cas9-guideRNA-Vektoren.....	68
<b>Abbildung 13:</b> Sequenzvergleich zwischen Teilen der humanen und der murinen <i>RNASEH2A</i> -Sequenz .....	69
<b>Abbildung 14:</b> Ausschnitt aus der Plasmidkarte von LeGO-H2A-eGFP.....	70
<b>Abbildung 15:</b> Durchflusszytometrische Auswertung der mit den CRISPR-Cas9-Plasmiden transfizierten murinen Indikator-Zellen .....	71
<b>Abbildung 16:</b> Beispielhafte Darstellung der immunoblotbasierten Identifikationsstrategie RNASEH2A-defizienter Klone.....	73
<b>Abbildung 17:</b> RNase H2-Expression und -Aktivität in (ausgewählten) RNASEH2A-defizienten Zellklonen .....	76
<b>Abbildung 18:</b> NGS-Analyse der RNASEH2A-defizienten Linien .....	78
<b>Abbildung 19:</b> Wachstumskurven .....	79
<b>Abbildung 20:</b> EdU-basierte Zellproliferationsmessung .....	80
<b>Abbildung 21:</b> Immunocytochemische 53BP1-Färbungen zur Ermessung der Genom-Integrität .....	81

---

<b>Abbildung 22:</b> Wiederherstellung der Typ I/II-RNase H-Aktivität in 293T- <i>knockout</i> -Zellen .....	83
<b>Abbildung 23:</b> Immunocytochemische DNA-Färbungen zur Ermessung der Genom-Integrität .....	84
<b>Abbildung 24:</b> <i>Nick-translation assay</i> .....	85
<b>Abbildung 25:</b> Gelelektrophoretische Auftrennung von alkalisensitiven Nukleinsäuren ..	86
<b>Abbildung 26:</b> Exom-Sequenzierung von HeLa-Parentalzellen und HeLa_KO1.....	87
<b>Abbildung 27:</b> Relative Expression der Typ I-Interferone <i>IFN-<math>\alpha_{1,13}</math></i> und <i>IFN-<math>\beta</math></i> .....	89
<b>Abbildung 28:</b> Relative Expression der IFN-stimulierten Gene <i>ISG15</i> , <i>IFI27</i> sowie <i>IFI44</i> ...	89
<b>Abbildung 29:</b> Relative Expression der endogenen Retroelemente <i>LINE-1 ORF1</i> , <i>ALU</i> , <i>HERV-K pro</i> und <i>rec</i> .....	91
<b>Abbildung 30:</b> Analyse der LINE-1-Retrotranspositionsaktivität mit Hilfe zweier Reportersysteme.....	92
<b>Abbildung 31:</b> Analyse der Alu-Retrotranspositionsaktivität mit Hilfe des neomycinresistenzgen-basierten Reportersystems .....	93
<b>Abbildung 32:</b> Folgen der RNase H2-Defizienz für humane Zellen.....	102
<b>Abbildung 33:</b> RNase H2-abhängiges Modell des LINE-1-TPRT-Prozesses .....	110
<b>Abbildung 34:</b> Grafische Auswertung der NGS-Daten von RNASEH2A-defizienten Zellen .....	154

---

## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Temperatureinstellungen für die Hybridisierung von einzelsträngigen, komplementären Oligonukleotiden .....	42
<b>Tabelle 2:</b> Transfektionsschema zur Lentiviren-Produktion .....	56
<b>Tabelle 3:</b> Transfektionsschema des luciferasebasierten LINE-1-Reportersystems .....	59
<b>Tabelle 4:</b> Transfektionsschema des eGFP-basierten LINE-1-Reportersystems .....	60
<b>Tabelle 5:</b> Transfektionsschema des neomycinresistenzgen-basierten Alu-Reportersystems .....	62

---

## 10 Literaturverzeichnis

- Adey, A., Burton, J.N., Kitzman, J.O., Hiatt, J.B., Lewis, A.P., Martin, B.K., Qiu, R., Lee, C. und Shendure, J. (2013). The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. *Nature* *500*, 207-211.
- Ahuja, D., Saenz-Robles, M.T. und Pipas, J.M. (2005). SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* *24*, 7729-7745.
- Aicardi, J. und Goutières, F. (1984). A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis. *Ann Neurol* *15*, 49-54.
- Akwa, Y., Hassett, D.E., Eloranta, M.L., Sandberg, K., Masliah, E., Powell, H., Whitton, J.L., Bloom, F.E. und Campbell, I.L. (1998). Transgenic expression of IFN-alpha in the central nervous system of mice protects against lethal neurotropic viral infection but induces inflammation and neurodegeneration. *J Immunol* *161*, 5016-5026.
- Anderson, E.M., Haupt, A., Schiel, J.A., Chou, E., Machado, H.B., Strezoska, Z., Lenger, S., McClelland, S., Birmingham, A., Vermeulen, A. und Smith, A. (2015). Systematic analysis of CRISPR-Cas9 mismatch tolerance reveals low levels of off-target activity. *J Biotechnol* *211*, 56-65.
- Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Bourc'his, D., Schaefer, C., Pezic, D., Toth, K.F., Bestor, T. und Hannon, G.J. (2008). A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell* *31*, 785-799.
- Arudchandran, A., Cerritelli, S., Narimatsu, S., Itaya, M., Shin, D.Y., Shimada, Y. und Crouch, R.J. (2000). The absence of ribonuclease H1 or H2 alters the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to hydroxyurea, caffeine and ethyl methanesulphonate: implications for roles of RNases H in DNA replication and repair. *Genes Cells* *5*, 789-802.
- Ashkenazi, A. und Salvesen, G. (2014). Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* *30*, 337-356.
- Avery, O.T., Macleod, C.M. und McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med* *79*, 137-158.
- Ballana, E. und Este, J.A. (2015). SAMHD1: at the crossroads of cell proliferation,

- immune responses, and virus restriction. *Trends Microbiol* 23, 680-692.
- Bargonetti, J., Reynisdottir, I., Friedman, P.N. und Prives, C. (1992). Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53. *Genes Dev* 6, 1886-1898.
  - Bartsch, K. (2016). Funktionsanalyse der RNase H2 anhand muriner, konditionaler knock-out Modelle (Kiel: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel). Dissertation
  - Beck-Engeser, G.B., Eilat, D. und Wabl, M. (2011). An autoimmune disease prevented by anti-retroviral drugs. *Retrovirology* 8, 91.
  - Beloglazova, N., Flick, R., Tchigvintsev, A., Brown, G., Popovic, A., Nocek, B. und Yakunin, A.F. (2013). Nuclease activity of the human SAMHD1 protein implicated in the Aicardi-Goutières syndrome and HIV-1 restriction. *J Biol Chem* 288, 8101-8110.
  - Ben-Porath, I. und Weinberg, R.A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 961-976.
  - Betermier, M., Bertrand, P. und Lopez, B.S. (2014). Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS Genet* 10, e1004086.
  - Bhoj, V.G. und Chen, Z.J. (2008). Linking retroelements to autoimmunity. *Cell* 134, 569-571.
  - Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
  - Boettcher, M. und McManus, M.T. (2015). Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol Cell* 58, 575-585.
  - Bottomley, R.H., Trainer, A.L. und Griffin, M.J. (1969). Enzymatic and chromosomal characterization of HeLa variants. *J Cell Biol* 41, 806-815.
  - Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R. und Hannon, G.J. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128, 1089-1103.
  - Brouha, B., Schustak, J., Badge, R.M., Lutz-Prigge, S., Farley, A.H., Moran, J.V. und Kazazian, H.H., Jr. (2003). Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5280-5285.
  - Bubeck, D., Reijns, M.A., Graham, S.C., Astell, K.R., Jones, E.Y. und Jackson, A.P. (2011). PCNA directs type 2 RNase H activity on DNA replication and repair substrates. *Nucleic Acids Res* 39, 3652-3666.

- 
- Buers, I., Nitschke, Y. und Rutsch, F. (2016). Novel interferonopathies associated with mutations in RIG-I like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 29, 101-107.
  - Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-1501.
  - Butz, K., Shahabeddin, L., Geisen, C., Spitkovsky, D., Ullmann, A. und Hoppe-Seyler, F. (1995). Functional p53 protein in human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene* 10, 927-936.
  - Bylund, L., Kytola, S., Lui, W.O., Larsson, C. und Weber, G. (2004). Analysis of the cytogenetic stability of the human embryonal kidney cell line 293 by cytogenetic and STR profiling approaches. *Cytogenet Genome Res* 106, 28-32.
  - Cao, X., Ding, Q., Lu, J., Tao, W., Huang, B., Zhao, Y., Niu, J., Liu, Y.J. und Zhong, J. (2015). MDA5 plays a critical role in interferon response during hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 62, 771-778.
  - Carmi, S., Borukhov, I. und Levanon, E.Y. (2011). Identification of widespread ultra-edited human RNAs. *PLoS Genet* 7, e1002317.
  - Cerella, C., Grandjenette, C., Dicato, M. und Diederich, M. (2016). Roles of Apoptosis and Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Curr Drug Targets* 17, 405-415.
  - Cerritelli, S.M. und Crouch, R.J. (2009). Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *FEBS J* 276, 1494-1505.
  - Cerritelli, S.M. und Crouch, R.J. (2016). The Balancing Act of Ribonucleotides in DNA. *Trends Biochem Sci* 41, 434-445.
  - Cerritelli, S.M., Frolova, E.G., Feng, C., Grinberg, A., Love, P.E. und Crouch, R.J. (2003). Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in Rnaseh1 null mice. *Mol Cell* 11, 807-815.
  - Chapados, B.R., Chai, Q., Hosfield, D.J., Qiu, J., Shen, B. und Tainer, J.A. (2001). Structural biochemistry of a type 2 RNase H: RNA primer recognition and removal during DNA replication. *J Mol Biol* 307, 541-556.
  - Chen, Q., Sun, L. und Chen, Z.J. (2016). Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol* 17, 1142-1149.
  - Chiruvella, K.K., Liang, Z. und Wilson, T.E. (2013). Repair of double-strand breaks by end joining. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a012757.

- Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M. und Kim, J.S. (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 31, 230-232.
- Chon, H., Sparks, J.L., Rychlik, M., Nowotny, M., Burgers, P.M., Crouch, R.J. und Cerritelli, S.M. (2013). RNase H2 roles in genome integrity revealed by unlinking its activities. *Nucleic Acids Res* 41, 3130-3143.
- Chon, H., Vassilev, A., DePamphilis, M.L., Zhao, Y., Zhang, J., Burgers, P.M., Crouch, R.J. und Cerritelli, S.M. (2009). Contributions of the two accessory subunits, RNASEH2B and RNASEH2C, to the activity and properties of the human RNase H2 complex. *Nucleic Acids Res* 37, 96-110.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A. und Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823.
- Cost, G.J., Feng, Q., Jacquier, A. und Boeke, J.D. (2002). Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *EMBO J* 21, 5899-5910.
- Crow, Y.J. (1993). Aicardi-Goutières Syndrome. In *GeneReviews(R)*, R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J.H. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J.H. Smith und K. Stephens, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle).
- Crow, Y.J. (2011). Type I interferonopathies: a novel set of inborn errors of immunity. *Ann N Y Acad Sci* 1238, 91-98.
- Crow, Y.J., Chase, D.S., Lowenstein Schmidt, J., Szykiewicz, M., Forte, G.M., Gornall, H.L., Oojageer, A., Anderson, B., Pizzino, A., Helman, G., Abdel-Hamid, M.S., Abdel-Salam, G.M., Ackroyd, S., Aeby, A., Agosta, G., Albin, C., Allon-Shalev, S., Arellano, M., Ariando, G., Aswani, V., Babul-Hirji, R., Baildam, E.M., Bahi-Buisson, N., Bailey, K.M., Barnerias, C., Barth, M., Battini, R., Beresford, M.W., Bernard, G., Bianchi, M., Billette de Villemeur, T., Blair, E.M., Bloom, M., Burlina, A.B., Carpanelli, M.L., Carvalho, D.R., Castro-Gago, M., Cavallini, A., Cereda, C., Chandler, K.E., Chitayat, D.A., Collins, A.E., Sierra Corcoles, C., Cordeiro, N.J., Crichtiutti, G., Dabydeen, L., Dale, R.C., D'Arrigo, S., De Goede, C.G., De Laet, C., De Waele, L.M., Denzler, I., Desguerre, I., Devriendt, K., Di Rocco, M., Fahey, M.C., Fazzi, E., Ferrie, C.D., Figueiredo, A., Gener, B., Goizet, C., Gowrinathan, N.R., Gowrishankar, K., Hanrahan, D., Isidor, B., Kara, B., Khan, N., King, M.D., Kirk, E.P., Kumar, R., Lagae, L., Landrieu, P., Lauffer, H., Laugel, V., La Piana, R.,

- Lim, M.J., Lin, J.P., Linnankivi, T., Mackay, M.T., Marom, D.R., Marques Lourenco, C., McKee, S.A., Moroni, I., Morton, J.E., Moutard, M.L., Murray, K., Nabbout, R., Nampoothiri, S., Nunez-Enamorado, N., Oades, P.J., Olivieri, I., Ostergaard, J.R., Perez-Duenas, B., Prendiville, J.S., Ramesh, V., Rasmussen, M., Regal, L., Ricci, F., Rio, M., Rodriguez, D., Roubertie, A., Salvatici, E., Segers, K.A., Sinha, G.P., Soler, D., Spiegel, R., Stodberg, T.I., Straussberg, R., Swoboda, K.J., Suri, M., Tacke, U., Tan, T.Y., te Water Naude, J., Wee Teik, K., Thomas, M.M., Till, M., Tonduti, D., Valente, E.M., Van Coster, R.N., van der Knaap, M.S., Vassallo, G., Vijzelaar, R., Vogt, J., Wallace, G.B., Wassmer, E., Webb, H.J., Whitehouse, W.P., Whitney, R.N., Zaki, M.S., Zuberi, S.M., Livingston, J.H., Rozenberg, F., Lebon, P., Vanderver, A., Orcesi, S. und Rice, G.I. (2015). Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1. *Am J Med Genet A* 167a, 296-312.
- Crow, Y.J., Hayward, B.E., Parmar, R., Robins, P., Leitch, A., Ali, M., Black, D.N., van Bokhoven, H., Brunner, H.G., Hamel, B.C., Corry, P.C., Cowan, F.M., Frints, S.G., Klepper, J., Livingston, J.H., Lynch, S.A., Massey, R.F., Meritet, J.F., Michaud, J.L., Ponsot, G., Voit, T., Lebon, P., Bonthron, D.T., Jackson, A.P., Barnes, D.E. und Lindahl, T. (2006a). Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. *Nat Genet* 38, 917-920.
  - Crow, Y.J., Leitch, A., Hayward, B.E., Garner, A., Parmar, R., Griffith, E., Ali, M., Semple, C., Aicardi, J., Babul-Hirji, R., Baumann, C., Baxter, P., Bertini, E., Chandler, K.E., Chitayat, D., Cau, D., Dery, C., Fazzi, E., Goizet, C., King, M.D., Klepper, J., Lacombe, D., Lanzi, G., Lyall, H., Martinez-Frias, M.L., Mathieu, M., McKeown, C., Monier, A., Oade, Y., Quarrell, O.W., Rittey, C.D., Rogers, R.C., Sanchis, A., Stephenson, J.B., Tacke, U., Till, M., Tolmie, J.L., Tomlin, P., Voit, T., Weschke, B., Woods, C.G., Lebon, P., Bonthron, D.T., Ponting, C.P. und Jackson, A.P. (2006b). Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nat Genet* 38, 910-916.
  - Crow, Y.J. und Manel, N. (2015). Aicardi-Goutières syndrome and the type I interferonopathies. *Nat Rev Immunol* 15, 429-440.
  - Daigaku, Y., Keszthelyi, A., Muller, C.A., Miyabe, I., Brooks, T., Retkute, R., Hubank, M., Nieduszynski, C.A. und Carr, A.M. (2015). A global profile of replicative polymerase

- usage. *Nat Struct Mol Biol* 22, 192-198.
- Dale, R.C., Tang, S.P., Heckmatt, J.Z. und Tatnall, F.M. (2000). Familial systemic lupus erythematosus and congenital infection-like syndrome. *Neuropediatrics* 31, 155-158.
  - Daniel, C., Behm, M. und Ohman, M. (2015). The role of Alu elements in the cis-regulation of RNA processing. *Cell Mol Life Sci* 72, 4063-4076.
  - de la Fuente-Nunez, C. und Lu, T.K. (2017). CRISPR-Cas9 technology: applications in genome engineering, development of sequence-specific antimicrobials, and future prospects. *Integr Biol (Camb)* 9, 109-122.
  - DeCarli, C., Civitello, L.A., Brouwers, P. und Pizzo, P.A. (1993). The prevalence of computed tomographic abnormalities of the cerebrum in 100 consecutive children symptomatic with the human immune deficiency virus. *Ann Neurol* 34, 198-205.
  - Deininger, P. (2011). Alu elements: know the SINEs. *Genome Biol* 12, 236.
  - Denli, A.M., Narvaiza, I., Kerman, B.E., Pena, M., Benner, C., Marchetto, M.C., Diedrich, J.K., Aslanian, A., Ma, J., Moresco, J.J., Moore, L., Hunter, T., Saghatelian, A. und Gage, F.H. (2015). Primate-specific ORF0 contributes to retrotransposon-mediated diversity. *Cell* 163, 583-593.
  - Dewannieux, M., Esnault, C. und Heidmann, T. (2003). LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet* 35, 41-48.
  - DiPaola, R.S. (2002). To arrest or not to G(2)-M Cell-cycle arrest : commentary re: A. K. Tyagi et al., Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G(2)-M arrest, and apoptosis. *Clin. cancer res.*, 8: 3512-3519, 2002. *Clin Cancer Res* 8, 3311-3314.
  - Doudna, J.A. und Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096.
  - Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. und Sharp, P.A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 457-467.
  - Eder, P.S. und Walder, J.A. (1991). Ribonuclease H from K562 human erythroleukemia cells. Purification, characterization, and substrate specificity. *J Biol Chem* 266, 6472-6479.
  - Eder, P.S., Walder, R.Y. und Walder, J.A. (1993). Substrate specificity of human RNase H1 and its role in excision repair of ribose residues misincorporated in DNA. *Biochimie* 75, 123-126.

- 
- El Hage, A., French, S.L., Beyer, A.L. und Tollervey, D. (2010). Loss of Topoisomerase I leads to R-loop-mediated transcriptional blocks during ribosomal RNA synthesis. *Genes Dev* 24, 1546-1558.
  - Elias, J., Dimitrio, L., Clairambault, J. und Natalini, R. (2014). The p53 protein and its molecular network: modelling a missing link between DNA damage and cell fate. *Biochim Biophys Acta* 1844, 232-247.
  - Feng, Q., Moran, J.V., Kazazian, H.H., Jr. und Boeke, J.D. (1996). Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* 87, 905-916.
  - Feng, S. und Cao, Z. (2016). Is the role of human RNase H2 restricted to its enzyme activity? *Prog Biophys Mol Biol* 121, 66-73.
  - Feschotte, C., Jiang, N. und Wessler, S.R. (2002). Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat Rev Genet* 3, 329-341.
  - Figiel, M., Chon, H., Cerritelli, S.M., Cybulska, M., Crouch, R.J. und Nowotny, M. (2011). The structural and biochemical characterization of human RNase H2 complex reveals the molecular basis for substrate recognition and Aicardi-Goutières syndrome defects. *J Biol Chem* 286, 10540-10550.
  - Francis, M.L., Meltzer, M.S. und Gendelman, H.E. (1992). Interferons in the persistence, pathogenesis, and treatment of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8, 199-207.
  - Frank, P., Braunshofer-Reiter, C., Wintersberger, U., Grimm, R. und Busen, W. (1998). Cloning of the cDNA encoding the large subunit of human RNase HI, a homologue of the prokaryotic RNase HII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12872-12877.
  - Gaj, T., Sirk, S.J., Shui, S.L. und Liu, J. (2016). *Genome-Editing Technologies: Principles and Applications*. Cold Spring Harb Perspect Biol 8.
  - Gall, A., Treuting, P., Elkon, K.B., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Barber, G.N. und Stetson, D.B. (2012). Autoimmunity initiates in nonhematopoietic cells and progresses via lymphocytes in an interferon-dependent autoimmune disease. *Immunity* 36, 120-131.
  - Goff, S.P. und Berg, P. (1976). Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell* 9, 695-705.
  - Goodier, J.L. (2016). Restricting retrotransposons: a review. *Mob DNA* 7, 16.

- 
- Goulian, M., Richards, S.H., Heard, C.J. und Bigsby, B.M. (1990). Discontinuous DNA synthesis by purified mammalian proteins. *J Biol Chem* *265*, 18461-18471.
  - Guo, Y., Long, J., He, J., Li, C.I., Cai, Q., Shu, X.O., Zheng, W. und Li, C. (2012). Exome sequencing generates high quality data in non-target regions. *BMC Genomics* *13*, 194.
  - Hancks, D.C. und Kazazian, H.H., Jr. (2012). Active human retrotransposons: variation and disease. *Curr Opin Genet Dev* *22*, 191-203.
  - Hancks, D.C. und Kazazian, H.H., Jr. (2016). Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mob DNA* *7*, 9.
  - Haruki, M., Tsunaka, Y., Morikawa, M. und Kanaya, S. (2002). Cleavage of a DNA-RNA-DNA/DNA chimeric substrate containing a single ribonucleotide at the DNA-RNA junction with prokaryotic RNases HII. *FEBS Lett* *531*, 204-208.
  - Hata, K. und Sakaki, Y. (1997). Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. *Gene* *189*, 227-234.
  - Heraud-Farlow, J.E. und Walkley, C.R. (2016). The role of RNA editing by ADAR1 in prevention of innate immune sensing of self-RNA. *J Mol Med (Berl)* *94*, 1095-1102.
  - Hiller, B., Achleitner, M., Glage, S., Naumann, R., Behrendt, R. und Roers, A. (2012). Mammalian RNase H2 removes ribonucleotides from DNA to maintain genome integrity. *J Exp Med* *209*, 1419-1426.
  - Hohjoh, H. und Singer, M.F. (1996). Cytoplasmic ribonucleoprotein complexes containing human LINE-1 protein and RNA. *EMBO J* *15*, 630-639.
  - Hsiao, K.Y. und Mizzen, C.A. (2013). Histone H4 deacetylation facilitates 53BP1 DNA damage signaling and double-strand break repair. *J Mol Cell Biol* *5*, 157-165.
  - Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G. und Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* *31*, 827-832.
  - Huang, S.Y., Ghosh, S. und Pommier, Y. (2015). Topoisomerase I alone is sufficient to produce short DNA deletions and can also reverse nicks at ribonucleotide sites. *J Biol Chem* *290*, 14068-14076.
  - Huet, J., Wyers, F., Buhler, J.M., Sentenac, A. und Fromageot, P. (1976). Association of RNase H activity with yeast RNA polymerase A. *Nature* *261*, 431-433.
  - Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. und Charpentier, E. (2012).

A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821.

- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E. und Doudna, J. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2, e00471.
- Kassiotis, G. und Stoye, J.P. (2016). Immune responses to endogenous retroelements: taking the bad with the good. *Nat Rev Immunol* 16, 207-219.
- Kauffman, W.M., Sivit, C.J., Fitz, C.R., Rakusan, T.A., Herzog, K. und Chandra, R.S. (1992). CT and MR evaluation of intracranial involvement in pediatric HIV infection: a clinical-imaging correlation. *AJNR Am J Neuroradiol* 13, 949-957.
- Kelly, R.B., Cozzarelli, N.R., Deutscher, M.P., Lehman, I.R. und Kornberg, A. (1970). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXII. Replication of duplex deoxyribonucleic acid by polymerase at a single strand break. *J Biol Chem* 245, 39-45.
- Kennedy, E.M., Amie, S.M., Bambara, R.A. und Kim, B. (2012). Frequent incorporation of ribonucleotides during HIV-1 reverse transcription and their attenuated repair in macrophages. *J Biol Chem* 287, 14280-14288.
- Khazina, E., Truffault, V., Buttner, R., Schmidt, S., Coles, M. und Weichenrieder, O. (2011). Trimeric structure and flexibility of the L1ORF1 protein in human L1 retrotransposition. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1006-1014.
- Kim, N., Huang, S.N., Williams, J.S., Li, Y.C., Clark, A.B., Cho, J.E., Kunkel, T.A., Pommier, Y. und Jinks-Robertson, S. (2011). Mutagenic processing of ribonucleotides in DNA by yeast topoisomerase I. *Science* 332, 1561-1564.
- Kind, B., Muster, B., Staroske, W., Herce, H.D., Sachse, R., Rapp, A., Schmidt, F., Koss, S., Cardoso, M.C. und Lee-Kirsch, M.A. (2014). Altered spatio-temporal dynamics of RNase H2 complex assembly at replication and repair sites in Aicardi-Goutières syndrome. *Hum Mol Genet* 23, 5950-5960.
- Klett, R.P., Cerami, A. und Reich, E. (1968). Exonuclease VI, a new nuclease activity associated with *E. coli* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 60, 943-950.
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K. und Schloss, P.D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 79, 5112-5120.
- Kroutter, E.N., Belancio, V.P., Wagstaff, B.J. und Roy-Engel, A.M. (2009). The RNA

polymerase dictates ORF1 requirement and timing of LINE and SINE retrotransposition. *PLoS Genet* 5, e1000458.

- Kunin, V., Sorek, R. und Hugenholtz, P. (2007). Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol* 8, R61.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lam, E. und Falck-Pedersen, E. (2014). Unabated adenovirus replication following activation of the cGAS/STING-dependent antiviral response in human cells. *J Virol* 88, 14426-14439.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, Y., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P.,

- Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowki, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y.J. und Szustakowki, J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860-921.
- Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* *358*, 15-16.
  - Lebon, P., Badoual, J., Ponsot, G., Goutières, F., Hemeury-Cukier, F. und Aicardi, J. (1988). Intrathecal synthesis of interferon-alpha in infants with progressive familial encephalopathy. *J Neurol Sci* *84*, 201-208.
  - Lee-Kirsch, M.A., Wolf, C. und Gunther, C. (2014). Aicardi-Goutières syndrome: a model disease for systemic autoimmunity. *Clin Exp Immunol* *175*, 17-24.
  - Leppard, J.B. und Champoux, J.J. (2005). Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma* *114*, 75-85.
  - Li, X. und Manley, J.L. (2005). Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell* *122*, 365-378.
  - Li, X., Shu, C., Yi, G., Chaton, C.T., Shelton, C.L., Diao, J., Zuo, X., Kao, C.C., Herr, A.B. und Li, P. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is activated by double-stranded DNA-induced oligomerization. *Immunity* *39*, 1019-1031.
  - Li, Y. und Breaker, R.R. (1999). Kinetics of RNA Degradation by Specific Base Catalysis of Transesterification Involving the 2'-Hydroxyl Group. *J Am Chem Soc* *121*, 5364-

5372.

- Liddicoat, B.J., Chalk, A.M. und Walkley, C.R. (2016). ADAR1, inosine and the immune sensing system: distinguishing self from non-self. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 7, 157-172.
- Liddicoat, B.J., Piskol, R., Chalk, A.M., Ramaswami, G., Higuchi, M., Hartner, J.C., Li, J.B., Seeburg, P.H. und Walkley, C.R. (2015). RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself. *Science* 349, 1115-1120.
- Lilyestrom, W., Klein, M.G., Zhang, R., Joachimiak, A. und Chen, X.S. (2006). Crystal structure of SV40 large T-antigen bound to p53: interplay between a viral oncoprotein and a cellular tumor suppressor. *Genes Dev* 20, 2373-2382.
- Lin, Y.C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., Reumers, J., Moisse, M., Plaisance, S., Drmanac, R., Chen, J., Speleman, F., Lambrechts, D., Van de Peer, Y., Tavernier, J. und Callewaert, N. (2014). Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun* 5, 4767.
- Livak, K.J. und Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Luan, D.D., Korman, M.H., Jakubczak, J.L. und Eickbush, T.H. (1993). Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell* 72, 595-605.
- Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen, R.S., Grofte, M., Chan, K.L., Hickson, I.D., Bartek, J. und Lukas, J. (2011). 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat Cell Biol* 13, 243-253.
- Mackenzie, K.J., Carroll, P., Lettice, L., Tarnauskaite, Z., Reddy, K., Dix, F., Revuelta, A., Abbondati, E., Rigby, R.E., Rabe, B., Kilanowski, F., Grimes, G., Fluteau, A., Devenney, P.S., Hill, R.E., Reijns, M.A. und Jackson, A.P. (2016). Ribonuclease H2 mutations induce a cGAS/STING-dependent innate immune response. *EMBO J* 35, 831-844.
- Maga, G. und Hubscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 116, 3051-3060.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E. und Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339,

823-826.

- Mali, P., Ye, Z., Hommond, H.H., Yu, X., Lin, J., Chen, G., Zou, J. und Cheng, L. (2008). Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells* 26, 1998-2005.
- Malik, H.S. (2005). Ribonuclease H evolution in retrotransposable elements. *Cytogenet Genome Res* 110, 392-401.
- Mallette, F.A., Mattioli, F., Cui, G., Young, L.C., Hendzel, M.J., Mer, G., Sixma, T.K. und Richard, S. (2012). RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *EMBO J* 31, 1865-1878.
- Mandel, M. und Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53, 159-162.
- Mathias, S.L., Scott, A.F., Kazazian, H.H., Jr., Boeke, J.D. und Gabriel, A. (1991). Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science* 254, 1808-1810.
- Mazur, D.J. und Perrino, F.W. (1999). Identification and expression of the TREX1 and TREX2 cDNA sequences encoding mammalian 3'→5' exonucleases. *J Biol Chem* 274, 19655-19660.
- Miller, H.I., Riggs, A.D. und Gill, G.N. (1973). Ribonuclease H (hybrid) in *Escherichia coli*. Identification and characterization. *J Biol Chem* 248, 2621-2624.
- Mita, P. und Boeke, J.D. (2016). How retrotransposons shape genome regulation. *Curr Opin Genet Dev* 37, 90-100.
- Morrish, T.A., Gilbert, N., Myers, J.S., Vincent, B.J., Stamato, T.D., Taccioli, G.E., Batzer, M.A. und Moran, J.V. (2002). DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. *Nat Genet* 31, 159-165.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M. und Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.
- Nick McElhinny, S.A., Kumar, D., Clark, A.B., Watt, D.L., Watts, B.E., Lundstrom, E.B., Johansson, E., Chabes, A. und Kunkel, T.A. (2010a). Genome instability due to ribonucleotide incorporation into DNA. *Nat Chem Biol* 6, 774-781.

- Nick McElhinny, S.A., Watts, B.E., Kumar, D., Watt, D.L., Lundstrom, E.B., Burgers, P.M., Johansson, E., Chabes, A. und Kunkel, T.A. (2010b). Abundant ribonucleotide incorporation into DNA by yeast replicative polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4949-4954.
- Ohtani, N., Haruki, M., Morikawa, M., Crouch, R.J., Itaya, M. und Kanaya, S. (1999). Identification of the genes encoding Mn<sup>2+</sup>-dependent RNase HII and Mg<sup>2+</sup>-dependent RNase HIII from *Bacillus subtilis*: classification of RNases H into three families. *Biochemistry* 38, 605-618.
- Orecchini, E., Doria, M., Antonioni, A., Galardi, S., Ciafre, S.A., Frassinelli, L., Mancone, C., Montaldo, C., Tripodi, M. und Michienzi, A. (2017). ADAR1 restricts LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res* 45, 155-168.
- Ostertag, E.M., Prak, E.T., DeBerardinis, R.J., Moran, J.V. und Kazazian, H.H., Jr. (2000). Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells. *Nucleic Acids Res* 28, 1418-1423.
- Pardo, B., Gomez-Gonzalez, B. und Aguilera, A. (2009). DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* 66, 1039-1056.
- Penzkofer, T., Jäger, M., Figlerowicz, M., Badge, R., Mundlos, S., Robinson, P.N. und Zemojtel, T. (2016). L1Base 2: more retrotransposition-active LINE-1s, more mammalian genomes. *Nucleic Acids Res* 45, D68-d73.
- Piskareva, O. und Schmatchenko, V. (2006). DNA polymerization by the reverse transcriptase of the human L1 retrotransposon on its own template in vitro. *FEBS Lett* 580, 661-668.
- Pizzi, S., Sertic, S., Orcesi, S., Cereda, C., Bianchi, M., Jackson, A.P., Lazzaro, F., Plevani, P. und Muzi-Falconi, M. (2015). Reduction of hRNase H2 activity in Aicardi-Goutières syndrome cells leads to replication stress and genome instability. *Hum Mol Genet* 24, 649-658.
- Pokatayev, V., Hasin, N., Chon, H., Cerritelli, S.M., Sakhuja, K., Ward, J.M., Morris, H.D., Yan, N. und Crouch, R.J. (2016). RNase H2 catalytic core Aicardi-Goutières syndrome-related mutant invokes cGAS-STING innate immune-sensing pathway in mice. *J Exp Med* 213, 329-336.
- Rabe, B. (2013). Aicardi-Goutières syndrome: clues from the RNase H2 knock-out

- mouse. *J Mol Med (Berl)* 91, 1235-40.
- Ramantani, G., Kohlhase, J., Hertzberg, C., Innes, A.M., Engel, K., Hunger, S., Borozdin, W., Mah, J.K., Ungerath, K., Walkenhorst, H., Richardt, H.H., Buckard, J., Bevot, A., Siegel, C., von Stulpnagel, C., Ikonomidou, C., Thomas, K., Proud, V., Niemann, F., Wiczorek, D., Hausler, M., Niggemann, P., Baltaci, V., Conrad, K., Lebon, P. und Lee-Kirsch, M.A. (2010). Expanding the phenotypic spectrum of lupus erythematosus in Aicardi-Goutières syndrome. *Arthritis Rheum* 62, 1469-1477.
  - Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A. und Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8, 2281-2308.
  - Reijns, M.A., Bubeck, D., Gibson, L.C., Graham, S.C., Baillie, G.S., Jones, E.Y. und Jackson, A.P. (2011). The structure of the human RNase H2 complex defines key interaction interfaces relevant to enzyme function and human disease. *J Biol Chem* 286, 10530-10539.
  - Reijns, M.A. und Jackson, A.P. (2014). Ribonuclease H2 in health and disease. *Biochem Soc Trans* 42, 717-725.
  - Reijns, M.A., Rabe, B., Rigby, R.E., Mill, P., Astell, K.R., Lettice, L.A., Boyle, S., Leitch, A., Keighren, M., Kilanowski, F., Devenney, P.S., Sexton, D., Grimes, G., Holt, I.J., Hill, R.E., Taylor, M.S., Lawson, K.A., Dorin, J.R. und Jackson, A.P. (2012). Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development. *Cell* 149, 1008-1022.
  - Reljic, B. und Stroud, D.A. (2016). Screening Strategies for TALEN-Mediated Gene Disruption. *Methods Mol Biol* 1419, 231-252.
  - Rice, G., Patrick, T., Parmar, R., Taylor, C.F., Aeby, A., Aicardi, J., Artuch, R., Montalto, S.A., Bacino, C.A., Barroso, B., Baxter, P., Benko, W.S., Bergmann, C., Bertini, E., Biancheri, R., Blair, E.M., Blau, N., Bonthron, D.T., Briggs, T., Brueton, L.A., Brunner, H.G., Burke, C.J., Carr, I.M., Carvalho, D.R., Chandler, K.E., Christen, H.J., Corry, P.C., Cowan, F.M., Cox, H., D'Arrigo, S., Dean, J., De Laet, C., De Praeter, C., Dery, C., Ferrie, C.D., Flintoff, K., Frints, S.G., Garcia-Cazorla, A., Gener, B., Goizet, C., Goutières, F., Green, A.J., Guet, A., Hamel, B.C., Hayward, B.E., Heiberg, A., Hennekam, R.C., Husson, M., Jackson, A.P., Jayatunga, R., Jiang, Y.H., Kant, S.G., Kao, A., King, M.D., Kingston, H.M., Klepper, J., van der Knaap, M.S., Kornberg, A.J., Kotzot, D., Kratzer, W., Lacombe, D., Lagae, L., Landrieu, P.G., Lanzi, G., Leitch, A., Lim, M.J., Livingston, J.H., Lourenco,

- C.M., Lyall, E.G., Lynch, S.A., Lyons, M.J., Marom, D., McClure, J.P., McWilliam, R., Melancon, S.B., Mewasingh, L.D., Moutard, M.L., Nischal, K.K., Ostergaard, J.R., Prendiville, J., Rasmussen, M., Rogers, R.C., Roland, D., Rosser, E.M., Rostasy, K., Roubertie, A., Sanchis, A., Schiffmann, R., Scholl-Burgi, S., Seal, S., Shalev, S.A., Corcoles, C.S., Sinha, G.P., Soler, D., Spiegel, R., Stephenson, J.B., Tacke, U., Tan, T.Y., Till, M., Tolmie, J.L., Tomlin, P., Vagnarelli, F., Valente, E.M., Van Coster, R.N., Van der Aa, N., Vanderver, A., Vles, J.S., Voit, T., Wassmer, E., Weschke, B., Whiteford, M.L., Willemsen, M.A., Zankl, A., Zuberi, S.M., Orcesi, S., Fazzi, E., Lebon, P. und Crow, Y.J. (2007). Clinical and molecular phenotype of Aicardi-Goutières Syndrome. *Am J Hum Genet* 81, 713-725.
- Rice, G.I., Bond, J., Asipu, A., Brunette, R.L., Manfield, I.W., Carr, I.M., Fuller, J.C., Jackson, R.M., Lamb, T., Briggs, T.A., Ali, M., Gornall, H., Couthard, L.R., Aeby, A., Attard-Montalto, S.P., Bertini, E., Bodemer, C., Brockmann, K., Brueton, L.A., Corry, P.C., Desguerre, I., Fazzi, E., Cazorla, A.G., Gener, B., Hamel, B.C., Heiberg, A., Hunter, M., van der Knaap, M.S., Kumar, R., Lagae, L., Landrieu, P.G., Lourenco, C.M., Marom, D., McDermott, M.F., van der Merwe, W., Orcesi, S., Prendiville, J.S., Rasmussen, M., Shalev, S.A., Soler, D.M., Shinawi, M., Spiegel, R., Tan, T.Y., Vanderver, A., Wakeling, E.L., Wassmer, E., Whittaker, E., Lebon, P., Stetson, D.B., Bonthron, D.T. und Crow, Y.J. (2009). Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response. *Nat Genet* 41, 829-832.
  - Rice, G.I., Del Toro Duany, Y., Jenkinson, E.M., Forte, G.M., Anderson, B.H., Ariaudo, G., Bader-Meunier, B., Baidam, E.M., Battini, R., Beresford, M.W., Casarano, M., Chouchane, M., Cimaz, R., Collins, A.E., Cordeiro, N.J., Dale, R.C., Davidson, J.E., De Waele, L., Desguerre, I., Faivre, L., Fazzi, E., Isidor, B., Lagae, L., Latchman, A.R., Lebon, P., Li, C., Livingston, J.H., Lourenco, C.M., Mancardi, M.M., Masurel-Paulet, A., McInnes, I.B., Menezes, M.P., Mignot, C., O'Sullivan, J., Orcesi, S., Picco, P.P., Riva, E., Robinson, R.A., Rodriguez, D., Salvatici, E., Scott, C., Szybowska, M., Tolmie, J.L., Vanderver, A., Vanhulle, C., Vieira, J.P., Webb, K., Whitney, R.N., Williams, S.G., Wolfe, L.A., Zuberi, S.M., Hur, S. und Crow, Y.J. (2014). Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling. *Nat Genet* 46, 503-9.
  - Rice, G.I., Forte, G.M., Szykiewicz, M., Chase, D.S., Aeby, A., Abdel-Hamid, M.S.,

- Ackroyd, S., Allcock, R., Bailey, K.M., Balottin, U., Barnerias, C., Bernard, G., Bodemer, C., Botella, M.P., Cereda, C., Chandler, K.E., Dabydeen, L., Dale, R.C., De Laet, C., De Goede, C.G., Del Toro, M., Effat, L., Enamorado, N.N., Fazzi, E., Gener, B., Haldre, M., Lin, J.P., Livingston, J.H., Lourenco, C.M., Marques, W., Jr., Oades, P., Peterson, P., Rasmussen, M., Roubertie, A., Schmidt, J.L., Shalev, S.A., Simon, R., Spiegel, R., Swoboda, K.J., Temtamy, S.A., Vassallo, G., Vilain, C.N., Vogt, J., Wermenbol, V., Whitehouse, W.P., Soler, D., Olivieri, I., Orcesi, S., Aglan, M.S., Zaki, M.S., Abdel-Salam, G.M., Vanderver, A., Kisand, K., Rozenberg, F., Lebon, P. und Crow, Y.J. (2013). Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutières syndrome associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, and ADAR: a case-control study. *Lancet Neurol* 12, 1159-1169.
- Rice, G.I., Kasher, P.R., Forte, G.M., Mannion, N.M., Greenwood, S.M., Szykiewicz, M., Dickerson, J.E., Bhaskar, S.S., Zampini, M., Briggs, T.A., Jenkinson, E.M., Bacino, C.A., Battini, R., Bertini, E., Brogan, P.A., Brueton, L.A., Carpanelli, M., De Laet, C., de Lonlay, P., del Toro, M., Desguerre, I., Fazzi, E., Garcia-Cazorla, A., Heiberg, A., Kawaguchi, M., Kumar, R., Lin, J.P., Lourenco, C.M., Male, A.M., Marques, W., Jr., Mignot, C., Olivieri, I., Orcesi, S., Prabhakar, P., Rasmussen, M., Robinson, R.A., Rozenberg, F., Schmidt, J.L., Steindl, K., Tan, T.Y., van der Merwe, W.G., Vanderver, A., Vassallo, G., Wakeling, E.L., Wassmer, E., Whittaker, E., Livingston, J.H., Lebon, P., Suzuki, T., McLaughlin, P.J., Keegan, L.P., O'Connell, M.A., Lovell, S.C. und Crow, Y.J. (2012). Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature. *Nat Genet* 44, 1243-1248.
  - Rice, G.I., Rodero, M.P. und Crow, Y.J. (2015). Human disease phenotypes associated with mutations in TREX1. *J Clin Immunol* 35, 235-243.
  - Robinson, J.T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G. und Mesirov, J.P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29, 24-26.
  - Rossi, M.L. und Bambara, R.A. (2006). Reconstituted Okazaki fragment processing indicates two pathways of primer removal. *J Biol Chem* 281, 26051-26061.
  - Roy, A.M., Carroll, M.L., Kass, D.H., Nguyen, S.V., Salem, A.H., Batzer, M.A. und Deininger, P.L. (1999). Recently integrated human Alu repeats: finding needles in the haystack. *Genetica* 107, 149-161.
  - Rychlik, M.P., Chon, H., Cerritelli, S.M., Klimek, P., Crouch, R.J. und Nowotny, M.

- (2010). Crystal structures of RNase H2 in complex with nucleic acid reveal the mechanism of RNA-DNA junction recognition and cleavage. *Mol Cell* *40*, 658-670.
- Rydberg, B. und Game, J. (2002). Excision of misincorporated ribonucleotides in DNA by RNase H (type 2) and FEN-1 in cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci USA* *99*, 16654-16659.
  - Ryoo, J., Choi, J., Oh, C., Kim, S., Seo, M., Kim, S.Y., Seo, D., Kim, J., White, T.E., Brandariz-Nunez, A., Diaz-Griffero, F., Yun, C.H., Hollenbaugh, J.A., Kim, B., Baek, D. und Ahn, K. (2014). The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nat Med* *20*, 936-941.
  - Sabharwal, R., Verma, P., Syed, M.A., Sharma, T., Subudhi, S.K., Mohanty, S. und Gupta, S. (2015). Emergence of micronuclei as a genomic biomarker. *Indian J Med Paediatr Oncol* *36*, 212-218.
  - Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
  - Samuels, D.C., Han, L., Li, J., Quangu, S., Clark, T.A., Shyr, Y. und Guo, Y. (2013). Finding the lost treasures in exome sequencing data. *Trends Genet* *29*, 593-599.
  - Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* *74*, 5463-5467.
  - Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. und Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* *63*, 1129-1136.
  - Schwarz, E., Freese, U.K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. und zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* *314*, 111-114.
  - Sekiguchi, J. und Shuman, S. (1997). Site-specific ribonuclease activity of eukaryotic DNA topoisomerase I. *Mol Cell* *1*, 89-97.
  - Sen, S.K., Huang, C.T., Han, K. und Batzer, M.A. (2007). Endonuclease-independent insertion provides an alternative pathway for L1 retrotransposition in the human genome. *Nucleic Acids Res* *35*, 3741-3751.
  - Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D. und Malim, M.H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* *418*, 646-650.

- 
- Sparks, J.L., Chon, H., Cerritelli, S.M., Kunkel, T.A., Johansson, E., Crouch, R.J. und Burgers, P.M. (2012). RNase H2-initiated ribonucleotide excision repair. *Mol Cell* 47, 980-986.
  - Speek, M. (2001). Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes. *Mol Cell Biol* 21, 1973-1985.
  - Stein, H. und Hausen, P. (1969). Enzyme from calf thymus degrading the RNA moiety of DNA-RNA Hybrids: effect on DNA-dependent RNA polymerase. *Science* 166, 393-395.
  - Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C. und Doudna, J.A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507, 62-67.
  - Stetson, D.B. (2012). Endogenous retroelements and autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 24, 692-697.
  - Stetson, D.B., Ko, J.S., Heidmann, T. und Medzhitov, R. (2008). Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* 134, 587-598.
  - Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. und Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 339, 786-791.
  - Swergold, G.D. (1990). Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol Cell Biol* 10, 6718-6729.
  - Szak, S.T., Pickeral, O.K., Makalowski, W., Boguski, M.S., Landsman, D. und Boeke, J.D. (2002). Molecular archeology of L1 insertions in the human genome. *Genome Biol* 3, research0052.
  - Tan, F.C., Hutchison, E.R., Eitan, E. und Mattson, M.P. (2014). Are there roles for brain cell senescence in aging and neurodegenerative disorders? *Biogerontology* 15, 643-660.
  - Taylor, M.S., LaCava, J., Mita, P., Molloy, K.R., Huang, C.R., Li, D., Adney, E.M., Jiang, H., Burns, K.H., Chait, B.T., Rout, M.P., Boeke, J.D. und Dai, L. (2013). Affinity proteomics reveals human host factors implicated in discrete stages of LINE-1 retrotransposition. *Cell* 155, 1034-1048.
  - Terradas, M., Martin, M., Tusell, L. und Genesca, A. (2009). DNA lesions sequestered in micronuclei induce a local defective-damage response. *DNA Repair (Amst)* 8, 1225-1234.

- 
- Terradas, M., Martin, M., Tusell, L. und Genesca, A. (2010). Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutat Res* 705, 60-67.
  - Thompson, P.J., Macfarlan, T.S. und Lorincz, M.C. (2016). Long Terminal Repeats: From Parasitic Elements to Building Blocks of the Transcriptional Regulatory Repertoire. *Mol Cell* 62, 766-776.
  - Tolmie, J.L., Shillito, P., Hughes-Benzie, R. und Stephenson, J.B. (1995). The Aicardi-Goutières syndrome (familial, early onset encephalopathy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis). *J Med Genet* 32, 881-884.
  - Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354.
  - Utani, K., Kohno, Y., Okamoto, A. und Shimizu, N. (2010). Emergence of micronuclei and their effects on the fate of cells under replication stress. *PLoS One* 5, e10089.
  - Van Heteren, J.T., Rozenberg, F., Aronica, E., Troost, D., Lebon, P. und Kuijpers, T.W. (2008). Astrocytes produce interferon-alpha and CXCL10, but not IL-6 or CXCL8, in Aicardi-Goutières Syndrome. *Glia* 56, 568-578.
  - Viollet, S., Monot, C. und Cristofari, G. (2014). L1 retrotransposition: The snap-velcro model and its consequences. *Mob Genet Elements* 4, e28907.
  - Volkman, H.E. und Stetson, D.B. (2014). The enemy within: endogenous retroelements and autoimmune disease. *Nat Immunol* 15, 415-422.
  - Wang, J., Huang, S., Xing, L., Cui, J., Tian, Z., Shen, H., Jiang, X., Yan, X., Wang, J. und Zhang, X. (2015). Sterigmatocystin induces G1 arrest in primary human esophageal epithelial cells but induces G2 arrest in immortalized cells: key mechanistic differences in these two models. *Arch Toxicol* 89, 2015-2025.
  - Weber, K., Bartsch, U., Stocking, C. und Fehse, B. (2008). A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther* 16, 698-706.
  - Wei, W., Gilbert, N., Ooi, S.L., Lawler, J.F., Ostertag, E.M., Kazazian, H.H., Boeke, J.D. und Moran, J.V. (2001). Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. *Mol Cell Biol* 21, 1429-1439.
  - Werness, B.A., Levine, A.J. und Howley, P.M. (1990). Association of human papilloma-

- virus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* *248*, 76-79.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S.H. und Doudna, J.A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* *482*, 331-338.
  - Wildschutte, J.H., Williams, Z.H., Montesion, M., Subramanian, R.P., Kidd, J.M. und Coffin, J.M. (2016). Discovery of unfixed endogenous retrovirus insertions in diverse human populations. *Proc Natl Acad Sci USA* *113*, E2326-2334.
  - Williams, A.B. und Schumacher, B. (2016). p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb Perspect Med* *6*.
  - Williams, J.S., Clausen, A.R., Lujan, S.A., Marjavaara, L., Clark, A.B., Burgers, P.M., Chabes, A. und Kunkel, T.A. (2015). Evidence that processing of ribonucleotides in DNA by topoisomerase 1 is leading-strand specific. *Nat Struct Mol Biol* *22*, 291-297.
  - Wimmer, K., Callens, T., Wernstedt, A. und Messiaen, L. (2011). The NF1 gene contains hotspots for L1 endonuclease-dependent de novo insertion. *PLoS Genet* *7*, e1002371.
  - Xie, Y., Rosser, J.M., Thompson, T.L., Boeke, J.D. und An, W. (2011). Characterization of L1 retrotransposition with high-throughput dual-luciferase assays. *Nucleic Acids Res* *39*, e16.
  - Yan, N., Regalado-Magdos, A.D., Stiggelbout, B., Lee-Kirsch, M.A. und Lieberman, J. (2010). The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nat Immunol* *11*, 1005-1013.
  - Yang, Y.G., Lindahl, T. und Barnes, D.E. (2007). Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell* *131*, 873-886.
  - Yoder, J.A., Walsh, C.P. und Bestor, T.H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* *13*, 335-340.
  - Yu, A.M. und McVey, M. (2010). Synthesis-dependent microhomology-mediated end joining accounts for multiple types of repair junctions. *Nucleic Acids Res* *38*, 5706-5717.
  - Yuan, F., Dutta, T., Wang, L., Song, L., Gu, L., Qian, L., Benitez, A., Ning, S., Malhotra, A., Deutscher, M.P. und Zhang, Y. (2015). Human DNA Exonuclease TREX1 Is Also an Exoribonuclease That Acts on Single-stranded RNA. *J Biol Chem* *290*, 13344-13353.
  - Zhang, S., Li, L., Kendrick, S.L., Gerard, R.D. und Zhu, H. (2014). TALEN-mediated somatic mutagenesis in murine models of cancer. *Cancer Res* *74*, 5311-5321.

- Zhao, K., Du, J., Han, X., Goodier, J.L., Li, P., Zhou, X., Wei, W., Evans, S.L., Li, L., Zhang, W., Cheung, L.E., Wang, G., Kazazian, H.H., Jr. und Yu, X.F. (2013). Modulation of LINE-1 and Alu/SVA retrotransposition by Aicardi-Goutières syndrome-related SAMHD1. *Cell Rep* 4, 1108-1115.

---

## 11 Anhang

### 11.1 Sequenzdaten der CRISPR-Cas9-Plasmide

#### 11.1.1 LeGO-Cas9-guide#1: U6-Promotor-*protospacer*-tracrRNA

TTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATT  
TGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAG  
TTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCG  
ATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGACACGGACTTTGTCCGGCTGTTTT  
AGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG  
TCGGTGCTTTTTTCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTCGCTTACGAGATTCCAGCAGGTCGA  
GGGACCTAATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATATTAAGGGTTCCAAGCTTAAGCG  
GCCGGCCGC

#### 11.1.2 LeGO-Cas9-guide#3: U6-Promotor-*protospacer*-tracrRNA

TTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATT  
TGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAG  
TTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCG  
ATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGCGTTCCAGGAAATATCGGTGTTTT  
AGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG  
TCGGTGCTTTTTTCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTCGCTTACGAGATTCCAGCAGGTCGA  
GGGACCTAATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATATTAAGGGTTCCAAGCTTAAGCG  
GCCGGCCGC

#### 11.1.3 LeGO-Cas9-guide#4: U6-Promotor-*protospacer*-tracrRNA

TTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATT  
TGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAG  
TTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCG  
ATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGCTCCTTGCGGCACACCGCGTTTT  
AGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG  
TCGGTGCTTTTTTCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTCGCTTACGAGATTCCAGCAGGTCGA

---

GGGACCTAATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATATTAAGGGTCCAAGCTTAAGCG  
GCCGGCCGC

## 11.2 Klonierung und Sequenzdaten von LeGO-H2A-eGFP

### 11.2.1 Klonierung

Für die Erzeugung einer murinen RNASEH2A-Indikator-Zelllinie wurde ein lentiviral nutzbarer Vektor generiert, der die Expression eines *RNASEH2A-eGFP*-Fusionskonstrukts erlaubt. Als Grundgerüst wurde das LeGO-iG2-Transferplasmid verwendet, welches freundlicherweise von Prof. Dr. Boris Fehse zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Vektor besitzt einen Polylinker („multiple cloning site“, MCS), der zwischen einen SFFV-Promotor und eine *IRES-eGFP*-Kassette geschaltet ist (Weber *et al.*, 2008). Da bei der Verwendung einer internen ribosomalen Eintrittsstelle die Translation des nachgeschalteten Gens unabhängig von dem sich 5′-befindlichen Zielgen initiiert wird und somit der *knockout* des *RNASEH2A*-Gens keinen Effekt auf die Fluoreszenz gezeigt hätte, musste die *IRES*-Sequenz aus dem Vektor entfernt werden. Dies wurde durch die enzymatische Hydrolyse des Vektors mit den Restriktionsendonukleasen *NotI* und *MscI* erreicht (siehe Kapitel 2.2.1.7, Seite 41). Anschließend wurden die Fragmente gelelektrophoretisch separiert und das Vektorgrundgerüst aus dem Agarosegel extrahiert (siehe Kapitel 2.2.1.11 bis 2.2.1.12, Seite 43).

Als Matrize für die Vervielfältigung der humanen *RNASEH2A*-Sequenz mittels Polymerasekettenreaktion (siehe Kapitel 2.2.1.4, Seite 38) diente das Plasmid pcDNA4TO-H2A-3xflag (Jessica Schneider, Universität Kiel, Institut für Biochemie). Die dazu verwendeten Oligonukleotide Ind\_H2A-F und Ind\_H2A-R2 besaßen ihrerseits die Erkennungssequenzen der oben genannten Enzyme und ermöglichten damit die gezielte Klonierung des *RNASEH2A-eGFP*-Fusionskonstrukts. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde mit Hilfe von Silicagel-Membran-Säulen aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.1.6, Seite 40) und anschließend mit *NotI* und *MscI* hydrolysiert. Die DNA wurden abermals über Säulen gereinigt und Vektor und Zielgen miteinander ligiert (siehe Kapitel 2.2.1.10, Seite 42). Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* Bakterien transformiert (siehe Kapitel 2.2.1.13, Seite 43), das Zielgen *RNASEH2A* via *colony*-PCR nachgewiesen und die Plasmid-DNA des fertigen Konstrukts LeGO-H2A-eGFP aus den Bakterien isoliert (siehe Kapitel 2.2.1.2, Seite 36). Die Korrektheit des *RNASEH2A*-

*eGFP*-Fusionsgens wurde mittels Sanger-Sequenzierung (siehe Kapitel 2.2.1.18, Seite 47) unter Verwendung der Oligonukleotide Ind\_H2A-F und Ind\_H2A-R2 nachgewiesen.

### 11.2.2 Sequenzdaten von LeGO-H2A-eGFP: SFFV-Promotor-*RNASEH2A-eGFP*

TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTGCAGTAACGCCATTTTCAAGGCATGGAAA  
AATACCAAACCAAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGGCGGGTACATGAAAATAGCTAACGTTGG  
GCCAAACAGGATATCTGCGGTGAGCAGTTTCGGCCCCGGCCGGGGCCAAGAACAGATGGTCAC  
CGCAGTTTCGGCCCCGGCCGAGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATATGGCCCAACCCTCAGC  
AGTTTCTTAAGACCCATCAGATGTTTCCAGGCTCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGCGCCTTAT  
TTGAATTAACCAATCAGCCTGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTTCCCGAGCTCTATAAAA  
GAGCTCACAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGATCCCAGTGT  
GGTGGTACGGGAATTCCTGCAGGCCTCGACGAGGGCCGGCGCGCCGCGGCCGCATGGATCTCA  
GCGAGCTGGAGAGAGACAATACAGGCCGCTGTCGCTGAGTTCGCCTGTGCCCGCGGTGTGCCG  
CAAGGAGCCTTGCGTCCTGGGCGTCGATGAGGCGGGCAGGGGCCCGTGTGGGCCCCATGGT  
CTACGCCATCTGTTATTGTCCCCTGCCTCGCCTGGCAGATCTGGAGGCGCTGAAAGTGGCAGACT  
CAAAGACCCTATTGGAGAGCGAGCGGAAAGGCTGTTTTCGAAAATGGAGGACACGGACTTTGT  
CGGCTGGGCGCTGGATGTGCTGTCTCCAAACCTCATCTCTACCAGCATGCTTGGGCGGGTCAAAT  
ACAACCTGAACTCCCTGTCACATGATACAGCCACTGGGCTTATACAGTATGCATTGGACCAGGGC  
GTGAACGTCACCCAGGTATTCGTGGACACCGTAGGGATGCCAGAGACATAACCAGGCGCGGCTGC  
AGCAAAGTTTTCCCGGATTGAGGTGACGGTCAAGGCCAAAGCAGATGCCCTCTACCCGGTGGT  
TAGTGCTGCCAGCATCTGTGCCAAGGTGGCCCGGGACCAGGCCGTGAAGAAATGGCAGTTCGTG  
GAGAAACTGCAGGACTTGGATACTGATTATGGCTCAGGCTACCCCAATGATCCAAGACAAAAGC  
GTGGTTGAAGGAGCACGTGGAGCCTGTGTTTCGGCTTCCCCAGTTTGTCCGGTTCAGCTGGCGCA  
CGGCCAGACCATCCTGGAGAAAGAGGCGGAAGATGTTATATGGGAGGACTCAGCATCCGAGA  
ATCAGGAGGGACTCAGGAAGATCACATCCTACTTCTCAATGAAGGGTCCAAGCCCGTCCCCGT  
TCTTCCCACCGATATTTCTGGAACGCGGCCTGGAGTCAGCAACCAGCCTGGCCACAACCATGGT  
GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGT  
AAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGAC  
CCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGAC  
CTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCG  
CCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACC  
CGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACT

---

```
TCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTA
TATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAG
GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGGCAGCGGCCCGTGC
TGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGC
GATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTA
CAAGTAA
```

### 11.3 Klonierung und Sequenzdaten von Ef1 $\alpha$ -RNaseH1-3xflag(C) und Ef1 $\alpha$ -H2A-IRES-puro

#### 11.3.1 Klonierung

Zur lentiviralen Rekonstituierung von RNASEH2A-defizienten Zellen wurden die beiden Transferplasmide Ef1 $\alpha$ -H2A-IRES-puro sowie Ef1 $\alpha$ -RNaseH1-3xflag(C) generiert, welche das *RNASEH2A*-Gen bzw. das Gen für die nukleäre Isoform der RNASEH1 codieren. Für die Klonierung von Ef1 $\alpha$ -RNaseH1-3xflag(C) musste zunächst ein C-terminales *flag*-Epitop an die *RNASEH1*-Sequenz angefügt werden, da kein spezifischer Antikörper für das Protein vorlag. Daher wurde das Gen zunächst unter Verwendung der Oligonukleotide HindIII-RNaseH1-F und RNaseH1-NotI-R sowie aus 293T-Zellen gewonnener cDNA als Matrize amplifiziert (siehe Kapitel 2.2.1.4, Seite 38, und Kapitel 2.2.1.14 bis 2.2.1.15, Seite 44 bis 45). Das amplifizierte PCR-Produkt wurde mit Hilfe von Silicagel-Membran-Säulen aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.1.6, Seite 40) und anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *NotI* hydrolysiert, ebenso wie der Vektor pcDNA4TO-H2A-3xflag (siehe Kapitel 2.2.1.7, Seite 41). Anschließend wurden beide Hydrolyseprodukte gelelektrophoretisch separiert und das Vektorgrundgerüst sowie das Transgen aus dem Agarosegel extrahiert (siehe Kapitel 2.2.1.12, Seite 43). Die Ligation von Vektor und Zielgen resultierte in der Generierung des Expressionsvektors pcDNA4TO-RNase H1-3xflag (siehe Kapitel 2.2.1.10, Seite 42). Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* Bakterien transformiert (siehe Kapitel 2.2.1.13, Seite 43), das Zielgen via *colony*-PCR nachgewiesen und die Plasmid-DNA des fertigen Konstrukts aus den Bakterien isoliert (siehe Kapitel 2.2.1.2, Seite 36).

Das so erzeugte *RNASEH1-3xflag*-Konstrukt wurde für die Generierung des Transferplasmids Ef1 $\alpha$ -RNaseH1-3xflag(C) mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide EcoRI-

RNaseH1-F und CflagSTOP-EcoRI-R amplifiziert, welche *EcoRI*-Erkennungssequenzen enthielten. Für die Klonierung von Ef1 $\alpha$ -H2A-IRES-puro hingegen wurden die Oligonukleotide H2A-EcoRI-F und H2Astop-EcoRI-R1 und das Plasmid pcDNA4TO-H2A-3xflag (Jessica Schneider, Universität Kiel, Institut für Biochemie) als Matrize verwendet und so die humane *RNASEH2A*-Sequenz amplifiziert. Dabei wurde jedoch das C-terminale *flag*-Epitop nicht bei der Amplifikation berücksichtigt. Stattdessen wurde die *RNASEH2A*-Sequenz mit einem Stopp-Codon sowie den für die Klonierung erforderlichen Erkennungssequenzen der Restriktionsendonuklease *EcoRI* versehen. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit Hilfe von Silicagel-Membran-Säulen aufgereinigt und anschließend mit *EcoRI* hydrolysiert.

Der für die Klonierung vorgesehene Endvektor Ef1 $\alpha$ \_Large T-antigen\_Ires\_Puro wurde über die Plattform *addgene* bezogen. Auch er wurde unter Verwendung von *EcoRI* enzymatisch hydrolysiert. Anschließend wurden sämtliche Hydrolyseprodukte gelelektrophoretisch separiert und das Vektorgrundgerüst sowie die Transgene aus dem Agarosegel extrahiert. Bedingt durch die Hydrolyse wurde der Vektor an zwei Seiten geöffnet und das Gen für das *Large T-antigen* entfernt. Die Ligation von Vektor und Zielgenen resultierte in der Generierung der lentiviral nutzbaren Transferplasmide Ef1 $\alpha$ -H2A-IRES-puro und Ef1 $\alpha$ -RNaseH1-3xflag(C). Beide Ligationsansätze wurden in *E. coli* Bakterien transformiert, die Zielgene *RNASEH2A* bzw. *RNASEH1* via *colony*-PCR nachgewiesen und die Plasmid-DNA der fertigen Konstrukte aus den Bakterien isoliert. Die Korrektheit der Plasmide wurde mittels Sanger-Sequenzierung (siehe Kapitel 2.2.1.18, Seite 47) unter Verwendung des Oligonukleotids Ef1a\_Seq-F nachgewiesen. Die fertigen Plasmide wurden für die lentivirale Transduktion von 293T-*knockout*-Zellen verwendet (siehe Kapitel 2.2.3.7, Seite 55).

### 11.3.2 Sequenzdaten von Ef1 $\alpha$ -H2A-IRES-puro: Ef1a-Promotor-*RNASEH2A*

```
GTGCCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCG
GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACT
GGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGT
TCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTG
GCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTACTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTC
TTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCC
TTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCTGCGAATCTGGTGG
```

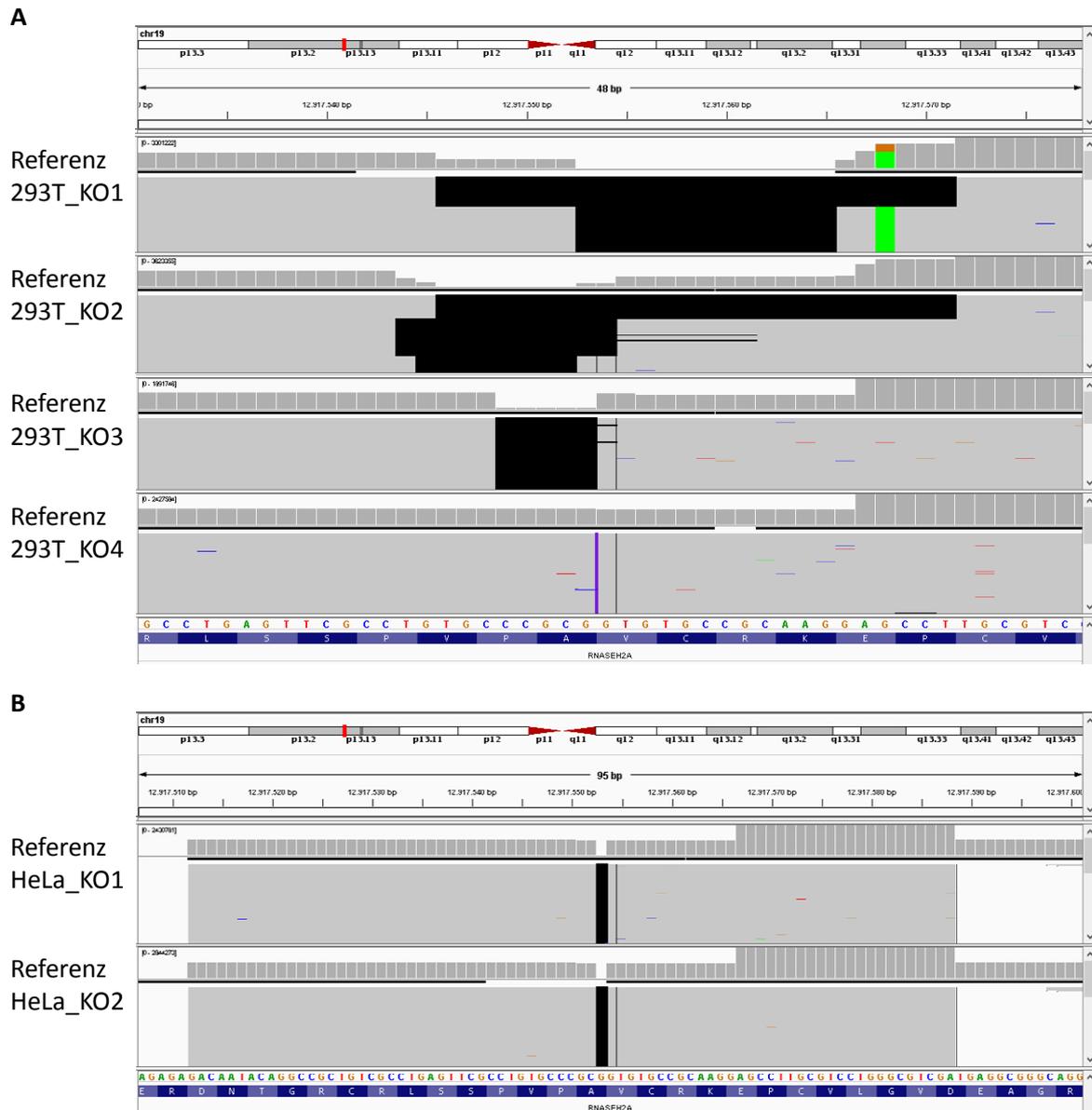
CACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTG  
CGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGG  
TTTTTGGGGCCGCGGGCGGGGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGG  
GCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGT  
GCCTGGCCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCA  
GTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGC  
GGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAG  
CCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGC  
TTTTGGAGTACGTGCTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGA  
GTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAAATTTGCCTTTT  
TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAG  
GTGTCGTGAGGAATTAGCTTGGTACTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGGTA  
AGCTTGATATCGAATTCATGGATCTCAGCGAGCTGGAGAGAGACAATACAGGCCGCTGTCGCCT  
GAGTTCGCCTGTGCCCCGGGTGTGCCGCAAGGAGCCTTGCCTCCTGGGCGTCGATGAGGCGGGC  
AGGGGCCCCGTGCTGGGCCCCATGGTCTACGCCATCTGTTATTGTCCCCTGCCTCGCCTGGCAGA  
TCTGGAGGCGCTGAAAGTGGCAGACTCAAAGACCCTATTGGAGAGCGAGCGGGAAAGGCTGTTT  
GCGAAAATGGAGGACACGGACTTTGTCGGCTGGGCGCTGGATGTGCTGTCTCCAAACCTCATCTC  
TACCAGCATGCTTGGGCGGGTCAAATACAACCTGAACTCCCTGTCACATGATACAGCCACTGGGC  
TTATACAGTATGCATTGGACCAGGGCGTGAACGTCACCCAGGTATTCGTGGACACCGTAGGGAT  
GCCAGAGACATAACCAGGCGGGCTGCAGCAAAGTTTTCCCGGATTGAGGTGACGGTCAAGGCC  
AAAGCAGATGCCCTCTACCCGGTGGTTAGTGCTGCCAGCATCTGTGCCAAGGTGGCCCCGGGACC  
AGGCCGTGAAGAAATGGCAGTTCGTGGAGAACTGCAGGACTTGGATACTGATTATGGCTCAGG  
CTACCCCAATGATCCCAAGACAAAAGCGTGGTTGAAGGAGCACGTGGAGCCTGTGTTTCGGCTTCC  
CCCAGTTTGTCCGGTTCAGCTGGCGCACGGCCAGACCATCCTGGAGAAAGAGGCGGAAGATGT  
TATATGGGAGGACTCAGCATCCGAGAATCAGGAGGGACTCAGGAAGATCACATCCTACTTCCTCA  
ATGAAGGGTCCCAAGCCCGTCCCCGTTCTCCACCGATATTTCTGGAACGCGGCCTGGAGTCA  
GCAACCAGCCTCTAG

### 11.3.3 Sequenzdaten von Ef1 $\alpha$ -RNaseH1-3xflag(C): Ef1a-Promotor-*RNASEH1-3xflag*

GTGCCCCTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCG  
GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACT

GGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGT  
TCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTG  
GCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGTCCTGAATTAATCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTC  
TTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCC  
TTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCTGCGAATCTGGTGG  
CACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTG  
CGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGG  
TTTTTGGGGCCCGGGCGGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGG  
GCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGT  
GCCTGGCCTCGCGCCCGCTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGTTCGGCACCA  
GTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGC  
GGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAG  
CCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGC  
TTTTGGAGTACGTGCTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGA  
GTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTT  
TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTAG  
GTGTCGTGAGGAATTAGCTTGGTACTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGGTA  
AGCTTGATATCGAATTCATGTTCTATGCCGTGAGGAGGGGCCGAAGACCGGGGTCTTTCTGACC  
TGGAATGAGTGCAGAGCACAGGTGGACCGGTTTCTGCTGCCAGATTTAAGAAGTTTGCCACAG  
AGGATGAGGCCTGGGCCTTTGTCAGGAAATCTGCAAGCCCGGAAGTTTCAAGAGGGCATGAAAA  
TCAACATGGACAAGAATCGGAGGCGAAAGCCAGCAAGCGACTCCGTGAGCCACTGGATGGAGA  
TGACATGAAAGCGCAGAGCCGTATGCAAAGCACATGAAGCCGAGCGTGGAGCCGGCGCCTCC  
AGTTAGCAGAGACACGTTTTCTACATGGGAGACTTCGTCGTCGTCTACACTGATGGCTGCTGCTC  
CAGTAATGGGCGTAGAAGGCCGCGAGCAGGAATCGGCGTTTTACTGGGGGCCGGCCATCCTTTA  
AATGTAGGCATTAGACTTCCTGGGCGGCAGACAAACCAAAGAGCGGAAATTCATGCAGCCTGCA  
AAGCCATTGAACAAGCAAAGACTCAAACATCAATAAACTGGTTCTGTATACAGACAGTATGTTT  
ACGATAAATGGTATAACTAACTGGGTTCAAGGTTGGAAGAAAAATGGGTGGAAGACAAGTGCA  
GGGAAAGAGGTGATCAACAANGAGGACTTTGTGGCACTGGAGAGGCTTACCCAGGGGATGGAC  
ATTCAGTGGATGCATGTTCTGGTCATTCGGGATTTATAGGCAATGAAGAAGCTGACAGATTAGC  
CAGAGAAGGAGCTAAACAATCGGAAGACGGGCGGCCGCTCGAGGGAGGCGGTGGAGCCGACT  
ACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGG  
GGCCCGTTTAA

## 11.4 NGS-Daten



**Abbildung 34: Grafische Auswertung der NGS-Daten von RNASEH2A-defizienten Zellen unter Verwendung der Software *Integrative Genomics Viewer*.** Am oberen Bildrand dargestellt ist ein Ausschnitt der humanen, genomischen *RNASEH2A*-Sequenz, deren Position im Chromosom 19 durch einen vertikalen roten Balken angegeben ist. Nachfolgend sind die Sequenzvergleiche der jeweiligen *knockout*-Klone mit dem humanen Referenzgenom gezeigt. Jeder graue Balken der Referenzsequenz steht dabei für eine Nukleotidübereinstimmung. Treten bei den *RNASEH2A*-defizienten Zellen Deletionen im Vergleich zum Referenzgenom auf, so sind diese durch schwarze horizontale Balken gekennzeichnet. Insertionen hingegen sind durch einen vertikalen blauen Strich dargestellt. Die genaue Sequenzabfolge sowie die Aminosäuresequenz sind am unteren Bildrand zu finden. **A:** 293T-Klone. **B:** HeLa HA-Klone.

---

## 12 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Stefan Rose-John, für die Aufnahme ins Biochemische Institut und damit die Gelegenheit zur Promotion sowie seine Anteilnahme am Fortgang meiner Arbeit danken.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Jun.-Prof. Dr. Björn Rabe für die Bereitstellung des spannenden Themas, das mich bis zuletzt interessiert, herausgefordert und angetrieben hat. Sein Enthusiasmus und seine Begeisterung für neue Techniken haben mich nachhaltig inspiriert und mir vielfältige Möglichkeiten zur Weiterentwicklung meiner Fertigkeiten geboten.

Prof. Dr. Thomas Roeder danke ich für die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit. Darüber hinaus gilt mein Dank Prof. Dr. Boris Fehse, Dr. Ulrike Mock, Dr. Kareen Bartsch, Dr. Bernhard Ellinger, Joseph Dahl, Dr. Britt-Sabina Petersen sowie Dr. Raheleh Sheibani für hilfreiche Anregungen und die Zusammenarbeit bei Versuchen. Prof. Dr. Andrew Jackson, Dr. John Goodier, Dr. Wenfeng An, Dr. Dirk Schmidt-Arras und Dr. Athena Chalaris-Rißmann möchte ich außerdem für die Bereitstellung von Materialien danken.

Meinen herzlichen Dank möchte ich auch Annett Lickert für ihre fortwährende und zuverlässige technische Unterstützung aussprechen und Dr. Janina Wolf für die gewissenhafte Durchsicht meiner Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich überdies all meinen Freunden sowie meinen Geschwistern für ihre aufmunternden Worte in Zeiten des Zweifels, die geteilte Freude über kleine und große Erfolge im Verlauf der Entstehung dieser Dissertation und dafür, dass sie mir stets eine Stütze waren.

## 13 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Katharina Knittler, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt habe.

Die Arbeit erfolgte unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Diese Dissertation wurde bisher an keiner anderen Fakultät vorgelegt oder veröffentlicht. Ich erkläre, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass darüber hinaus keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Kiel, im Mai 2017

Katharina Knittler