Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Universitätsklinikum Eppendorf

Entwicklung eines Knockout-Models zur Untersuchung der Rolle der nicht-kodierenden kleinen RNA smRC1 unter Verwendung von CRISPR/Cas9 Vektoren

Bachelorarbeit
im Studiengang B. Sc. Biotechnologie

Lisa Tamminga
Mn: [redacted]
E-Mail: [redacted]

Betreuende:
Prof. Dr. Jörg Andrä,
PD Dr. Johann von Felden,
Dr. Francesca Pagani,
Dr. Lara Stein

Abgabedatum: 26.08.2026

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem angegebenen Titel ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, 26.08.26

Lisa Tamminga

Vorwort

Diese Bachelorarbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Felden am Universitätsklinikum Eppendorf im Rahmen des Studiengangs Biotechnologie an der HAW Hamburg angefertigt. Ich möchte mich hiermit herzlich bei allen bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben. Vielen Dank an Prof. Dr. Jörg Andrä, für die Betreuung und Bewertung meiner Arbeit und dafür, dass Sie sich Zeit für mich und meine Fragen genommen haben. Danke an Dr. Johann von Felden, ebenfalls für die Betreuung und Bewertung der Arbeit und für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe! Danke für die Möglichkeit, Teil eurer Forschung zu sein. To Dr. Francesca Pagani, thank you for your support, supervision and everything I had the opportunity to learn from you. Danke dir Dr. Lara Stein für deine Ratschläge und Unterstützung. Es ist mir eine große Freude, mit euch zu arbeiten.

Diese Arbeit stellt den Abschluss meines Bachelorstudiums dar und ich möchte mich hiermit auch bei allen Mitarbeitenden der HAW Hamburg bedanken, die mich während der Zeit begleitet haben. Die Vorlesungen und Praktika haben mir viel Spaß gemacht und ich bin sehr dankbar für alles, was ich lernen durfte, sowie für die Möglichkeit als studentische Hilfskraft und Tutorin noch mehr Erfahrungen sammeln zu können. Dafür gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Gesine Cornelissen, die mich zusätzlich bei der Organisation der Arbeit unterstützt hat, und Prof. Dr. Susanne Heise.

Außerdem Danke an meine Freundinnen. Für alle Gespräche, euren Support und das Anhören meiner vielen Nachrichten. Und dir Nico vielen Dank für all die Praktika, Vorlesungen und Stunden auf Teams, die wir für unsere Protokolle, Klausuren und Arbeiten zusammen verbracht haben. Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Danke an meine Eltern, für euer Vertrauen in mich und dafür, dass ihr mir mein Studium ermöglicht. Danke Schwester, für deine Art, die mir ganz viel Leichtigkeit und Freude gibt und dafür, dass du mich so bestärkst. Und dir Jonathan, Danke für deine Hand auf meiner Schulter und dafür, dass du für mich da bist.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 5
Symbolverzeichnis 5
1.) Zusammenfassung 6
2.) Einleitung 7
3.1.) Hepatozelluläres Karzinom 9
3.2.) Nicht-kodierende RNA 10
3.2.1.) Lange nicht-kodierende RNA 10
3.2.2.) Kleine nicht-kodierende RNA 11
3.3) Kleine RNA-Cluster 11
3.3.1.) Entdeckung der smRCs 11
3.3.2.) Eigenschaften von smRC1 12
3.4.) Gen-Knockout mittels CRISPR/Cas9 14
3.4.1.) Gen-Knockout 14
3.4.2.) CRISPR/Cas9 14
3.4.3.) Lentivirale Transduktion 16
4.) Material und Methoden 18
4.1.) Zellkultur 19
4.2.) Dosis-Wirkungs-Kurve 21
4.3.) Lentivirale Transduktion 21
4.4.) Klonale Isolation 22
4.4.1.) Einzelzellklonierung 23
4.4.2.) Kolonie-Picking 23
4.4.3.) Klonierung in semisolidem Medium 24
4.5.) DNA-Sequenzierung 24
4.5.1.) Probenahme 26
4.5.2.) DNA-Extraktion 26
4.5.3.) Quantifizierung 27
4.5.4.) PCR 27
4.5.5.) Gelelektrophorese 28
4.5.6.) Aufreinigung der PCR-Produkte 29
4.5.7.) Sequenzierung 29
4.6.) Untersuchung der Genexpression 29
4.6.1.) Probenvorbereitung 31
4.6.2.) RNA-Extraktion 31

4.6.3.) Quantifizierung ... 32
4.6.4.) Reverse Transkription ... 32
4.6.5.) RT-qPCR ... 34
4.7.) Kolonie-Bildungs-Assay ... 35
5.) Ergebnisse ... 37
5.1.) Entwicklung der Puromycin-Selektion ... 37
5.2.) Isolation der Zell-Klone ... 37
5.3.) Amplifikation von smRC1 ... 38
5.4.) Charakterisierung der Zelllinien ... 38
5.4.1.) SNU-475 CRISPR/Cas9 ... 39
5.4.2.) Alex/PLC CRISPR/Cas9 ... 40
5.4.3.) Hep 3B CRISPR/Cas9 ... 41
5.5.) Untersuchung der relativen Genexpression ... 43
5.5.1.) Alex/PLC CRISPR/Cas9 ... 44
5.5.3.) Hep 3B CRISPR/Cas9 ... 45
5.6.) Bewertung des klonogenen Potentials ... 47
5.6.1.) Alex/PLC CRISPR/Cas9 ... 47
5.6.2.) Hep 3B CRISPR/Cas9 ... 48
6.) Diskussion ... 51
Literaturverzeichnis ... 54
Abbildungsverzeichnis ... 57
Tabellenverzeichnis ... 64
Anhang ... 70
smRC1-Sequenz ... 70
Vektor-Maps ... 70
Quantifizierung der DNA-Proben ... 71
Bilder der Gelelektrophorese ... 73
Chromatogramme der DNA-Sequenzierung ... 74
C_T-Werte der RT-qPCRs ... 78
Bilder des Kolonie-Bildungs-Assay ... 79

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis.

Abkürzung	Bedeutung
AG	Arbeitsgruppe
bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNA
C_T-Wert	Threshold Cycle
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Media
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EVs	Extrazelluläre Vesikel
FBS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
kb	Kilobasen
KO	Knockout
lncRNA	Lange nicht-kodierende RNA
mRNA	Messenger RNA
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PBS	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline
smRC	kleine RNA-Cluster
sncRNA	Kleine nicht-kodierende RNA
sRNA	Kleine RNA
rcf	Relative Centrifugal Force
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	Real Time Quantitative Polymerase-Chain-Reaction
rpm	Rounds per minute
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
VF	Verdünnungsfaktor

Symbolverzeichnis

Tabelle 2: Symbolverzeichnis.

Symbol	Bedeutung
c	Konzentration
I	Pixel-Intensität
m	Masse
n	Anzahl
RQ	Relative Quantifizierung
V	Volumen

1.) Zusammenfassung

Das Hepatozelluläre Karzinom ist eine der tödlichsten Krebsarten weltweit und durch seine schleichende Entwicklung erst spät diagnostizierbar. Die Arbeitsgruppe von Felden konnte drei verschiedene kleine, nicht kodierende RNA-Cluster (smRC1, smRC2, smRC3) identifizieren, die aus extrazellulären Vesikeln aus dem Blut von Patientinnen und Patienten mit Hepatozellulärem Karzinom isoliert wurden. Die Funktion dieser RNA-Cluster soll zukünftig untersucht werden und könnte von hoher Bedeutung für die Erkennung und Behandlung des Hepatozellulären Karzinoms sein.[1] Der Fokus liegt zunächst auf smRC1, dessen Rolle bereits mit Knockout-Experimenten bei der Zelllinie Huh-7 untersucht wurde. Erst kürzlich konnte festgestellt werden, dass es sich bei smRC1 nicht, wie anfangs angenommen, um eine eigenständige kleine RNA handelt, sondern um einen Teil der langen nicht-kodierenden RNA ENST00000647660.

Ziel dieses Projektes ist die Etablierung von smRC1-Knockout-Zellklonen der Zelllinien SNU-475, Hep 3B und PLC/PRF/5. Dafür wurde die Gensequenz von smRC1 mittels lentiviraler Transduktion unter Verwendung von CRISPR/Cas9 Vektoren ausgeknockt. Parallel wurde eine Kontroll-Zelllinie mit dem leeren Vektor SCRAMBLE infiziert. Mit Einzelzellklonierung, Kolonie-Picking und der Klonierung in semisolidem Medium wurden verschiedene Methoden zur klonalen Isolation neuer Zelllinien getestet. Die isolierten Zelllinien wurden mittels DNA-Sequenzierung auf den Knockout untersucht und charakterisiert. Von den Zelllinien PLC/PRF/5 und Hep 3B konnten nach der Transduktion mehrere Kontroll- und Knockout-Zelllinien etabliert werden, während dies bei den neu gewonnenen SNU-475-Zelllinien scheiterte. Die Untersuchung der relativen smRC1-Genexpression mittels RT-qPCR erlaubte keine Differenzierung zwischen den Kontroll-Zelllinien und den Knockoutzelllinien, jedoch wurde durch einen Kolonie-Bildungs-Assay ein geringeres klonogenes Potential der Knockout-Zelllinien im Vergleich mit den Kontroll-Zelllinien festgestellt. Dieses Ergebnis könnte dafür sprechen, dass smRC1 an dem aggressiven Verhalten der Krebszellen des Hepatozellulären Karzinoms beteiligt ist.

2.) Einleitung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist ein bösartiger Tumor, der aus Hepatozyten entsteht. Die hohe Mortalität der Krebserkrankung ist durch den schleichenden Beginn und die Diagnose im fortgeschrittenen, inoperablen Spätstadium begründet. Aktuelle onkologische Forschungsergebnisse zeigen ein großes diagnostisches und prognostisches Potential von extrazellulären Vesikeln (EVs) im Blutplasma, welches als reichhaltiges Reservoir zirkulierender Biomoleküle, insbesondere kleiner, nicht-kodierender RNAs (sncRNAs), fungiert. Diese RNAs regulieren zentrale onkologische Prozesse wie Tumorentstehung, Angiogenese, die Umgehung der Immunantwort und die Entstehung von Therapieresistenzen.[1]

Der Arbeitsgruppe (AG) von Felden gelang mit ihrer bisherigen Forschung die Identifikation und Charakterisierung von drei kleinen nicht-kodierenden RNA-Clustern (smRCs) aus zirkulierenden EVs in dem Blut von Patientinnen und Patienten mit Leberkrebs. Diese wurden als smRC1, smRC2 und smRC3 bezeichnet und könnten als Signatur zur frühzeitigen Erkennung von HCC genutzt werden. Unter Verwendung smRC-spezifischer Sonden wurde mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierung die Expression der RNA-Clustern sowohl in Tumorzellen als auch in Zellen des Tumormikromilieus in formalin-fixierten, paraffin-eingebetteten HCC-Gewebeproben (FFPEs) bestätigt.[1] Die drei smRCs sind bislang noch nicht tiefergehend erforscht. Bisherige *in-vitro*-Daten deuten darauf hin, dass smRC1 eine funktionelle Rolle in der Hepatokarzinogenese sowie der Tumorprogression einnimmt und somit aktiv an der Entwicklung des HCC beteiligt ist. Aufgrund dessen stellt smRC1 einen neuartigen, potentiell therapeutisch nutzbaren Angriffspunkt dar.

Begonnen bei smRC1 kann mittels Knockout (KO)-Versuchen die Rolle der RNA in der Zelle untersucht werden und ob ihre Abwesenheit Auswirkungen hat. In nachfolgenden Versuchen kann mit den KO-Zelllinien getestet werden, ob smRC1 an der Tumorentstehung, der Metastasierung oder der Signalwegregulation beteiligt ist. Mithilfe eines gezielten KO von smRC1 kann zunächst untersucht werden, wie sich der Verlust dieser RNA auf zelluläre Prozesse auswirkt und welche funktionelle Bedeutung ihr zukommt. Anschließend lässt sich analysieren, ob und in welchem Ausmaß smRC1 an der Tumorentstehung, Metastasierung oder Signalwegregulation beteiligt ist.[1,2]

Für den KO von smRC1 wurde von der AG von Felden ein *in-vitro*-CRISPR/Cas9 Modell etabliert. Dieses System wurde erfolgreich in der Zelllinie Huh-7 angewandt. Auf dieser Grundlage wurden weiterführende Versuche zur Untersuchung der Funktion von smRC1 durchgeführt. Ziel dieser Arbeit war es, den KO in den Zelllinien SNU-475, Hep 3B und PLC/PRF/5, die auch als Alex/PLC bezeichnet werden, zu reproduzieren. Mittels lentiviraler Transduktion wurde das Gen für smRC1 ausgeknockt. Als Kontrolle wurde der leere Vektor SCRAMBLE (SCR) verwendet. Im Anschluss an die lentivirale Transduktion wurde eine klonale Isolation durchgeführt. Dabei sollten einzelne Klone isoliert und als neue Zelllinie etabliert werden. Zur Überprüfung wurden die erfolgreich isolierten Zelllinien mittels DNA-

Sequenzierung auf den smRC1-KO untersucht und charakterisiert. Abschließend wurde die Genexpression von smRC1 in den neuen Zelllinien in einer RT-qPCR untersucht und das klonogene Potential mittels eines Kolonie-Bildungs-Assays bewertet. Der Ablauf ist in Abbildung 1 dargestellt.

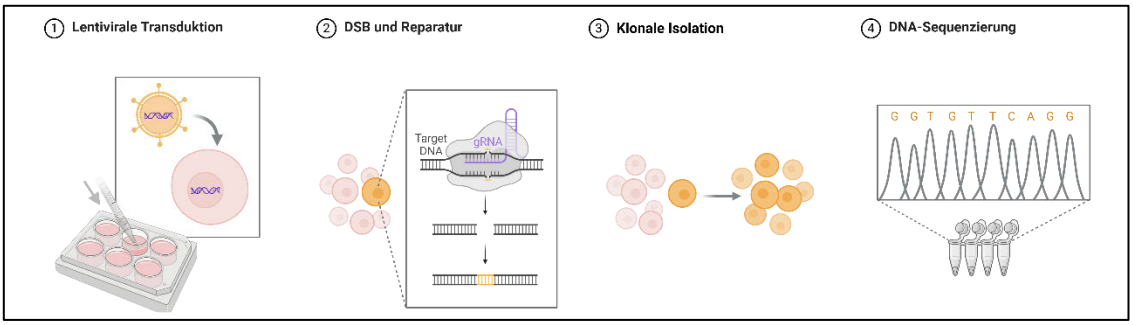


Abbildung 1: Ablauf des KO-Versuchs von smRC1. 1. Der Knockout (KO) von smRC1 wurde mittels lentiviraler Transduktion durchgeführt. 2. Die smRC1-spezifischen CRISPR/Cas9 Vektoren initiierten Doppelstrangbrüche (DSB) in der DNA, welche von zelleigenen Reparatur-Mechanismen behoben wurden, die zu dem KO führen. 3. Mittels verschiedener Methoden wurde eine klonale Isolation durchgeführt und die Zellen wurden expandiert. 4. Zur Validierung wurde eine DNA-Sequenzierung durchgeführt, bei der die DNA-Sequenz zu smRC1 analysiert wurde. (Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender)

3.) Theoretischer Hintergrund

3.1.) Hepatozelluläres Karzinom

Leberkrebs ist nach dem Pankreaskarzinom der zweittödlichste Tumor weltweit. In 90 % der Fälle handelt es sich dabei um das Hepatozelluläre Karzinom (HCC), welches die am häufigsten vorkommende Form von primärem Leberkrebs ist. HCC ist ein prototypischer entzündungsassoziierter Krebs, was bedeutet, dass er typischerweise als Folge einer chronischen Lebererkrankung entsteht. Die häufigsten Risikofaktoren sind Infektionen mit dem Hepatitis-B-Virus, dem Hepatitis-C-Virus, nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen und Alkoholmissbrauch. Auch Tabakkonsum spielt als Kofaktor eine Rolle. Hieraus entsteht durch chronische Inflammation eine Zirrhose, die als Präkanzerose gilt und genetische Instabilität fördert. [3,4]

HCC hat eine aggressive Natur und wird oftmals erst spät diagnostiziert, weshalb es zu den häufigsten Ursachen für krebsspezifische Todesfälle zählt. Die Diagnose kann durch typisches Kontrastmittelverhalten mittels bildgebender Verfahren nicht-invasiv gestellt werden. So ist eine Untersuchung von Gewebebiopsien nicht zwingend notwendig, allerdings ist diese für eine Charakterisierung auf molekularer Ebene von Vorteil. Patientinnen und Patienten mit Leberzirrhose sollten durch das erhöhte Risiko für die Entstehung eines HCC halbjährlich mittels Ultraschall und dem Tumormarker α-Fetoprotein auf HCC untersucht werden. Aufgrund der eingeschränkten Sensitivität dieser Kombination besteht allerdings ein großes Interesse, genauere Alternativen mit der Möglichkeit auf eine höhere Sensitivität, wie beispielsweise Flüssigbiopsien, zu erforschen.[3–5]

Die minimalinvasive Methode der Flüssigbiopsie ist gut reproduzierbar. Sie ist, anders als beispielsweise Abdomen-Sonographie, unabhängig von den Untersuchenden, hat eine hohe Genauigkeit und lässt sich problemlos in das klinische Umfeld integrieren. Bei der Flüssigbiopsie werden Tumorkomponenten wie zirkulierende Tumor-DNA, extrazelluläre Vesikel (EV) oder ganze zirkulierende Tumorzellen untersucht. Diese Methode vereinfacht den Zugang zu molekularen Tumorinformationen und ermöglicht eine sequenzielle Probenentnahme zur dynamischen Verlaufsbeobachtung. Das ist entscheidend für die molekulare Überwachung des HCC, die Bestimmung der klonalen Zusammensetzung des Tumors sowie den Nachweis von Resistenzmechanismen in Echtzeit. Aufgrund dieser positiven Eigenschaften ist die Flüssigbiopsie eine potenzielle Möglichkeit zur Früherkennung, Krebsüberwachung, Prognosevorhersage und der molekularen Überwachung des therapeutischen Ansprechens.[3]

Bei früh erkanntem HCC liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei über 70 %. Bei fortgeschrittenem HCC liegt nach einer systemischen Therapie, die Überlebensrate bei etwa 20 bis 24 Monaten. Somit ist die Früherkennung und, damit einhergehend, die Erforschung von molekularen Mechanismen, für die Patientinnen und Patienten von großem Interesse. [3]

3.2.) Nicht-kodierende RNA

Die Hepatokarzinogenese beschreibt den mehrstufigen Prozess der Entstehung und Entwicklung von HCC, bei dem Hepatozyten durch eine Reihe genetischer Veränderungen die maligne Transformation durchlaufen. Die komplizierte Biologie von HCC ist bislang nicht vollständig verstanden. Es gibt frühe genetische Veränderungen, die als Gatekeeper bezeichnet werden. Dazu gehören beispielsweise Mutationen im telomerase reverse transcriptase (TERT)-Promoter, wodurch die Telomerase dauerhaft aktiv bleibt und die Zellen eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit erlangen. Weitere Gatekeeper sind molekulare Veränderungen von regulatorischen Signalwegen. Beispielsweise der Wnt-β-Catenin-Signalweg ist durch eine Mutation in dem Gen *CTNNB1*, welches für β-Catenin kodiert, häufig überaktiviert, was zu der Immunausschluss-Signatur beiträgt. So wird verhindert, dass das Immunsystem die Tumorzellen erreichen kann. Zusätzlich wird das Wachstum und Überleben der Tumorzellen durch die Hochregulation der Signalwege PI3-AKT-mTor und RAS-MAPK gesichert. Weitere Mutationen führen zu der Störung des Tumorsuppressors p53 oder Regulatoren der Zellzykluskontrolle. Dadurch wird die zelluläre DNA-Schadensantwort blockiert, was dazu führt, dass die Tumorzellen trotz fehlerhafter DNA weiterwachsen können. Auch epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierungen, durch die Tumorsuppressorgene beeinträchtigt werden, sowie Histon-Modifikationen und Chromatin-Remodellierung, die die Zugänglichkeit des Genoms verändern, sind Teil der Hepatokarzinogenese.[3–5]

Als weitere Schlüsselfaktoren der Hepatokarzinogenese konnten nicht-kodierende RNAs (ncRNAs) identifiziert werden. Dabei handelt es sich um RNA-Moleküle, die zwar transkribiert werden, aber nicht für Proteine codieren. Sie sind wesentlicher Bestandteil des Transkriptoms und haben viele regulatorische Funktionen. Die nicht-kodierenden RNAs werden anhand ihrer Länge in zwei Gruppen eingeteilt.[5,6]

3.2.1.) Lange nicht-kodierende RNA

Lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs) sind polyadenylierte, mRNA-ähnliche Transkripte mit einer Länge von über 200 Nukleotiden. Sie stellen Schlüsselregulatoren der Chromatindynamik, der Genexpression sowie von Zellwachstum und -entwicklung dar. Ihr direkter Einfluss auf biologische Prozesse zeigt sich beispielsweise an der lncRNA XIST, welche für die X-Chromosomen-Inaktivierung verantwortlich ist. Die lncRNAs können aber durch das Leiten von Transkriptionsfaktoren oder Proteinkomplexen auch indirekt zur Genregulation beitragen.[7]

Durch die breitgefächerten regulatorischen Funktionen sind lncRNAs besonders im Kontext von komplexen Erkrankungen wie Krebs von Bedeutung. Es gibt bereits mehrere lncRNAs, die nachgewiesen an der Entwicklung und dem Fortschreiten von HCC beteiligt sind. Ein Beispiel dafür ist die lncRNA HOTTIP, deren Expression in Zusammenhang mit der Expression des Gens *HOXA13* steht und direkten Einfluss auf den Krankheitsverlauf bei HCC hat.[5]

3.2.2.) Kleine nicht-kodierende RNA

Kleine nicht-kodierende RNAs (sncRNAs) sind RNA-Moleküle mit weniger als 200 Nukleotiden. Sie übernehmen ebenfalls viele regulatorische und strukturelle Aufgaben, wie beispielsweise bei der Transkription, Post-Transkription und Translation. So werden Zellwachstum und Zellteilung beeinflusst, weshalb die sncRNAs auch relevant für die Tumorentstehung und -progression sind. Fehlregulationen können Einfluss auf unkontrollierte Zellvermehrung, Tumorinitiierung, Tumorgenese und Metastasierung haben. Zunächst wurde angenommen, dass die von der AG von Felden entdeckten smRCs zu der Gruppe der sncRNAs gehören.[1,6]

3.3) Kleine RNA-Cluster

Kleine RNA-Cluster (smRCs) sind Gruppen von kleinen RNA-Sequenzen, die in der Genexpressionsanalyse identifiziert werden können. In der AG von Felden wurden drei smRC-Expressionssignaturen, die bei HCC Patientinnen und Patienten signifikant überexprimiert sind, aus EVs quantifiziert und charakterisiert. Diese wurden als smRC1, smRC2 und smRC3 bezeichnet.[1]

3.3.1.) Entdeckung der smRCs

In der ersten Phase der Entdeckung der smRCs wurden die EVs mittels differentieller Ultrazentrifugation und mikrofluidischer nanoscale deterministic lateral displacement (DLD)-Assays isoliert und das gesamte Spektrum von sRNAs, inklusive der nicht-kodierenden Regionen, sequenziert. Dabei wurden wiederholt benachbarte Genomregionen mit bis dahin nicht annotierten RNA-Signalen entdeckt. Diese Häufungen wurden als smRCs definiert und jedes smRC wurde genomisch charakterisiert, um die Validität zu bewerten. Bestimmt wurde die Peak-Abdeckung, die relative Häufung der RNA-Fragmente an bestimmten Stellen aufzeigt. Außerdem die Entropie der RNA-Sequenz, die angibt, wie zufällig die Verteilung innerhalb des Clusters ist, sowie die Konsensussequenz, eine repräsentative Abfolge von Nukleotiden aus einer Gruppe ähnlicher RNA-Sequenzen innerhalb jedes smRCs. Die smRCs haben eine durchschnittliche Länge von 16,5 Nukleotiden und sind somit kleiner als sRNAs in Zellen, die eine durchschnittliche Größe von 22,6 Nukleotiden haben. Dies zeigt, dass EVs einzigartige smRCs transportieren, die sich von zellulären Profilen unterscheiden.[1] Abbildung 2 fasst den Ablauf der Entdeckung der smRCs zusammen.

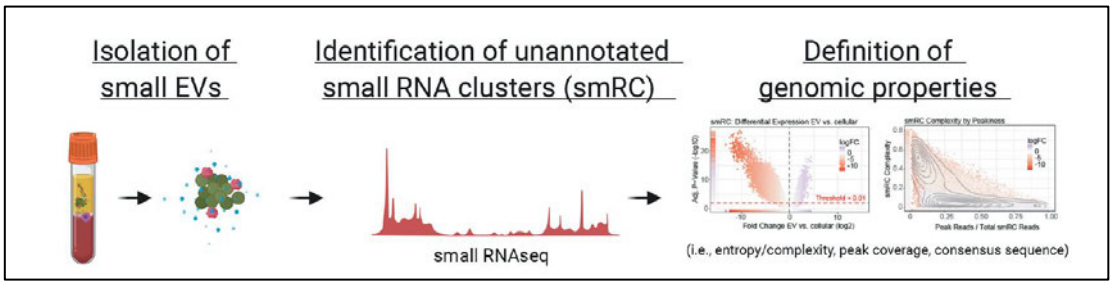


Abbildung 2: Die Entdeckung von smRCs. Aus dem Blut von Patientinnen und Patienten mit HCC wurden EVs isoliert, aus welchen mittels RNA-Sequenzierung Cluster aus bislang nicht annotierten RNA-Signalen entdeckt, deren Eigenschaften über die Peak-Sequenz, die Entropie der RNA-Sequenz und eine Konsensussequenz definiert wurden.[1]

In der zweiten Phase wurde eine retrospektive Fall-Kontroll-Studie zur Untersuchung der Biomarker durchgeführt, in der anhand der Sensitivität, der Spezifität und der diagnostischen Genauigkeit geprüft wurde, ob mittels smRCs eine Früherkennung von HCC möglich ist.[1] Abbildung 3 zeigt den Ablauf dieser Studie.

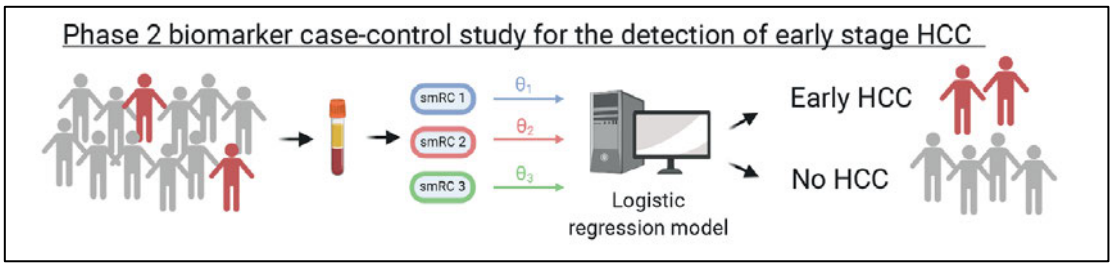


Abbildung 3: Fall-Kontroll-Studie zur Untersuchung der Biomarker. Die Studie wurde durchgeführt, um zu testen, ob mittels smRCs eine Früherkennung von HCC möglich ist. Die Testgruppe umfasste Patientinnen und Patienten mit frühem HCC und anderen Lebererkrankungen. Aus dem Blut-Plasma wurden die smRCs isoliert und untersucht. Die drei smRCs (smRC1, smRC2 und smRC3) sind bei Patientinnen und Patienten mit HCC deutlich überexprimiert.[1]

Die Testgruppe umfasste Patientinnen und Patienten aus zwei Gruppen. Eine Gruppe mit unbehandeltem HCC im Frühstadium und eine Gruppe mit Leberzirrhose, oder sonstigem HCC-Risikoprofil ohne nachgewiesenes HCC. Aus dem Blutplasma wurden die EVs isoliert, die drei smRCs mittels RT-qPCR quantifiziert und anschließend die Expressionswerte der Gruppen verglichen. Die 3-smRC-Signatur zeigte eine Sensitivität von 86 % und eine Spezifität von 91 % zwischen frühem HCC und Hochrisikokontrolle. Das bedeutet, die Expression der smRCs war bei den Patientinnen und Patienten mit HCC deutlich stärker als bei den Patientinnen und Patienten ohne nachgewiesenes HCC. Da etablierte Überwachungsmethoden wie Ultraschall und α-Fetoprotein-Tests in ihrer diagnostischen Genauigkeit begrenzt sind, bieten smRCs aus zirkulierenden EVs hochsensible Alternativen. Über einfache Blutproben, auch als Liquid Biopsies bezeichnet, könnte smRC1 somit als valider Biomarker für die Früherkennung und das Verlaufsmonitoring des HCC dienen.[1]

3.3.2.) Eigenschaften von smRC1

Bislang beschäftigt sich die AG von Felden mit der Forschung an smRC1. Dabei wurde festgestellt, dass es sich nicht, wie zunächst angenommen, um eine einzelne sRNA handelt, sondern, dass smRC1 Teil der lncRNA ENST00000647660 ist, die von dem Gen ENSG00000285817 kodiert wird, welches im Zuge des Havana Projekts des Sanger Institutes manuell annotiert wurde. Die Lage des Gens im Genom ist auf dem Chromosom 8 an der Stelle 137.524.755 bis 137.645.564 auf dem Reverse-Strang.[8–10, (interne Daten AG von Felden, nicht publiziert)] Die Lage des Gens auf dem Chromosom 8 ist in Abbildung 4 dargestellt.

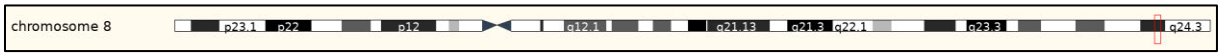


Abbildung 4: Chromosom 8. Das gesamte Chromosom mit seinen unterschiedlichen Bereichen. Das Gen ENSG00000285817 ist in dem rot markierten Bereich (rechts) lokalisiert.[11]

Der rotmarkierte Bereich des Chromosoms ist in Abbildung 5 dargestellt, in der das Gen ebenfalls rot markiert ist.



Abbildung 5: Genomische Lage des Gens ENSG00000285817. Das rot markierte Gen ist in dem Bereich von 137.524.755 bis 137.645.564 auf dem Reverse-Strang lokalisiert.[11]

Die lncRNA ENST00000647660 ist das Transkript des Gens und hat eine Länge von 120,81 kb. Sie besteht aus Introns und 4 Exons, die zusammen eine Länge von 1 992 bp haben.[9] Die lncRNA ist in Abbildung 6 dargestellt.

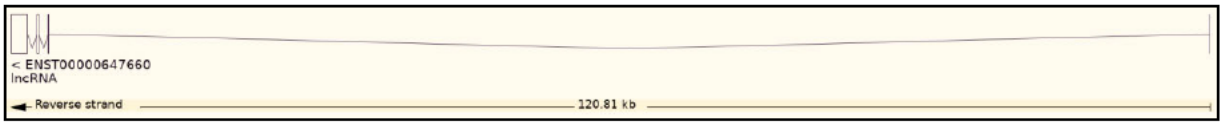


Abbildung 6: Die lncRNA ENST00000647660. Die lncRNA wird von dem Gen ENSG00000285817 kodiert, welches auf dem Reverse-Strang liegt. Sie hat eine Länge von 120,81 kb und besteht aus Exons (Kästen) und Introns (Striche).[9]

Durch Versuche mit smRC1 konnten bereits einige Eigenschaften der RNA entschlüsselt werden. smRC1 liegt auf einem der Introns der lncRNA in dem Bereich 137.627.017 bis 137.627.182 und hat eine Länge von 166 bp.[1] Dieser Bereich des Chromosom 8 ist in Abbildung 7 dargestellt.

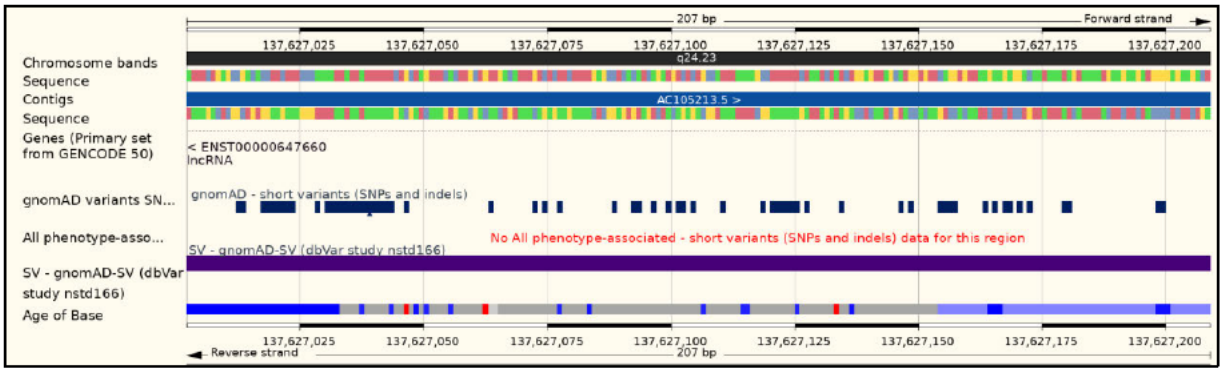


Abbildung 7: Genomische Lage von smRC1. smRC1 ist Teil der lncRNA ENST00000647660 und liegt in dem Bereich 137,627,017 bis 137,627,182 auf dem Chromosom 8.[11]

Die von der AG von Felden ermittelte Konsensussequenz von smRC1 lautet: CCUCUUCUUAACACC. Sie wurde für das Design von Primern für eine RT-qPCR erweitert. Die in der DNA eingesetzte Base Thymin wird in der RNA durch Uracil ersetzt. Dementsprechend wurde die RNA-Sequenz in die entsprechende DNA-Sequenz übersetzt. Da sich die DNA-Sequenz für smRC1 in 3´-5´-Leserichtung auf dem Reverse-Strang befindet, wurde die komplementäre Sequenz auf dem Forward-Stang bestimmt. In 5´-3´-Leserichtung lautet sie: GGTGTTAAGAAGAGGACAA. (interne Daten AG von Felden, nicht publiziert) Abbildung 8 zeigt die Sequenz in ihrer genomischen Lage.

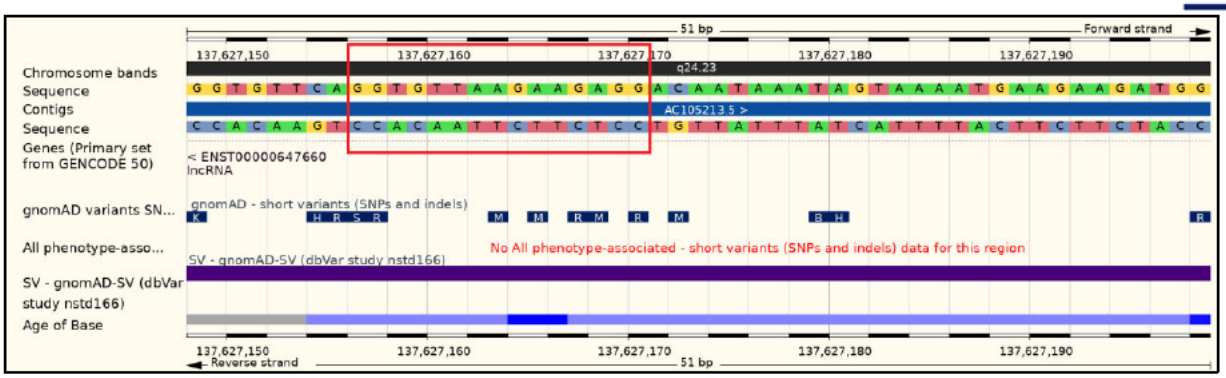


Abbildung 8: Genomische Lage der Konsensussequenz von smRC1. Die RNA-Sequenz von smRC1 lautet: CCUCUUCUUAACACC. Diese wurde um einige Basen erweitert und in die DNA-Sequenz übersetzt. Die Sequenz für smRC1 in 3′-5′-Leserichtung liegt auf dem Reverse-Stang. Auf dem Forward-Strang in 5′-3′-Leserichtung lautet die DNA-Sequenz somit: GGTGTTAAGAAGAGGACAA.[11]

3.4.) Gen-Knockout mittels CRISPR/Cas9

3.4.1.) Gen-Knockout

Bei einem Gen-Knockout (KO) wird das zu untersuchende Gen gezielt ausgeschaltet. Als Kontrolle wird eine Zelllinie ohne KO mitgeführt. Der KO kann verschiedene Gründe haben. Es kann beispielsweise ermittelt werden, welche Funktion das Gen übernimmt und welche Auswirkungen ein Genverlust hat. So können Gene identifiziert werden, die eine essentielle Rolle für die Zelle spielen. Auch Resistenzmechanismen gegen Medikamente können mit Hilfe von KO-Versuchen erforscht werden. Somit stellen KO-Ansätze eine wichtige Methode in der Entwicklung neuer Erkenntnisse zu möglichen Therapieansätzen dar.[2,12,13]

3.4.2.) CRISPR/Cas9

CRISPR ist ein Abwehrsystem von Bakterien, durch das Abschnitte viraler DNA mithilfe einer Guide-RNA (gRNA) erkannt werden können. Cas9 ist ein Enzym, das Doppelstrangbrüche (DSB) initiieren kann und so die DNA schneidet. CRISPR/Cas9 kann somit gezielt als Genschere eingesetzt werden. Durch die Verwendung von CRISPR/Cas9 kommt es regulär zu einer Verschiebung des Leserasters, wodurch die Expression des Gens verhindert wird.[2] Der Ablauf eines KO mittels CRISPR/Cas9 ist in Abbildung 9 dargestellt.

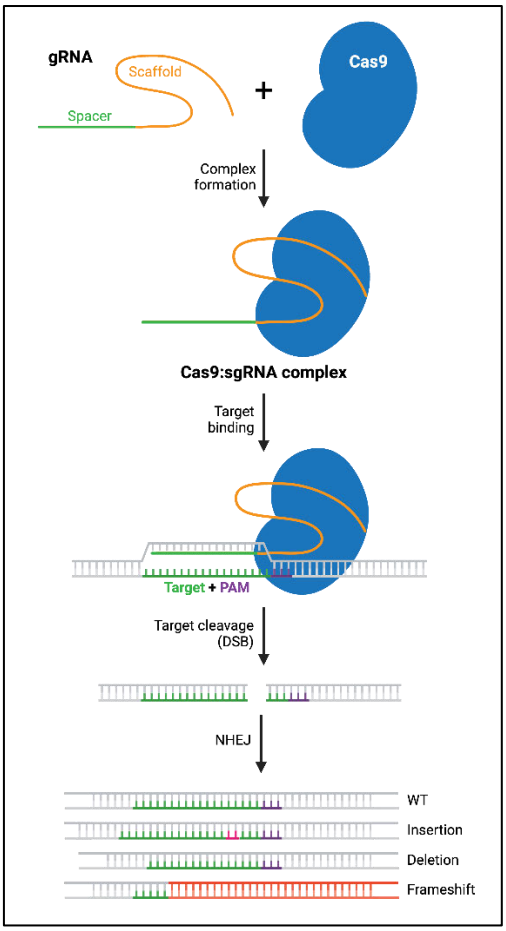


Abbildung 9: Gen-KO mittels CRISPR/Cas9. Die gRNA besteht aus dem Spacer, ein kurzer RNA-Abschnitt, der komplementär zu der Zielsequenz ist, und dem Scaffold, der Bereich, der an das Enzym Cas9 bindet. Der Komplex aus der RNA und dem Enzym bindet über den PAM an das Zielgen (hier als Target bezeichnet) und schneidet die DNA. Dieser DSB wird durch zelluläre Reparatur-Mechanismen, wie Non-homologous-End-Joining (NHEJ), wieder zusammengefügt. Dabei können verschiedene Fehler unterlaufen, die die Expression des Zielgens verhindern und somit zu einem KO führen. (https://media.addgene.org/cms/filer_public/c4/cd/c4cd7a42-a7ca-41e1-8468-231e508fa394/knockout.png)

Die gRNA setzt sich aus zwei Bereichen zusammen. Das Scaffold ist eine RNA-Struktur, die an Cas9 bindet und der Spacer ist ein kurzer Bereich, der komplementär zu der Zielsequenz angepasst wird und neben dem PAM (Protospacer Adjacent Motif) liegt. Dabei handelt es sich um eine kurze Basensequenz, die die Bindung von Cas9 ermöglicht. Der Komplex aus der gRNA und Cas9 bindet nach der PAM-Erkennung an das Zielgen. Dabei wird der Doppelstrang getrennt und es kommt zu einer Basenpaarung zwischen der DNA und dem Spacer. Durch diese Paarung wird eine Konformationsänderung von Cas9 ausgelöst und die DNA-Stränge werden vor dem PAM geschnitten. Nach dem Schnitt der DNA werden die offenen Enden innerhalb der Zelle erkannt und durch Reparatur-Mechanismen, wie Non-homologous-End-Joining (NHEJ), wieder zusammengefügt. Dabei kann es, durch den Verlust oder das fehlerhafte Einfügen von Basen, zu Fehlern des Leserasters, auch als Frameshift bezeichnet, kommen. Solche Veränderungen der DNA-Sequenz werden als Indels bezeichnet und können zu einem KO des Gens führen.[2,12,13]

Bei der Verwendung von CRISPR/Cas9 gibt es einige Risiken, die beachtet werden müssen. Es kann zu Off-Target-Aktivitäten kommen, was bedeutet, dass die DNA in Bereichen geschnitten wird, welche der Zielsequenz sehr ähnlich sind. Dieses Risiko kann durch Optimierungen bei

dem Entwurf des personalisierten CRISPR/Cas9-Systems verringert werden. Des Weiteren bedeuten die DSB zellulären Stress und können zu chromosomaler Instabilität führen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Reparatur der DNA zu In-Frame-Mutationen führt. Dabei werden Basen so eingefügt, dass das Leseraster erhalten bleibt und beispielsweise für funktionelle Proteine kodiert, anstatt das Gen vollständig auszuknocken.[2,14]

3.4.3.) Lentivirale Transduktion

Der Einsatz von CRISPR/Cas9 findet üblicherweise mittels der Transduktion von lentiviralen Vektoren statt. Für die Produktion der Vektoren werden üblicherweise HEK293T-Zellen verwendet. Die Plasmide, die in die Zellen gebracht werden, erfüllen verschiedene Funktionen. Das Transfer-Plasmid enthält die Informationen für die gRNA, die Cas9-Nuklease und einen Selektionsmarker für ein Antibiotikum. Die Packaging-Plasmide enthalten Informationen für die Enzyme und Proteine, die für die Struktur des Virus-Partikels benötigt werden. Das Envelope-Plasmid kodiert für das Oberflächen-Protein des Vektors, das den Eintritt in die Zellen ermöglicht. In den Produzentenzellen werden daraus die lentiviralen Vektoren erzeugt, welche anschließend aus dem Medium isoliert werden. Nach der Aufreinigung können die Vektoren für die Transduktion *in-vivo* oder *in-vitro* genutzt werden.[15] Der Ablauf der Produktion ist in Abbildung 10 dargestellt.

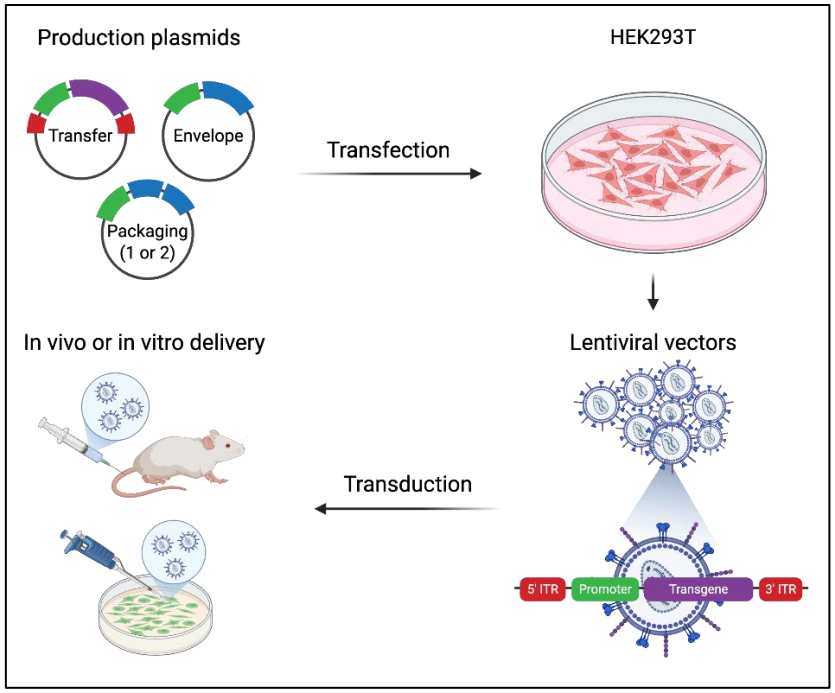


Abbildung 10: Produktion und Einsatz lentiviraler Vektoren. Die Produktions-Plasmide enthalten die Informationen über das Ziel-Gen und das CRISPR/Cas9 System, die Struktur-Proteine und -Enzyme, sowie das Oberflächen-Protein, das für eine Transduktion notwendig ist. Die Vektoren werden von den Produzentenzellen hergestellt und können nach der Aufreinigung für die Transduktion *in-vivo* oder *in-vitro* eingesetzt werden.(https://media.addgene.org/cms/filer_public/c2/00/c200c74c-1a59-450d-9a1b-0b688f4f4ca3/lenti_production.png)

Bei der lentiviralen Transduktion werden die Zielzellen mit den Viruspartikeln infiziert und das Wirtsgenom wird entsprechend verändert. Dies ist in Abbildung 11 dargestellt. Aufgrund des eingebrachten Selektionsmarkers sind nur die Zellen resistent, bei denen die Transduktion erfolgreich war. Ob der KO des Ziel-Gens erfolgreich war, kann nach einer klonalen Isolation

mittels DNA-Sequenzierung überprüft werden.[12–14]

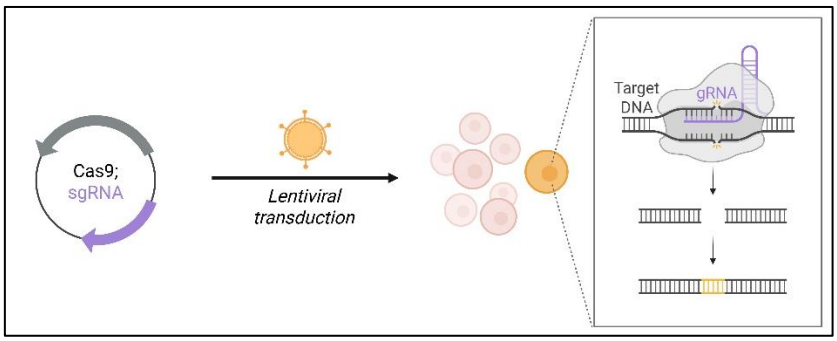


Abbildung 11: Gen-KO von mittels lentiviraler Transduktion. Das CRISPR/Cas9 Modell wird in die Zellen eingebracht. Durch die spezifische Bindung an das Zielgen von smRC1 wird über den DSB die Expression des Gens verhindert. (Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender)

4.) Material und Methoden

Tabelle 3: Verwendete Geräte.

Name	Hersteller	Modell
CO_2-Inkubator	VWR	INCU Line CO_2
Gel Electrophoresis Horizontal Gel System	Cleaver Scientific	MultiSub Mini One
Heizblock	Eppendorf	ThermoMixer C
Imaging System	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	iBright CL750
Mikroskop	KERN	
Sicherheitswerkbank Klasse II	Berner	Claire pure
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific	Precision GP 20
Vakuumpumpe	KNF	N 811 LABOPORT
Zentrifuge	Heraeus Instruments	Megafuge 1.0
Mikro Tischzentrifuge, gekühlt	Eppendorf	5424 R
Mikrowelle	Sharp	
Nano Spectrophotometer, Drop and Cuvette UV-Vis System	VWR	
PCR-Thermocycler	Eppendorf	X50s
RT-PCR System	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific	Quant Studio 3
Tischzentrifuge, gekühlt	Eppendorf	5910 Ri
Mini Tischzentrifuge	Fisher Scientific by Thermo Fisher Scientific	Fisherbrand

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Zubehör.

Name	Hersteller
Injekt Einmalspritzen	B. Braun
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen, Multikanalpipette	Mettler-Toledo
Petrischalen, 10 cm	Sarstedt
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Eppendorf
Serologische Pipetten	Sarstedt
Zellkultur-Platten	Sarstedt

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Name	Hersteller
Ethanol absolut, 99 %	Th. Geyer
Chloroform	Carl Roth
DMSO	Th. Geyer
EDTA	Sigma-Aldrich
Methanol	Carl Roth
Nuklease-freies Wasser	Qiagen

4.1.) Zellkultur

Alle verwendeten Materialien für das Arbeiten mit Zellkulturen sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Materialien für das Arbeiten mit Zellkulturen

Name	Hersteller
DMEM, Low Glucose (1g/l), w/o L-Glutamine with Sodium Pyruvate, steril-filtriert	Capricorn Scientific
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum, Research Grade, sterile-filtered	Biophyll
Glutamin 200mM (100X)	Anprotec
Penicillin/Streptomycin (100X)	Capricorn Scientific
Puromycin-Lösung, 10 mg/mL	InvivoGen
RPMI 1640, w/o L-Glutamine, steril-filtriert	Capricorn Scientific
Trypanblaulösung, 0,4 %	Carl Roth
Trypsin-EDTA (0,05 %) in HBSS (1X) with Phenol Red	Capricorn Scientific

Für die KO-Versuche wurden drei Zelllinien verwendet. Die Zelllinie SNU-475 ist eine schlecht differenzierte HCC-Zelllinie eines 43-jährigen Mannes. Der Patient erhielt zuvor keine Behandlung. SNU-475 ist eine Hepatitis B Virus (HBV) positive Zelllinie, die schlecht differenziert ist, was bedeutet, dass die Zellen kaum noch Ähnlichkeit mit den ursprünglichen, gesunden Leberzellen haben.[16] Die Zelllinie PLC/PRF/5, auch Alexander-Zelllinie, wurde aus der Leber eines männlichen Spenders mit Hepatom isoliert. Sie ist HBV-positiv und kann in der Forschung an Krebs, Infektionskrankheiten und sexuell übertragbaren Krankheiten eingesetzt werden. Sie wird in dieser Arbeit als Alex/PLC bezeichnet.[17] Die dritte Zelllinie Hep 3B ist eine Zelllinie mit Epithelmorphologie, die aus Lebergewebe isoliert wurde, das von einem 8-jährigen Jungen mit Leberkrebs abgeleitet wurde. Sie enthält ein integriertes Hepatitis-B-Virus-Genom.[18]

Die verwendeten Zelllinien wurden von der AG von Felden in Einfriermedium in einem Stickstofftank gelagert. Als Einfriermedium wurde FBS mit 10 % DMSO genutzt. Die Zellen wurden für die Durchführung der Versuche in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt und in eine Petrischale mit Kulturmedium überführt. Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem CO_2-Gehalt von 5 % in Zellkultur-Platten oder Petrischalen kultiviert. Dabei wurde die Größe der Fläche abhängig von dem Wachstum der Zellkultur gewählt. Die verwendeten Medien für die verschiedenen Zelllinien sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Für die Zelllinien verwendete Medien. Jede Zelllinie benötigt ein individuelles Medium, wie in der Tabelle angegeben. Für die Kultivierung wurden diesen Medien noch Glutamin, Penicillin/Streptomycin und FBS hinzugefügt.

Zelllinie	Medium
SNU-475	RPMI
Alex/PLC	DMEM
Hep 3B	DMEM

Das Medium wird als komplett bezeichnet, wenn Glutamin und Penicillin/Streptomycin

entsprechend hinzugefügt wurden. Die Bezeichnung Kulturmedium wird dann verwendet, wenn zusätzlich FBS hinzugefügt wurde. Der FBS-Anteil für die Kultivierung einer stabilen Zelllinie liegt bei 10 %.

Um die Zellen zu passagieren, wurden alle benötigten Materialen in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das Kulturmedium wurde vollständig entfernt und die Zellen wurden gewaschen. Dafür wurde PBS mit 2 mM EDTA verwendet. Nach dem Entfernen des PBS wurde Trypsin auf die Zellen gegeben und für maximal 5 Minuten inkubiert, bis die Zellen sich durch Klopfen an die Zellkultur-Platte oder die Petrischale abgelöst hatten. Die Zellen wurden durch Mischen mit der Pipette separiert und in Kulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde für das Aussäen verwendet. Falls notwendig, wurden die Zellen ausgezählt oder es wurde eine Verdünnung, abhängig von der Menge an Zellen und ihrer Wachstumsgeschwindigkeit, gewählt. Die Zellen wurden in eine neue Zellkultur-Platte oder Petrischale mit Kulturmedium überführt. Die neue Platte wurde geschwenkt und in den Inkubator gestellt.

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauer Zählkammer genutzt. Die Zellen wurden, wie beschrieben, mit Trypsin abgelöst und anschließend in einem definierten Volumen mit Kulturmedium verdünnt. Zur Färbung der toten Zellen wurde die Zellsuspension mit einem VF von 2 mit Trypanblaulösung gemischt. Die Zählkammer wurde mit 70 % Ethanol gereinigt und das Deckgläschen auf die Zählkammer gesetzt. Die Zellen in einem Volumen von 10 µL wurden in dem Raster der Zählkammer gezählt. Ein Feld des Rasters hat ein Volumen von 0,1 µL. Für die Berechnung der Zellzahl in 1 µL der Zellsuspension wurde die berechnete Konzentration mit dem Faktor 10 multipliziert. Die Zellkonzentration der Zellsuspension wurde mittels Gleichung 1 berechnet.

$$c = \frac{\text{Zellzahl}}{n} \cdot \text{VF} \cdot 10 \qquad \text{Gleichung 1}$$

Mit:

c := Zellkonzentration der Zellsuspension in Kulturmedium, Zellen/µL

Zellzahl := Anzahl der Zellen in den gezählten Feldern des Rasters

n := Anzahl der gezählten Felder des Rastern

VF := Verdünnungsfaktor der Verdünnung mit Trypanblau

Für das Aussäen der Zellen mit einer definierten Zellzahl wurde das benötigte Volumen der Zellsuspension mittels der Gleichung 2 berechnet.

$$V(\text{Zellsuspension}) = \frac{\text{Benötigte Zellzahl}}{c} \qquad \text{Gleichung 2}$$

Mit:

V(Zellsuspension) := Benötigtes Volumen der Zellsuspension, µL

c := Zellkonzentration der Zellsuspension in Kulturmedium, Zellen/µL

4.2.) Dosis-Wirkungs-Kurve

Mittels der Dosis-Wirkungskurve wurde für jede Zelllinie die Puromycin-Konzentration bestimmt, bei der die Zellen in einem Zeitraum von 2 bis 4 Tagen sterben. An Tag 0 wurden die Zellen je mit einer, wie in Kapitel 4.1.) Zellkultur beschrieben, bestimmten Anzahl von 20 000 Zellen/cm^2 und 10 000 Zellen/cm^2 in eine 24-Well-Platte ausgesät.

An Tag 1 wurde das Medium mit unterschiedlichen Puromycin-Konzentrationen angesetzt. Dafür wurde aus einer Stocklösung mit einer Konzentration von 10 mg/mL eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Konzentrationen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Puromycin-Konzentrationen für die Dosis-Wirkungs-Kurve. Das Kulturmedium wurde mittels einer Verdünnungsreihe in den angegebenen Konzentrationen *c* angesetzt. Dafür wurde eine Puromycin-Stocklösung mit einer Konzentration von 10 mg/µL verwendet.

***c*(Puromycin), µg/mL**
2,5
1,5
1
0,75
0,5
0,25

Das Medium von Tag 0 wurde entfernt und die Wells mit je 500 µL des Mediums mit der entsprechenden Puromycin-Konzentration gefüllt. Dabei wurden die Zellen in zwei Wells nicht mit Puromycin behandelt und als Kontrolle verwendet. Die Zellen wurden alle 24 Stunden unter dem Mikroskop begutachtet.

4.3.) Lentivirale Transduktion

Für den KO von smRC1 hat die AG von Felden ein eigenes Modell entwickelt. Die Konsensussequenz von smRC1 wurde erweitert und als Ziel-Sequenz für die Transduktion genutzt. Die Ziel-Sequenz ist also: GGTGTTCAGGTGTTAAGAAGAGG. Die abschließende Sequenz AGG dient dabei als PAM für Cas9. Diese findet sich, wie in Kapitel 3.3.2.) Eigenschaften von smRC1 beschrieben, in dem Genom wieder. Nach der Transduktion kann über den Vergleich der nachfolgenden Basenreihenfolge der KO-Zelllinien mit den Kontroll-Zelllinien, festgestellt werden, ob der KO erfolgreich war. Für die Kontroll-Zelllinien wurde der leere Vektor SCRAMBLE (SCR) eingesetzt. Die Vektoren von smRC1 und SCR enthielten zusätzlich eine Sequenz für eine Resistenz gegen das Antibiotikum Puromycin, das somit für die positive Selektion verwendet werden konnte.

Für die lentivirale Transduktion wurden die Zellen, wie in Kapitel 4.1.) Zellkultur beschrieben, an Tag 1 geerntet, die Zellzahl wurde entsprechend der Tabelle 9 eingestellt und die Zellen wurden in eine 24-Well-Platte ausgesät.

Tabelle 9: Zellzahl für die lentivirale Transduktion. Die lentivirale Transduktion wurde mit den drei Zelllinien SNU-475, Alex/PLC und Hep 3B durchgeführt, die mit der angegebenen Zellzahl/cm² in eine 24-Well-Platte ausgesät wurden.

Zelllinie	Benötigte Zellzahl/cm²
SNU 475	15 000
Alex/PLC	10 000
Hep 3B	10 000

An Tag 2 wurde das Kulturmedium gewechselt und die Viruspartikel wurden hinzugefügt. Die eingesetzten Viruskonzentrationen für die verschiedenen Zelllinien beruhten auf vorangegangenen Versuchen der AG von Felden. Bei der Transduktion der Zelllinie SNU-475 wurden die Viruspartikel mit je einem Volumen von 5 µL und 10 µL eingesetzt. Die Zelllinien Hep 3B und Alex/PLC wurden je mit 5 µL und 15 µL der beiden Lentiviren mit den Vektoren SCR und smRC1 infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 5 h wurde das Kulturmedium gewechselt.

An Tag 4 wurde die Selektion mittels Puromycin gestartet. Dafür wurde das Kulturmedium mit der zellspezifischen Puromycin-Konzentration, die in Kapitel 4.2.) Dosis-Wirkungs-Kurve bestimmt wurde, angesetzt. Nach der Selektion wurden die wachsenden Zellen wie in Kapitel 4.1.) Zellkultur beschrieben, gelöst und in eine 12-Well-Platte überführt.

4.4.) Klonale Isolation

Die speziell für die klonale Isolation verwendeten Materialien sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Verwendete Materialen für die klonale Isolation.

Name	Hersteller
ClonaCell Flex, semisolides methylzellulose-basiertes Medium	Stemcell Technologies

Da die Transduktion bei jeder Zelle individuell abgelaufen ist, war eine klonale Isolation notwendig. Dabei wurden einzelne Zellen aus dem Pool der Zelllinien isoliert und expandiert, mit dem Ziel eine monoklonale Zelllinie zu isolieren. Für die klonale Isolation der Zelllinien von SNU-475 wurden drei verschiedene Methoden angewandt. Es wurden die Methoden Einzelzellklonierung, Kolonie-Picking und die Klonierung mit semisolidem Medium durchgeführt. Bei den neuen Zelllinien von Hep 3B und Alex/PLC wurde die klonale Isolation mit Einzelzellklonierung und Kolonie-Picking durchgeführt. Alle Zelllinien, die für die klonale Isolation ausgewählt wurden, sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Zelllinien für die klonale Isolation. Der Name der Zelllinie setzt sich aus dem Namen der Zelllinie, der verwendeten Methode CRISPR/Cas9 und dem transduzierten Virus (SCR oder smRC1) zusammen. Da eine Transduktion in jeder Zelle individuell abläuft, werden die neuen Zelllinien als Pool bezeichnet.

Zelllinie
SNU-475 CRISPR/Cas9 SCR Pool
SNU-475 CRISPR/Cas9 smRC1 KO Pool
Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR Pool
Alex/PLC CRISPR/Cas9 smRC1 KO Pool

Zelllinie
Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR Pool
Hep 3B CRISPR/Cas9 smRC1 KO Pool

4.4.1.) Einzelzellklonierung

Bei der Einzelzellklonierung wurden die Zellen, wie in Kapitel 4.1.) Zellkultur beschrieben gelöst und die Zellzahl wurde bestimmt. Mit dem Kulturmedium wurde eine Zellsuspension mit 0,75 Zellen/Well einer 96-Well-Platte angesetzt. So sollte die Wahrscheinlichkeit für mehr als eine Zelle pro Well minimiert werden. Für jede Zelllinie wurden 2 Platten ausgesät und in den Inkubator gestellt.

Nach einem Zeitraum von etwa 7 Tagen wurden die Wells erstmalig auf Zellwachstum überprüft. Die Wells, in welchen mehr als eine Zelle wuchsen, wurden markiert und aussortiert. Bei den Wells, in welchen eine einzelne Zelle anwuchs und eine Kolonie bildete, wurde das Kulturmedium in regelmäßigen Abständen gewechselt. Dabei wurde der FBS-Anteil des Kulturmediums auf 15 % erhöht. Je nach Wachstum der Zellen wurden sie in die nächstgrößeren Wells überführt, beispielsweise von einer 96-Well-Platte in eine 48-Well-Platte, und so expandiert. Bis sie in einer Petrischale mit einem Durchmesser von 10 cm wachsen konnten, wurde der erhöhte FBS-Anteil beibehalten.

4.4.2.) Kolonie-Picking

Für die klonale Isolation mittels Kolonie-Picking wurden die Zellen aus dem Well der 12-Well Platte, wie in Kapitel 4.1.) Zellkultur beschrieben, mit 150 µL Trypsin gelöst und in einem Gesamtvolumen von 1 mL Kulturmedium verdünnt. Davon wurden 100 µL in 9,9 mL Kulturmedium pipettiert und in eine 10 cm Petrischale ausgesät. So sollte eine geringe Zelldichte erreicht werden, aus welcher separierte Zellkolonien wachsen sollten. Das Kulturmedium wurde, wenn nötig, gewechselt.

Nach einem Zeitraum von etwa 10 Tagen waren bei allen Zelllinien die Kolonien sichtbar und wurden unter dem Mikroskop mit einem Marker markiert. Mit einer 200 µL Pipettenspitze wurden einzelne Kolonien aufgenommen und in eine 24-Well-Platte mit Kulturmedium überführt. Dieser Vorgang wurde mit mehreren, separiert angewachsenen Kolonien jeder Zelllinie durchgeführt und ist in Abbildung 12 beispielhaft dargestellt.

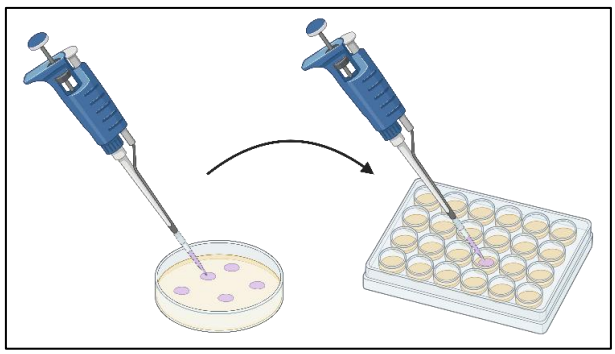


Abbildung 12: Kolonie-Picking. Die angewachsenen Zell-Kolonien wurden unter dem Mikroskop markiert, mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in eine 24-Well-Platte überführt. (Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender)

Die gepickten Zellen wurden regelmäßig auf Wachstum überprüft und entsprechend expandiert. Dabei wurde der FBS-Anteil des Kulturmediums auf 15 % erhöht, bis die Zellen in einer 10 cm Petrischale wachsen konnten.

4.4.3.) Klonierung in semisolidem Medium

Für die Klonierung in semisolidem Medium wurde das ClonaCell Flex Medium verwendet. Diese Art der Klonierung wurde nur mit der Zelllinie SNU-475 nach der Transduktion durchgeführt. Das Medium wurde auf Raumtemperatur erwärmt und in einem Verhältnis von 1:1 mit 2X RPMI Medium mit Glutamin und Penicillin/Streptomycin gemischt. Für den finalen Ansatz des semisoliden Mediums wurden für jede Zelllinie ein Volumen von 9 mL des Mediums vorgelegt. Es wurden 1 mL FBS und 75 µL Puromycin-Lösung mit einer Konzentration von 100 µg/mL hinzugefügt. Es wurden die Zellsuspensionen aus Kapitel 4.4.2.) Kolonie-Picking genutzt. Von den Zellsuspensionen der verwendeten Pools der Zelllinien SNU-475 CRISPR/Cas9 SCR und SNU-475 CRISPR/Cas9 smRC1 wurde je ein Volumen von 100 µL und 200 µL dem Ansatz des Mediums hinzugefügt. Das Medium mit den Zellen wurde für 10 Minuten stehen gelassen, um Luftblasen zu minimieren. Anschließend wurde mit einer Einmalspritze mit einer stumpfen Kanüle das Medium aufgezogen und in eine Petrischale mit einem Durchmesser von 10 cm überführt. Mit rotierenden Bewegungen wurde das Medium verteilt und die Platte in den Inkubator gestellt.

Nach einem Zeitraum von 17 Tagen wurden die angewachsenen Kolonien unter dem Mikroskop markiert, mit einer Einmalspritze mit einer stumpfen Kanüle aufgesogen und in ein Well einer 24-Well-Platte mit Kulturmedium überführt. Die gepickten Zellen wurden regelmäßig auf Wachstum überprüft und entsprechend expandiert. Dabei wurde der FBS-Anteil des Kulturmediums auf 15 % erhöht, bis die Zellen in einer 10 cm Petrischale wachsen konnten.

4.5.) DNA-Sequenzierung

Die speziell für die DNA-Sequenzierung verwendeten Materialien sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Verwendete Materialen für die DNA-Sequenzierung.

Name	Hersteller
100bp DNA ladder, DirectLoad Plus	Merck
Agarose Standard	Carl Roth
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
Monarch Spin PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg)	New England BioLabs Inc
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	Thermo Scientific
Roti Gel Stain	Carl Roth
TAE Puffer 50X	Carl Roth
TE-Puffer (1X), pH 8,0 low EDTA	PanReac AppliChem ITW Reagents

Für die DNA-Sequenzierung wurde die DNA der Zellen extrahiert, quantifiziert, das Zielgen smRC1 wurde mittels PCR amplifiziert und nach erneuter Bestimmung der Konzentration aufgereinigt. Für die Sequenzierung wurden die Proben an die Firma Eurofins Genomics gesendet. Die Pools der Kontroll-Zelllinien und der KO-Zelllinien wurden vor den isolierten Zelllinien sequenziert, um anhand des Chromatogramms abschätzen zu können, ob KO-Zellen vorhanden sein könnten. Die in diesem Kapitel bestimmten Konzentrationen sowie alle verwendeten Volumina befinden sind in den folgenden Tabellen. Alle DNA-Proben, die von den Zellen SNU-475 CRISPR/Cas9 genommen wurden, sind in Tabelle 13 angegeben. Tabelle 14 gibt alle DNA-Proben der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9 an und in Tabelle 15 sind die Angaben für die Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9 zu finden.

Tabelle 13: DNA-Proben der Zelllinien SNU-475 CRISPR/Cas9. Die DNA der Proben der angegebenen Passage P wurde extrahiert und mittels Nano Drop wurde die Konzentration *c*(DNA) bestimmt. Die Proben wurden mit dem angegebenen VF mit nuklease-freiem Wasser verdünnt, um die DNA-Konzentration $c_{verdünnt}$(DNA) zu erreichen. Das Volumen *V* der DNA-Proben der Zelllinien enthält eine DNA-Masse von 200 ng. Die Proben wurden mit nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11 µL ergänzt und für den PCR-Ansatz zur Amplifikation des Zielgens von smRC1 eingesetzt. Für die nachfolgende Aufreinigung wurde das Volumen der PCR-Produkte V(PCR) der Zelllinien anhand der Ergebnisse der zuvor durchgeführten Gelelektrophorese gewählt.

Nr.	Zelllinie	P	*c*(DNA), ng/µL	*V*(DNA), µL	*V*(PCR), µL
1	SCR Pool	4	46,649	4,29	10
2	KO Pool	4	247,203	0,81	10
3	SCR E	5	24,875	8,04	8
4	KO I	6	56,320	3,55	5

Tabelle 14: DNA-Proben der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9. Die DNA der Proben der angegebenen Passage P wurde extrahiert und mittels Nano Drop wurde die Konzentration *c*(DNA) bestimmt. Die Proben wurden mit dem angegebenen VF mit nuklease-freiem Wasser verdünnt, um die DNA-Konzentration $c_{verdünnt}$(DNA) zu erreichen. Das Volumen *V* der DNA-Proben der Zelllinien enthält eine DNA-Masse von 200 ng. Die Proben wurden mit nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11 µL ergänzt und für den PCR-Ansatz zur Amplifikation des Zielgens von smRC1 eingesetzt. Für die nachfolgende Aufreinigung wurde das Volumen der PCR-Produkte V(PCR) der Zelllinien anhand der Ergebnisse der zuvor durchgeführten Gelelektrophorese gewählt. Zusätzlich zu den Proben des KO-Versuches wurde eine DNA-Probe der Zelllinie Alex/PLC von der AG von Felden zur Verfügung gestellt. Die Probe umfasste 2 Millionen Zellen, wurde am 31.08.2023 genommen und am 14.09.2023 wurde die DNA isoliert. Seitdem wurde sie bei -20 °C gelagert.

Nr.	Zelllinie	P	*c*(DNA), ng/µL	VF	$c_{verdünnt}$(DNA), ng/µL	*V*(DNA), µL	*V*(PCR), µL
5	SCR Pool	2	58,459	1	58,459	3,42	5
6	KO Pool	2	98,792	1	98,792	2,02	5
7	SCR O	5	41,353	1	41,353	4,84	5
8	SCR P	5	159,123	1	159,123	1,26	5
9	SCR A	5	105,427	1	105,427	1,90	5
10	KO 1	5	187,773	1	187,773	1,07	5
11	KO 2	5	222,586	3	74,195	2,70	5
12	KO 3	5	143,124	1	143,124	1,40	5
13	KO 4	4	114,486	1	114,486	1,75	5
14	KO 5	5	264,697	3	88,232	2,27	8
15	KO L	5	176,381	1	176,381	1,13	8
16	KO 6	5	233,078	3	77,693	2,57	5
17	KO 7	5	348,676	3	116,225	1,72	8
18	KO 8	5	313,012	3	104,337	1,92	5
19	KO T	5	128,759	1	128,759	1,55	8
20	KO I	5	329,732	3	109,911	1,82	10

Nr.	Zelllinie	P	*c*(DNA), ng/µL	VF	$c_{verdünnt}$(DNA), ng/µL	*V*(DNA), µL	*V*(PCR), µL
21	KO 9	5	195,239	1	195,239	1,02	5
22	KO E	6	213,138	3	71,046	2,82	8
23	KO 10	6	134,681	1	134,681	1,48	5
24	Alex/PLC	2	416,000	3	138,667	1,44	5

Tabelle 15: DNA-Proben der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9. Die DNA der Proben der angegebenen Passage P wurde extrahiert und mittels Nano Drop wurde die Konzentration *c*(DNA) bestimmt. Die Proben wurden mit dem angegebenen VF mit nuklease-freiem Wasser verdünnt, um die DNA-Konzentration $c_{verdünnt}$(DNA) zu erreichen. Das Volumen *V* der DNA-Proben der Zelllinien enthält eine DNA-Masse von 200 ng. Die Proben wurden mit nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11 µL ergänzt und für den PCR-Ansatz zur Amplifikation des Zielgens von smRC1 eingesetzt. Für die nachfolgende Aufreinigung wurde das Volumen der PCR-Produkte V(PCR) der Zelllinien anhand der Ergebnisse der zuvor durchgeführten Gelelektrophorese gewählt.

Nr.	Zelllinie	P	*c*(DNA), ng/µL	VF	$c_{verdünnt}$(DNA), ng/µL	*V*(DNA), µL	*V*(PCR), µL
25	SCR Pool	3	75,721	1	75,721	2,64	10
26	KO Pool	3	83,532	1	83,532	2,39	10
27	KO A	5	213,725	3	71,242	2,81	5
28	KO L	5	138,919	1	138,919	1,44	5
29	KO 1	3	542,725	3	180,908	1,11	5
30	KO M	3	196,926	1	196,926	1,02	10
31	KO C	5	179,107	1	179,107	1,12	10
32	KO 2	5	96,155	1	96,155	2,08	5
33	KO 3	4	78,735	1	78,735	2,54	5
34	KO Y	4	148,818	1	148,818	1,34	5
35	KO 4	4	75,464	1	75,464	2,65	5
36	KO H	4	94,288	1	94,288	2,12	8
37	KO E	3	104,514	1	104,514	1,91	8
38	KO 5	4	120,304	1	120,304	1,66	8
39	SCR 1	5	111,085	1	111,085	1,80	5
40	SCR 2	5	104,157	1	104,157	1,92	5

4.5.1.) Probenahme

Die Zellen wurden, wie in Kapitel 4.1.) Zellkultur beschrieben, gelöst. Für die DNA-Sequenzierung wurde von jeder Zelllinie ein vollständig bewachsenes Well einer 6-Well-Platte verwendet. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 500 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in PBS resuspendiert, bevor es erneut zentrifugiert wurde. Erneut wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet wurde in 200 µL PBS resuspendiert. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

4.5.2.) DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurde das QIAamp DNA Mini Kit verwendet. Einer Probe wurden 20 µL Proteinase K und 200 µL Puffer AL hinzugefügt. Nach 15 s mischen mit dem Vortexmischer, wurde die Probe 10 min bei 56 °C inkubiert und anschließend kurz herunterzentrifugiert. Es wurden 200 µL 99,9 % Ethanol hinzugefügt und nach 15 s mischen mit dem Vortexmischer wurde die Probe erneut herunterzentrifugiert, bevor sie auf die QIAamp Mini Spin Säule in einem 2 mL Reaktionsgefäß gegeben wurde. Die Säule wurde 1 min bei 6 000 rcf zentrifugiert.

Der Durchfluss wurde verworfen und es wurden 500 µL AW1 Puffer auf die Säule gegeben. Nach einer Zentrifugation bei 6 000 rcf wurde der Durchfluss erneut verworfen und 500 µL AW2 Puffer auf die Säule gegeben. Die Säule wurde für 3 min bei 20 000 rcf zentrifugiert und anschließend in einem neuen Reaktionsgefäß erneut für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und die Membran wurde mit 100 µL AE Puffer bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurde die Säule für 1 min bei 6 000 rcf zentrifugiert, wobei die Probe eluiert wurde.

4.5.3.) Quantifizierung

Die DNA-Konzentration des Durchflusses wurde mittels Nano Drop bestimmt. Als Blank wurde 1 µL nuklease-freies Wasser verwendet und es wurde je 1 µL der Probe gemessen. Zusätzlich zu den Proben des KO-Versuches wurde eine DNA-Probe der Zelllinie Alex/PLC von der AG von Felden zur Verfügung gestellt. Die Probe umfasste 2 Millionen Zellen, wurde am 31.08.2023 genommen und am 14.09.2023 wurde die DNA isoliert. Seitdem wurde sie bei -20 °C gelagert.

4.5.4.) PCR

Zur Amplifikation der Ziel-Region von smRC1 wurde eine PCR durchgeführt. Die Primer wurden von der AG von Felden speziell für smRC1 designt. Dafür wurde jeweils die Sequenz von dem Anfang und dem Ende der DNA-Sequenz von smRC1 verwendet. Der Forward-Primer ist in 5´-3´-Richtung, der Reverse-Primer in 3´-5´-Richtung designt. Die Tabelle 16 zeigt die Sequenzen der beiden Primer.

Tabelle 16: Primer für die Amplifikation von smRC1. Die Primer für die PCR wurden von der AG von Felden designt. Dabei wurde die Anfangs- und die Endsequenz von dem Gen für smRC1 verwendet, um den gesamten Abschnitt amplifizieren zu können. Der Forward-Primer ist in 5´-3´-Richtung, der Reverse-Primer in 3´-5´-Richtung designt. Beide Primer haben eine Stoffmengenkonzentration *c* von 10 µM.

Primer	**Sequenz**	***c*, µM**
smRC1 Forward	CTGAGAGTTCCCATTTCTGAGC	10
smRC1 Reverse	ATAAAACCAAGCAAAAGCATCC	10

Dafür wurde zuerst der Master Mix hergestellt. Verwendet wurden die Reagenzien, wie in Tabelle 17 angegeben, hochgerechnet auf die Anzahl der Proben.

Tabelle 17: Ansatz des Master Mixes für die PCR zur Amplifikation der Ziel-Region von smRC1. Das Volumen *V* ist für eine Probe angegeben und wurde für den Ansatz entsprechend der Anzahl der Proben angepasst. Die beiden Primer wurden von der AG von Felden designt.

Name	***V*(1X), µL**
DreamTaq Green PCR Master Mix 2X	12,5
Primer Forward	0,75
Primer Reverse	0,75

Die Proben wurden mit dem angegebenen VF mit nuklease-freiem Wasser verdünnt, um eine geeignete Konzentration $c_{\text{verdünnt}}$(DNA) zu erreichen. Die PCR-Proben wurden mit einer Masse von 200 ng DNA angesetzt. Zur Berechnung der benötigten Volumina *V*(DNA) wurde die Gleichung 3 verwendet. Die Proben wurden mit nuklease-freiem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 11 µL ergänzt.

$$V(\mathrm{DNA}) = \frac{m(\mathrm{DNA})}{c(\mathrm{DNA})}$$ Gleichung 3

Mit:
V(DNA) := Benötigtes Volumen der DNA-Probe, µL
m(DNA) := Eingesetzte DNA-Masse = 200 ng
c(DNA) := DNA-Konzentration der Probe, ng/µL

Für die PCR wurden je 14 µL Master Mix und 11 µL verdünnte Probe gemischt. Die Tabelle 18 zeigt die Phasen des verwendeten PCR-Programms.

Tabelle 18: Phasen der PCR zur Amplifikation des Zielgens von smRC1.

Phase	Zeit, min	Temperatur, °C	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	3	95	1
Denaturierung	0,5	95	35
Primerhybridisierung	0,5	56	
Elongation	1	72	
Finale Elongation	5	72	1
Kühlung	4	∞	-

4.5.5.) Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese analysiert. So konnte überprüft werden, ob die Amplifikation erfolgreich war und anhand der Bandenintensität konnte die DNA-Menge abgeschätzt werden. Dafür wurde ein Gel mit TAE-Puffer und 1,5 % Agarose angesetzt. Dem Gel wurden außerdem 1 µL Gel Stain pro 20 mL Ansatz hinzugefügt. Dabei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der an die DNA bindet und so die Detektion möglich macht. Das Gel wurde etwa eine Stunde vor der Verwendung angesetzt. Das Gel wurde in den Tank gelegt, welcher mit TAE-Puffer gefüllt wurde. Zur Beladung des Gels wurden je 5 µL Probe und 5 µL Marker verwendet. Die Elektrophorese wurde für 40 bis 50 min bei 4 °C und einer Spannung von 50 Volt durchgeführt. Nach der Auftrennung fand die Detektion an dem Imaging-System statt. Abbildung 13 zeigt die erwarteten Banden des verwendeten DNA-Markers.

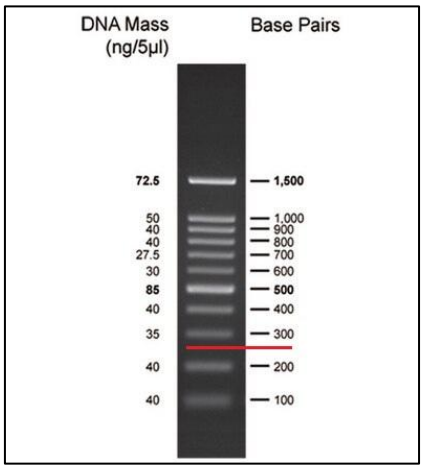


Abbildung 13: Banden des DNA-Markers. Es wurde die DirectLoad Plus 100 bp DNA Ladder verwendet. Die Bande von smRC1 wird auf Höhe der roten Markierung bei einer Größe von 280 bp erwartet. (https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/DirectLoad-Plus-100bp-DNA-Ladder,MM_NF-DPLUS-100)

4.5.6.) Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des CleanUp-Kits aufgereinigt und so von überschüssigen Primern, Nukleotiden, Enzymen oder anderen Bestandteilen der PCR-Reaktion befreit. Dafür wurde anhand der Ergebnisse aus Kapitel 4.5.5.) Gelelektrophorese das benötigte Volumen der PCR-Produkte *V*(PCR), abhängig von der Intensität der Bande zwischen 5 µL und 10 µL bestimmt. Hierfür wurden bereits etablierte Ergebnisse der AG von Felden als Grundlage genutzt.

Die Proben wurden entsprechend mit TE-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 100 µL ergänzt. Anschließend wurden 500 µL Binding Puffer hinzugefügt, die Probe wurde auf die Säule geladen und für 1 min zentrifugiert. Während der Aufreinigung wurden alle Zentrifugationen bei 16 000 rcf durchgeführt. Der Durchfluss wurde verworfen und es wurden zwei Waschschritte mit 200 µL Waschpuffer und anschließender Zentrifugation von 1 min durchgeführt. Abschließend wurde die Säule auf ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gesteckt und es wurden 10 µL Elutionspuffer auf die Matrix der Säule gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurde die DNA mittels 1 min Zentrifugation eluiert.

4.5.7.) Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde der TubeSeq Supreme Sequencing Service von der Firma Eurofins Genomics genutzt. Es wurde ein Sanger Sequencing in Tubes durchgeführt. Die eingesendeten Proben enthielten die aufgereinigten PCR-Produkte mit einer Länge von etwa 280 bp, für die von der Firma eine ungefähre Konzentration von 5 ng/µL gewünscht wird. Die Proben wurden mit einem Volumen von 20 µL versendet.[19]

Vor der Einsendung wurde die aufgereinigte Probe mit nuklease-freiem Wasser und einem VF von 10 verdünnt, um eine Konzentration von 1 bis 10 ng/µL zu erreichen. Die Proben wurden mit den entsprechenden Barcodes versehen und versendet. Zusätzlich wurden die in der PCR verwendeten Primer in einer Konzentration von 10 pmol/µl versendet, um die Sequenzierung zu ermöglichen.

4.6.) Untersuchung der Genexpression

Die speziell für die Untersuchung der Genexpression verwendeten Materialien sind in Tabelle ***19*** aufgelistet.

Tabelle 19: Verwendete Materialen für die Untersuchung der Genexpression.

Name	Hersteller
High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific
miRNeasy Micro Kit (50)	Qiagen
Taqman Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific

Name	Hersteller
Taqman MicroRNA Reverse Transkription Kit	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific
Taqman Primer GAPDH	Applied Biosystems by Thermo Fischer Scientific

Für die Untersuchung der Genexpression wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und mittels cDNA-Synthese auf die RT-qPCR vorbereitet. Anhand der Ergebnisse der RT-qPCR konnte die relative Genexpression von smRC1 der Kontroll-Zelllinien und der smRC1-KO-Zelllinien bestimmt werden. Die Genexpression wurde in zwei Durchläufen separat untersucht. In Tabelle 20 und Tabelle 21 sind die Ansätze von Durchlauf 1/2 der Zelllinien Alex/PLC und Hep 3B zu finden.

Tabelle 20: RNA-Proben der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9 in Durchlauf 1/2. Die RNA der Proben der angegebenen Passage P wurde extrahiert und mittels Nano Drop quantifiziert (*c*(RNA)). Für die nachfolgende reverse Transkription wurde die Probe 5 mit einem VF_{RT} von 2 verdünnt, wodurch die verwendete Konzentration bei $c_{verdünnt}$(RNA)=368,838 ng/µL lag. Für die reverse Transkription der sRNA wurde das Volumen *V*(sRNA) für die RNA-Masse *m*(sRNA) berechnet und nach der Transkription wurde die cDNA mit dem VF(sRNA) verdünnt. Für die reverse Transkription der mRNA wurde das Volumen *V*(mRNA) für die RNA-Masse *m*(mRNA)=500 ng berechnet und nach der Transkription mit einem VF(mRNA) von 5 verdünnt.

Nr.	Zelllinie	P	*c*(RNA), ng/µL	*m*(sRNA), ng	*V*(sRNA), µL	VF(sRNA)	*V*(mRNA), µL
1	SCR O	10	108,731	100	0,92	2	4,60
2	SCR P	10	249,842	500	2,00	10	2,00
3	SCR A	10	59,614	100	1,68	2	8,39
4	KO L	9	63,697	100	1,57	2	7,85
5	KO I	8	737,676	500	1,36	10	1,36

Tabelle 21: RNA-Proben der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9 in Durchlauf 1/2. Die RNA der Proben der angegebenen Passage P wurde extrahiert und mittels Nano Drop quantifiziert (*c*(RNA)). Für die reverse Transkription der sRNA wurde das Volumen *V*(sRNA) für die RNA-Masse *m*(sRNA)=100 ng berechnet, wobei bei der Probe 10 *m*(sRNA)=250 ng eingesetzt wurde. Nach der Transkription wurde die cDNA mit dem VF(sRNA)=2 verdünnt, wobei der VF(sRNA) für Probe 10 bei 5 lag. Für die reverse Transkription der mRNA wurde das Volumen *V*(mRNA) für die RNA-Masse *m*(mRNA) berechnet und nach der Transkription mit dem VF(mRNA) verdünnt

Nr.	Zelllinie	P	*c*(RNA), ng/µL	*V*(sRNA), µL	*m*(mRNA), ng	*V*(mRNA), µL	VF(mRNA)
6	SCR A	9	29,454	3,40	250	8,49	2,5
7	SCR L	9	23,537	4,25	100	4,25	1
8	KO C	8	66,250	1,51	500	7,55	5
9	KO M	7	27,835	3,59	250	8,98	2,5
10	KO Y	7	79,735	3,14	500	6,27	5

Die Ansätze für Durchlauf 2/2 sind in Tabelle 22 und Tabelle 23 aufgelistet.

Tabelle 22: RNA-Proben der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9 in Durchlauf 2/2. Die RNA der Proben der angegebenen Passage P wurde extrahiert und mittels Nano Drop quantifiziert (*c*(RNA)). Mit einem VF von 20 wurde die verwendete Konzentration $c_{verdünnt}$(RNA) erreicht. Für die reverse Transkription wurde das Volumen *V*(RNA) für die RNA-Masse *m*(RNA)=500 ng berechnet. Für die nachfolgende RT-qPCR wurde die cDNA der sRNA mit einem VF von 10 und die cDNA der mRNA mit einem VF von 5 verdünnt.

Nr.	Zelllinie	P	*c*(RNA), ng/µL	$c_{verdünnt}$(RNA), ng/µL	*V*(RNA), µL
1	SCR O	11	5196,010	259,801	1,92
2	SCR P	11	5267,910	263,396	1,90
3	SCR A	11	5098,440	254,922	1,96

Nr.	Zelllinie	P	*c*(RNA), ng/µL	$c_{verdünnt}$(RNA), ng/µL	*V*(RNA), µL
4	KO L	10	5071,830	253,592	1,97
5	KO I	9	5240,170	262,009	1,91
6	KO T	9	5220,160	261,008	1,92
7	KO T	9	4572,360	228,618	2,19
8	KO E	9	4550,620	227,531	2,20
9	KO E	9	5289,050	264,453	1,89

Tabelle 23: RNA-Proben der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9 in Durchlauf 2/2. Die RNA der Proben der angegebenen Passage P wurde extrahiert und mittels Nano Drop quantifiziert (*c*(RNA)). Mit dem VF_{RT} wurde die verwendete Konzentration $c_{verdünnt}$(RNA) erreicht. Für die reverse Transkription wurde das Volumen *V*(RNA) für die RNA-Masse *m*(RNA)=500 ng berechnet. Für die nachfolgende RT-qPCR wurde die cDNA der sRNA mit einem VF von 10 und die cDNA der mRNA mit einem VF von 5 verdünnt.

Nr.	Zelllinie	P	*c*(RNA), ng/µL	VF_{RT}	$c_{verdünnt}$(RNA), ng/µL	*V*(RNA), µL
10	SCR A	10	3172,450	20	158,623	3,15
11	SCR L	10	2896,450	10	289,645	1,73
12	KO C	9	2283,820	10	228,382	2,19
13	KO H	9	4280,390	20	214,020	2,34
14	KO H	9	3783,050	20	189,153	2,64
15	KO E	9	3007,560	10	300,756	1,66
16	KO E	9	3779,680	20	188,984	2,65
17	KO M	8	3993,510	20	199,676	2,50
18	KO Y	8	3957,830	20	197,892	2,53

4.6.1.) Probenvorbereitung

Die Zellen wurden wie in Kapitel 4.1.) Zellkultur beschrieben gelöst und die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Für die RNA-Extraktion aus kultivierten Zellen wurde eine vollständig bewachsene Petrischale mit einem Durchmesser von 10 cm verwendet.

Die Reaktionsgefäße mit den Zellsuspensionen wurden für 5 min bei 500 rcf zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1000 µL PBS resuspendiert. Die Reaktionsgefäße wurden erneut für 5 min bei 500 rcf zentrifugiert und der Waschvorgang wurde ein zweites Mal durchgeführt. Der Überstand wurde wieder abgenommen und das Pellet in 700 µL Trizol resuspendiert. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.6.2.) RNA-Extraktion

Die Probe wurde aufgetaut und 140 µL Chloroform wurden hinzugefügt. Nach 15 s kräftigem Schütteln und 2 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgefäß für 15 min bei 12 000 rcf bei 4 °C zentrifugiert. Die Probe trennte sich in zwei Phasen. Die obere, durchsichtige Phase wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 525 µL 99,9 % Ethanol gemischt. 700 µL des Gemisches wurden in die RNeasy MinElute spin Säule gegeben und für 30 s bei 8000 rcf bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem Rest der Probe wiederholt, wobei der Durchfluss jeweils verworfen wurde.

Es wurden 700 µL RWT Puffer auf die Säule pipettiert und für 30 s bei 8000 rcf zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 500 µL RPE Puffer wiederholt, wobei der Durchfluss jeweils verworfen wurde. Um die Membran zu waschen, wurden 500 µL 80 % Ethanol auf die Säule pipettiert und für 2 min bei 8000 rcf zentrifugiert. Die Säule wurde auf einem neuen 2 mL Reaktionsgefäß platziert und für 5 min bei der höchsten Geschwindigkeit von etwa 21 000 rcf zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Anschließend wurde die Säule erneut auf einem neuen 1,5 mL Reaktionsgefäß platziert. Die Matrix wurde mit 14 µL RNase-freiem Wasser benetzt und für 1 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. So konnten etwa 12 µL Probe eluiert werden.

4.6.3.) Quantifizierung

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration c(RNA) wurde der Nano Drop verwendet. Als Blank wurde 1 µL RNase freies Wasser verwendet und es wurde je 1 µL der Probe gemessen.

4.6.4.) Reverse Transkription

Es wurden zwei reverse Transkriptionen durchgeführt. Für die Analyse von smRC1 wurde die cDNA-Synthese der sRNA unter Verwendung von smRC-spezifischen Primern durchgeführt. Für die Analyse des Housekeeping Gens *GAPDH* wurde die mRNA jeder Probe in cDNA transkribiert.

4.6.4.1.) Kleine RNA

Für die reverse Transkription der sRNA wurde das Taqman MicroRNA Assay verwendet. Es wurde 1 µL des RT-Primers in einem Gesamtvolumen von 100 µL TE-Puffer angesetzt. Der verdünnte Primer konnte für 2 Monate bei -20 °C gelagert und für die Reaktionen verwendet werden. Der Ansatz des Master Mixes wurde, wie in Tabelle 24 angegeben, entsprechend der Anzahl der Proben berechnet und angesetzt.

Tabelle 24: Ansatz des Master Mixes für die PCR zur smRC1-spezifischen cDNA-Synthese der sRNA. Das Volumen *V* ist für eine Probe angegeben und wurde für den Ansatz entsprechend der Anzahl der Proben angepasst.

Name	***V*(1X), µL**
RT Primer	6
10X RT Puffer	1,5
dNTPs mit dTTP	0,3
Rnase Inhibitor	0,19
MultiScribe Reverse Transkriptase	3

Die benötigten Volumina *V*(RNA) der RNA-Proben wurden mittels Gleichung 4 berechnet.

$$V(\mathrm{RNA}) = \frac{m(\mathrm{RNA})}{c(\mathrm{RNA})}$$ **Gleichung 4**

Mit:

V(RNA) := Benötigtes Volumen der RNA-Probe, µL

m(RNA) := Eingesetzte RNA-Masse, ng

c(RNA) := RNA-Konzentration der Probe, ng/µL

Die Proben wurden mit nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 4,01 µL ergänzt und für die Reaktion mit 10,99 µL Master Mix gemischt. Die Probe wurde kurz zentrifugiert und nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurde das Programm, wie in Tabelle 25 dargestellt, gestartet.

Tabelle 25: Phasen der PCR zur smRC-spezifischen cDNA-Synthese der sRNA.

Phase	Zeit, min	Temperatur, °C
Primerhybridisierung	30	16
Elongation	30	42
Enzym-Inaktivierung	5	85
Kühlung	∞	4

Nach dem Abschließen des Programms wurden die Proben mit nuklease-freiem Wasser verdünnt, wobei der VF für eine eingesetzte RNA-Menge von *m*(RNA)=500 ng bei 10 lag, und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.6.4.2.) mRNA

Für die Reverse Transkription der mRNA wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit verwendet. Der Master Mix wurde, wie in Tabelle 26 angegeben, entsprechend der Anzahl der Proben berechnet und angesetzt.

Tabelle 26: Ansatz des Master Mixes für die PCR zur cDNA-Synthese der mRNA. Das Volumen *V* ist für eine Probe angegeben und wurde für den Ansatz entsprechend der Anzahl der Proben angepasst.

Name	*V*(1X), µL
10X RT Puffer	2
10X RT Random Primer	2
25X dNTP Mix	0,8
MultiScribe Reverse Transkriptase	1

Für die Reaktion wurden die gleichen Volumina *V*(RNA) wie für die cDNA-Sythese der sRNA eingesetzt. Die Proben wurden mit nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 14,20 µL ergänzt und für die Reaktion mit 5,80 µL Master Mix gemischt. Nach einer kurzen Zentrifugation der Proben wurde das Programm, wie in Tabelle 27 angegeben, gestartet.

Tabelle 27: Phasen der PCR zur cDNA-Synthese der mRNA.

Phase	Zeit, min	Temperatur, °C
Primerhybridisierung	10	25
Elongation	120	37
Enzym-Inaktivierung	5	85
Kühlung	∞	4

Nach dem Abschließen des Programms wurden die Proben mit nuklease-freiem Wasser mit verdünnt, wobei der VF für eine eingesetzte RNA-Menge von *m*(RNA)=500 ng bei 5 lag, und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.6.5.) RT-qPCR

Mittels der RT-qPCR wurde die Expression von smRC1 untersucht. Dabei wurde GAPDH als Referenz verwendet. Der Primer für smRC1 wurde von der AG von Felden anhand der Konsensussequenz designt. Die Target-Sequenz des Primers lautet: UUGUCCUCUUCUUAACACC. Der Master Mix wurde, wie in Tabelle 28 angegeben, entsprechend der Anzahl der Proben für die beiden verwendeten Primer angesetzt.

Tabelle 28: Ansatz des Master Mixes für die RT-qPCR. Der Master Mix wurde für die beiden verwendeten Primer entsprechend der Anzahl der Proben angesetzt. Gemessen wurden GAPDH als Referenz und smRC1 als Ziel-Region.

Name	***V*(1X), µL**
Taqman Fast Advanced Master Mix 2X	5
Nuklease-freies Wasser	3,5
Taqman Primer	0,5

In die Wells der 96-Well-PCR-Platte wurden je 9 µL Master Mix und 1 µL der verdünnten Proben pipettiert. Die cDNA der mRNA wurde mit dem Primer für GAPDH gemessen und die cDNA der sRNA mit dem Primer für smRC1. Das Programm wurde, wie in Tabelle 29 angegeben, durchlaufen.

Tabelle 29: Programm für die RT-qPCR.

Phase	**Zeit, s**	**Temperatur, °C**	**Anzahl der Zyklen**
Initiale Denaturierung und Polymerase-Aktivierung	20	95	1
Denaturierung	2	95	40
Primerhybridisierung und Elongation	20	60	

In der Auswertung der RT-qPCR wurde die relative Genexpression mit der $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$-Methode bestimmt. Der C_T-Wert gibt den PCR-Zyklus an, in dem das Signal der Probe den Schwellenwert überschreitet. Je niedriger der Wert, desto früher wurde der Schwellenwert erreicht, desto höher die ursprünglich vorhandene Menge des Zielgens.[20]

Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen und für die Auswertung wurden zunächst die Mittelwerte der C_T-Werte von smRC1 und GAPDH der Proben berechnet. Anhand dieser wurde die Normalisierung mittels Gleichung 5 vorgenommen.

$$\Delta C_T = \bar{C}_{T,\mathrm{smRC1}} - \bar{C}_{T,\mathrm{GPADH}} \qquad \text{Gleichung 5}$$

Mit:

ΔC_T := Normalisierter C_T-Wert

$\bar{C}_{T,\mathrm{smRC1}}$:= Mittlerer C_T-Wert der Messung von smRC1

$\bar{C}_{T,\mathrm{GPADH}}$:= Mittlerer C_T-Wert der Messung von GAPDH

Von den Werten der Kontrollzelllinien SCR wurde ein Mittelwert bestimmt, der als Vergleichswert für die Expression in den KO-Zelllinien genutzt wurde. Die normalisierten Werte wurden mittels Gleichung 6 verglichen.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T,KO} - \Delta\bar{C}_{T,SCR}$$ Gleichung 6

Mit:

$\Delta\Delta C_T$:= Differenz zwischen den normalisierten C_T-Werten

$\Delta C_{T,KO}$:= Normalisierter C_T-Wert der KO-Zelllinie

$\Delta\bar{C}_{T,SCR}$:= Mittelwert der normalisierten C_T-Wert der Kontroll-Zelllinien SCR

Mittels Gleichung 7 wurde die relative Quantifizierung RQ durchgeführt und so die relative Expression von smRC1 bestimmt.

$$RQ = 2^{-(\Delta\Delta C_T)} \cdot 100$$ Gleichung 7

Mit:

RQ:= Relative Expression, %

Ist die RQ > 100, ist die Expression des Ziel-Gens in der KO-Zelllinie höher, als in der Kontroll-Zelllinie. Diese Werte wurden für jede Probe einzeln berechnet. Für jede Zelllinie wurde die RT-qPCR zwei Mal durchgeführt und abschließend wurden mittels des Programmes GraphPad Prism die Mittelwerte und Standardabweichungen der Doppelbestimmungen der Zelllinien berechnet.

4.7.) Kolonie-Bildungs-Assay

Die speziell für den Kolonie-Bildungs-Assay verwendeten Materialien sind in Tabelle 30 aufgelistet.

Tabelle 30: Verwendete Materialen für den Kolonie-Bildungs-Assay.

Name	Hersteller
Kristallviolett-Lösung, 1 %	Sigma Aldrich

Der Kolonie-Bildungs-Assay dient der Überprüfung, ob die Zelllinien nach der Transduktion langfristig überlebensfähig sind und einzelne Zellen in der Lage sind Kolonien zu bilden.[21] Zusätzlich wurde das Wachstum der Kontrollzelllinien SCR mit dem der smRC1-KO-Zelllinien verglichen. Dafür wurden die Zellen wie in Kapitel 4.1.) Zellkultur beschrieben gelöst und die Zellzahl wurde bestimmt. Es wurden von jeder Zelllinie 1 500 Zellen in je ein Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Platten wurden für eine Woche in den Inkubator gestellt.

Nachdem die Kolonien angewachsen waren, wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 70 % Ethanol für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Wells an der Luft getrocknet, bevor die Zellen mit 0,1 % Kristallviolett in 20 % Methanol für 15 min gefärbt wurden. Nach dem Färben wurden die Zellen mit deionisiertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Wells wurden mit dem iBright-System dokumentiert.

In der Auswertung wurde die Grauwert-Intensität der einzelnen Wells mittels des Programmes ImageJ bestimmt. Dafür wurde eine Region of Interest (ROI) in der Größe eines Wells definiert. Mittels dieser wurden die mittlere Pixel-Intensität der Wells bestimmt. Für jede Platte wurde ein leeres Well als Blank genutzt. Die Graustufen von ImageJ reichen von

Schwarz, was einem Wert von 0 entspricht, bis Weiß, was einem Wert von 255 entspricht. Mittels Gleichung 8 wurde die invertierte Pixel-Intensität berechnet.

$$I_{\text{invertiert}} = 255 - I_{\text{ermittelt}}$$ **Gleichung 8**

Mit:
$I_{\text{invertiert}}$:= Invertierte Pixel-Intensität
$I_{\text{ermittelt}}$:= Ermittelte Pixel-Intensität

Aus den Werten der Kontroll-Zelllinien wurde jeweils der Mittelwert bestimmt und mittels Gleichung 9 wurde die relative Quantifizierung RQ durchgeführt und so die relative Pixel-Intensität bestimmt.

$$\text{RQ} = \frac{I_{\text{invertiert}}(\text{KO})}{\bar{I}_{\text{invertiert}}(\text{SCR})} \cdot 100$$ **Gleichung 9**

Mit:
RQ := Relative Pixel-Intensität, %

Im Anschluss wurden mittels des Programmes GraphPad Prism die Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontroll-Zelllinien und aller KO-Zelllinien berechnet und ein Welch´s-t-Test durchgeführt. Dabei wurde für zwei unabhängige Stichproben mit ungleicher Varianz getestet, ob sich die Mittelwerte der Kontroll-Gruppe von denen der KO-Gruppe unterscheiden. Zur Bewertung des p-Wertes wird ein Signifikanzniveau von α=0,05 gewählt. Ist der p-Wert < α, ist der Unterschied signifikant, ist der p-Wert >= α, liegt kein signifikanter Unterschied vor.

5.) Ergebnisse

5.1.) Entwicklung der Puromycin-Selektion

Für die Puromycin-Selektion nach der lentiviralen Transduktion wurde die benötigte Konzentration mittels einer Dosis-Wirkungs-Kurve bestimmt. Die Konzentrationen, bei denen die Zellen innerhalb der ersten 48 h starben, wurden für zu hoch befunden. Die Konzentration, bei der nach 72 h der Einfluss auf die Zellen sichtbar war, wurde für die folgenden Versuche eingesetzt. Bei der Zelllinie SNU-475 wurde eine Puromycin-Konzentration von 0,75 µg/mL mit einer Zellzahl von anfänglich 15 000 Zellen/cm^2 bestimmt. Für die Zelllinien Hep 3B und Alex/PLC wurde eine Zellzahl von 10 000 Zellen/cm^2 ausgewählt. Für die Hep 3B lag die ermittelte Puromycin-Konzentration bei 0,25 µg/µL und für die Alex/PLC bei 2,50 µg/µL. Diese Konzentrationen wurden für die Selektion der Zellen nach der lentiviralen Transduktion eingesetzt.

5.2.) Isolation der Zell-Klone

Die klonale Isolation dient der Gewinnung monoklonaler Zelllinien nach der lentiviralen Transduktion, bei der aus jeder Zelllinie die Pools einer Kontroll-Zelllinie und einer KO-Zelllinie erstellt wurden. Bei allen drei Zelllinien wurden die Zellen, bei welchen die höhere Viruskonzentration eingesetzt wurde, nach der Selektion mit Puromycin für die klonale Isolation verwendet. Die Zellen, bei welchen die niedrigere Virus-Konzentration eingesetzt wurde, wurden verworfen. Der Name der neuen Zelllinie setzt sich aus dem Namen der Zelllinie, der verwendeten Methode CRISPR/Cas9 und dem Vektor zusammen. Nach der klonalen Isolation wurden die isolierten Zell-Klone zu monoklonalen Zelllinien expandiert. Jede Zelllinie, die mindestens einmal passagiert wurde, wurde dokumentiert. Bei der Klonierung der Zelllinie SNU-475 in semisolidem Medium konnten zwar einige Kolonien gepickt werden, allerdings wuchs keine der Kolonien an. Die klonale Isolation der Zelllinien Alex/PLC und Hep 3B wurde erst später gestartet und aufgrund dieses Ergebnisses wurde die Klonierung in semisolidem Medium für diese Zelllinien nicht durchgeführt. Die Anzahl der erfolgreich isolierten Zell-Klone bei den Methoden der Einzelzellklonierung und des Kolonie-Pickings sind in Tabelle 31 angegeben.

Tabelle 31: Anzahlen der erfolgreich isolierten Zell-Klone. Es wurden verschiedene Methoden der klonalen Isolation durchgeführt. Die isolierten Zell-Klone wurden zu neuen Zelllinien expandiert, wobei jede Zelllinie, die mindestens einmal passagiert wurde, dokumentiert wurde. Die Anzahl dieser erfolgreich isolierten Zelllinien, je nach der verwendeten Methode, ist in der Tabelle angegeben. Nach der Klonierung in semisolidem Medium konnte kein Zell-Klon erfolgreich isoliert werden, weshalb diese Methode nicht mit aufgeführt ist. Die Anzahl$_{gesamt}$ gibt an, wie viele Zell-Klone jeweils unabhängig von der Art der Isolation, isoliert werden konnten.

Zelllinie	Einzelzellklonierung	Kolonie-Picking	Anzahl$_{gesamt}$
SNU-475 CRISPR/Cas9 SCR	7	4	11
SNU-475 CRISPR/Cas9 smRC1 KO	4	6	10
Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR	24	4	28
Alex/PLC CRISPR/Cas9 smRC1 KO	24	3	27
Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR	26	1	27
Hep 3B CRISPR/Cas9 smRC1 KO	16	9	25

Das Ziel war, von jeder Zelllinie, unabhängig von der Art der Isolation, mindestens zwei Zell-Klone zu isolieren und als neue Zelllinie zu etablieren. Dieses Ziel wurde erreicht. Die Überprüfung des KO mittels DNA-Sequenzierung wurde nicht mit allen Zelllinien durchgeführt. Einige der neuen Zelllinien wuchsen nach einigen Passagen nicht weiter. Sobald eine ausreichende Anzahl an Zelllinien erreicht wurde, bei der der KO bestätigt werden konnte, wurden die anderen aussortiert.

5.3.) Amplifikation von smRC1

Die Auswertung der Gelelektrophorese wird im Folgenden beispielhaft an einem Bild erklärt. Die Abbildung 33 zeigt das Bild der Gelelektrophorese der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR O, SCR P und SCR A.

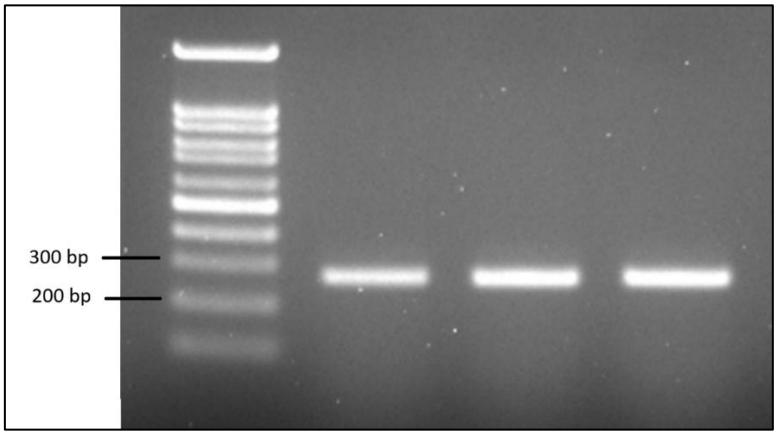


Abbildung 14: Ergebnis der Gelelektrophorese LT054. Nach der DNA-Extraktion wurde die DNA quantifiziert und die Ziel-Region von smRC1 wurde mittels PCR amplifiziert. Für die Detektion wurden 5 µL Probe und DNA-Marker sowie ein 1,5 % Agarose Gel verwendet. Die Gelelektrophorese lief für 50 min bei 4 °C und 50 Volt. Die Bande von smRC1 ist wie erwartet auf einer Höhe von 280 bp zu sehen. Zu sehen sind die Banden folgender Proben: Marker, 1. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR O, 2. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR P, 3. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR A.

Die Banden der PCR-Produkte nach der Amplifikation der Ziel-Region von smRC1 befinden sich auf einer Höhe von 280 bp. Für die Bestimmung des Volumens für die Aufreinigung wurde die Intensität der Bande mit der des Markers verglichen. Je intensiver die Bande der Probe ist, desto höher die DNA-Konzentration. Von den Proben, deren Banden auf der Abbildung zu sehen sind, wurden 5 µL in der Aufreinigung verwendet. Die Bilder der Gelelektrophorese zeigten für alle Zelllinien die entsprechende Bande, womit festgehalten werden kann, dass bei allen Zelllinien die Ziel-Region für smRC1 erfolgreich amplifiziert werden konnte.

5.4.) Charakterisierung der Zelllinien

Für die Auswertung der DNA-Sequenzierung wurden die Chromatogramme, die von der Firma Eurofins Genomics zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Die Ziel-Sequenz für den KO von smRC1 ist: GGTGTTCAGGTGTTAAGAAGAGG. Die End-Sequenz AGG diente dabei als PAM für Cas9, was bedeutet, dass die DNA davor geschnitten worden sein sollte und ab dieser Stelle sollten die Unterschiede der Basensequenz auftreten. Die Farbe des Peaks in dem Chromatogramm gibt an, welche Base gemessen wurde.

Alle gemessenen Basen wurden notiert und anschließend wurde die Basensequenz der Kontroll-Zelllinien SCR mit denen der smRC1-KO-Zelllinien verglichen. Sollten an einer Stelle mehrere Basen gemessen worden sein, durfte für eine Abweichung keine der gemessenen Basen der KO-Zelllinie mit denen der Kontroll-Zelllinie übereinstimmen. Die gemessenen Basen wurden den beiden Allelen zugeordnet. Die Basensequenz der Kontroll-Zelllinien entsprechen alle dem Wildtyp der ursprünglichen Zelllinie, weshalb die Chromatogramme verschiedener Kontroll-Zelllinien gleich aussehen. Einige der erzeugten Chromatogramme werden im Folgenden beispielhaft für die Auswertung genutzt. Es wird außerdem nur die Auswertung der Zelllinien aufgeführt, die erfolgreich als Kontroll- oder KO-Zelllinien charakterisiert werden konnten. Die Chromatogramme aller getesteten Zelllinien sind im Anhang aufgeführt.

5.4.1.) SNU-475 CRISPR/Cas9

Die Abbildung 15 zeigt das Chromatogramm der Kontroll-Zelllinie SNU-475 CRISPR/Cas9 SCR E.

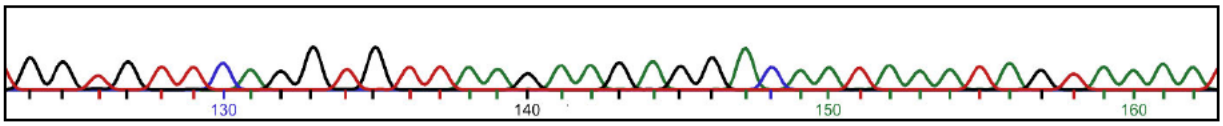


Abbildung 15: Chromatogramm der Zelllinie SNU-475 CRISPR/Cas9 SCR E. Das Chromatogramm zeigt die Basensequenz der Kontroll-Zelllinie, begonnen bei der Ziel-Sequenz von smRC1: GGTGTTCAGGTGTTAAGAAGAGG. Die Basensequenz entspricht der des Wildtypen von SNU-475. Der Farbcode für die Basen ist: Adenin (grün), Thymin (rot), Guanin (schwarz), Cytosin (blau).

Anhand des Chromatogramms konnte folgende Basensequenz für die beiden Allele bestimmt werden:

A1	…	G	G	T	G	T	T	C	A	G	G	T	G	T	T	A	A	G	A	A	G	A	G	G	A	C	A	A	T	A	A	A	T	A	G	T	A	A	A	A	…
A2	…	G	G	T	G	T	T	C	A	G	G	T	G	T	T	A	A	G	A	A	G	A	G	G	A	C	A	A	T	A	A	A	T	A	G	T	A	A	A	A	…

Die Basensequenz entspricht auf beiden Allelen der Sequenz von smRC1. Somit wurde die Zelllinie SNU-475 CRISPR/Cas9 SCR E als Wildtyp charakterisiert und konnte für nachfolgende Versuche als Kontroll-Zelllinie genutzt werden.

Die Abbildung 16 zeigt das Chromatogramm der Zelllinie SNU-475 CRISPR/Cas9 smRC1 I.

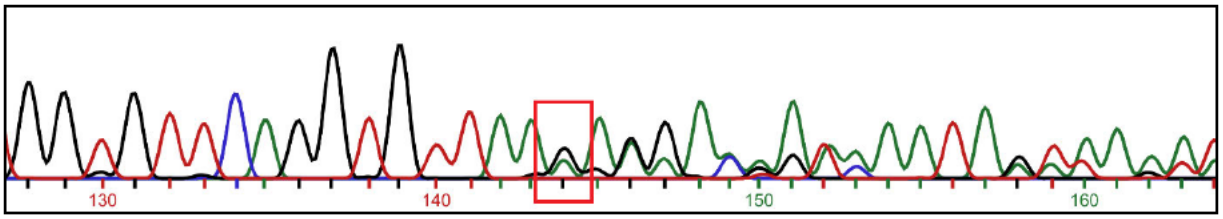


Abbildung 16: Chromatogramm der Zelllinie SNU-475 CRISPR/Cas9 smRC1 I. Das Chromatogramm zeigt die gemessenen Peaks der Basensequenz der KO-Zelllinie, begonnen bei der Ziel-Sequenz von smRC1: GGTGTTCAGGTGTTAAGAAGAGG. Der Farbcode für die Basen ist: Adenin (grün), Thymin (rot), Guanin (schwarz), Cytosin (blau). Die markierte Stelle zeigt einen Doppelpeak, der durch die Detektion von zwei unterschiedliche Basen an derselben Stelle erzeugt wird.

Die rot markierten Peaks dienen als Beispiele für die nachfolgenden Auswertungen. Die markierte Stelle hat einen schwarzen Peak für die Base Guanin und einen grünen Peak für die Base Adenin. Somit ist auf einem Allel die Base A notiert und auf dem anderen die Base G.

Folgende Basensequenz konnte ermittelt werden:

A1 … G G T G T T C A G G T G T T A A G A G G A A G A T A A A T A A T A A A A A A …
A2 … G G T G T T C A G G T G T T A A A A A A T A G A T A A T A G A T A G T T G A …

Die abweichenden Basen werden in der Sequenz mit fetten Buchstaben dargestellt. Die Stellen, an welchen keine der ermittelten Basen auf den Allelen der entsprechenden Base in der smRC1-Sequenz entspricht, sind durch einen Rahmen markiert. Für die Charakterisierung einer KO-Zelllinie muss mindestens eine Stelle auf beiden Allelen abweichen.

Es konnte jeweils eine SNU-475-Kontroll-Zelllinie und eine SNU-475-KO-Zelllinie charakterisiert werden. Die Zelllinien wuchsen nach einigen Passagen allerdings nicht weiter und wurden daher nicht in den nachfolgenden Versuchen genutzt.

5.4.2.) Alex/PLC CRISPR/Cas9

Die Abbildung 17 zeigt das Chromatogramm der Kontroll-Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR O.

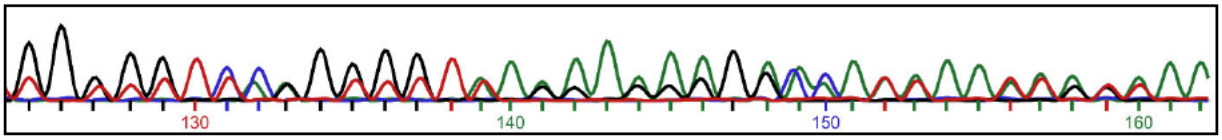


Abbildung 17: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR O. Das Chromatogramm zeigt die Basensequenz der Kontroll-Zelllinie, begonnen bei der Ziel-Sequenz von smRC1: GGTGTTCAGGTGTTAAGAAGAGG. Der Farbcode für die Basen ist: Adenin (grün), Thymin (rot), Guanin (schwarz), Cytosin (blau).

Das Chromatogramm der Kontroll-Zelllinien zeigt an mehreren Stellen Doppelpeaks. Um dies zu überprüfen, wurde die Zelllinie Alex/PLC ebenfalls sequenziert. Das Chromatogramm zeigte die gleichen Doppelpeaks, weshalb diese als Wildtyp der Zelllinie angenommen werden. Somit ergibt sich folgende Basensequenz:

A1 … G G T G T T C A G G T G T T A A G A A G A G G A C A A T A A A T A G T A A A A …
A2 … *T G G T G T T C A G G T G T T A A G A A G A G G A C A A T A A A T A G T A A A* …

Die Auswertung der Peaks zeigt, dass die Ziel-Sequenz auf beiden Allelen versetzt erkennbar ist. Auf dem zweiten Allel werden die Buchstaben aufgrund der Versetzung kursiv dargestellt. Es konnten zwei weitere Zelllinien als Kontroll-Zelllinien charakterisiert werden. Dabei handelt es sich um die Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR P und Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR A.

In Abbildung 18 ist das Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO L dargestellt.

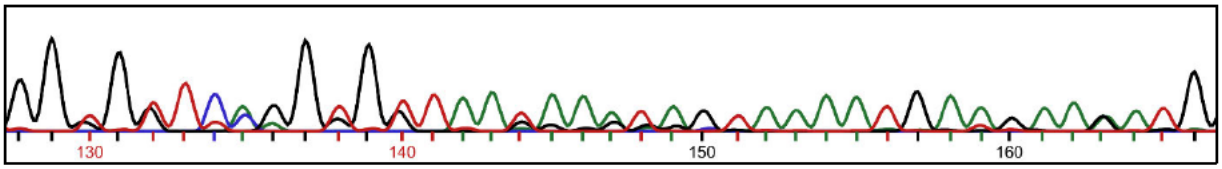
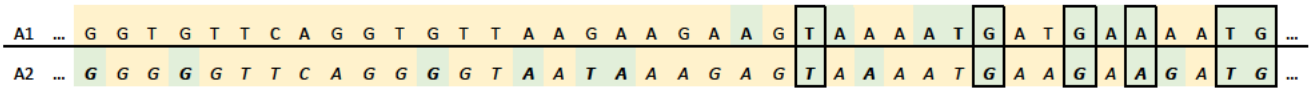


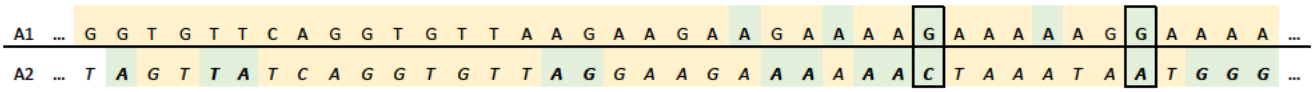
Abbildung 18: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO L. Das Chromatogramm zeigt die Basensequenz der KO-Zelllinie begonnen bei der Ziel-Sequenz von smRC1: GGTGTTCAGGTGTTAAGAAGAGG. Der Farbcode für die Basen ist: Adenin (grün), Thymin (rot), Guanin (schwarz), Cytosin (blau).

Aus dem Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO L konnte folgende Basensequenz ermittelt werden:

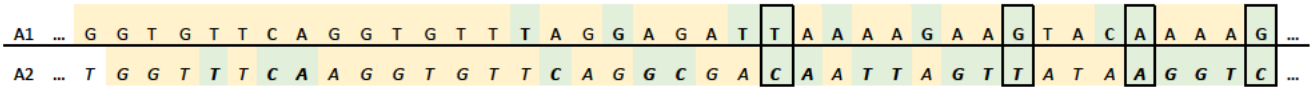


Für einen KO muss die Abweichung trotz der Versetzung an der gleichen Stelle auftreten. Die Sequenz zeigt auf dem dargestellten Abschnitt fünf abweichende Basen auf beiden Allelen. Somit handelt es sich um eine KO-Zelllinie. Die folgenden Zelllinien konnten alle als KO-Zelllinien charakterisiert werden.

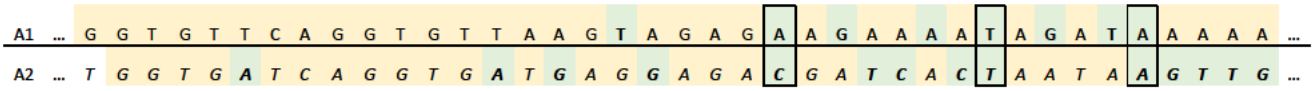
Die Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO I zeigt in der folgenden Basensequenz eine Abweichung an zwei Stellen und kann somit als KO-Zelllinie identifiziert werden.



Die ermittelte Basensequenz der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO T lautet:



Auch bei der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO E handelt es sich mit der folgenden Basensequenz um eine KO-Zelllinie:



Es konnten insgesamt drei Kontroll-Zelllinien und vier KO-Zelllinien der Alex/PLC-Zellen gewonnen werden.

5.4.3.) Hep 3B CRISPR/Cas9

In Abbildung 19 ist das Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR A dargestellt.

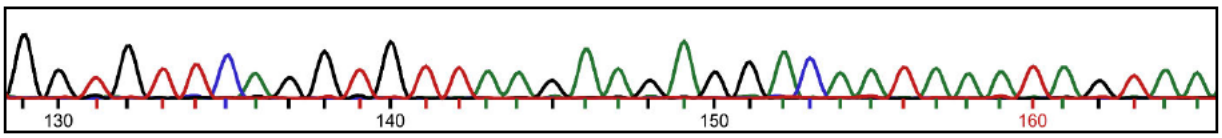
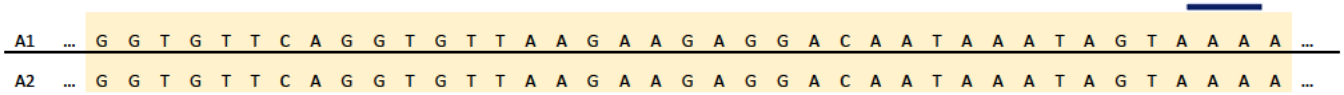


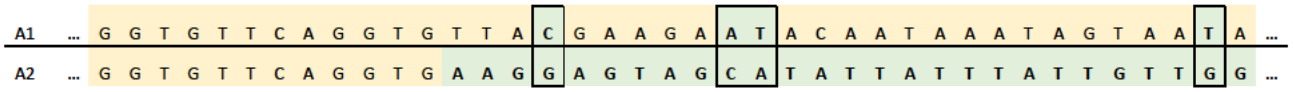
Abbildung 19: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR A. Das Chromatogramm zeigt die Basensequenz der Kontroll-Zelllinie, begonnen bei der Ziel-Sequenz von smRC1: GGTGTTCAGGTGTTAAGAAGAGG. Der Farbcode für die Basen ist: Adenin (grün), Thymin (rot), Guanin (schwarz), Cytosin (blau).

Die bestimmte Basensequenz entspricht auf beiden Allelen der Sequenz von smRC1, womit die Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR A als Kontroll-Zelllinie genutzt werden kann. Die Sequenz lautet:

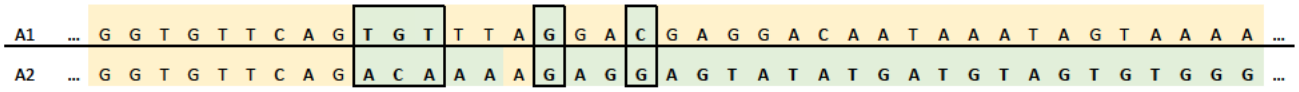


Mit der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR L konnte eine weitere Kontroll-Zelllinie charakterisiert werden. Die folgenden Zelllinien konnten als KO-Zelllinie charakterisiert werden.

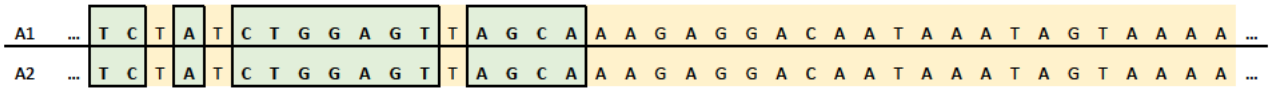
Die Basensequenz der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO C lautet:



Die Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO H zeigt schon vor dem PAM AGG erste Abweichungen:

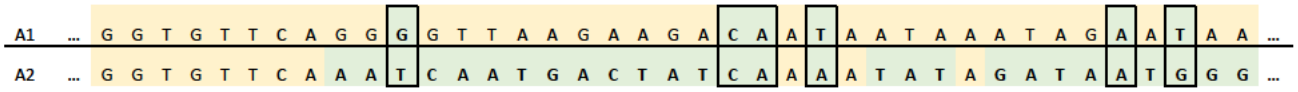


Die Basensequenz der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 2 ist:

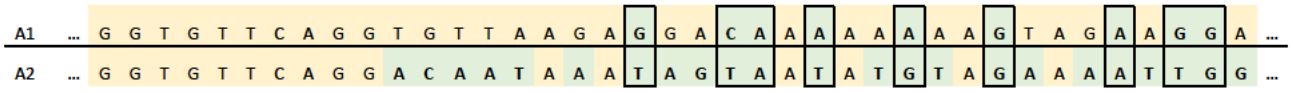


Die Bestimmung der Basensequenz gestaltete sich aufgrund der frühen Abweichungen als Herausforderung. Die Zellen zeigten außerdem eine abweichende Morphologie im Vergleich zu den anderen Hep 3B-Zelllinien und wurden daher aussortiert.

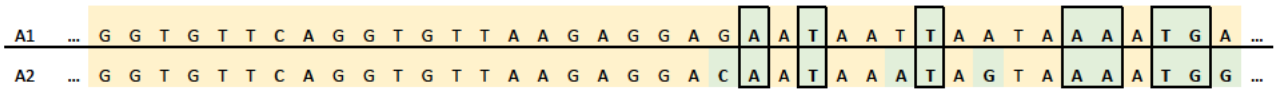
Die Basensequenz der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO E lautet:



Für die Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO M konnte folgende Basensequenz ermittelt werden:



Und abschließend die Basensequenz der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO Y:



Es konnten insgesamt zwei Kontroll-Zelllinien und fünf KO-Zelllinien der Hep 3B-Zellen gewonnen werden.

5.5.) Untersuchung der relativen Genexpression

Um zu untersuchen, ob der KO Auswirkungen auf die Expression von smRC1 hat, wurde in zwei Durchläufen RT-qPCRs durchgeführt. So sollte getestet werden, ob es sich um einen funktionellen KO handeln könnte. Dabei wurden von jeder Zelllinie zwei Proben genommen. Die Abbildung 20 zeigt den Graphen der RT-qPCR 1/2.

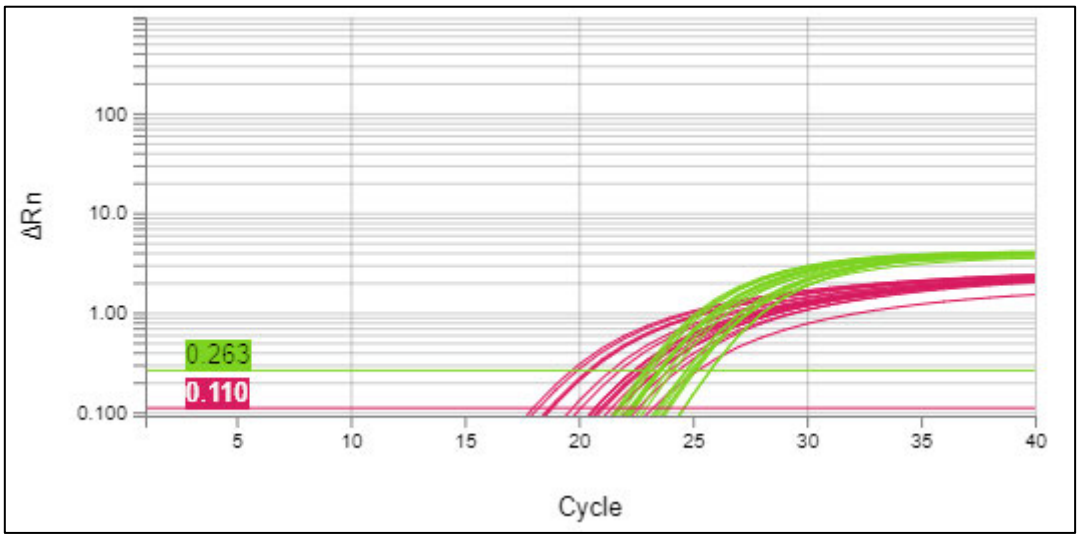


Abbildung 20: Plot der Amplifikation der RT-qPCR 1/2. Der Graph zeigt die Expression von smRC1 (grün) und GAPDH (pink). Der Threshold wurde automatisch bestimmt.

Die Abbildung 21 zeigt den Graphen des Durchlaufs 2/2.

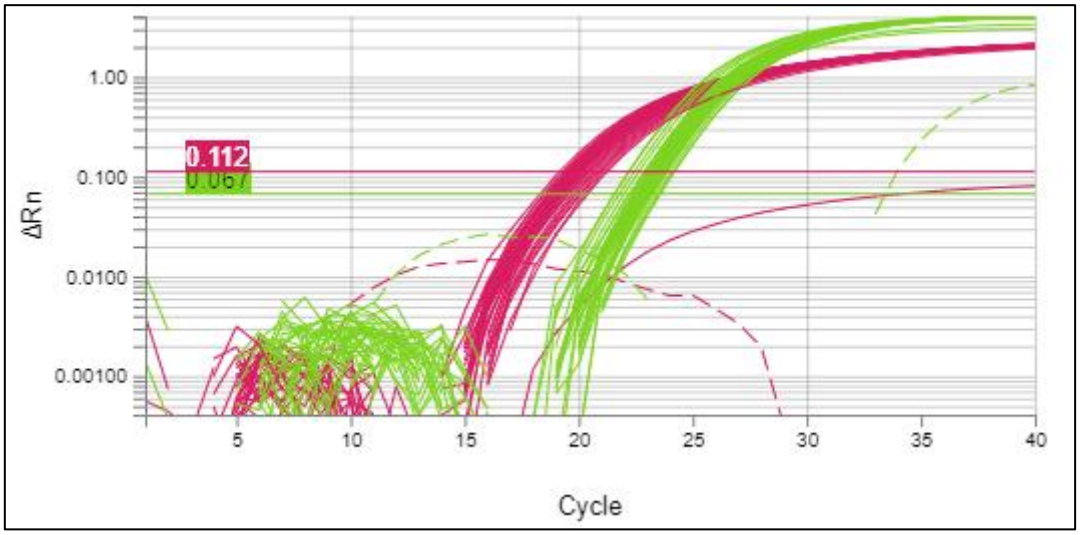


Abbildung 21: Plot der Amplifikation der RT-qPCR 2/2. Der Graph zeigt die Expression von smRC1 (grün) und GAPDH (pink). Der Threshold wurde automatisch bestimmt. Die gestrichelten Expressions-Signaturen wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

Die in den Abbildungen angegebenen Schwellenwerte wurden automatisch bei der Messung bestimmt. Die gestrichelten Expressions-Signaturen wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

5.5.1.) Alex/PLC CRISPR/Cas9

Die berechneten Werte der RT-qPCR 1/2 sind in Tabelle 32 aufgelistet.

Tabelle 32: PCR-Ergebnisse Alex/PLC CRISPR/Cas9 aus dem Durchlauf 1/2. Die Zelllinien wurden mittels RT-qPCR auf ihre Genexpression von smRC1 und GAPDH untersucht. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen und für die Auswertung wurden die Mittelwerte $\bar{C}_T$ der C_T-Werte von smRC1 und GAPDH berechnet. Daraus wurde mittels Gleichung 5 ΔC_T bestimmt.

Nr	Zelllinie	$\bar{C}_{T,\,smRC1}$	$\bar{C}_{T,\,GAPDH}$	ΔC_T
1	SCR O	22,951	20,912	2,038
2	SCR P	23,984	18,455	5,530
3	SCR A	25,027	20,700	4,326
4	KO L	23,521	18,381	5,140
5	KO I	22,978	19,889	3,089

Die berechneten Werte der RT-qPCR 2/2 sind in Tabelle 32 aufgelistet.

Tabelle 33: PCR-Ergebnisse Alex/PLC CRISPR/Cas9 aus dem Durchlauf 2/2. Die Zelllinien wurden mittels RT-qPCR auf ihre Genexpression von smRC1 und GAPDH untersucht. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen und für die Auswertung wurden die Mittelwerte $\bar{C}_T$ der C_T-Werte von smRC1 und GAPDH berechnet. Daraus wurde mittels Gleichung 5 ΔC_T bestimmt.

Nr	Zelllinie	$\bar{C}_{T,\,smRC1}$	$\bar{C}_{T,\,GAPDH}$	ΔC_T
1	SCR O	24,424	19,222	5,202
2	SCR P	24,035	19,478	4,557
3	SCR A	24,197	19,718	4,480
4	KO L	24,578	19,906	4,673
5	KO I	23,940	19,592	4,349
6	KO T	24,638	19,928	4,710
7	KO T	23,159	19,469	3,690
8	KO E	23,521	19,800	3,721
9	KO E	24,129	19,653	4,476

Aus den ΔC_T-Werten der Kontroll-Zelllinien wurde der Mittelwert gebildet. Für Durchlauf 1/2 liegt dieser bei $\Delta\bar{C}_{T,\,SCR}$ = 3,965. Dieser Wert wurde mit Gleichung 6 und Gleichung 7 für die relative Quantifizierung genutzt. Die berechneten Werte sind in Tabelle 34 angegeben.

Tabelle 34: Relative Quantifizierung der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9 in Durchlauf 1/2. Mittels Gleichung 6 wurde die Differenz $\Delta\Delta C_T$ der KO-Zelllinie und des jeweiligen Kontroll-Pools bestimmt. Mittels Gleichung 7 und $\Delta\bar{C}_{T,\,SCR}$ = 3,965 wurde die relative Quantifizierung RQ berechnet. Ist die RQ > 100, ist die Expression des Zielgens in der KO-Zelllinie höher als in der Kontroll-Zelllinie.

Zelllinie	$\Delta\Delta C_T$	RQ, %
SCR pool	0,000	100,00
KO L	1,175	44,30
KO I	-0,875	183,45

Für den Durchlauf 2/2 wurde $\Delta\bar{C}_{T,\,SCR}$ = 4,746 bestimmt und für die Berechnungen der Werte in Tabelle 35 genutzt.

Tabelle 35: Relative Quantifizierung der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9 in Durchlauf 2/2. Mittels Gleichung 6 wurde die Differenz $\Delta\Delta C_T$ der KO-Zelllinie und des jeweiligen Kontroll-Pools bestimmt. Mittels Gleichung 7 und $\Delta\bar{C}_{T,\,SCR}$ = 4,746 wurde die relative Quantifizierung RQ berechnet. Ist die RQ > 100, ist die Expression des Zielgens in der KO-Zelllinie höher als in der Kontroll-Zelllinie.

Zelllinie	$\Delta\Delta C_T$	RQ, %
SCR pool	0,000	100,00
KO L	-0,073	105,22
KO I	-0,397	131,72
KO T	-0,036	102,52
KO T	-1,056	207,89
KO E	-1,025	203,54
KO E	-0,270	120,59

In Abbildung 22 ist die Auswertung der beiden Durchläufe gemeinsam dargestellt.

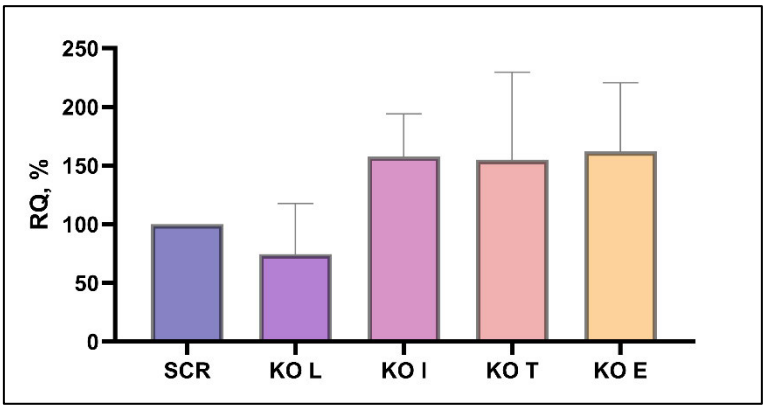


Abbildung 22: Relative Quantifizierung von smRC1 in den Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9. In zwei Durchläufen wurde mittels RT-qPCR die Genexpression von smRC1 und GAPDH gemessen (n=2). Mittels der $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$-Methode wurde die relative Quantifizierung jeder Zelllinie in Bezug auf den Pool der Kontroll-Zelllinien durchgeführt und die relative Expression von smRC1 berechnet.

Sowohl in den Kontroll-Zelllinien als auch in den KO-Zelllinien wurde ein Signal für smRC1 erfasst.

5.5.3.) Hep 3B CRISPR/Cas9

Die berechneten Werte der RT-qPCR 1/2 sind in Tabelle 36 aufgelistet.

Tabelle 36: PCR-Ergebnisse Hep 3B CRISPR/Cas9 aus dem Durchlauf 1/2. Die Zelllinien wurden mittels RT-qPCR auf ihre Genexpression von smRC1 und GAPDH untersucht. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen und für die Auswertung wurden die Mittelwerte $\bar{C}_T$ der C_T-Werte von smRC1 und GAPDH berechnet. Daraus wurde mittels Gleichung 5 ΔC_T bestimmt.

Nr	Zelllinie	$\bar{C}_{T,\,smRC1}$	$\bar{C}_{T,\,GAPDH}$	ΔC_T
6	SCR A	25,738	22,917	2,822
7	SCR L	24,697	21,751	2,946
8	KO C	23,514	20,961	2,553
9	KO M	24,934	21,587	3,346
10	KO Y	23,503	20,509	2,994

Die berechneten Werte der RT-qPCR 2/2 sind in Tabelle 37 aufgelistet.

Tabelle 37: PCR-Ergebnisse Hep 3B CRISPR/Cas9 aus dem Durchlauf 2/2. Die Zelllinien wurden mittels RT-qPCR auf ihre Genexpression von smRC1 und GAPDH untersucht. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen und für die Auswertung wurden die Mittelwerte $\bar{C}_T$ der C_T-Werte von smRC1 und GAPDH berechnet. Daraus wurde mittels Gleichung 5 ΔC_T bestimmt.

Nr	Zelllinie	$\bar{C}_{T,\ smRC1}$	$\bar{C}_{T,\ GAPDH}$	ΔC_T
10	SCR A	24,395	19,676	4,718
11	SCR L	24,560	20,380	4,180
12	KO C	24,095	20,408	3,687
13	KO H	24,716	20,134	4,582
14	KO H	24,834	20,117	4,716
15	KO E	25,129	21,143	3,986
16	KO E	24,853	20,911	3,943
17	KO M	24,047	20,684	3,363
18	KO Y	24,403	20,063	4,340

Aus den ΔC_T-Werten der Kontroll-Zelllinien wurde der Mittelwert gebildet. Für Durchlauf 1/2 liegt dieser bei $\Delta\bar{C}_{T,\ SCR}$ = 2,884. Dieser Wert wurde mit Gleichung 6 und Gleichung 7 für die relative Quantifizierung genutzt. Die berechneten Werte sind in Tabelle 38 angegeben.

Tabelle 38: Relative Quantifizierung der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9 in Durchlauf 1/2. Mittels Gleichung 6 wurde die Differenz $\Delta\Delta C_T$ der KO-Zelllinie und des jeweiligen Kontroll-Pools bestimmt. Mittels Gleichung 7 und $\Delta\bar{C}_{T,\ SCR}$ = 2,884 wurde die relative Quantifizierung RQ berechnet. Ist die RQ > 100, ist die Expression des Zielgens in der KO-Zelllinie höher, als in der Kontroll-Zelllinie.

Zelllinie	$\Delta\Delta C_T$	RQ, %
SCR pool	0,000	100,00
KO C	-0,331	125,77
KO M	0,463	72,57
KO Y	0,110	92,65

Für den Durchlauf 2/2 wurde $\Delta\bar{C}_{T,\ SCR}$ = 4,449 bestimmt und für die Berechnungen der Werte in Tabelle 39 genutzt.

Tabelle 39: Relative Quantifizierung der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9 in Durchlauf 2/2. Mittels Gleichung 6 wurde die Differenz $\Delta\Delta C_T$ der KO-Zelllinie und des jeweiligen Kontroll-Pools bestimmt. Mittels Gleichung 7 und $\Delta\bar{C}_{T,\ SCR}$ = 4,449 wurde die relative Quantifizierung RQ berechnet. Ist die RQ > 100, ist die Expression des Zielgens in der KO-Zelllinie höher als in der Kontroll-Zelllinie.

Zelllinie	$\Delta\Delta C_T$	RQ, %
SCR pool	0,000	100,00
KO C	-0,762	169,55
KO H	0,133	91,18
KO H	0,267	83,09
KO E	-0,463	137,87
KO E	-0,506	142,04
KO M	-1,086	212,28
KO Y	-0,109	107,86

In Abbildung 23 ist die Auswertung der beiden Durchläufe gemeinsam dargestellt.

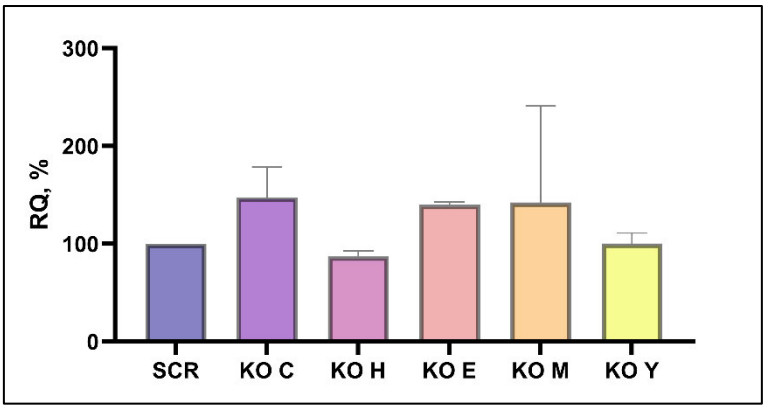


Abbildung 23: Relative Quantifizierung von smRC1 in den Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9. In zwei Durchläufen wurde mittels RT-qPCR die Genexpression von smRC1 und GAPDH gemessen (*n*=2). Mittels der $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$-Methode wurde die relative Quantifizierung jeder Zelllinie in Bezug auf den Pool der Kontroll-Zelllinien durchgeführt und die relative Expression von smRC1 berechnet.

Auch bei den Hep 3B-Zelllinien wurde sowohl in den Kontroll-Zelllinien als auch in den KO-Zelllinien ein Signal für smRC1 erfasst.

5.6.) Bewertung des klonogenen Potentials

5.6.1.) Alex/PLC CRISPR/Cas9

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse des Kolonie-Bildungs-Assay beispielhaft an zwei Zelllinien dargestellt.

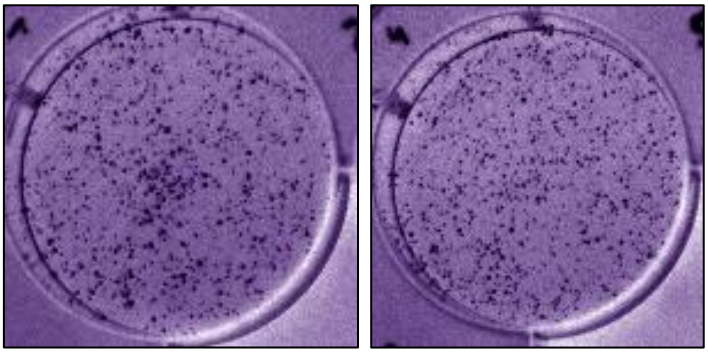


Abbildung 24: Kolonie-Bildungs-Assay der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9. Die gefärbten Zellen Kontroll-Zelllinie SCR A (links) und der KO-Zelllinie KO L (rechts). Für das Assay wurden 1500 Zellen für eine Woche in einem Well einer 6-Well-Platte kultiviert, mit 70 % Ethanol fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.

In Tabelle 40 sind die Pixel-Intensitäten der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 angegeben.

Tabelle 40: Pixel-Intensitäten der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9. Nach dem Kolonie-Bildungs-Assay, bei dem 1500 Zellen jeder Zelllinie für eine Woche kultiviert wurden, wurden die Pixel-Intensitäten $I_{ermittelt}$ mittels ImageJ bestimmt. Mittels Gleichung 8 wurde die invertierte Intensität $I_{invertiert}$ berechnet.

Zelllinie	$I_{ermittelt}$	$I_{invertiert}$
SCR O	148,002	106,998
SCR P	130,521	124,479
SCR A	155,304	99,696
KO L	157,128	97,872
KO I	153,735	101,265
KO T	162,169	92,831
KO E	156,176	98,824

Für die Kontroll-Zelllinien wurde der Mittelwert $\bar{I}_{\text{invertiert}}(\text{SCR}) = 110{,}391$ berechnet und mittels Gleichung 9 wurde die relative Quantifizierung durchgeführt. Diese sind in Abbildung 25 dargestellt.

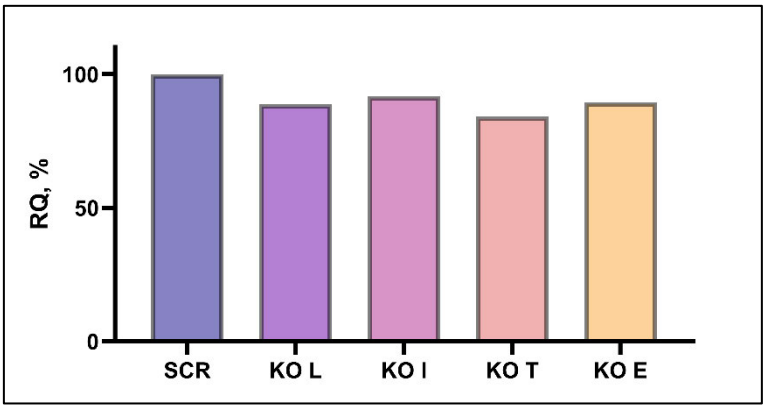


Abbildung 25: Relative Quantifizierung der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9. Nach dem Kolonie-Bildungs-Assay, bei dem 1500 Zellen jeder Zelllinie für eine Woche kultiviert wurden, wurden die Pixel-Intensitäten $I_{\text{ermittelt}}$ mittels ImageJ bestimmt. Mittels $\bar{I}_{\text{invertiert}}(\text{SCR}) = 110{,}391$ und Gleichung 9 und den Mittelwerten der Kontroll-Zelllinien wurden die relative Quantifizierung durchgeführt und die relativen Pixel-Intensitäten berechnet.

Die Abbildung 26 zeigt den Vergleich von der Kontroll-Zelllinie und den KO-Zelllinien, für den der Mittelwert aus allen KO-Zelllinien bestimmt wurde.

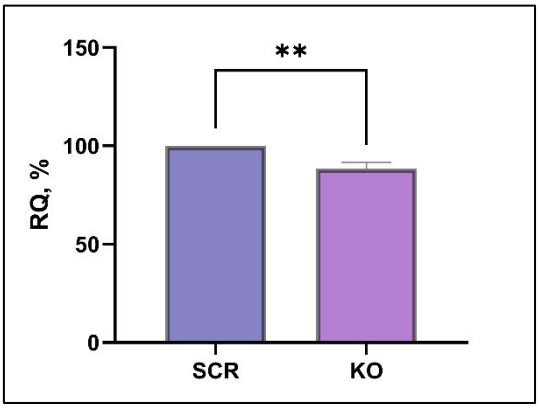


Abbildung 26: Vergleich der Alex/PLC CRISPR/Cas9 Kontroll- und KO-Zelllinien. Nach dem Kolonie-Bildungs-Assay, bei dem 1500 Zellen jeder Zelllinie für eine Woche kultiviert wurden, wurden die Pixel-Intensitäten mittels ImageJ bestimmt. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Quantifizierung der Kontroll-Zelllinien SCR (n=3) und der KO-Zelllinien (n=4) bestimmt und mittels GraphPad Prism wurde ein Welch´s-t-Test durchgeführt. Dabei wurde für zwei unabhängige Stichproben mit ungleicher Varianz getestet, ob sich die Mittelwerte der Kontroll-Gruppe von denen der KO-Gruppe unterscheiden. Es gilt: *p < 0,05, **p < 0,01.

Der ermittelte p-Wert liegt bei 0,0056, womit ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll-Zelllinie SCR und den KO-Zelllinien vorliegt.

5.6.2.) Hep 3B CRISPR/Cas9

In Abbildung 27 sind die Ergebnisse des Kolonie-Bildungs-Assay beispielhaft an zwei Zelllinien dargestellt.

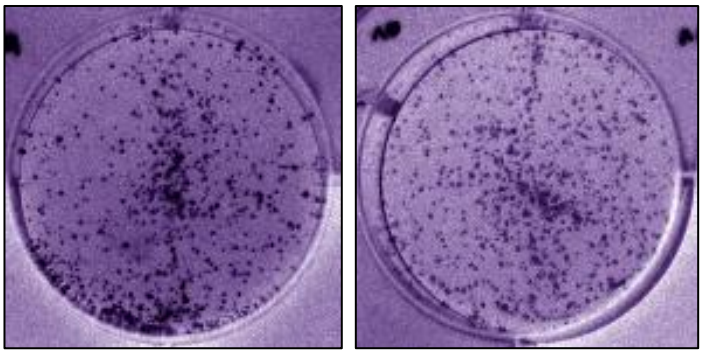


Abbildung 27: Kolonie-Bildungs-Assay der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9. Die gefärbten Zellen Kontroll-Zelllinie SCR L (links) und der KO-Zelllinie KO C (rechts). Für das Assay wurden 1500 Zellen für eine Woche in einem Well einer 6-Well-Platte kultiviert, mit 70 % Ethanol fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.

Die ermittelten und berechneten Pixel-Intensitäten der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 sind in Tabelle 41 aufgelistet.

Tabelle 41: Pixel-Intensitäten der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9. Nach dem Kolonie-Bildungs-Assay, bei dem 1500 Zellen jeder Zelllinie für eine Woche kultiviert wurden, wurden die Pixel-Intensitäten $I_{\text{ermittelt}}$ mittels ImageJ bestimmt. Mittels Gleichung 8 wurde die invertierte Intensität $I_{\text{invertiert}}$ berechnet.

Zelllinie	$I_{\text{ermittelt}}$	$I_{\text{invertiert}}$
SCR A	147,219	107,781
SCR L	137,832	117,168
KO C	167,872	87,128
KO H	162,553	92,447
KO E	167,527	87,473
KO M	157,110	97,890
KO Y	155,724	99,276

Für die Kontroll-Zelllinien wurde der Mittelwert $\bar{I}_{\text{invertiert}}(\text{SCR}) = 112{,}475$ berechnet und mittels Gleichung 9 wurde die relative Quantifizierung durchgeführt. Diese sind in Abbildung *28* dargestellt.

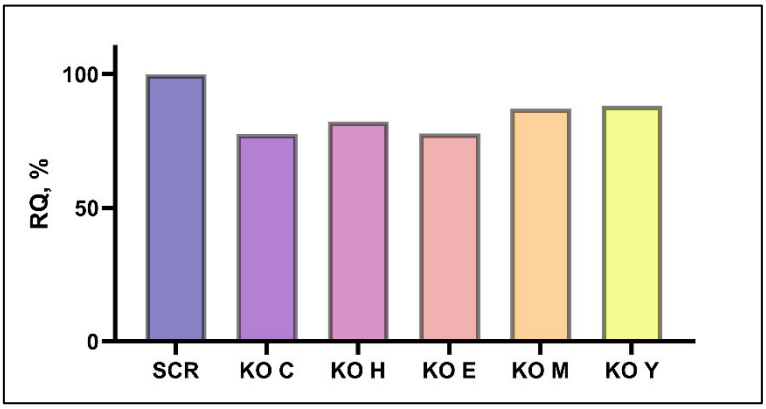


Abbildung 28: Relative Quantifizierung der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9. Nach dem Kolonie-Bildungs-Assay, bei dem 1500 Zellen jeder Zelllinie für eine Woche kultiviert wurden, wurden die Pixel-Intensitäten $I_{\text{ermittelt}}$ mittels ImageJ bestimmt. Mittels $\bar{I}_{\text{invertiert}}(\text{SCR}) = 112{,}475$ und Gleichung 9 und den Mittelwerten der Kontroll-Zelllinien wurde die relative Quantifizierung RQ durchgeführt und die relativen Pixel-Intensitäten berechnet.

Die Abbildung 29 zeigt den Vergleich von der Kontroll-Zelllinie und den KO-Zelllinien, für den der Mittelwert aus allen KO-Zelllinien bestimmt wurde.

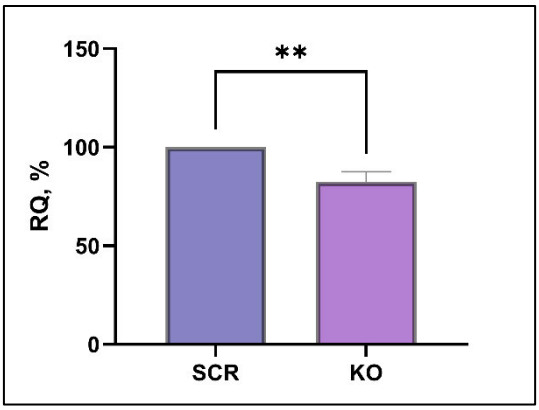


Abbildung 29: Vergleich der Hep 3B CRISPR/Cas9 Kontroll- und KO-Zelllinien. Nach dem Kolonie-Bildungs-Assay, bei dem 1500 Zellen jeder Zelllinie für eine Woche kultiviert wurden, wurden die Pixel-Intensitäten mittels ImageJ bestimmt. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Quantifizierung der Kontroll-Zelllinien SCR (*n*=2) und der KO-Zelllinien (*n*=5) bestimmt und mittels GraphPad Prism wurde ein Welch´s-t-Test durchgeführt. Dabei wurde für zwei unabhängige Stichproben mit ungleicher Varianz getestet, ob sich die Mittelwerte der Kontroll-Gruppe von denen der KO-Gruppe unterscheiden. Es gilt: *p < 0,05, **p < 0,01.

Der ermittelte p-Wert liegt bei 0,0015, womit ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll-Zelllinie SCR und den KO-Zelllinien vorliegt.

6.) Diskussion

smRC1 ist eine von drei smRC-Signaturen, die von der AG von Felden identifiziert wurden und in der Zukunft als Biomarker für die frühzeitige Erkennung und Überwachung von HCC fungieren könnten. Da HCC eine der weltweit tödlichsten Krebsarten ist, ist die detaillierte Untersuchung der biologischen Funktion der smRCs von großer Bedeutung.[1] Das Ziel war ein KO-Model zur Untersuchung der Rolle der sncRNA smRC1 zu entwickeln, wobei CRISPR/Cas9 Vektoren verwendet wurden. Jüngste Erkenntnisse zeigten, dass es sich bei smRC1 um einen Teil der lncRNA ENST00000647660 handelt und nicht, wie anfangs angenommen, um eine eigenständige sncRNA. (interne Daten AG von Felden, nicht publiziert) Die KO-Versuche wurden trotz dessen wie geplant durchgeführt. Die Vektoren wurden von der AG von Felden entwickelt, etabliert und im Rahmen dieser Arbeit für die lentivirale Transduktion der Zelllinien SNU-475, PLC/PRF/5, auch als Alex/PLC bezeichnet, und Hep 3B eingesetzt. Nach der Transduktion und Selektion wurden drei Methoden der klonalen Isolation getestet, mit dem Ziel monoklonale Zelllinien zu etablieren. Dabei wurden je zwei KO-Zelllinien und zwei Kontroll-Zelllinien angestrebt.

Mit der ersten Methode, der Einzelzellklonierung, konnte die höchste Anzahl an Zelllinien erfolgreich isoliert werden. Auch mit der Methode des Kolonie-Pickings konnten monoklonale Zelllinien gewonnen werden. Die dritte Methode, das Klonieren in semisolidem Medium, führte in dem Versuch mit der Zelllinie SNU-475 zu keinem Ergebnis, weshalb diese Methode bei den anderen beiden Zelllinien nicht wiederholt wurde. Die Zellen wuchsen zunächst in dem semisoliden Medium an, nach dem Transfer in das Kulturmedium blieb weiteres Wachstum allerdings aus. Es gibt verschiedene Arbeiten, die zeigten, dass die Methode grundsätzlich funktionieren kann. Es konnten beispielsweise CHO-Produzenten, PC-3-KO-Klone oder Cas9-exprimierende Zelllinien isoliert und etabliert werden.[22–24] Schonende Handhabung ist essenziell für die Kultivierung von Zellen. Durch das semisolide Medium sowie das Aufnehmen mit der stumpfen Kanüle könnten die Zellen mechanischem Stress ausgeliefert gewesen sein, wodurch sich ihre Kolonie-Bildungs-Fähigkeit verringert haben könnte.[25] Zusätzlich erforderte die Methode das Ansetzen des Mediums und somit mehr Aufwand in der Vorbereitung. Da die ersten beiden Methoden vergleichbar viel Aufwand in der Durchführung mit sich brachten, konnte geschlussfolgert werden, dass die Einzelzellklonierung in den durchgeführten Versuchen am effizientesten war.

Von allen Zelllinien, die isoliert werden konnten, wurden DNA-Proben genommen, isoliert und mittels PCR wurde das Zielgen von smRC1 amplifiziert und in der Gelelektrophorese gemessen. Alle Zelllinien zeigten eine erfolgreiche Amplifikation, weshalb die DNA-Sequenz ermittelt werden konnte. Von der Zelllinie SNU-475 konnte nur je ein Kontroll-Klon und ein KO-Klon isoliert werden, da keine weiteren Zellen ausreichend heranwuchsen. Diese wiesen aber die vorausgesetzten DNA-Sequenzen auf und konnten so als Wildtyp- und KO-Zelllinie charakterisiert werden. Da sie in ihrem Wachstum stagnierten, konnten sie allerdings nicht für die folgenden Versuche genutzt werden und wurden nicht als neue Zelllinien etabliert. Bei einem KO von AXL zeigte die Zelllinie SNU-475 nach der Isolation ebenfalls Beeinträchtigungen

in ihrem Wachstum und der Fähigkeit langfristig zu überleben.[26] Da die Kontroll-Zelllinien genau wie die KO-Zelllinien nicht langfristig kultivierbar waren, kann der beobachtete Effekt nicht allein dem smRC1-KO zugeschrieben werden. Er könnte vielmehr im Zusammenhang mit der klonalen Isolation oder der Transduktion stehen. Um dies zu überprüfen hätte die isolierte Kontroll-Zelllinie mit der nicht-transduzierten Zelllinie verglichen werden müssen.[27]

Die Zelllinie PLC/PRF/5 zeigt in den Chromatogrammen teilweise Doppelpeaks und die Auswertung zeigte, dass die Zielsequenz für smRC1 scheinbar versetzt auf beiden Allelen zu finden ist. Dies ist bei den Kontroll-Zelllinien und bei der Zelllinie vor der Transduktion sichtbar. Die Aufreinigung der Proben wurde dabei separat durchgeführt, weshalb diese Beobachtung nicht auf eine fehlerhafte Durchführung der verwendeten Methoden zurückzuführen sein sollte. Die Zelllinie PLC/PRF/5 hat ein komplexes Genom und aufgrund von integrierten Hepatitis-B-Virus-Sequenzen sind verschiedene Varianten der Basensequenzen möglich. Die aufgenommene Sequenz deutet auf einen 1-bp-Indel hin. [28] Die Zellpopulation wurde als Wildtyp angenommen. Es konnten drei Kontroll-Zelllinien und vier KO-Zelllinien etabliert werden. Von der Zelllinie Hep 3B konnten zwei Kontroll-Zelllinien und fünf KO-Zelllinien charakterisiert und etabliert werden. Dieses Ergebnis spiegelt sich in anderen KO-Versuchen der beiden Zelllinien wider, bei welchen erfolgreich KO-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9 etabliert wurden. Dazu gehören bei Hep 3B der KO von GPC3 und ADAMTSL3 sowie der KO von PCK1 und DAPK1 in der Zelllinie PLC/PRF/5.[29–32]

Die Untersuchung der Genexpression von smRC1 zeigte, dass smRC1 in allen Zelllinien exprimiert wird. Aufgrund des durch die Basensequenz bestätigten KOs von smRC1 entspricht dies nicht den Erwartungen. Grund dafür könnte sein, dass die RNA trotz des KOs von smRC1 transkribiert wird. Es handelt sich nicht zwingend um einen funktionellen KO und aufgrund der Veränderung von nur wenigen Basenpaaren, könnten die Primer der cDNA-Synthese teilweise anlagern. So könnte es trotz der Mutationen zu der Synthese der richtigen cDNA kommen, die dann in der RT-qPCR gemessen wird.[33] Auch eine Kontamination mit genomischer DNA könnte zu den hohen Signalen beitragen. Dies könnte über RT(-)-Kontrollen identifiziert werden. Dabei wird keine reverse Transkriptase eingesetzt, wodurch ohne die cDNA-Synthese der RNA nur die in der Probe vorhandene DNA zu einem Signal führt. In der Zukunft könnte das Primer-Design überarbeitet werden, um die Ergebnisse der RT-qPCR zu optimieren. Durch den Einsatz von DNase vor der cDNA-Synthese könnte das Risiko der Anwesenheit von DNA minimiert werden.[34]

Da die Genexpressions-Analyse keine Unterschiede zwischen den Kontroll-Zelllinien und KO-Zelllinien aufzeigen konnte, wurde nachfolgend das biologische Verhalten der Zelllinien untersucht. Für das Kolonie-Bildungs-Assay wurde eine geringe Anzahl an Zellen ausgesät und anhand der Kolonie-Bildung konnte das klonogene Potential der Zellen bewertet werden.[21] Der Vergleich der KO-Zelllinien mit den Kontroll-Zelllinien zeigte sowohl für PLC/PRF/5 als auch für Hep 3B ein erhöhtes klonogenes Potential der Kontroll-Zelllinien. Dies deutet darauf hin, dass smRC1 in Zusammenhang mit einem erhöhten langfristigen Zell-Überleben steht und eine mögliche Rolle bei der Tumor-Bildungsfähigkeit spielen könnte. Dies könnte

weitergehend mittels Proliferations-Assays und Apoptose-Analyse untersucht werden.[35] Die erzeugten Ergebnisse spiegeln sich in vorangegangenen KO-Versuchen mit der Zelllinie Huh-7 wider, in denen die Forschung an der funktionellen Rolle von smRC1 bereits weiter fortgeschritten ist. (interne Daten AG von Felden, nicht publiziert)

In der Bewertung der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass smRC1 Teil der lncRNA ENST00000647660 ist. Diese könnte Einfluss auf regulatorische Prozesse und benachbarte Gene haben.[5,7] Der KO von smRC1 macht nur einen kleinen Teil des gesamten RNA-Moleküls aus. Eine Veränderung einzelner Basenpaare verhindert nicht zwingend die Transkription, die lncRNA könnte demnach trotzdem exprimiert werden. Ob die Veränderung der Basensequenz dennoch Auswirkung hat, könnte durch die Untersuchung der Genexpression benachbarter Gene überprüft werden. Des Weiteren zeigte eine methodische CRISPR/Cas9-Studie zur Ausschaltung der lncRNA CCAT1 in anderen Karzinom-Zelllinien, dass es sinnvoll sein könnte einen größeren Teil der Sequenz auszuknocken und zusätzlich ein Transkriptionsstoppsignal einzubauen. [36]

Aufgrund ihrer regulatorischen Rolle in Prozessen wie Genexpression, Tumorwachstum, Immunflucht oder Therapieresistenzen gewinnen nicht-kodierende RNAs immer mehr an Bedeutung in der Forschung an HCC. Dazu gehören weitgreifende Themen wie Therapieresistenzen, beispielsweise durch die lncRNA DUXAP8, oder RNA-basierte Therapien, für die aktuell an der mikroRNA miR-107, die in Mausmodellen nachgewiesen bei HCC vermindert ist, geforscht wird.[37,38] smRC1 gehört zu den möglichen blutbasierten RNA-Biomarkern und ist somit von großer Bedeutung für die aktuelle Forschung. Die Entwicklung der KO-Modelle war erfolgreich und die neu etablierten Zelllinien können in künftigen Versuchen genutzt werden, um die Rolle von smRC1 weitergehend zu erforschen, um langfristig zu der Entwicklung neuer Untersuchungs- und Therapiemöglichkeiten beizutragen.

Literaturverzeichnis

1. Von Felden J, Garcia-Lezana T, Dogra N, et al. Unannotated small RNA clusters associated with circulating extracellular vesicles detect early stage liver cancer. Gut 2022;71(10):2069–2080; doi: 10.1136/gutjnl-2021-325036.

2. Pacesa M, Pelea O, Jinek M. Past, present, and future of CRISPR genome editing technologies. Cell 2024;187(5):1076–1100; doi: 10.1016/j.cell.2024.01.042.

3. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma. Nat Rev Dis Primers 2021;7(1):6; doi: 10.1038/s41572-020-00240-3.

4. Craig AJ, Von Felden J, Garcia-Lezana T, et al. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2020;17(3):139–152; doi: 10.1038/s41575-019-0229-4.

5. Quagliata L, Matter MS, Piscuoglio S, et al. Long noncoding RNA HOTTIP/HOXA13 expression is associated with disease progression and predicts outcome in hepatocellular carcinoma patients. Hepatology 2014;59(3):911–923; doi: 10.1002/hep.26740.

6. Zhang Z, Zhang J, Diao L, et al. Small non-coding RNAs in human cancer: function, clinical utility, and characterization. Oncogene 2021;40(9):1570–1577; doi: 10.1038/s41388-020-01630-3.

7. Bhan A, Soleimani M, Mandal SS. Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. Cancer Research 2017;77(15):3965–3981; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2634.

8. Gene: ENSG00000285817 - Summary - Homo_sapiens - Ensembl Genome Browser 116. https://jun2026.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000285817;r=8:137524755-137645564;t=ENST00000647660 [Erster Zugriff: 06.08.2026].

9. Transcript: ENST00000647660.1 - Summary - Homo_sapiens - Ensembl Genome Browser 116. https://jun2026.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000285817;r=8:137524755-137645564;t=ENST00000647660 [Erster Zugriff: 06.08.2026].

10. Manual Annotation. https://www.sanger.ac.uk/collaboration/manual-annotation/ [Erster Zugriff: 06.08.2026].

11. Chromosome 8: 137,522,339-137,647,980 - Region in Detail - Homo_sapiens - Ensembl Genome Browser 116. https://jun2026.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000285817;r=8:137522339-137647980;t=ENST00000647660 [Erster Zugriff: 06.08.2026].

12. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. Science 2014;343(6166):84–87; doi: 10.1126/science.1247005.

13. Sanjana NE. Genome-scale CRISPR pooled screens. Analytical Biochemistry 2017;532:95–99; doi: 10.1016/j.ab.2016.05.014.

14. Joung J, Konermann S, Gootenberg JS, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. Nat Protoc 2017;12(4):828–863; doi: 10.1038/nprot.2017.016.

15. Merten O-W, Hebben M, Bovolenta C. Production of lentiviral vectors. Molecular Therapy - Methods & Clinical Development 2016;3:16017; doi: 10.1038/mtm.2016.17.

16. SNU-475 - CRL-2236 | ATCC. https://www.atcc.org/products/crl-2236 [Erster Zugriff: 02.06.2026].

17. PLC/PRF/5 - CRL-8024 | ATCC. https://www.atcc.org/products/crl-8024 [Erster Zugriff: 02.06.2026].

18. Hep 3B2.1-7 [Hep 3B, Hep-3B, Hep3B] - HB-8064 | ATCC. https://www.atcc.org/products/hb-8064 [Erster Zugriff: 02.06.2026].

19. TubeSeq Supreme. https://eurofinsgenomics.eu/en/custom-dna-sequencing/tubeseq-supreme/ [Erster Zugriff: 12.05.2026].

20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods 2001;25(4):402–408; doi: 10.1006/meth.2001.1262.

21. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, et al. Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc 2006;1(5):2315–2319; doi: 10.1038/nprot.2006.339.

22. Timonova SS, Kirik IA, Zaripova DT, et al. Comparison of Aflibercept Producers Derived from CHO and CHO-GS Cell Lines. BIOMEDICINE 2025;21(1):46–57; doi: 10.33647/2074-5982-21-1-46-57.

23. Schröder SK, Pinoé-Schmidt M, Weiskirchen R. Lipocalin-2 (LCN2) Deficiency Leads to Cellular Changes in Highly Metastatic Human Prostate Cancer Cell Line PC-3. Cells 2022;11(2):260; doi: 10.3390/cells11020260.

24. Walsh E, Torres TZB, Prince BC, et al. Generation of Cas9 Knock-In Culex quinquefasciatus Mosquito Cells. DNA 2025;5(1):1; doi: 10.3390/dna5010001.

25. Puck TT, Marcus PI, Cieciura SJ. CLONAL GROWTH OF MAMMALIAN CELLS IN VITRO. The Journal of Experimental Medicine 1956;103(2):273–284; doi: 10.1084/jem.103.2.273.

26. Batur T, Argundogan A, Keles U, et al. AXL Knock-Out in SNU475 Hepatocellular Carcinoma Cells Provides Evidence for Lethal Effect Associated with G2 Arrest and Polyploidization. IJMS 2021;22(24):13247; doi: 10.3390/ijms222413247.

27. Zhen S, Hua L, Liu Y-H, et al. Inhibition of long non-coding RNA UCA1 by CRISPR/Cas9 attenuated malignant phenotypes of bladder cancer. Oncotarget 2017;8(6):9634–9646; doi: 10.18632/oncotarget.14176.

28. Chen C-C, Guan G, Qi X, et al. Pacbio Sequencing of PLC/PRF/5 Cell Line and Clearance of HBV Integration Through CRISPR/Cas-9 System. Front Mol Biosci 2021;8:676957; doi:

10.3389/fmolb.2021.676957.

29. Chung J-Y. Glypican-3 deficiency in liver cancer upregulates MAPK/ERK pathway but decreases cell proliferation. Am J Cancer Res 2024;14(7):3348–3371; doi: 10.62347/TTNY4279.

30. Zhou X, Li R, Jing R, et al. Genome-wide CRISPR knockout screens identify ADAMTSL3 and PTEN genes as suppressors of HCC proliferation and metastasis, respectively. J Cancer Res Clin Oncol 2020;146(6):1509–1521; doi: 10.1007/s00432-020-03207-9.

31. Tuo L, Xiang J, Pan X, et al. PCK1 negatively regulates cell cycle progression and hepatoma cell proliferation via the AMPK/p27Kip1 axis. J Exp Clin Cancer Res 2019;38(1):50; doi: 10.1186/s13046-019-1029-y.

32. Li Y, Huang H, Yu H, et al. Differential gene expression analysis after DAPK1 knockout in hepatocellular carcinoma cells. PeerJ 2022;10:e13711; doi: 10.7717/peerj.13711.

33. Lee JH, Yu S, Nam TW, et al. The position of the target site for engineered nucleases improves the aberrant mRNA clearance in in vivo genome editing. Sci Rep 2020;10(1):4173; doi: 10.1038/s41598-020-61154-4.

34. Laurell H, Iacovoni JS, Abot A, et al. Correction of RT–qPCR data for genomic DNA-derived signals with ValidPrime. Nucleic Acids Research 2012;40(7):e51–e51; doi: 10.1093/nar/gkr1259.

35. Li W, Cho M-Y, Lee S, et al. CRISPR-Cas9 mediated CD133 knockout inhibits colon cancer invasion through reduced epithelial-mesenchymal transition. Ahmad A. ed. PLoS ONE 2019;14(8):e0220860; doi: 10.1371/journal.pone.0220860.

36. Zare K, Shademan M, Ghahramani Seno MM, et al. CRISPR/Cas9 Knockout Strategies to Ablate CCAT1 lncRNA Gene in Cancer Cells. Biol Proced Online 2018;20(1):21; doi: 10.1186/s12575-018-0086-5.

37. Castoldi M, Roy S, Angendohr C, et al. Regulation of KIF23 by miR-107 controls replicative tumor cell fitness in mouse and human hepatocellular carcinoma. Journal of Hepatology 2025;82(3):499–511; doi: 10.1016/j.jhep.2024.08.025.

38. Shi Z, Li Z, Jin B, et al. Loss of LncRNA DUXAP8 synergistically enhanced sorafenib induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma via SLC7A11 de-palmitoylation. Clinical & Translational Med 2023;13(6):e1300; doi: 10.1002/ctm2.1300.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ablauf des KO-Versuchs von smRC1. 1. Der Knockout (KO) von smRC1 wurde mittels lentiviraler Transduktion durchgeführt. 2. Die smRC1-spezifischen CRISPR/Cas9 Vektoren initiierten Doppelstrangbrüche (DSB) in der DNA, welche von zelleigenen Reparatur-Mechanismen behoben wurden, die zu dem KO führen. 3. Mittels verschiedener Methoden wurde eine klonale Isolation durchgeführt und die Zellen wurden expandiert. 4. Zur Validierung wurde eine DNA-Sequenzierung durchgeführt, bei der die DNA-Sequenz zu smRC1 analysiert wurde. (Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender) 8

Abbildung 2: Die Entdeckung von smRCs. Aus dem Blut von Patientinnen und Patienten mit HCC wurden EVs isoliert, aus welchen mittels RNA-Sequenzierung Cluster aus bislang nicht annotierten RNA-Signalen entdeckt, deren Eigenschaften über die Peak-Sequenz, die Entropie der RNA-Sequenz und eine Konsensussequenz definiert wurden.[1] 11

Abbildung 3: Fall-Kontroll-Studie zur Untersuchung der Biomarker. Die Studie wurde durchgeführt, um zu testen, ob mittels smRCs eine Früherkennung von HCC möglich ist. Die Testgruppe umfasste Patientinnen und Patienten mit frühem HCC und anderen Lebererkrankungen. Aus dem Blut-Plasma wurden die smRCs isoliert und untersucht. Die drei smRCs (smRC1, smRC2 und smRC3) sind bei Patientinnen und Patienten mit HCC deutlich überexprimiert.[1] 12

Abbildung 4: Chromosom 8. Das gesamte Chromosom mit seinen unterschiedlichen Bereichen. Das Gen ENSG00000285817 ist in dem rot markierten Bereich (rechts) lokalisiert.[11] 12

Abbildung 5: Genomische Lage des Gens ENSG00000285817. Das rot markierte Gen ist in dem Bereich von 137.524.755 bis 137.645.564 auf dem Reverse-Strang lokalisiert.[11] 13

Abbildung 6: Die lncRNA ENST00000647660. Die lncRNA wird von dem Gen ENSG00000285817 kodiert, welches auf dem Reverse-Strang liegt. Sie hat eine Länge von 120,81 kb und besteht aus Exons (Kästen) und Introns (Striche).[9] 13

Abbildung 7: Genomische Lage von smRC1. smRC1 ist Teil der lncRNA ENST00000647660 und liegt in dem Bereich 137,627,017 bis 137,627,182 auf dem Chromosom 8.[11] 13

Abbildung 8: Genomische Lage der Konsensussequenz von smRC1. Die RNA-Sequenz von smRC1 lautet: CCUCUUCUUAACACC. Diese wurde um einige Basen erweitert und in die DNA-Sequenz übersetzt. Die Sequenz für smRC1 in 3´-5´-Leserichtung liegt auf dem Reverse-Stang. Auf dem Forward-Strang in 5´-3´-Leserichtung lautet die DNA-Sequenz somit: GGTGTTAAGAAGAGGACAA.[11] 14

Abbildung 9: Gen-KO mittels CRISPR/Cas9. Die gRNA besteht aus dem Spacer, ein kurzer RNA-Abschnitt, der komplementär zu der Zielsequenz ist, und dem Scaffold, der Bereich, der an das

Enzym Cas9 bindet. Der Komplex aus der RNA und dem Enzym bindet über den PAM an das Zielgen (hier als Target bezeichnet) und schneidet die DNA. Dieser DSB wird durch zelluläre Reparatur-Mechanismen, wie Non-homologous-End-Joining (NHEJ), wieder zusammengefügt. Dabei können verschiedene Fehler unterlaufen, die die Expression des Zielgens verhindern und somit zu einem KO führen. (https://media.addgene.org/cms/filer_public/c4/cd/c4cd7a42-a7ca-41e1-8468-231e508fa394/knockout.png) 15

Abbildung 10: Produktion und Einsatz lentiviraler Vektoren. Die Produktions-Plasmide enthalten die Informationen über das Ziel-Gen und das CRISPR/Cas9 System, die Struktur-Proteine und -Enzyme, sowie das Oberflächen-Protein, das für eine Transduktion notwendig ist. Die Vektoren werden von den Produzentenzellen hergestellt und können nach der Aufreinigung für die Transduktion *in-vivo* oder *in-vitro* eingesetzt werden.(https://media.addgene.org/cms/filer_public/c2/00/c200c74c-1a59-450d-9a1b-0b688f4f4ca3/lenti_production.png) 16

Abbildung 11: Gen-KO von mittels lentiviraler Transduktion. Das CRISPR/Cas9 Modell wird in die Zellen eingebracht. Durch die spezifische Bindung an das Zielgen von smRC1 wird über den DSB die Expression des Gens verhindert. (Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender) 17

Abbildung 12: Kolonie-Picking. Die angewachsenen Zell-Kolonien wurden unter dem Mikroskop markiert, mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in eine 24-Well-Platte überführt. (Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender) 23

Abbildung 13: Banden des DNA-Markers. Es wurde die DirectLoad Plus 100 bp DNA Ladder verwendet. Die Bande von smRC1 wird auf Höhe der roten Markierung bei einer Größe von 280 bp erwartet. (https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/DirectLoad-Plus-100bp-DNA-Ladder,MM_NF-DPLUS-100) 28

Abbildung 14: Ergebnis der Gelelektrophorese LT054. Nach der DNA-Extraktion wurde die DNA quantifiziert und die Ziel-Region von smRC1 wurde mittels PCR amplifiziert. Für die Detektion wurden 5 µL Probe und DNA-Marker sowie ein 1,5 % Agarose Gel verwendet. Die Gelelektrophorese lief für 50 min bei 4 °C und 50 Volt. Die Bande von smRC1 ist wie erwartet auf einer Höhe von 280 bp zu sehen. Zu sehen sind die Banden folgender Proben: Marker, 1. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR O, 2. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR P, 3. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR A. 38

Abbildung 15: Chromatogramm der Zelllinie SNU-475 CRISPR/Cas9 SCR E. Das Chromatogramm zeigt die Basensequenz der Kontroll-Zelllinie, begonnen bei der Ziel-Sequenz von smRC1: GGTGTTCAGGTGTTAAGAAGAGG. Die Basensequenz entspricht der des Wildtypen von SNU-475. Der Farbcode für die Basen ist: Adenin (grün), Thymin (rot), Guanin (schwarz), Cytosin (blau)..... 39

Abbildung 16: Chromatogramm der Zelllinie SNU-475 CRISPR/Cas9 smRC1 I. Das Chromatogramm zeigt die gemessenen Peaks der Basensequenz der KO-Zelllinie, begonnen bei der Ziel-Sequenz von smRC1: GGTGTTCAGGTGTTAAGAAGAGG. Der Farbcode für die Basen ist: Adenin (grün), Thymin (rot), Guanin (schwarz), Cytosin (blau). Die markierte Stelle zeigt

einen Doppelpeak, der durch die Detektion von zwei unterschiedliche Basen an derselben Stelle erzeugt wird..... 39

Abbildung 17: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR O. Das Chromatogramm zeigt die Basensequenz der Kontroll-Zelllinie, begonnen bei der Ziel-Sequenz von smRC1: GGTGTTCAGGTGTTAAGAAGAGG. Der Farbcode für die Basen ist: Adenin (grün), Thymin (rot), Guanin (schwarz), Cytosin (blau). 40

Abbildung 18: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO L. Das Chromatogramm zeigt die Basensequenz der KO-Zelllinie begonnen bei der Ziel-Sequenz von smRC1: GGTGTTCAGGTGTTAAGAAGAGG. Der Farbcode für die Basen ist: Adenin (grün), Thymin (rot), Guanin (schwarz), Cytosin (blau). 40

Abbildung 19: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR A. Das Chromatogramm zeigt die Basensequenz der Kontroll-Zelllinie, begonnen bei der Ziel-Sequenz von smRC1: GGTGTTCAGGTGTTAAGAAGAGG. Der Farbcode für die Basen ist: Adenin (grün), Thymin (rot), Guanin (schwarz), Cytosin (blau). 41

Abbildung 20: Plot der Amplifikation der RT-qPCR 1/2. Der Graph zeigt die Expression von smRC1 (grün) und GAPDH (pink). Der Threshold wurde automatisch bestimmt. 43

Abbildung 21: Plot der Amplifikation der RT-qPCR 2/2. Der Graph zeigt die Expression von smRC1 (grün) und GAPDH (pink). Der Threshold wurde automatisch bestimmt. Die gestrichelten Expressions-Signaturen wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. 43

Abbildung 22: Relative Quantifizierung von smRC1 in den Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9. In zwei Durchläufen wurde mittels RT-qPCR die Genexpression von smRC1 und GAPDH gemessen (*n*=2). Mittels der $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$-Methode wurde die relative Quantifizierung jeder Zelllinie in Bezug auf den Pool der Kontroll-Zelllinien durchgeführt und die relative Expression von smRC1 berechnet. 45

Abbildung 23: Relative Quantifizierung von smRC1 in den Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9. In zwei Durchläufen wurde mittels RT-qPCR die Genexpression von smRC1 und GAPDH gemessen (*n*=2). Mittels der $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$-Methode wurde die relative Quantifizierung jeder Zelllinie in Bezug auf den Pool der Kontroll-Zelllinien durchgeführt und die relative Expression von smRC1 berechnet. 47

Abbildung 24: Kolonie-Bildungs-Assay der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9. Die gefärbten Zellen Kontroll-Zelllinie SCR A (links) und der KO-Zelllinie KO L (rechts). Für das Assay wurden 1500 Zellen für eine Woche in einem Well einer 6-Well-Platte kultiviert, mit 70 % Ethanol fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. 47

Abbildung 25: Relative Quantifizierung der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9. Nach dem Kolonie-Bildungs-Assay, bei dem 1500 Zellen jeder Zelllinie für eine Woche kultiviert wurden,

wurden die Pixel-Intensitäten $I_{\text{ermittelt}}$ mittels ImageJ bestimmt. Mittels $I_{\text{invertiert}}(\text{SCR}) = 110{,}391$ und Gleichung 9 und den Mittelwerten der Kontroll-Zelllinien wurden die relative Quantifizierung durchgeführt und die relativen Pixel-Intensitäten berechnet. 48

Abbildung 26: Vergleich der Alex/PLC CRISPR/Cas9 Kontroll- und KO-Zelllinien. Nach dem Kolonie-Bildungs-Assay, bei dem 1500 Zellen jeder Zelllinie für eine Woche kultiviert wurden, wurden die Pixel-Intensitäten mittels ImageJ bestimmt. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Quantifizierung der Kontroll-Zelllinien SCR (*n*=3) und der KO-Zelllinien (*n*=4) bestimmt und mittels GraphPad Prism wurde ein Welch´s-t-Test durchgeführt. Dabei wurde für zwei unabhängige Stichproben mit ungleicher Varianz getestet, ob sich die Mittelwerte der Kontroll-Gruppe von denen der KO-Gruppe unterscheiden. Es gilt: *p < 0,05, **p < 0,01. 48

Abbildung 27: Kolonie-Bildungs-Assay der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9. Die gefärbten Zellen Kontroll-Zelllinie SCR L (links) und der KO-Zelllinie KO C (rechts). Für das Assay wurden 1500 Zellen für eine Woche in einem Well einer 6-Well-Platte kultiviert, mit 70 % Ethanol fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. 49

Abbildung 28: Relative Quantifizierung der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9. Nach dem Kolonie-Bildungs-Assay, bei dem 1500 Zellen jeder Zelllinie für eine Woche kultiviert wurden, wurden die Pixel-Intensitäten $I_{\text{ermittelt}}$ mittels ImageJ bestimmt. Mittels $I_{\text{invertiert}}(\text{SCR}) = 112{,}475$ und Gleichung 9 und den Mittelwerten der Kontroll-Zelllinien wurde die relative Quantifizierung RQ durchgeführt und die relativen Pixel-Intensitäten berechnet. 49

Abbildung 29: Vergleich der Hep 3B CRISPR/Cas9 Kontroll- und KO-Zelllinien. Nach dem Kolonie-Bildungs-Assay, bei dem 1500 Zellen jeder Zelllinie für eine Woche kultiviert wurden, wurden die Pixel-Intensitäten mittels ImageJ bestimmt. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Quantifizierung der Kontroll-Zelllinien SCR (*n*=2) und der KO-Zelllinien (*n*=5) bestimmt und mittels GraphPad Prism wurde ein Welch´s-t-Test durchgeführt. Dabei wurde für zwei unabhängige Stichproben mit ungleicher Varianz getestet, ob sich die Mittelwerte der Kontroll-Gruppe von denen der KO-Gruppe unterscheiden. Es gilt: *p < 0,05, **p < 0,01. 50

Abbildung 30: Vektor-Map des verwendeten Vektors für die SCR-Kontroll-Zelllinien. Das Vektor-Design wurde von der AG von Felden entwickelt. 70

Abbildung 31: Vektor-Map des verwendeten Vektors für die smRC1-KO-Zelllinien. Das Vektor-Design wurde von der AG von Felden entwickelt. 71

Abbildung 32: Ergebnis der Gelelektrophorese LT040. Marker, 1. SNU-475 CRISPR/Cas9 SCR Pool, 2. SNU-475 CRISPR/Cas9 KO Pool. 73

Abbildung 33: Ergebnis der Gelelektrophorese LT049. Marker, 1. SNU-475 CRISPR/Cas9 SCR E, 2. SNU-475 CRISPR/Cas9 smRC1 I, 3. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR Pool, 4. Hep 3B CRISPR/Cas9

KO Pool. 73

Abbildung 34: Ergebnis der Gelelektrophorese LT050. Marker, 1. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR Pool, 2. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO Pool. 73

Abbildung 35: Ergebnis der Gelelektrophorese LT055. Marker, 1. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 1, 2. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 2, 3. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 3, 4. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 4, 5. Alex/PLC CRISPR/Cas9 smRC1 LT044.1, 6. Alex/PLC CRISPR/Cas9 smRC1 LT044.2, 7. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 2, 8. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 3, Marker, 9. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR A, 10. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR L, 11. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 1, 12. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO M, 13. Alex/PLC..... 73

Abbildung 36: Ergebnis der Gelelektrophorese LT056. Marker, 1. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO C, 2. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 2, 3. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 3, 4. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO Y, 5. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 4, 6. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO H, 7. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO E, 8. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 5, Marker, 9. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR 1 , 10. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR 2, 11. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 4, 12. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO T, 13. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO I, 14. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 5, 15. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO E, 16. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 6. 74

Abbildung 37: Chromatogramm der Zelllinie SNU-475 CRISPR/Cas9 SCR Pool. 74

Abbildung 38: Chromatogramm der Zelllinie SNU-475 CRISPR/Cas9 KO Pool...... 74

Abbildung 39: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC Line. 74

Abbildung 40: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR Pool...... 74

Abbildung 41: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO Pool. 74

Abbildung 42: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR O. 75

Abbildung 43: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR P. 75

Abbildung 44: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR A...... 75

Abbildung 45: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 1. 75

Abbildung 46: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 2. 75

Abbildung 47: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 3. 75

Abbildung 48: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 4. 75

Abbildung 49: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 1. 75

Abbildung 50: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO L...... 75

Abbildung 51: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 2. 76

Abbildung 52: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 3. 76

Abbildung 53: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 4. 76

Abbildung 54: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO T...... 76

Abbildung 55: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO I. 76

Abbildung 56: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 5. 76

Abbildung 57: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO E...... 76

Abbildung 58: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 6. 76

Abbildung 59: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR Pool. 76

Abbildung 60: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO Pool. 77

Abbildung 61: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR L. 77

Abbildung 62: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 1...... 77

Abbildung 63: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO M. 77

Abbildung 64: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO C. 77

Abbildung 65: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 2...... 77

Abbildung 66: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 3...... 77

Abbildung 67: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO Y. 77

Abbildung 68: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 4...... 78

Abbildung 69: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO H. 78

Abbildung 70: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO E...... 78

Abbildung 71: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 5...... 78

Abbildung 72: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR 1. 78

Abbildung 73: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR 2. 78

Abbildung 74: Kolonie-Bildungs-Assay der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR. 1. SCR O, 2. SCR P, 3. SCR A..... 79

Abbildung 75: Kolonie-Bildungs-Assay der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9 smRC1. 4. KO L, 5. KO I, 6. KO T, 7. KO E. 80

Abbildung 76: Kolonie-Bildungs-Assay der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR. 8. SCR A, 9. SCR L. 80

Abbildung 77: Kolonie-Bildungs-Assay der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9 smRC1. 10. KO C, 11. KO H, 12. KO E, 13. KO M, 14. KO Y. 80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis. 5

Tabelle 2: Symbolverzeichnis. 5

Tabelle 3: Verwendete Geräte. 18

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Zubehör. 18

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Reagenzien. 18

Tabelle 6: Verwendete Materialien für das Arbeiten mit Zellkulturen 19

Tabelle 7: Für die Zelllinien verwendete Medien. Jede Zelllinie benötigt ein individuelles Medium, wie in der Tabelle angegeben. Für die Kultivierung wurden diesen Medien noch Glutamin, Penicillin/Streptomycin und FBS hinzugefügt. 19

Tabelle 8: Puromycin-Konzentrationen für die Dosis-Wirkungs-Kurve. Das Kulturmedium wurde mittels einer Verdünnungsreihe in den angegebenen Konzentrationen *c* angesetzt. Dafür wurde eine Puromycin-Stocklösung mit einer Konzentration von 10 mg/µL verwendet. 21

Tabelle 9: Zellzahl für die lentivirale Transduktion. Die lentivirale Transduktion wurde mit den drei Zelllinien SNU-475, Alex/PLC und Hep 3B durchgeführt, die mit der angegebenen Zellzahl/cm^2 in eine 24-Well-Platte ausgesät wurden. 22

Tabelle 10: Verwendete Materialen für die klonale Isolation. 22

Tabelle 11: Zelllinien für die klonale Isolation. Der Name der Zelllinie setzt sich aus dem Namen der Zelllinie, der verwendeten Methode CRISPR/Cas9 und dem transduzierten Virus (SCR oder smRC1) zusammen. Da eine Transduktion in jeder Zelle individuell abläuft, werden die neuen Zelllinien als Pool bezeichnet. 22

Tabelle 12: Verwendete Materialen für die DNA-Sequenzierung. 24

Tabelle 13: DNA-Proben der Zelllinien SNU-475 CRISPR/Cas9. Die DNA der Proben der angegebenen Passage P wurde extrahiert und mittels Nano Drop wurde die Konzentration *c*(DNA) bestimmt. Die Proben wurden mit dem angegebenen VF mit nuklease-freiem Wasser verdünnt, um die DNA-Konzentration $c_{verdünnt}$(DNA) zu erreichen. Das Volumen *V* der DNA-Proben der Zelllinien enthält eine DNA-Masse von 200 ng. Die Proben wurden mit nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11 µL ergänzt und für den PCR-Ansatz zur Amplifikation des Zielgens von smRC1 eingesetzt. Für die nachfolgende Aufreinigung wurde das Volumen der PCR-Produkte *V*(PCR) der Zelllinien anhand der Ergebnisse der zuvor durchgeführten Gelelektrophorese gewählt. 25

Tabelle 14: DNA-Proben der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9. Die DNA der Proben der angegebenen Passage P wurde extrahiert und mittels Nano Drop wurde die Konzentration *c*(DNA) bestimmt. Die Proben wurden mit dem angegebenen VF mit nuklease-freiem Wasser verdünnt, um die DNA-Konzentration $c_{verdünnt}$(DNA) zu erreichen. Das Volumen *V* der DNA-Proben der Zelllinien enthält eine DNA-Masse von 200 ng. Die Proben wurden mit nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11 µL ergänzt und für den PCR-Ansatz zur Amplifikation des Zielgens von smRC1 eingesetzt. Für die nachfolgende Aufreinigung wurde das Volumen der PCR-Produkte *V*(PCR) der Zelllinien anhand der Ergebnisse der zuvor durchgeführten Gelelektrophorese gewählt. Zusätzlich zu den Proben des KO-Versuches wurde eine DNA-Probe der Zelllinie Alex/PLC von der AG von Felden zur Verfügung gestellt. Die Probe umfasste 2 Millionen Zellen, wurde am 31.08.2023 genommen und am 14.09.2023 wurde die DNA isoliert. Seitdem wurde sie bei -20 °C gelagert. 25

Tabelle 15: DNA-Proben der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9. Die DNA der Proben der angegebenen Passage P wurde extrahiert und mittels Nano Drop wurde die Konzentration *c*(DNA) bestimmt. Die Proben wurden mit dem angegebenen VF mit nuklease-freiem Wasser verdünnt, um die DNA-Konzentration $c_{verdünnt}$(DNA) zu erreichen. Das Volumen *V* der DNA-Proben der Zelllinien enthält eine DNA-Masse von 200 ng. Die Proben wurden mit nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11 µL ergänzt und für den PCR-Ansatz zur Amplifikation des Zielgens von smRC1 eingesetzt. Für die nachfolgende Aufreinigung wurde das Volumen der PCR-Produkte *V*(PCR) der Zelllinien anhand der Ergebnisse der zuvor durchgeführten Gelelektrophorese gewählt. 26

Tabelle 16: Primer für die Amplifikation von smRC1. Die Primer für die PCR wurden von der AG von Felden designt. Dabei wurde die Anfangs- und die Endsequenz von dem Gen für smRC1 verwendet, um den gesamten Abschnitt amplifizieren zu können. Der Forward-Primer ist in 5´-3´-Richtung, der Reverse-Primer in 3´-5´-Richtung designt. Beide Primer haben eine Stoffmengenkonzentration *c* von 10 µM. 27

Tabelle 17: Ansatz des Master Mixes für die PCR zur Amplifikation der Ziel-Region von smRC1. Das Volumen *V* ist für eine Probe angegeben und wurde für den Ansatz entsprechend der Anzahl der Proben angepasst. Die beiden Primer wurden von der AG von Felden designt. 27

Tabelle 18: Phasen der PCR zur Amplifikation des Zielgens von smRC1. 28

Tabelle 19: Verwendete Materialen für die Untersuchung der Genexpression. 29

Tabelle 20: RNA-Proben der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9 in Durchlauf 1/2. Die RNA der Proben der angegebenen Passage P wurde extrahiert und mittels Nano Drop quantifiziert (*c*(RNA)). Für die nachfolgende reverse Transkription wurde die Probe 5 mit einem VF_{RT} von 2 verdünnt, wodurch die verwendete Konzentration bei $c_{verdünnt}$(RNA)=368,838 ng/µL lag. Für die reverse Transkription der sRNA wurde das Volumen *V*(sRNA) für die RNA-Masse *m*(sRNA)

berechnet und nach der Transkription wurde die cDNA mit dem VF(sRNA) verdünnt. Für die reverse Transkription der mRNA wurde das Volumen *V*(mRNA) für die RNA-Masse *m*(mRNA)=500 ng berechnet und nach der Transkription mit einem VF(mRNA) von 5 verdünnt. 30

Tabelle 21: RNA-Proben der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9 in Durchlauf 1/2. Die RNA der Proben der angegebenen Passage P wurde extrahiert und mittels Nano Drop quantifiziert (*c*(RNA)). Für die reverse Transkription der sRNA wurde das Volumen *V*(sRNA) für die RNA-Masse *m*(sRNA)=100 ng berechnet, wobei bei der Probe 10 *m*(sRNA)=250 ng eingesetzt wurde. Nach der Transkription wurde die cDNA mit dem VF(sRNA)=2 verdünnt, wobei der VF(sRNA) für Probe 10 bei 5 lag. Für die reverse Transkription der mRNA wurde das Volumen *V*(mRNA) für die RNA-Masse *m*(mRNA) berechnet und nach der Transkription mit dem VF(mRNA) verdünnt 30

Tabelle 22: RNA-Proben der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9 in Durchlauf 2/2. Die RNA der Proben der angegebenen Passage P wurde extrahiert und mittels Nano Drop quantifiziert (*c*(RNA)). Mit einem VF von 20 wurde die verwendete Konzentration $c_{verdünnt}$(RNA) erreicht. Für die reverse Transkription wurde das Volumen *V*(RNA) für die RNA-Masse *m*(RNA)=500 ng berechnet. Für die nachfolgende RT-qPCR wurde die cDNA der sRNA mit einem VF von 10 und die cDNA der mRNA mit einem VF von 5 verdünnt. 30

Tabelle 23: RNA-Proben der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9 in Durchlauf 2/2. Die RNA der Proben der angegebenen Passage P wurde extrahiert und mittels Nano Drop quantifiziert (*c*(RNA)). Mit dem VF_{RT} wurde die verwendete Konzentration $c_{verdünnt}$(RNA) erreicht. Für die reverse Transkription wurde das Volumen *V*(RNA) für die RNA-Masse *m*(RNA)=500 ng berechnet. Für die nachfolgende RT-qPCR wurde die cDNA der sRNA mit einem VF von 10 und die cDNA der mRNA mit einem VF von 5 verdünnt. 31

Tabelle 24: Ansatz des Master Mixes für die PCR zur smRC1-spezifischen cDNA-Synthese der sRNA. Das Volumen *V* ist für eine Probe angegeben und wurde für den Ansatz entsprechend der Anzahl der Proben angepasst. 32

Tabelle 25: Phasen der PCR zur smRC-spezifischen cDNA-Synthese der sRNA. 33

Tabelle 26: Ansatz des Master Mixes für die PCR zur cDNA-Synthese der mRNA. Das Volumen *V* ist für eine Probe angegeben und wurde für den Ansatz entsprechend der Anzahl der Proben angepasst 33

Tabelle 27: Phasen der PCR zur cDNA-Synthese der mRNA. 33

Tabelle 28: Ansatz des Master Mixes für die RT-qPCR. Der Master Mix wurde für die beiden verwendeten Primer entsprechend der Anzahl der Proben angesetzt. Gemessen wurden GAPDH als Referenz und smRC1 als Ziel-Region. 34

Tabelle 29: Programm für die RT-qPCR..... 34

Tabelle 30: Verwendete Materialen für den Kolonie-Bildungs-Assay. 35

Tabelle 31: Anzahlen der erfolgreich isolierten Zell-Klone. Es wurden verschiedene Methoden der klonalen Isolation durchgeführt. Die isolierten Zell-Klone wurden zu neuen Zelllinien expandiert, wobei jede Zelllinie, die mindestens einmal passagiert wurde, dokumentiert wurde. Die Anzahl dieser erfolgreich isolierten Zelllinien, je nach der verwendeten Methode, ist in der Tabelle angegeben. Nach der Klonierung in semisolidem Medium konnte kein Zell-Klon erfolgreich isoliert werden, weshalb diese Methode nicht mit aufgeführt ist. Die $Anzahl_{gesamt}$ gibt an, wie viele Zell-Klone jeweils unabhängig von der Art der Isolation, isoliert werden konnten. 37

Tabelle 32: PCR-Ergebnisse Alex/PLC CRISPR/Cas9 aus dem Durchlauf 1/2. Die Zelllinien wurden mittels RT-qPCR auf ihre Genexpression von smRC1 und GAPDH untersucht. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen und für die Auswertung wurden die Mittelwerte C_T der C_T-Werte von smRC1 und GAPDH berechnet. Daraus wurde mittels Gleichung 5 ΔC_T bestimmt..... 44

Tabelle 33: PCR-Ergebnisse Alex/PLC CRISPR/Cas9 aus dem Durchlauf 2/2. Die Zelllinien wurden mittels RT-qPCR auf ihre Genexpression von smRC1 und GAPDH untersucht. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen und für die Auswertung wurden die Mittelwerte C_T der C_T-Werte von smRC1 und GAPDH berechnet. Daraus wurde mittels Gleichung 5 ΔC_T bestimmt..... 44

Tabelle 34: Relative Quantifizierung der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9 in Durchlauf 1/2. Mittels Gleichung 6 wurde die Differenz $\Delta\Delta C_T$ der KO-Zelllinie und des jeweiligen Kontroll-Pools bestimmt. Mittels Gleichung 7 und $\Delta C_{T,\,SCR}$ = 3,965 wurde die relative Quantifizierung RQ berechnet. Ist die RQ > 100, ist die Expression des Zielgens in der KO-Zelllinie höher als in der Kontroll-Zelllinie..... 44

Tabelle 35: Relative Quantifizierung der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9 in Durchlauf 2/2. Mittels Gleichung 6 wurde die Differenz $\Delta\Delta C_T$ der KO-Zelllinie und des jeweiligen Kontroll-Pools bestimmt. Mittels Gleichung 7 und $\Delta C_{T,\,SCR}$ = 4,746 wurde die relative Quantifizierung RQ berechnet. Ist die RQ > 100, ist die Expression des Zielgens in der KO-Zelllinie höher als in der Kontroll-Zelllinie..... 45

Tabelle 36: PCR-Ergebnisse Hep 3B CRISPR/Cas9 aus dem Durchlauf 1/2. Die Zelllinien wurden mittels RT-qPCR auf ihre Genexpression von smRC1 und GAPDH untersucht. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen und für die Auswertung wurden die Mittelwerte der C_T-Werte von smRC1 und GAPDH berechnet. Daraus wurde mittels Gleichung 5 ΔC_T bestimmt..... 45

Tabelle 37: PCR-Ergebnisse Hep 3B CRISPR/Cas9 aus dem Durchlauf 2/2. Die Zelllinien

wurden mittels RT-qPCR auf ihre Genexpression von smRC1 und GAPDH untersucht. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen und für die Auswertung wurden die Mittelwerte der C_T-Werte von smRC1 und GAPDH berechnet. Daraus wurde mittels Gleichung 5 ΔC_T bestimmt. 46

Tabelle 38: Relative Quantifizierung der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9 in Durchlauf 1/2. Mittels Gleichung 6 wurde die Differenz $\Delta\Delta C_T$ der KO-Zelllinie und des jeweiligen Kontroll-Pools bestimmt. Mittels Gleichung 7 und $\Delta C_{T,\,SCR}$ = 2,884 wurde die relative Quantifizierung RQ berechnet. Ist die RQ > 100, ist die Expression des Zielgens in der KO-Zelllinie höher, als in der Kontroll-Zelllinie. 46

Tabelle 39: Relative Quantifizierung der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9 in Durchlauf 2/2. Mittels Gleichung 6 wurde die Differenz $\Delta\Delta C_T$ der KO-Zelllinie und des jeweiligen Kontroll-Pools bestimmt. Mittels Gleichung 7 und $\Delta C_{T,\,SCR}$ = 4,449 wurde die relative Quantifizierung RQ berechnet. Ist die RQ > 100, ist die Expression des Zielgens in der KO-Zelllinie höher als in der Kontroll-Zelllinie. 46

Tabelle 40: Pixel-Intensitäten der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9. Nach dem Kolonie-Bildungs-Assay, bei dem 1500 Zellen jeder Zelllinie für eine Woche kultiviert wurden, wurden die Pixel-Intensitäten $I_{ermittelt}$ mittels ImageJ bestimmt. Mittels Gleichung 8 wurde die invertierte Intensität $I_{invertiert}$ berechnet. 47

Tabelle 41: Pixel-Intensitäten der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9. Nach dem Kolonie-Bildungs-Assay, bei dem 1500 Zellen jeder Zelllinie für eine Woche kultiviert wurden, wurden die Pixel-Intensitäten $I_{ermittelt}$ mittels ImageJ bestimmt. Mittels Gleichung 8 wurde die invertierte Intensität $I_{invertiert}$ berechnet. 49

Tabelle 42: LT040 DNA Quantifizierung. Mit 1. SNU-475 CRISPR/Cas9 SCR Pool, 2. SNU-475 CRISPR/Cas9 KO Pool. 71

Tabelle 43: LT049 DNA Quantifizierung. Mit 3. SNU 475 CRISPR/Cas9 SCR E, 4. SNU 475 CRISPR/Cas9 smRC1 I, 25. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR Pool, 26. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO Pool. 71

Tabelle 44: LT050 DNA-Quantifizierung. Mit 1. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR Pool, 6. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO Pool. 72

Tabelle 45: LT054 DNA-Quantifizierung. Mit 7. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR O, 8. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR P, 9. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR A. 72

Tabelle 46: LT055 DNA-Quantifizierung. Mit 10. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 1, 11. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 2, 12. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 3, 13. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 4, 14. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 1, 15. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO L, 16. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 2, 17. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 3, 27. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR A, 28. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR L, 29. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 1, 30. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO M. 72

Tabelle 47: LT056 DNA-Quantifizierung. Mit 31. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO C, 32. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 2, 33. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 3, 34. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO Y, 35. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 4, 36. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO H, 37. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO E, 38. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 5, 39. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR 1 , 40. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR 2, 18. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 4, 19. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO T, 20. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO I, 21. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 5, 22. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO E, 23. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 6. 72

Tabelle 48: Ergebnisse der RT-qPCR 1/2 der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9. 78

Tabelle 49: Ergebnisse der RT-qPCR 1/2 der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9...... 78

Tabelle 50: Ergebnisse der RT-qPCR 2/2 der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9. 79

Tabelle 51: Ergebnisse der RT-qPCR 2/2 der Zelllinien Hep3B CRISPR/Cas9. 79

Anhang

smRC1-Sequenz

Die vollständige Sequenz von smRC1, in seiner genomischen Lage von 137.627.017 bis 137.627.182 ist:

*CTGAGAGTTCCCATTTCTGAGC*CGACACCTTCTTTCCCAAAATTATTATTTTTTCTGCTAGTTTCACTTG
CTGTTGACATTTGTCTCTTCTTTTGAGCCTCACATCAGATGTCTCTGCCATTTAAAAGCCTTTTTTCTAA
TCTATCTGGAGTTAGCATGGTGTTCAGGTGTTAAGAAGAGGACAATAAATAGTAAAATGAAGAAGA
TGGGGAGAAGACTAAGAAGAAAAGACAATGGCTTCATTAATTAGTTTTATTTggatgcttttgcttggtttta
tt

Mit:

Konsensussequenz

CRISPR/Cas9-Ziel-Sequenz

PAM

Primer Forward

primer reverse

Vektor-Maps

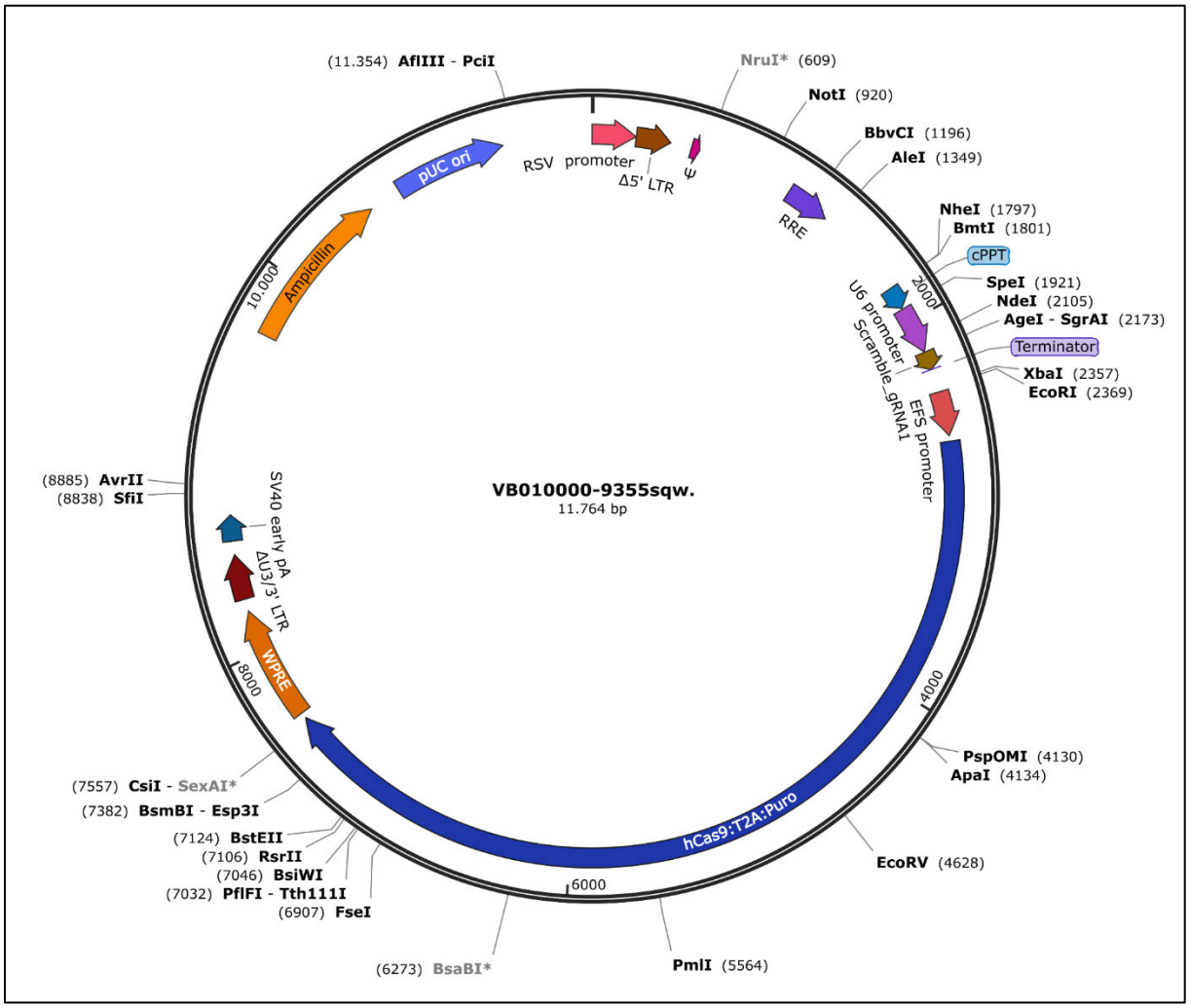


Abbildung 30: Vektor-Map des verwendeten Vektors für die SCR-Kontroll-Zelllinien. Das Vektor-Design wurde von der AG

von Felden entwickelt.

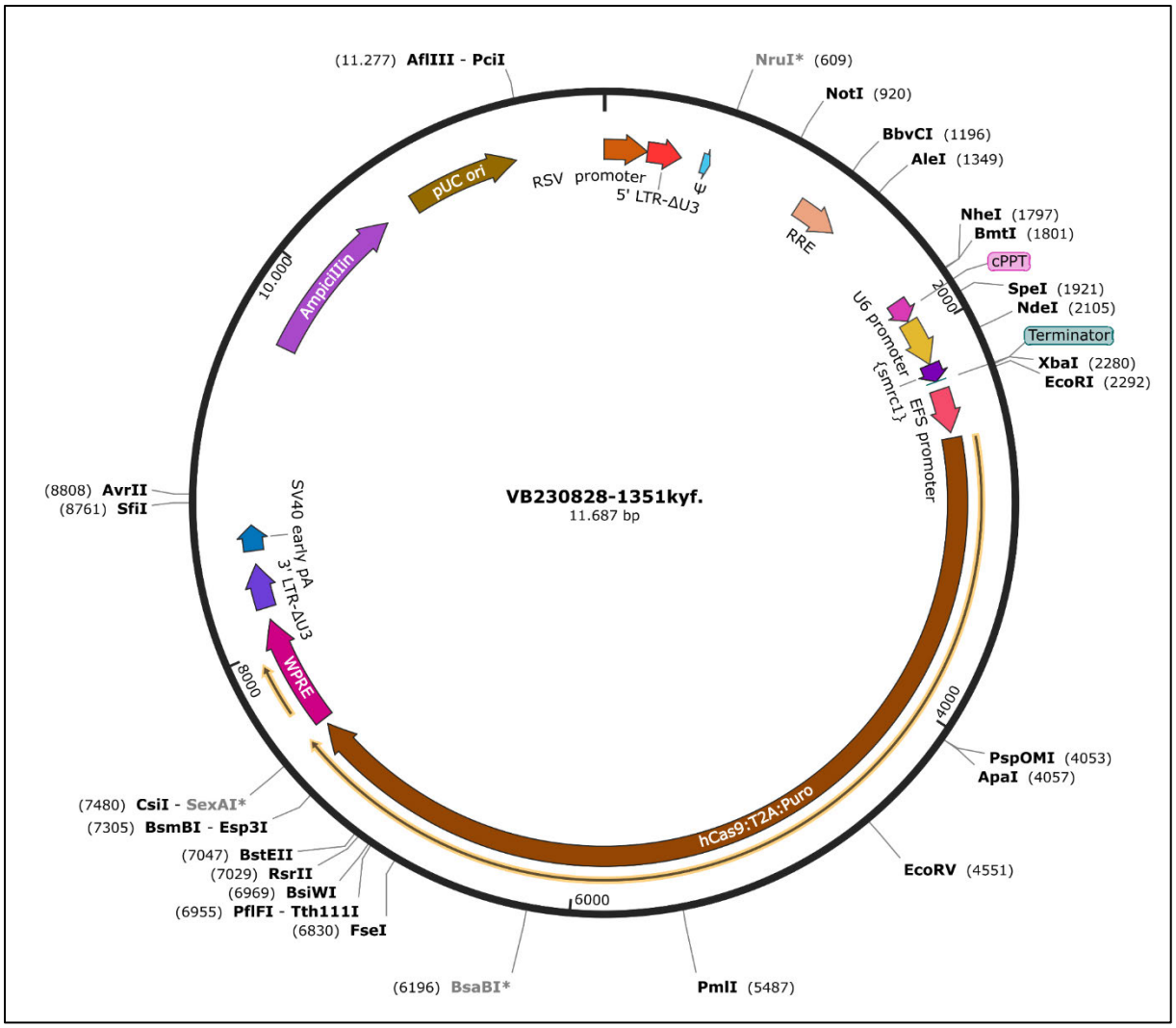


Abbildung 31: Vektor-Map des verwendeten Vektors für die smRC1-KO-Zelllinien. Das Vektor-Design wurde von der AG von Felden entwickelt.

Quantifizierung der DNA-Proben

Tabelle 42: LT040 DNA Quantifizierung. Mit 1. SNU-475 CRISPR/Cas9 SCR Pool, 2. SNU-475 CRISPR/Cas9 KO Pool.

Nr.	*c*(DNA), ng/µL	A260	A280	A230	A260/A280	A260/A230
1	46,649	0,932	0,429	0,751	2,17	1,24
2	247,203	4,944	2,296	2,601	2,15	1,90

Tabelle 43: LT049 DNA Quantifizierung. Mit 3. SNU 475 CRISPR/Cas9 SCR E, 4. SNU 475 CRISPR/Cas9 smRC1 I, 25. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR Pool, 26. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO Pool.

Nr.	*c*(DNA), ng/µL	A260	A280	A230	A260/A280	A260/A230
3	24,875	0,497	0,232	0,717	2,14	0,69
4	56,320	1,126	0,542	1,021	2,08	1,10
25	75,721	1,514	0,711	1,016	2,13	1,49
26	83,532	1,670	0,778	1,054	2,15	1,58

Tabelle 44: LT050 DNA-Quantifizierung. Mit 1. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR Pool, 6. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO Pool.

Nr.	*c*(DNA), ng/µL	A260	A280	A230	A260/A280	A260/A230
5	58,459	1,169	0,540	0,873	2,16	1,34
6	98,792	1,975	0,933	1,242	2,12	1,59

Tabelle 45: LT054 DNA-Quantifizierung. Mit 7. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR O, 8. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR P, 9. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR A.

Nr.	*c*(DNA), ng/µL	A260	A280	A230	A260/A280	A260/A230
7	41,353	0,827	0,397	0,674	2,08	1,23
8	159,123	3,182	1,535	1,786	2,07	1,78
9	105,427	2,108	1,003	1,247	2,10	1,69

Tabelle 46: LT055 DNA-Quantifizierung. Mit 10. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 1, 11. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 2, 12. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 3, 13. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 4, 14. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 1, 15. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO L, 16. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 2, 17. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 3, 27. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR A, 28. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR L, 29. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 1, 30. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO M.

Nr.	*c*(DNA), ng/µL	A260	A280	A230	A260/A280	A260/A230
10	187,773	3,755	1,749	2,014	2,15	1,86
11	222,586	4,451	2,226	3,070	2,00	1,45
12	143,124	2,862	1,362	1,747	2,10	1,64
13	114,486	2,289	1,071	1,344	2,14	1,70
14	264,697	5,293	2,483	2,756	2,13	1,92
15	176,381	3,527	1,647	1,901	2,14	1,85
16	233,078	4,661	2,185	2,429	2,13	1,92
17	348,676	6,973	3,293	3,518	2,12	1,98
27	213,725	4,274	2,064	2,576	2,07	1,66
28	138,919	2,778	1,304	1,598	2,13	1,74
29	542,725	10,854	5,293	5,216	2,05	2,08
30	196,926	3,938	1,946	2,703	2,02	1,46

Tabelle 47: LT056 DNA-Quantifizierung. Mit 31. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO C, 32. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 2, 33. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 3, 34. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO Y, 35. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 4, 36. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO H, 37. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO E, 38. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 5, 39. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR 1 , 40. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR 2, 18. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 4, 19. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO T, 20. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO I, 21. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 5, 22. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO E, 23. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 6.

Nr.	*c*(DNA), ng/µL	A260	A280	A230	A260/A280	A260/A230
31	179,107	3,582	1,675	1,908	2,14	1,88
32	96,155	1,923	0,900	1,147	2,13	1,68
33	78,735	1,574	0,742	1,040	2,12	1,51
34	148,818	2,976	1,387	1,652	2,14	1,80
35	75,464	1,509	0,699	0,959	2,16	1,57
36	94,288	1,885	0,899	1,262	2,10	1,49
37	104,514	2,090	0,992	1,348	2,11	1,55
38	120,304	2,406	1,157	1,599	2,08	1,50
39	111,085	2,221	1,045	1,339	2,12	1,66
40	104,157	2,083	0,977	1,245	2,13	1,67
18	313,012	6,260	2,956	3,530	2,12	1,77
19	128,759	2,575	1,210	1,562	2,13	1,65
20	329,732	6,594	3,074	3,395	2,14	1,94

Nr.	*c*(DNA), ng/µL	A260	A280	A230	A260/A280	A260/A230
21	195,239	3,904	1,955	2,834	2,00	1,38
22	213,138	4,262	2,343	4,274	1,82	1,00
23	134,681	2,693	1,456	2,601	1,85	1,04

Bilder der Gelelektrophorese

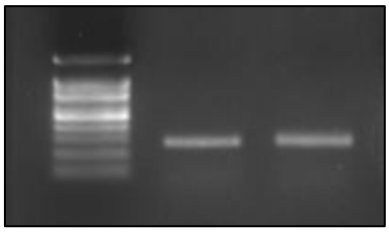


Abbildung 32: Ergebnis der Gelelektrophorese LT040. Marker, 1. SNU-475 CRISPR/Cas9 SCR Pool, 2. SNU-475 CRISPR/Cas9 KO Pool.

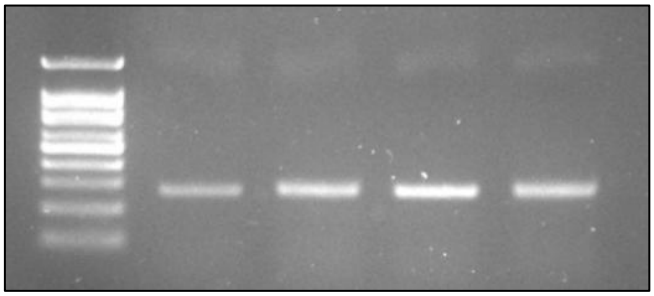


Abbildung 33: Ergebnis der Gelelektrophorese LT049. Marker, 1. SNU-475 CRISPR/Cas9 SCR E, 2. SNU-475 CRISPR/Cas9 smRC1 I, 3. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR Pool, 4. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO Pool.

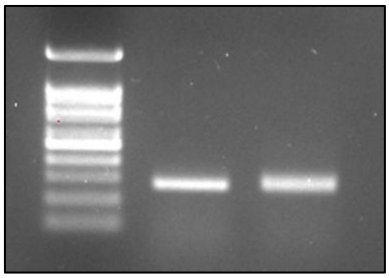


Abbildung 34: Ergebnis der Gelelektrophorese LT050. Marker, 1. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR pool, 2. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO Pool.

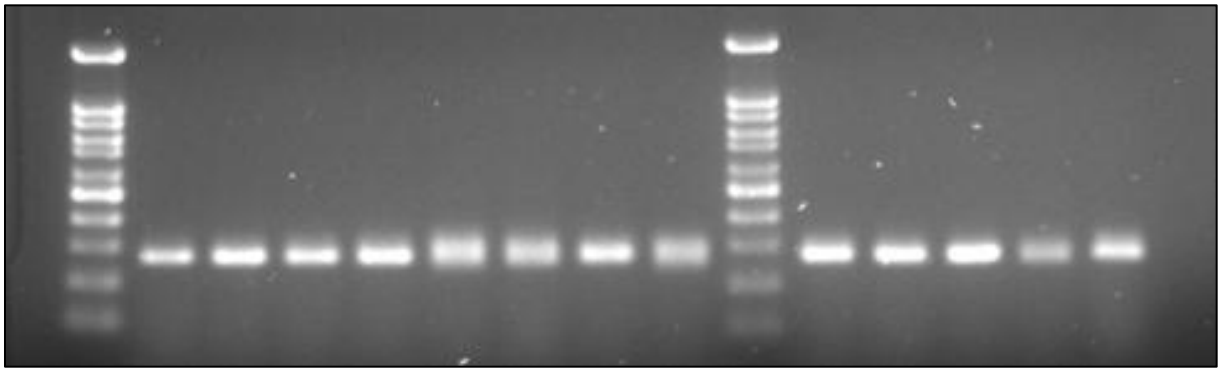


Abbildung 35: Ergebnis der Gelelektrophorese LT055. Marker, 1. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 1, 2. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 2, 3. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 3, 4. Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 4, 5. Alex/PLC CRISPR/Cas9 smRC1 LT044.1, 6. Alex/PLC CRISPR/Cas9 smRC1 LT044.2, 7. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 2, 8. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 3, Marker, 9. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR A, 10. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR L, 11. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 1, 12. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO M, 13. Alex/PLC

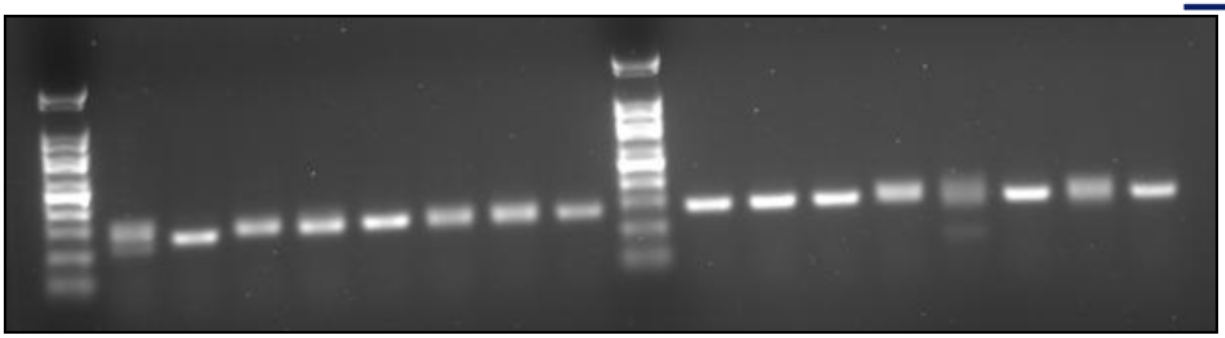


Abbildung 36: Ergebnis der Gelelektrophorese LT056. Marker, 1. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO C, 2. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 2, 3. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 3, 4. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO Y, 5. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 4, 6. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO H, 7. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO E, 8. Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 5, Marker, 9. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR 1 , 10. Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR 2, 11. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 4, 12. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO T, 13. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO I, 14. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 5, 15. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO E, 16. Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 6.

Chromatogramme der DNA-Sequenzierung

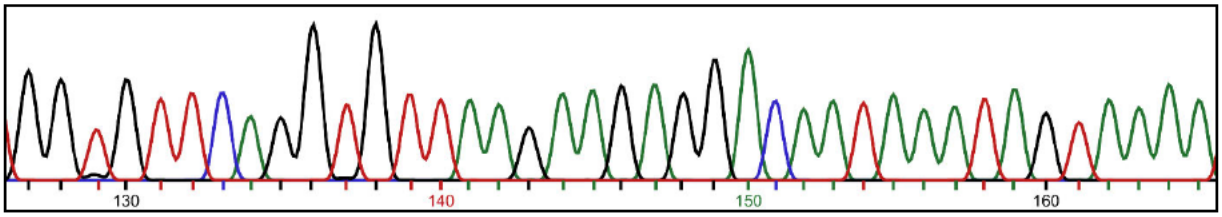


Abbildung 37: Chromatogramm der Zelllinie SNU-475 CRISPR/Cas9 SCR Pool.

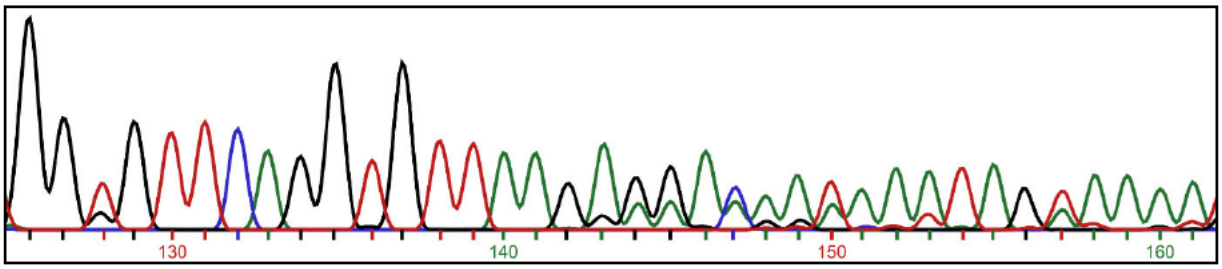


Abbildung 38: Chromatogramm der Zelllinie SNU-475 CRISPR/Cas9 KO Pool.

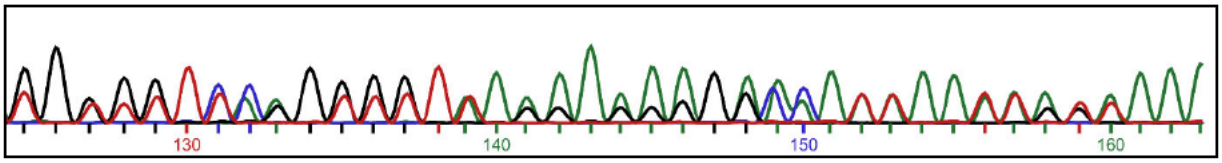


Abbildung 39: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC Line.

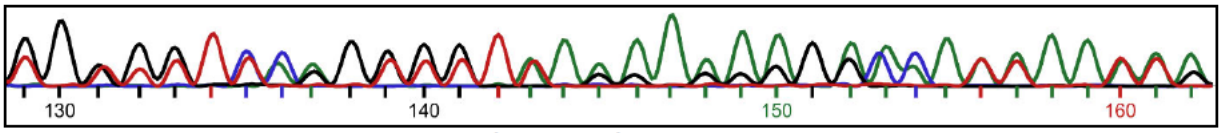


Abbildung 40: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR Pool.

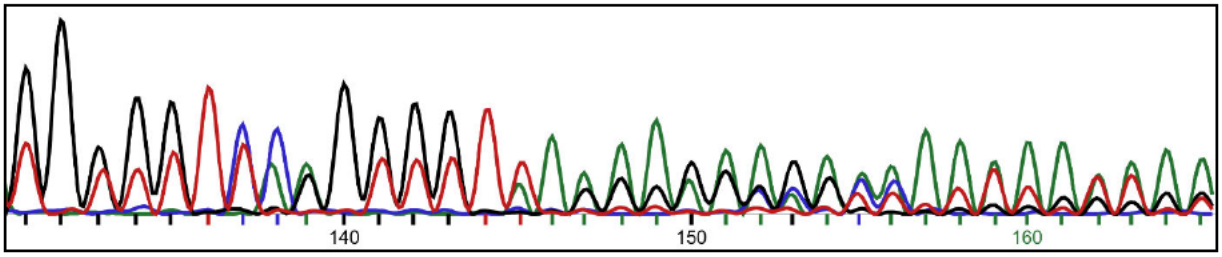


Abbildung 41: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO Pool.

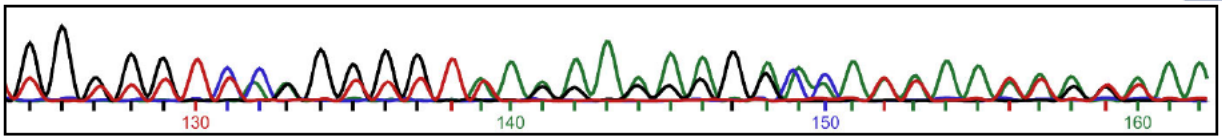


Abbildung 42: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR O.

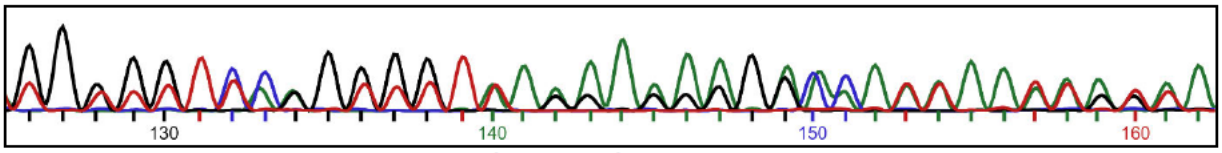


Abbildung 43: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR P.

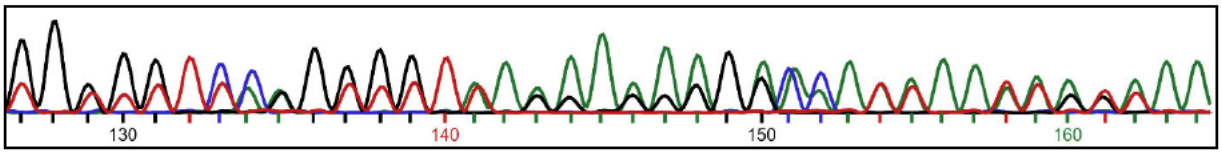


Abbildung 44: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR A.

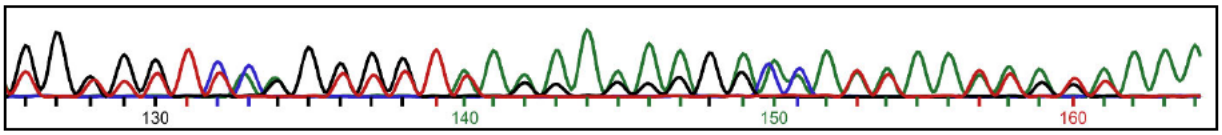


Abbildung 45: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 1.

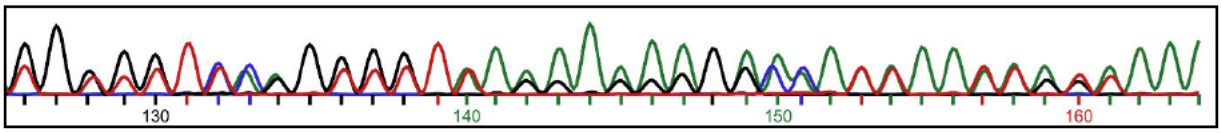


Abbildung 46: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 2.

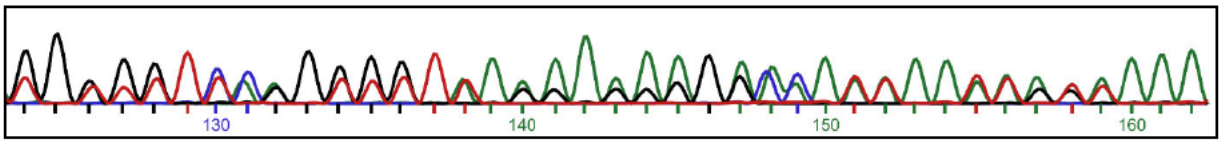


Abbildung 47: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 3.

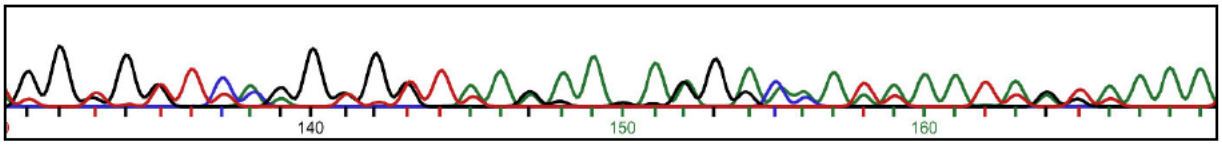


Abbildung 48: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR 4.

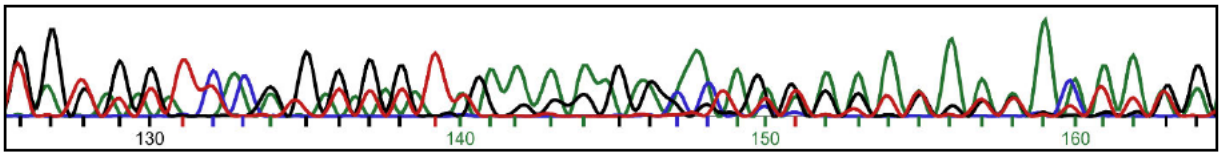


Abbildung 49: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 1.

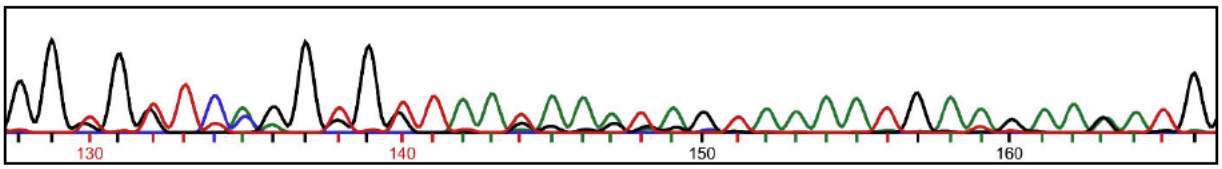


Abbildung 50: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO L.

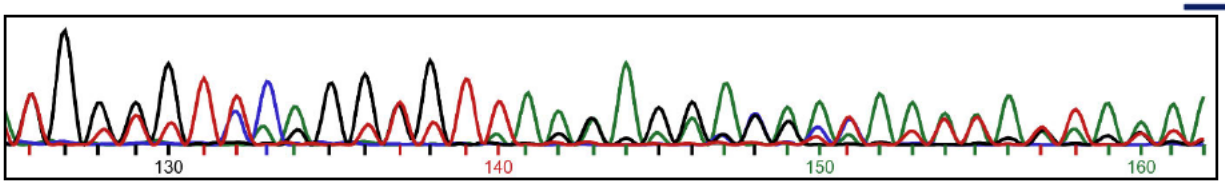


Abbildung 51: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 2.

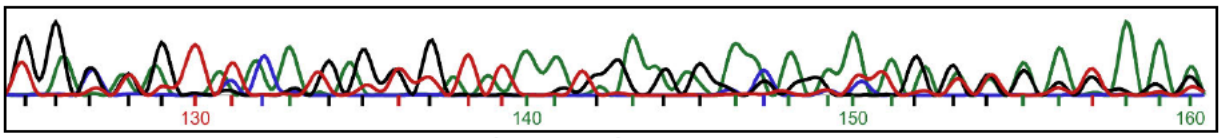


Abbildung 52: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 3.

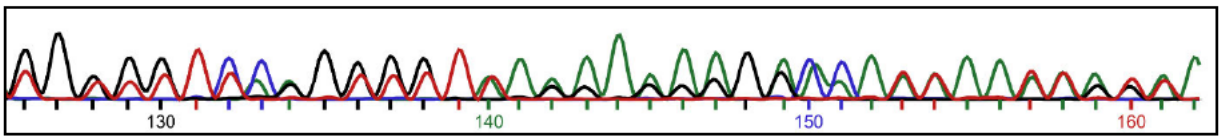


Abbildung 53: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 4.

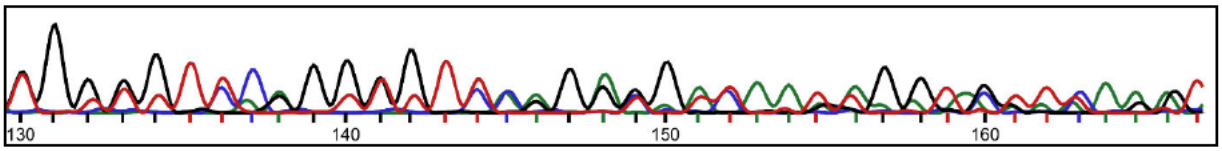


Abbildung 54: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO T.

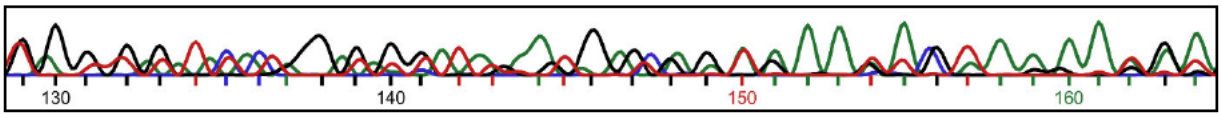


Abbildung 55: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO I.

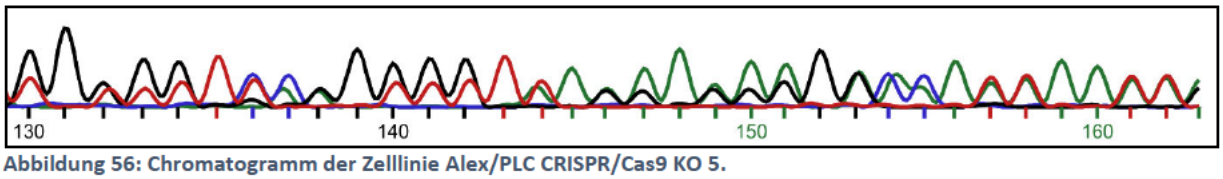


Abbildung 56: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 5.

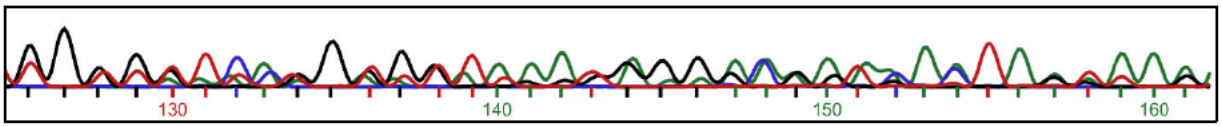


Abbildung 57: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO E.

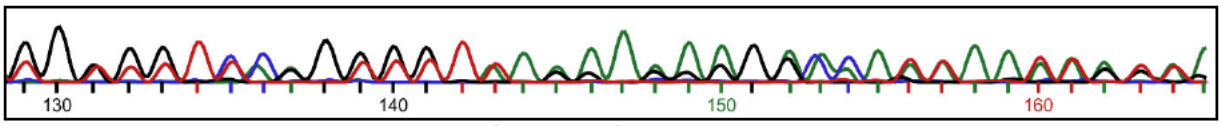


Abbildung 58: Chromatogramm der Zelllinie Alex/PLC CRISPR/Cas9 KO 6.

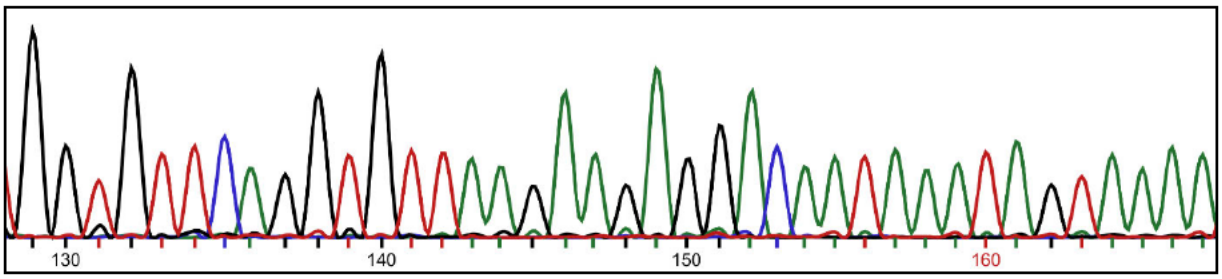


Abbildung 59: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR Pool.

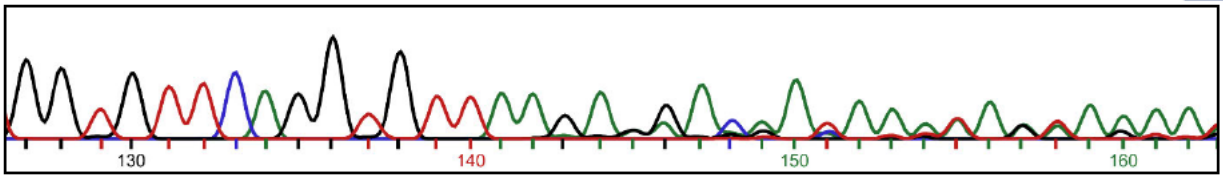


Abbildung 60: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO Pool.

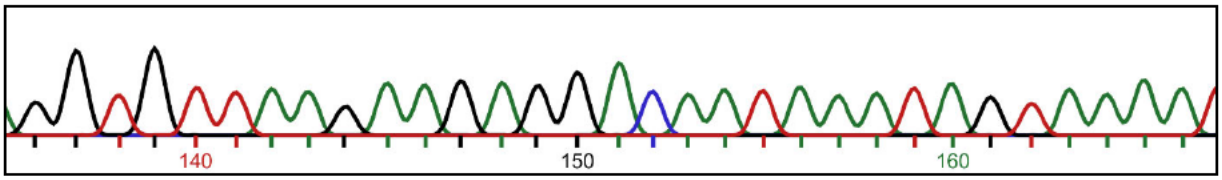


Abbildung 61: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR L.

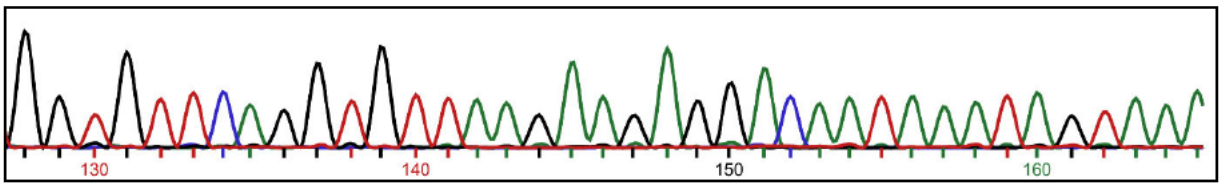


Abbildung 62: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 1.

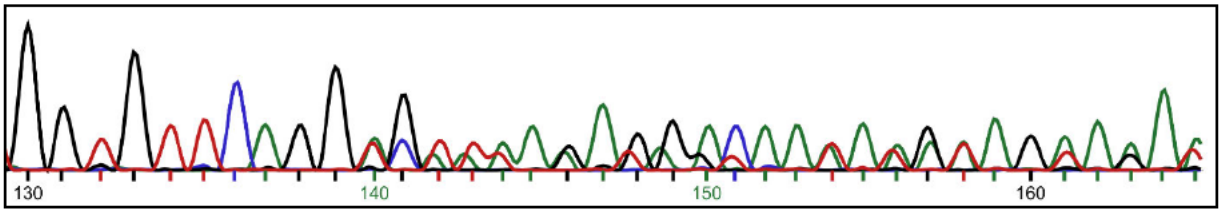


Abbildung 63: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO M.

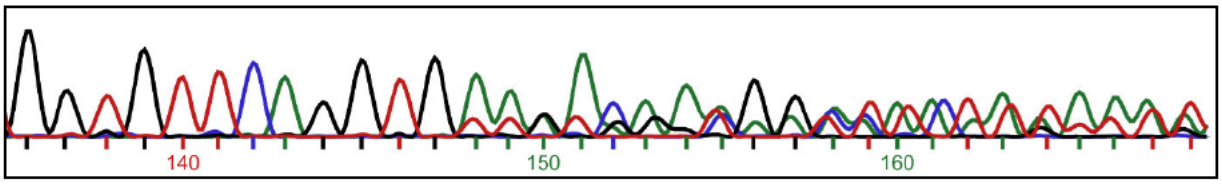


Abbildung 64: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO C.

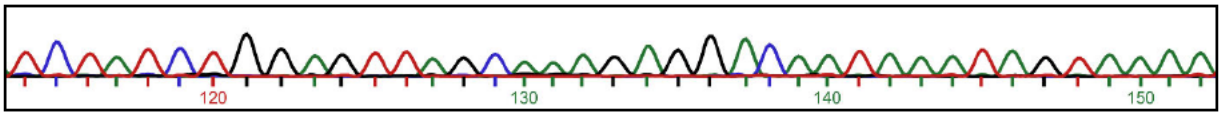


Abbildung 65: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 2.

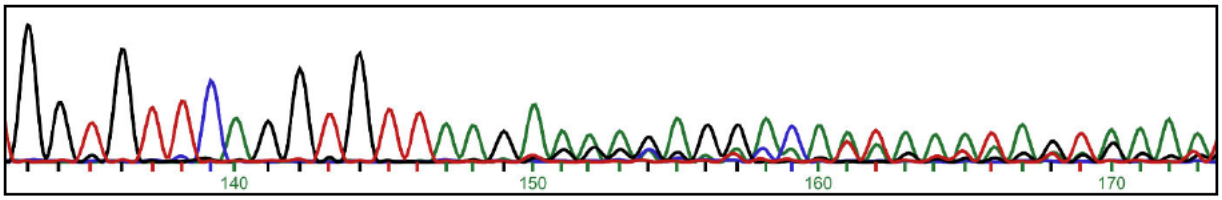


Abbildung 66: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 3.

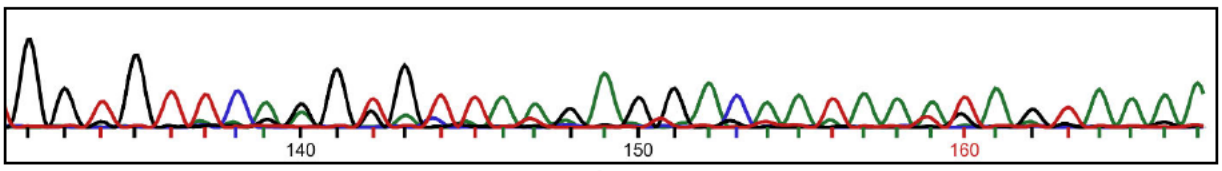


Abbildung 67: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO Y.

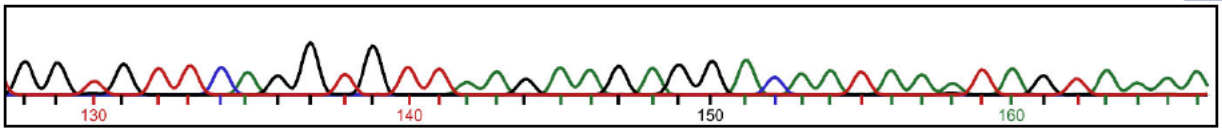


Abbildung 68: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 4.

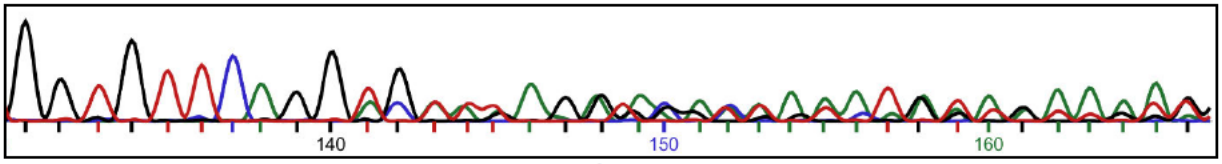


Abbildung 69: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO H.

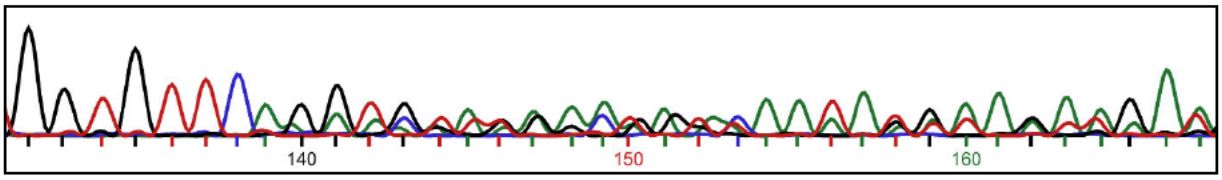


Abbildung 70: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO E.

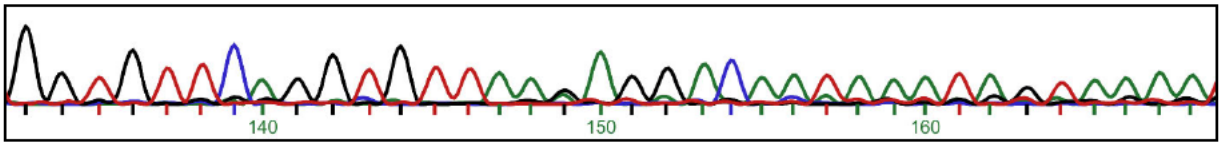


Abbildung 71: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 KO 5.

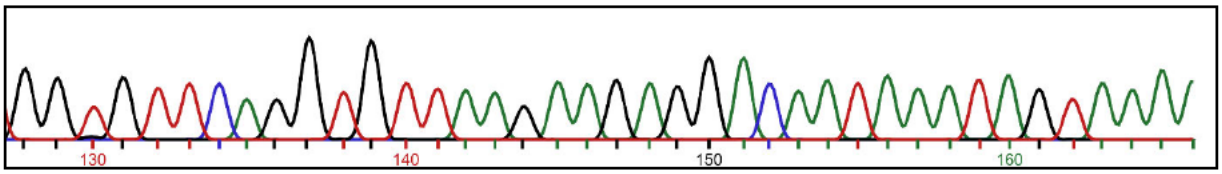


Abbildung 72: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR 1.

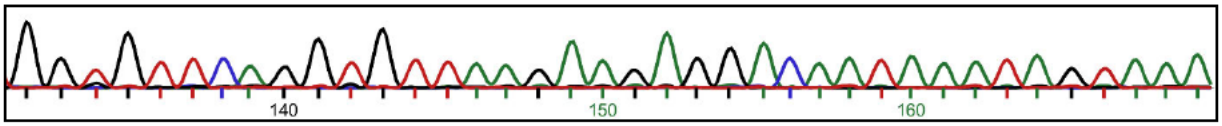


Abbildung 73: Chromatogramm der Zelllinie Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR 2.

C_T-Werte der RT-qPCRs

Tabelle 48: Ergebnisse der RT-qPCR 1/2 der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9.

Nr.	Zelllinie	$C_{T,smRC1}(1)$	$C_{T,smRC1}(2)$	$SD(C_{T,smRC1})$	$C_{T,GAPDH}(1)$	$C_{T,GAPDH}(2)$	$SD(C_{T,GAPDH})$
1	SCR O	22,951	22,950	0,001	20,731	21,094	0,256
2	SCR P	23,880	24,089	0,148	18,212	18,697	0,343
3	SCR A	24,975	25,079	0,074	20,693	20,708	0,010
4	KO L	23,474	23,568	0,067	17,979	18,783	0,568
5	KO I	22,835	23,121	0,202	20,066	19,711	0,252

Tabelle 49: Ergebnisse der RT-qPCR 1/2 der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9.

Nr.	Zelllinie	$C_{T,smRC1}(1)$	$C_{T,smRC1}(2)$	$SD(C_{T,smRC1})$	$C_{T,GAPDH}(1)$	$C_{T,GAPDH}(2)$	$SD(C_{T,GAPDH})$
6	SCR A	25,729	25,748	0,014	22,593	23,241	0,458
7	SCR L	24,680	24,714	0,024	21,730	21,772	0,030
8	KO C	23,487	23,541	0,038	20,957	20,965	0,006

Nr.	Zelllinie	$C_{T,smRC1}(1)$	$C_{T,smRC1}(2)$	$SD(C_{T,smRC1})$	$C_{T,GAPDH}(1)$	$C_{T,GAPDH}(2)$	$SD(C_{T,GAPDH})$
9	KO M	24,892	24,975	0,059	21,763	21,411	0,249
10	KO Y	23,457	23,550	0,066	18,818	22,200	2,392

Tabelle 50: Ergebnisse der RT-qPCR 2/2 der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9.

Nr.	Zelllinie	$C_{T,smRC1}(1)$	$C_{T,smRC1}(2)$	$SD(C_{T,smRC1})$	$C_{T,GAPDH}(1)$	$C_{T,GAPDH}(2)$	$SD(C_{T,GAPDH})$
1	SCR O	24,523	24,325	0,140	19,306	19,138	0,119
2	SCR P	23,962	24,108	0,103	19,453	19,503	0,035
3	SCR A	24,210	24,185	0,018	19,634	19,802	0,119
4	KO L	24,432	24,725	0,208	19,872	19,940	0,048
5	KO I	23,933	23,947	0,010	19,588	19,595	0,005
6	KO T	24,656	24,621	0,025	19,888	19,969	0,057
7	KO T	23,140	23,178	0,027	19,344	19,593	0,176
8	KO E	23,418	23,624	0,146	19,774	19,827	0,038
9	KO E	24,049	24,210	0,114		19,653	

Tabelle 51: Ergebnisse der RT-qPCR 2/2 der Zelllinien Hep3B CRISPR/Cas9.

Nr.	Zelllinie	$C_{T,smRC1}(1)$	$C_{T,smRC1}(2)$	$SD(C_{T,smRC1})$	$C_{T,GAPDH}(1)$	$C_{T,GAPDH}(2)$	$SD(C_{T,GAPDH})$
10	SCR A	24,439	24,351	0,062	19,517	19,836	0,225
11	SCR L	24,647	24,472	0,123	20,372	20,388	0,011
12	KO C	23,875	24,315	0,311	20,295	20,520	0,159
13	KO H	24,700	24,731	0,022	20,106	20,162	0,040
14	KO H	24,835	24,833	0,002	20,079	20,156	0,054
15	KO E	25,124	25,134	0,007	21,079	21,207	0,090
16	KO E	24,754	24,953	0,140	20,857	20,964	0,076
17	KO M	24,072	24,023	0,035	20,633	20,735	0,072
18	KO Y	24,347	24,458	0,078	20,054	20,072	0,013

Bilder des Kolonie-Bildungs-Assay

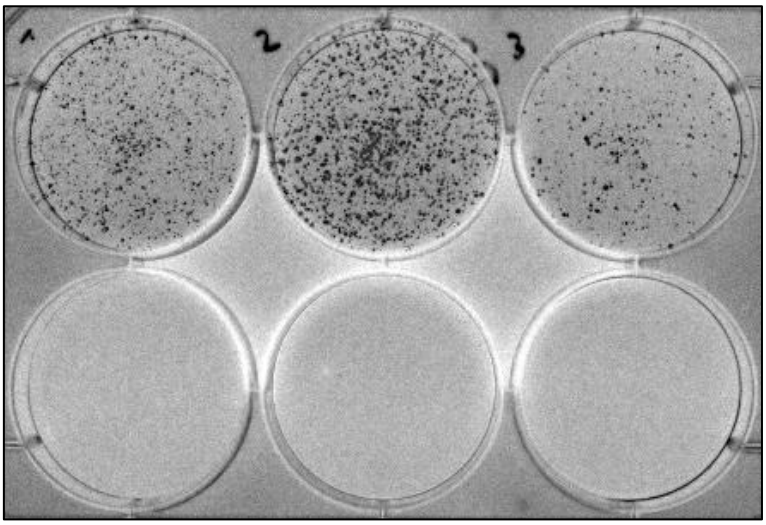


Abbildung 74: Kolonie-Bildungs-Assay der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9 SCR. 1. SCR O, 2. SCR P, 3. SCR A.

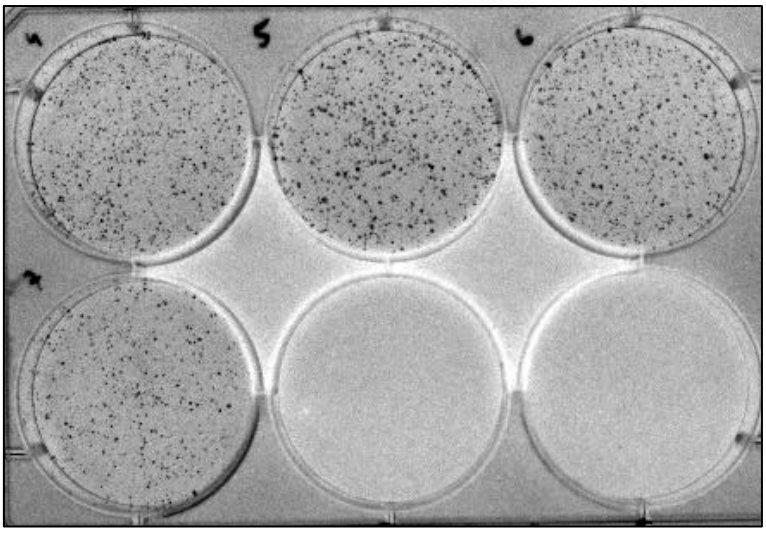


Abbildung 75: Kolonie-Bildungs-Assay der Zelllinien Alex/PLC CRISPR/Cas9 smRC1. 4. KO L, 5. KO I, 6. KO T, 7. KO E.

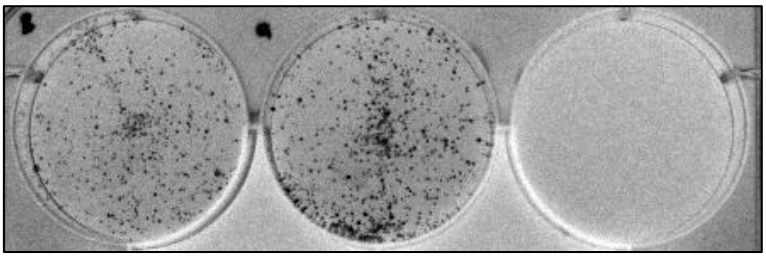


Abbildung 76: Kolonie-Bildungs-Assay der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9 SCR. 8. SCR A, 9. SCR L.

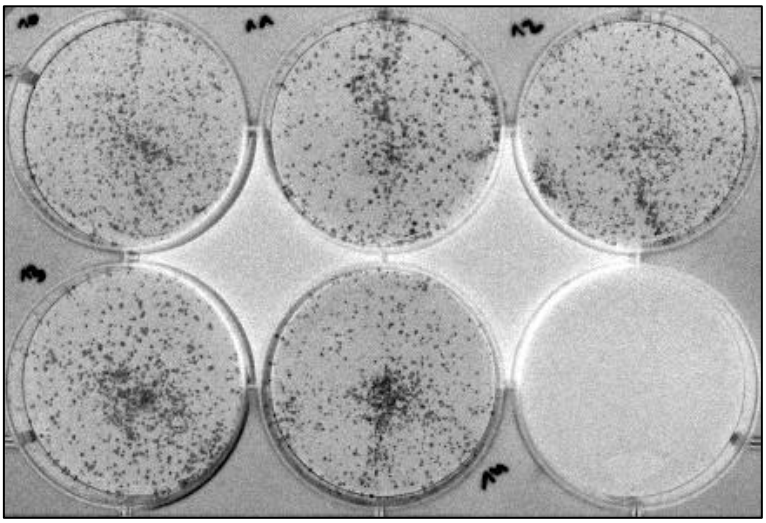


Abbildung 77: Kolonie-Bildungs-Assay der Zelllinien Hep 3B CRISPR/Cas9 smRC1. 10. KO C, 11. KO H, 12. KO E, 13. KO M, 14. KO Y.