

Aus dem Institut für Humangenetik  
(Prof. Dr. med. B. Wollnik)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Funktionelle Analysen zu Erkrankungen,  
die zu einer Dysfunktion/Fehlregulation  
ribosomaler Proteine führen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Miriam Daniela Noceti**

aus

Waiblingen

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer/in: Prof. Dr. med. S. Pauli

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. C. Kramm

### **Prüfungskommission**

Referent/in: Prof. Dr. med. S. Pauli

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. C. Kramm

Datum der mündlichen Prüfung: 19.01.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Funktionelle Analysen zu Erkrankungen, die zu einer Dysfunktion/Fehlregulation ribosomaler Proteine führen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....  
(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

|  |            |
|--|------------|
| <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>   | <b>III</b> |
| <b>Tabellenverzeichnis .....</b>   | <b>IV</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>  | <b>V</b>   |
| <b>1 Einleitung .....</b>  | <b>1</b>   |
| 1.1 Ribosomopathien .....  | 1          |
| 1.1.1 Ribosomopathien und Krebserkrankungen – die Rolle von p53.....                       | 2          |
| 1.2 Diamond-Blackfan-Anämie.....   | 4          |
| 1.2.1 Detektion der Variante <i>RPS27A</i> c.335G>A (p.G112D) bei einem DBA-Patienten..... | 5          |
| 1.3 <i>ZMAT5</i> .....   | 6          |
| 1.3.1 <i>AUTS2</i> und <i>FBRSL1</i> – zwei paraloge Polycomb-Komplex-Proteine.....        | 6          |
| 1.3.2 Detektion einer Mikrodeletion mit <i>ZMAT5</i> als betroffenes Gen.....              | 9          |
| 1.4 Zielsetzung .....  | 11         |
| <b>2 Material und Methoden .....</b>   | <b>12</b>  |
| 2.1 Material.....  | 12         |
| 2.1.1 Technisches Equipment.....   | 12         |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....  | 14         |
| 2.1.3 Chemikalien, Biochemikalien und Reagenzien .....                                     | 16         |
| 2.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme .....  | 19         |
| 2.1.5 Sterilisation .....  | 20         |
| 2.1.6 Puffer und Lösungen .....  | 20         |
| 2.1.7 Plasmide und Vektoren .....  | 23         |
| 2.1.8 Bakterienstämme .....  | 24         |
| 2.1.9 Eukaryotische Zelllinien.....  | 25         |
| 2.1.10 Genomische DNA .....  | 27         |
| 2.1.11 Hefestämme .....  | 27         |
| 2.1.12 Antikörper .....  | 28         |
| 2.1.13 Synthetische Oligonukleotide.....   | 30         |
| 2.1.14 Enzyme .....  | 33         |
| 2.1.15 Molekulargewichtstandards.....  | 33         |
| 2.1.16 Patientenprobe.....   | 34         |
| 2.1.17 Datenbank / Online-Tools / Programme .....  | 34         |
| 2.1.18 Statistische Analyse .....  | 35         |
| 2.2 Methoden.....  | 35         |
| 2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....   | 35         |
| 2.2.2 Methoden der Proteinmanipulation .....   | 48         |
| 2.2.3 Yeast two-Hybrid .....   | 51         |
| 2.2.4 Zellkulturmethoden .....   | 52         |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse.....</b>   | <b>56</b> |
| 3.1      | Führen pathogene Varianten im <i>RPS27A</i> -Gen zum Phänotyp der Diamond-Blackfan-Anämie .....  | 56        |
| 3.1.1    | Nachweis der <i>RPS27A</i> -Variante c.335G>A in Patienten-Fibroblasten.....   | 56        |
| 3.1.2    | <i>RPS27A</i> wird in verschiedenen Zelllinien auf RNA- und Proteinebene exprimiert.....   | 56        |
| 3.1.3    | <i>RPS27A</i> zeigt keine Auffälligkeiten in der zellulären Lokalisation.....  | 59        |
| 3.1.4    | Die <i>RPS27A</i> -VUS hat keinen Einfluss auf die Proteinmenge von <i>RPS27A</i> , <i>MDM2</i> und <i>p53</i> unter Actinomycin D-Behandlung.....   | 61        |
| 3.1.5    | <i>MDM2</i> co-immunpräzipitiert mit <i>RPS27A</i> -WT und <i>RPS27A</i> (p.G112D) .....   | 63        |
| 3.1.6    | <i>MDM2</i> interagiert nicht direkt mit <i>RPS27A</i> -WT und <i>RPS27A</i> (p.G112D).....  | 64        |
| 3.2      | <i>ZMAT5</i> .....   | 66        |
| 3.2.1    | Kein Nachweis einer Mutation in <i>ZMAT5</i> im zweiten Allel .....  | 66        |
| 3.2.2    | <i>ZMAT5</i> wird in verschiedenen Zelllinien auf RNA- und Protein-Ebene exprimiert...   | 66        |
| 3.2.3    | Die Mikrodeletion 22q12.1-q12.2 hat keinen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von <i>ZMAT5</i> .....  | 68        |
| 3.2.4    | Die Mikrodeletion 22q12.1-q12.2 zeigt keinen Einfluss auf <i>ZMAT5</i> und <i>p53</i> auf Proteinebene.....  | 69        |
| 3.2.5    | Einfluss der Herunterregulierung von <i>ZMAT5</i> auf die Expression von <i>FBRSL1-V1</i> und <i>FBRSL1-V2</i> in Fibroblasten.....                  | 70        |
| 3.2.6    | Effekt der Mikrodeletion 22q12.1-q12.2 auf das Expressionslevel verschiedener <i>Ribosomal Protein</i> -Gene in Blutzellen und in Fibroblasten ..... | 75        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>   | <b>79</b> |
| 4.1      | Zusammenfassung der Ergebnisse .....   | 79        |
| 4.2      | <i>RPS27A</i> .....  | 80        |
| 4.2.1    | Variante c.335G>A (p.G112D) im <i>RPS27A</i> -Gen als neue pathogene DBA-Variante?<br>80   |           |
| 4.2.2    | Einfluss der Variante <i>RPS27A</i> (p.G112D) auf die zelluläre Lokalisation und Protein-Expression .....  | 80        |
| 4.2.3    | Einfluss der Variante <i>RPS27A</i> (p.G112D) auf den RP- <i>MDM2</i> - <i>p53</i> -Signalweg.....   | 82        |
| 4.2.4    | Ausblick.....  | 84        |
| 4.3      | <i>ZMAT5</i> .....   | 85        |
| 4.3.1    | <i>ZMAT5</i> – Regulator des Polycomb-Komplex-Proteins <i>FBRSL1</i> ?.....  | 85        |
| 4.3.2    | <i>ZMAT5</i> und <i>FBRSL1</i> – Krankheitsbild einer neuen Ribosomopathie? .....  | 88        |
| 4.3.3    | Auswirkung von <i>ZMAT5</i> und <i>FBRSL1</i> auf den <i>p53</i> -/Apoptose-Signalweg.....   | 89        |
| 4.3.4    | Ausblick.....  | 91        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung.....</b>  | <b>92</b> |
| <b>6</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>93</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Ribosomale Biosynthese.....  | 2  |
| Abbildung 2: RP-MDM2-p53-Signalweg.....   | 3  |
| Abbildung 3: Zusammenhang zwischen Ribosomopathien und Tumoren. ....  | 4  |
| Abbildung 4: Modell von Ub-RPS27A. ....   | 6  |
| Abbildung 5: AUTS2 und FBRSL1 im Polycomb-Komplex. ....   | 7  |
| Abbildung 6: Modelle der FBRSL1-Isoformen V1 und V2. ....   | 9  |
| Abbildung 7: Parallelen zwischen AUTS2/ZMAT3 und FBRSL1/ZMAT5. ....   | 10 |
| Abbildung 8: VUS <i>RPS27A</i> c.335G>A (p.G112D) in Patienten-Fibroblasten nachgewiesen. ....  | 56 |
| Abbildung 9: Expressionsanalyse von <i>RPS27A</i> in verschiedenen Zelllinien. ....   | 57 |
| Abbildung 10: Nachweis von <i>RPS27A</i> in verschiedenen Zelllinien auf Proteinebene. ....   | 58 |
| Abbildung 11: Nachweis von <i>RPS27A</i> in WT- und Patienten-Fibroblasten auf Proteinebene. ....   | 59 |
| Abbildung 12: Zelluläre Lokalisation von <i>RPS27A</i> -cmyc und <i>RPS27A</i> in transfizierten<br>Fibroblasten. ....                            | 60 |
| Abbildung 13: Zelluläre Lokalisation von <i>RPS27A</i> in WT- und Patienten-Fibroblasten.....   | 60 |
| Abbildung 14: Zelluläre Lokalisation von B23 und endogenem <i>RPS27A</i> in WT- und Patienten-<br>Fibroblasten. ....                              | 61 |
| Abbildung 15: Nachweis von <i>RPS27A</i> , p53 und MDM2 auf Proteinebene unter der<br>Behandlung von Actinomycin D.....                           | 62 |
| Abbildung 16: Transfektion von <i>RPS27A</i> -WT-MDM2 und <i>RPS27A</i> -p.G112D-MDM2<br>Plasmiden in HEK293-Zellen. ....                         | 63 |
| Abbildung 17: Co-Immunpräzipitation von MDM2 und <i>RPS27A</i> -WT- und <i>RPS27A</i><br>(p.G112D)-Varianten in HEK293-Zellen. ....               | 64 |
| Abbildung 18: Yeast two-Hybrid Versuch. ....  | 65 |
| Abbildung 19: Expressionsanalyse von <i>ZMAT5</i> in verschiedenen Zelllinien.....  | 67 |
| Abbildung 20: Nachweis von <i>ZMAT5</i> in verschiedenen Zelllinien auf Proteinebene. ....  | 68 |
| Abbildung 21: Zelluläre Lokalisation von <i>ZMAT5</i> in Fibroblasten. ....   | 69 |
| Abbildung 22: Nachweis von <i>ZMAT5</i> und p53 in WT- und Patienten-Fibroblasten auf<br>Proteinebene. ....                                       | 70 |
| Abbildung 23: Expressionsanalyse von <i>ZMAT5</i> in WT- und Patienten-Fibroblasten vor und<br>nach Transfektion mit <i>scramble</i> -siRNA. .... | 71 |
| Abbildung 24: Expressionsanalyse von <i>ZMAT5</i> in WT- und Patienten-Fibroblasten nach<br>Knockdown von <i>ZMAT5</i> mit siRNA.....             | 72 |
| Abbildung 25: Expressionsanalyse von <i>FBRSL1-V1</i> in WT- und Patienten-Fibroblasten nach<br>Knockdown von <i>ZMAT5</i> mit siRNA.....         | 73 |
| Abbildung 26: Expressionsanalyse von <i>FBRSL1-V2</i> in WT- und Patienten-Fibroblasten nach<br>Knockdown von <i>ZMAT5</i> mit siRNA.....         | 74 |
| Abbildung 27: Expressionsanalyse von <i>RPL36A</i> und <i>RPS7</i> in Fibroblasten.....   | 76 |
| Abbildung 28: Expressionsanalyse von <i>RPL5</i> und <i>RPL11</i> in Fibroblasten. ....   | 77 |
| Abbildung 29: Expressionsanalyse von <i>RPL18A</i> , <i>RPL38</i> und <i>RPS28</i> in Fibroblasten.....   | 78 |
| Abbildung 30: <i>RPS27A</i> -MDM2-p53 Feedback-Loop.....  | 82 |
| Abbildung 31: <i>RPS27A</i> -MDM2-Interaktionskomplex.....  | 83 |
| Abbildung 32: Auswirkungen einer Dysregulation von <i>ZMAT3</i> auf p53 und <i>AUTS2</i> . ....   | 86 |
| Abbildung 33: Einfluss von <i>ZMAT5</i> und <i>BMI1</i> auf p53 und den Zellzyklus-Arrest.....  | 90 |

## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Technisches Equipment.....   | 12 |
| Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....   | 14 |
| Tabelle 3: Chemikalien, Biochemikalien, Reagenzien.....   | 16 |
| Tabelle 4: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....   | 19 |
| Tabelle 5: Puffer und Lösungen.....   | 20 |
| Tabelle 6: Plasmide und Vektoren.....   | 23 |
| Tabelle 7: Bakterienstämme.....   | 24 |
| Tabelle 8: Puffer und Lösungen.....   | 24 |
| Tabelle 9: Eukaryotische Zelllinien.....  | 25 |
| Tabelle 10: Medium für eukaryotische Zelllinien.....  | 26 |
| Tabelle 11: Einfriermedium.....   | 26 |
| Tabelle 12: Genomische DNA.....   | 27 |
| Tabelle 13: Hefestämme.....   | 27 |
| Tabelle 14: Medien und Agarplatten für Hefekulturen.....  | 27 |
| Tabelle 15: Primäre Antikörper.....   | 28 |
| Tabelle 16: Sekundäre Antikörper.....   | 29 |
| Tabelle 17: Primer für Kontroll-PCR und cDNA-Synthese.....  | 30 |
| Tabelle 18: Primer für Sequenzanalysen.....   | 30 |
| Tabelle 19: Primer für PCR.....   | 31 |
| Tabelle 20: Primer für qPCR.....  | 31 |
| Tabelle 21: Oligonukleotide für siRNA.....  | 33 |
| Tabelle 22: Restriktionsenzyme und Puffer.....  | 33 |
| Tabelle 23: Molekulargewichtstandards.....  | 33 |
| Tabelle 24: Datenbanken, Online-Tools, Programme.....   | 34 |
| Tabelle 25: Pipettierschema für Standard PCR.....   | 38 |
| Tabelle 26: Thermocycler-Programm für Standard PCR.....   | 38 |
| Tabelle 27: Thermocycler-Programm für Touchdown PCR zur Amplifizierung von cDNA<br>Gö651 für Sequenzanalyse.....                                | 39 |
| Tabelle 28: Thermocycler-Programm für Touchdown PCR zur Amplifizierung von gDNA<br>51836 zur Sequenzanalyse.....                                | 40 |
| Tabelle 29: Thermocycler-Programm für Touchdown PCR zur Herstellung der Inserts in<br>Vorbereitung einer Transformation kompetenter Zellen..... | 40 |
| Tabelle 30: Pipettierschema für reverse Transkription.....  | 41 |
| Tabelle 31: Pipettierschema für Kontroll-PCR nach cDNA Synthese.....  | 42 |
| Tabelle 32: Thermocycler-Programm für Kontroll-PCR nach cDNA Synthese.....  | 42 |
| Tabelle 33: Thermocycler-Programm für qRT-PCR.....  | 43 |
| Tabelle 34: Pipettierschema für Sequenzanalyse.....   | 44 |
| Tabelle 35: Thermocycler-Programm für Sequenzanalysen.....  | 45 |
| Tabelle 36: Reaktionsansatz für Restriktionsverdau von DNA-Plasmiden.....   | 46 |
| Tabelle 37: Zellkonzentrationen für Transfektion.....   | 53 |
| Tabelle 38: Reaktionsmischung zur Transfektion mit jetPRIME®, jetOPTIMUS®.....  | 53 |

## Abkürzungsverzeichnis

### A

|       |  |
|-------|--|
| AS    | Aminosäuren                              |
| ATP   | Adenosintriphosphat                      |
| AUTS2 | <i>autism susceptibility candidate 2</i> |

### B

|             |   |
|-------------|---|
| BamHI       | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>                                       |
| Bmi1        | <i>B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1</i> |
| bp          | Basenpaare  |
| $\beta$ -ME | $\beta$ -Mercaptoethanol  |
| BSA         | Bovines Serumalbumin  |

### C

|                |   |
|----------------|---|
| cPRC           | canonical-PRC   |
| cDNA           | <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) |
| CK2            | Casein-Kinase 2   |
| c-Myc-tag      | <i>cellular myelocytomatosis marker</i> (zellulärer Myelozytomatosemarker)        |
| Co-IP          | Co-Immunoprecipitation  |
| C <sub>t</sub> | <i>threshold cycle</i> (Schwellenzyklus)  |
| C-terminus     | Carboxy-Terminus  |

### D

|        |  |
|--------|--|
| DAPI   | 4',6-diamidino-2-phenylindol                                       |
| DCAF7  | <i>DDB1 And CUL4 Associated Factor 2</i>                           |
| ddNTPs | Didesoxynukleotide   |
| del    | Deletion   |
| DMEM   | Dulbecco's Modified Eagle Medium                                   |
| DMSO   | Dimethylsulfoxid   |
| DNA    | <i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)              |
| dNTPs  | <i>deoxynucleotide triphosphates</i> (Desoxynucleotidtriphosphate) |
| DPBS   | Dulbecco's phosphate-buffered saline                               |



**D**

DPY30 dpy-30 Histonmethyltransferasekomplex regulatorische Untereinheit

DTT 1,4-Dithiothreitol

**E**

*E. coli* *Escherichia coli*

EDTA Ethylendiamintetraacetat

EP300 E1A-bindendes Protein 300

**F**

FBS Fetal bovines Serum

FBRSL1 *fibrosin like 1*

Ftsk *filament temperature sensitive mutant K*

**G**

GATA1 *GATA binding factor 1*

**H**

HA-tag Hämagglutinin Epitopmarker

HeLa menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms

HEK *human embryonic kidney* (humane embryonale Nierenzellen)

**I**

IF Immunfluoreszenz

IgG Immunglobulin G

**J****K**

K562 humane immortalisierte myeloische Leukämiezellen

**L**

LB *lysogeny broth* (Luria-Bertani Medium)

IF Immunofluoreszenz

-LT ohne Leucin und Tryptophan

-LTHA ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin

MDM2 *murine double minute 2*

**M**

|      |   |
|------|---|
| me   | Methylierung                                  |
| mRNA | <i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-RNS) |

**N**

|            |  |
|------------|--|
| NdeI       | <i>Neisseria dentrificans</i>                                    |
| NEAA       | <i>non-essential amino acids</i> (nicht-essentielle Aminosäuren) |
| NK         | Negativkontrolle   |
| ncPRC      | noncanonical-PRC   |
| N-Terminus | Amino-Terminus   |
| NTC        | <i>negative template control</i> (Negativkontrolle)              |

**O****P**

|      |   |
|------|---|
| p21  | Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1  |
| PBS  | <i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)                   |
| PBGD | Porphobilinogen-Desaminase  |
| PBST | <i>phosphate-buffered saline Triton</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Triton) |
| PCGF | <i>polycomb group RING finger</i>   |
| pCMV | Plasmid Cytomegalievirus  |
| PCR  | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)                         |
| PK   | Positivkontrolle  |
| PPI  | Peptidylprolyl Isomerase  |
| PRC  | <i>polycomb repressive complex</i>  |
| P/S  | Penicillin/Streptomycin   |
| PUMA | <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>                                       |

**Q****R**

|     |  |
|-----|--|
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)   |
| RP  | Ribosomales Protein  |
| RPL | <i>ribosomal protein large subunit</i> (Ribosomales Protein der großen Untereinheit) |

**R**

|      |   |
|------|---|
| RPS  | <i>ribosomal protein small subunit</i> (Ribosomales Protein der kleinen Untereinheit) |
| RT   | Raumtemperatur  |
| RYBP | <i>RING1 and YY1 Binding Protein</i>  |

**S**

|        |   |
|--------|---|
| scram  | <i>scramble-siRNA</i>                                       |
| SDHA   | Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Untereinheit A |
| SDS    | <i>sodium-dodecyl-sulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)         |
| SD     | Schwachman-Diamond-Syndrom                                  |
| si1    | siRNA 1   |
| si2    | siRNA 2   |
| siRNA  | <i>short interfering-RNA</i>                                |
| S.O.C. | <i>super optimal broth with</i> (Nährmedium)                |

**T**

|                |  |
|----------------|--|
| taq            | <i>Thermus aquaticus</i>   |
| TBE            | Tris-Borat EDTA  |
| TBP            | <i>TATA box binding</i> -Protein   |
| TBST           | <i>tris-buffered saline tween</i> (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween) |
| TCS            | Treacher-Collins-Syndrom   |
| TE             | Tris-EDTA  |
| TF             | Transkriptionsfaktor   |
| T <sub>m</sub> | <i>melting temperature</i> (Schmelztemperatur)                           |
| Tris           | 2-Amino-2-Hydroxymethyl-Propan-1,3-diol                                  |

**U**

|     |  |
|-----|--|
| ÜN  | Über Nacht   |
| UTX | <i>ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome</i> |
| UV  | Ultraviolett   |

**V**

|   |      |
|---|------|
| V | Volt |
|---|------|

**V**

|     |                              |
|-----|------------------------------|
| V1  | Variante 1                   |
| VUS | Varianz unklarer Signifikanz |

**W**

|    |         |
|----|---------|
| WT | Wildtyp |
|----|---------|

**X****Y**

|      |                                |
|------|--------------------------------|
| Y2H  | Yeast two-Hybrid               |
| YAF2 | <i>YY1 associated Factor 2</i> |

**Z**

|       |                                  |
|-------|----------------------------------|
| ZMAT3 | <i>zinc finger matrin-type 3</i> |
| ZMAT5 | <i>zinc finger matrin-type 5</i> |

**Sonderzeichen**

|          |                         |
|----------|-------------------------|
| $\Delta$ | Delta                   |
| $\sim$   | ungefähr                |
| $\infty$ | unendlich               |
| %        | Prozent                 |
| ®        | registrierte Marke      |
| ™        | Trade Mark              |
| >        | größer als              |
| $\geq$   | größer als oder gleich  |
| <        | kleiner als             |
| $\leq$   | kleiner als oder gleich |

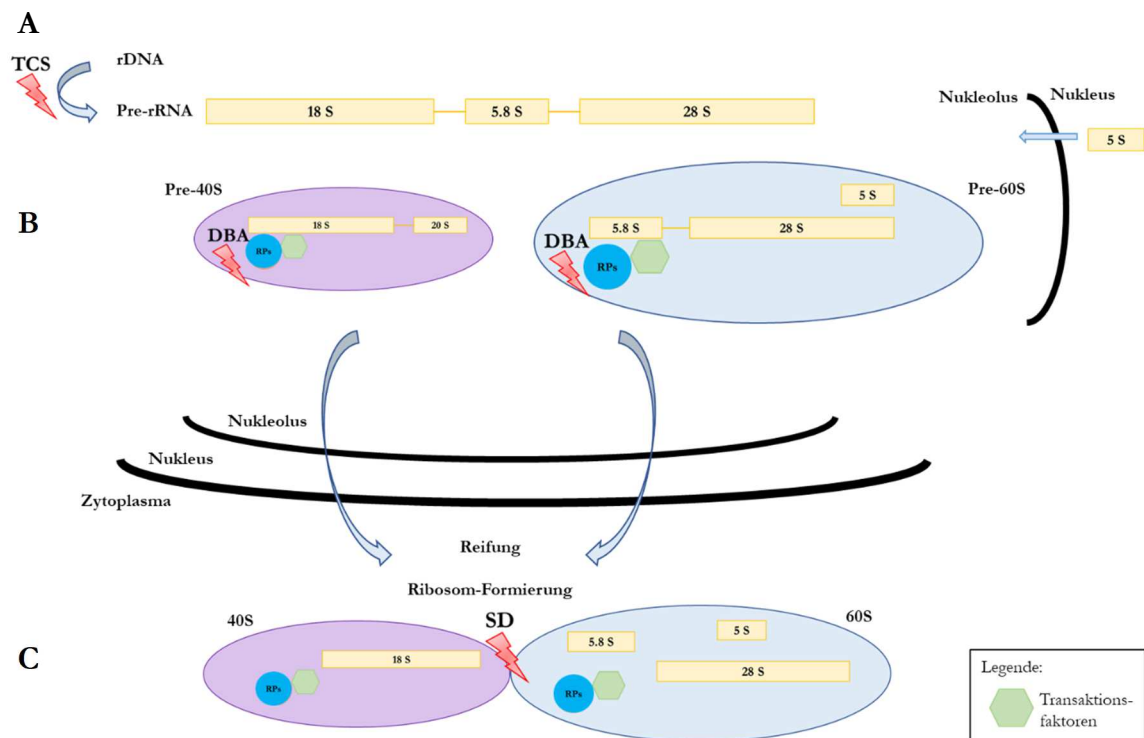
# 1 Einleitung

## 1.1 Ribosomopathien

Ribosomen sind Zellorganellen, die der Proteinsynthese dienen (Xu et al. 2016). In eukaryotischen Zellen bilden eine kleine 40S Untereinheit mit dekodierender Funktion und eine große 60S Untereinheit, welche die Bildung von Peptidverbindungen katalysiert, zusammen ein 80S Ribosom (Orgebin et al. 2020; Sulima et al. 2019; Xu et al. 2016). Ribosomen bestehen aus ribosomaler RNA (rRNA), *small nucleolar RNA* (snoRNA) und ribosomalen Proteinen (RPs) (Nakhoul et al. 2014). Während die rRNA die Verbindung der Aminosäuren (AS) bei der Proteinsynthese katalysiert (Nakhoul et al. 2014; Sloan et al. 2017), regulieren snoRNAs die chemische Modifikation anderer RNAs (Danilova und Gazda 2015; Nakhoul et al. 2014). Die RPs dienen der Optimierung der rRNA-Prozessierung und der Stabilisierung des Ribosoms (Sloan et al. 2017; Nakhoul et al. 2014). Man unterscheidet dabei die 33 ribosomalen Proteine der kleinen Untereinheit (RPS) (Penzo et al. 2019) und die 47 ribosomalen Proteine der großen Untereinheit (RPL) (Penzo et al. 2019; Yelick und Trainor 2015).

Ribosomopathien sind Erkrankungen, welche Änderungen am Ribosom oder verschiedene Komponenten, die der Stabilisierung oder Funktion der Ribosomen dienen, betreffen (Nakhoul et al. 2014; Uechi und Kenmochi 2019; Yelick und Trainor 2015). Ursächlich sind Mutationen in Genen, die für Komponenten der normalen ribosomalen Biogenese kodieren und zu seltenen kongenitalen Syndromen führen (Narla und Ebert 2010). Während der ribosomalen Biosynthese werden aus rDNA die pre-rRNAs 18S, 5.8S und 28S von der RNA-Polymerase I im Nukleolus synthetisiert, gespalten und modifiziert (Abbildung 1) (Fatica und Tollervey 2002; Henras et al. 2015). Die 5S pre-rRNA wird hingegen im Nukleus von der RNA-Polymerase III gebildet und anschließend in den Nukleolus transportiert. Die pre-40S Untereinheit enthält 18S- und 20S-rRNA, die pre-60S-Untereinheit enthält 5.8S-, 28S- und 5S-rRNA (Henras et al. 2015). Mithilfe der RPs und den über 200 weiteren Faktoren werden die Untereinheiten aus dem Nukleolus in das Zytoplasma transportiert, wo es zur finalen Ausreifung zu den 40S- und 60S-Untereinheiten und der Formierung des Ribosoms kommt (Narla und Ebert 2010; Henras et al. 2015; Sulima et al. 2019). Störungen in verschiedenen Schritten der ribosomalen Biosynthese führen zu einer großen Variation klinischer Erscheinungsbilder der Ribosomopathien (Danilova und Gazda 2015; Orgebin et al. 2020). Häufiger auftretende Erkrankungsbilder unter den Ribosomopathien sind das Treacher-Collins-Syndrom (TCS), die Diamond-Blackfan-Anämie (DBA) und das Schwachman-Diamond-Syndrom (SD) (Narla und Ebert 2010; Sulima et al. 2019; Yelick und Trainor 2015). Im Falle des TCS ist die Transkription von rDNA in 47S pre-rRNA gestört. Dahingegen sind bei der DBA vornehmlich Mutationen in RPs ursächlich für die Krankheitsentstehung, wohingegen

das SD vor allem durch Fehlfunktionen in der Bindung der 40S und 60S Untereinheit gekennzeichnet ist. Dies führt zu einer verminderten Bildung funktionsfähiger 80S Ribosomen (Orgebin et al. 2020).

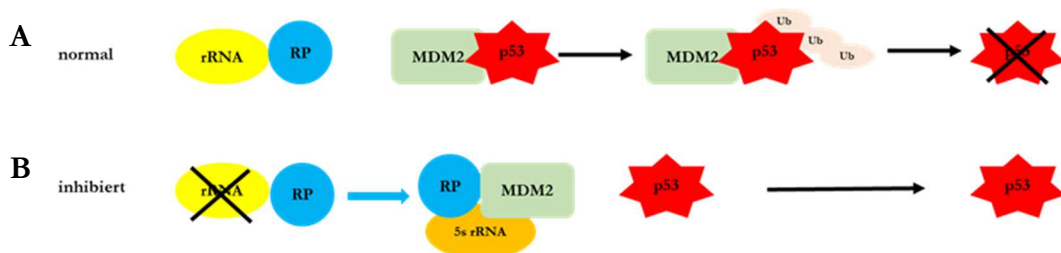


**Abbildung 1: Ribosomale Biosynthese.** **A** Die pre-rRNAs 18S, 5.8S und 28S werden im Nukleolus von der RNA-Polymerase I aus rDNA gebildet. Im Falle des Treacher-Collins-Syndrom (TCS) ist dieser Schritt der ribosomalen Biosynthese gestört. Die 5S-pre-rRNA wird hingegen von der RNA-Polymerase III im Nukleus synthetisiert und dann in den Nukleolus transportiert. **B** Die pre-40S-Untereinheit enthält 18S- und 20S-rRNA, wohingegen die pre-60S-Untereinheit 5.8S-, 28S- und 5S-rRNA enthält. Mithilfe von RPs und über 200 weiteren Transaktionsfaktoren reifen die ribosomalen Untereinheiten aus und werden aus dem Nukleolus transportiert. Dysfunktionale ribosomale Proteine (RPs) können zu dem Krankheitsbild der Diamond-Blackfan-Anämie (DBA) führen. **C** Im Zytoplasma reifen die Untereinheiten zu der 40S und 60S Untereinheit aus und formieren sich zu einem 80S Ribosom. Das Schwachman-Diamond-Syndrom (SD) ist durch das Ausbleiben der Bindung der 40S und 60S Untereinheit gekennzeichnet, was zu einer verminderten Bildung von 80S Ribosomen führt. (Danilova und Gazda 2015; Orgebin et al. 2020)

### 1.1.1 Ribosomopathien und Krebserkrankungen – die Rolle von p53

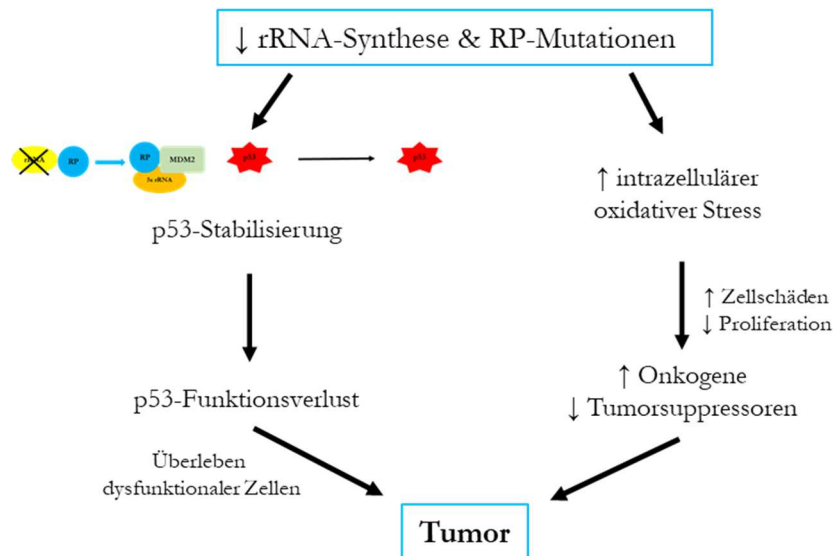
Im Zusammenhang mit Ribosomopathien treten gehäuft Tumorerkrankungen auf (Sulima et al. 2019). Eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielt der Tumorsuppressor p53 und der RP-MDM2-p53-Signalweg (Abbildung 2) (Danilova und Gazda 2015; Deisenroth et al. 2016). *Murine double minute 2* (MDM2), eine E3-Ubiquitin-Ligase, interagiert im normalen Zellzustand mit p53 (García-Cano et al. 2020; Nag et al. 2013; Zhang et al. 2003). Einerseits induziert p53 die Expression von MDM2 und andererseits führt eine Interaktion zwischen MDM2 und p53 zur Ubiquitinierung von p53 und folglich zu dessen Abbau (Deisenroth et

al. 2016; Nag et al. 2013; Zhu et al. 2009). Ein geringer Anteil von MDM2 wird durch RPs inhibiert, die nicht zur ribosomalen Biogenese benötigt werden (Penzo et al. 2019). Durch Stress ausgelöste Störungen in der rRNA-Synthese können die ribosomale Biogenese unterbrechen, was zu einer Akkumulation von RPs führt, die daraufhin MDM2 binden und p53 stabilisieren können (Deisenroth et al. 2016; Zhang und Lu 2009). Actinomycin D (Act D) wirkt als ein solcher Stressor, indem es die rRNA-Synthese hemmt (Perry 1963). Daraufhin interagieren RPs wie RPL11 (Zhang et al. 2003), RPL5 (Marechal et al. 1994) und RPL23 (Dai et al. 2004) mit MDM2 und bilden zusammen mit 5s rRNA einen Komplex (Penzo et al. 2019). Dies führt zu einem Stopp des MDM2-vermittelten Abbaus von p53 und somit zu einer Akkumulation von p53 in den betroffenen Zellen (Deisenroth et al. 2016; Moll und Petrenko 2003).



**Abbildung 2: RP-MDM2-p53-Signalweg.** **A** Im Normalzustand der Zelle werden ribosomale Proteine zur rRNA-Synthese verwendet. Die Interaktion von MDM2 und p53 führt zur Ubiquitinierung von p53 und letztlich zu dessen Abbau. **B** Ist die rRNA-Synthese inhibiert kommt es zu einer Akkumulation von RPs. RPs, die mit MDM2 interagieren, bilden zusammen mit 5s rRNA einen Komplex. Die Interaktion von MDM2 und p53 wird so unterbunden und die fehlende Ubiquitinierung von p53 führt zu einer Akkumulation von p53. (nach Penzo et al. 2019)

Diese konsequente p53-Stabilisierung führt durch den aktivierten RP-MDM2-p53 Signalweg zunächst zu einem hypoproliferativen Phänotyp (Aspesi et al. 2014; García-Cano et al. 2020). Dieser Zustand führt zu Zellstress und begünstigt die Entstehung somatischer Mutationen in p53, die zu dessen Funktionsverlust führen können (Deisenroth et al. 2016; Penzo et al. 2019). Zusätzlich kommt es durch Dysfunktionen der Ribosomen zu einem intrazellulären Anstieg von oxidativem Stress, welcher Zellschäden verursacht und Zellproliferation verhindert (Kampen et al. 2020; Penzo et al. 2019; Sulima et al. 2019). Dies hat eine veränderte Produktion von Onkogenen und Tumorsuppressoren zur Folge, was zu einer Umwandlung des zuvor hypoproliferativen in einen hyperproliferativen Phänotyp führt (Kampen et al. 2020; Keersmaecker et al. 2015; Penzo et al. 2019; Sulima et al. 2019). Beide Mechanismen begünstigen die Tumorentstehung (Abbildung 3) (Penzo et al. 2019).



**Abbildung 3: Zusammenhang zwischen Ribosomopathien und Tumoren.** Ursächlich für Ribosomopathien können eine verminderte rRNA-Synthese oder RP-Mutationen sein. Über Aktivierung des RP-MDM2-p53-Signalwegs kommt es zu einer p53-Stabilisierung und zunächst zu einem hypoproliferativen Phänotyp. Der dadurch ausgelöste Zellstress begünstigt somatische Mutationen, die zum Funktionsverlust von p53 und zu einem Überleben der dysfunktionalen Zellen führen. Gleichzeitig führen ribosomale Dysfunktionen zu einem Anstieg von intrazellulärem oxidativem Stress, was Zellschäden und eine verminderte Proliferationsrate begünstigen. Dadurch kommt es zu einer veränderten Produktion von Onkogenen und Tumorsuppressoren. Beide Mechanismen begünstigen die Tumorentstehung. (nach Penzo et al. 2019)

## 1.2 Diamond-Blackfan-Anämie

Eine der häufigeren Erkrankungen unter den Ribosomopathien ist die Diamond-Blackfan-Anämie (DBA), welche mit einer Prävalenz von 5 bis 7:1.000.000 vorkommt (Oyarbide et al. 2019; Uechi und Kenmochi 2019).

Die DBA ist gekennzeichnet durch eine erythrozytäre Aplasie mit Störungen der Erythropoese auf Knochenmarkebene, die sich innerhalb der ersten Lebensjahre manifestiert (Uechi und Kenmochi 2019; Ulirsch et al. 2018). Weitere Symptome zeigen eine variable Ausprägung und reichen von skelettalen Anomalien über Wachstumsretardierung bis hin zu kongenitalen Lippenpalten, Malformationen des Herzens, der oberen Extremitäten und des Harntrakts (Engidaye et al. 2019; Oyarbide et al. 2019; Uechi und Kenmochi 2019). Darüber hinaus liegt eine Assoziation zu Tumorerkrankungen, wie dem myelodysplastischen Syndrom (MDS), der akuten myeloischen Leukämie (AML), der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) sowie dem Osteosarkom und Kolonkarzinom, vor (Aspesi et al. 2017; Oyarbide et al. 2019; Sakamoto und Narla 2018).

Bisher sind mindestens 19 verschiedene Gene ribosomaler Proteine bekannt, bei denen Mutationen in den entsprechenden Genen ursächlich für den Phänotyp einer DBA sein können



(Aspesi et al. 2017). *RPS19* ist mit einer Mutationsrate von 25% unter den DBA-Fällen am häufigsten betroffen (Engidaye et al. 2019). Weitere häufige Mutationen betreffen unter anderem die RP-Gene *RPS7*, *RPL5* und *RPL11*, sowie den *Gata binding factor 1 (GATA1)* (Engidaye et al. 2019; Wang et al. 2015). Alle der über 200 bekannten RP-Mutationen im Zusammenhang mit einer DBA sind heterozygot, da homozygote Mutationen letal für die Embryos verlaufen (Matsson et al. 2006; Nakhoul et al. 2014). Die große Anzahl der bekannten Mutationen in Assoziation mit einer DBA und die mitunter inkomplette Penetranz und variable Expressivität erklären die hohe phänotypische Variabilität (Nakhoul et al. 2014). Meist handelt es sich um sporadische *de novo* Mutationen, wobei etwa 20% der DBA-Fälle von einem Elternteil vererbt sind (Wang et al. 2015). Bei 35 bis 40% der DBA Patient:innen kann keine Mutation in einem der bekannten Gene identifiziert werden (Engidaye et al. 2019; Wang et al. 2015).

Derzeit gibt es keine kausale Therapie und die Patient:innen mit einer DBA werden in erster Linie mit Bluttransfusionen und in zweiter Linie mit Kortikosteroiden behandelt (Sakamoto und Narla 2018; Vlachos und Muir 2010). Eine hämatopoetische Stammzelltransplantation wird im Falle einer Steroidresistenz oder bei transfusions-abhängigen Patient:innen durchgeführt (Vlachos und Muir 2010). Folgen der Therapie können Hypertension, Diabetes mellitus und Wachstumsretardierung aufgrund der Steroidtherapie sein (Orgebin et al. 2020; Stark et al. 2001). Des Weiteren kann es aufgrund des Eisenüberschusses durch die Transfusionstherapie zur Entwicklung einer kardialen Hämosiderose kommen (Vlachos und Muir 2010), sowie zu Nebenwirkungen, die im Zusammenhang mit der schweren Immunsuppression im Rahmen der Stammzelltransplantation stehen (Orgebin et al. 2020). Die 40 Jahre Überlebenswahrscheinlichkeit von Patient:innen mit einer DBA liegt bei etwa 75% und ist abhängig von Komplikationen im Zusammenhang mit der Therapie und mit der erhöhten Rate von Tumorerkrankungen (Lipton et al. 2006).

### 1.2.1 Detektion der Variante *RPS27A* c.335G>A (p.G112D) bei einem DBA-Patienten

Ausgangspunkt für diesen Themenkomplex ist ein Patient, bei dem kurz nach der Geburt die Diagnose einer DBA gestellt wurde und der an der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) behandelt wird. Im Alter von 3 Jahren erfolgte eine Exom-Sequenzierung, wobei keine relevante Mutation in einem der bekannten DBA-Gene gefunden wurde. Stattdessen wurde eine Variante unklarer Signifikanz (VUS) im *RPS27A*-Gen (NM\_002954) detektiert. Dabei handelt es sich um die Punktmutation *RPS27A* c.335G>A (p.G112D). *RPS27A* (Abbildung 4) ist ein ribosomales Protein, das aus 80 AS besteht und als natürliches

Ubiquitin(Ub)-*C-terminal extension*-Protein (früher wurde RPS27A auch als CEP80 bezeichnet) synthetisiert wird (Redman und Rechsteiner 1989). Es wird zu einem individuellen Ub-Monomer und RPS27A hydrolysiert (Komander et al. 2009).



**Abbildung 4: Modell von Ub-RPS27A.** RPS27A wird als natürliches Ubiquitin(Ub)-*C-terminal extension*-Protein (CEP) synthetisiert und besteht aus 80 AS. Durch Hydrolyse entstehen das Ub-Monomer und RPS27A.

Im Rahmen der humangenetischen Diagnostik wurde an der Universitätsmedizin Göttingen eine Segregationsanalyse an Proben der Mutter, des Vaters und des Onkels väterlicherseits durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass sowohl der Vater als auch der Onkel die *RPS27A*-Variante c.335G>A (p.G112D) tragen. Darüber hinaus wurde eine familiäre Häufung von Tumorerkrankungen festgestellt. Der Onkel des Patienten väterlicherseits verstarb im Alter von 19 Jahren und erkrankte zu Lebzeiten an einem Rhabdomyosarkom und einem Glioblastom. Zudem wurde bei dem Urgroßvater väterlicherseits, der zum Zeitpunkt der Diagnose des Patienten 83 Jahre alt war, im Alter von 27 Jahren eine Leukämie diagnostiziert. Vater und Mutter des Patienten waren phänotypisch gesund.

Aufgrund der familiären Häufung von Tumorerkrankungen und der passenden Segregation der Variante im *RPS27A*-Gen stellte sich die Frage, ob die detektierte *RPS27A*-Variante c.335G>A (p.G112D) ursächlich für den Phänotyp einer DBA sein und als weiteres DBA-Gen etabliert werden könnte. Zu Forschungszwecken wurde eine Hautstanze genommen und die Patienten-Fibroblasten von dem Institut für Humangenetik (Universitätsmedizin Göttingen) kultiviert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

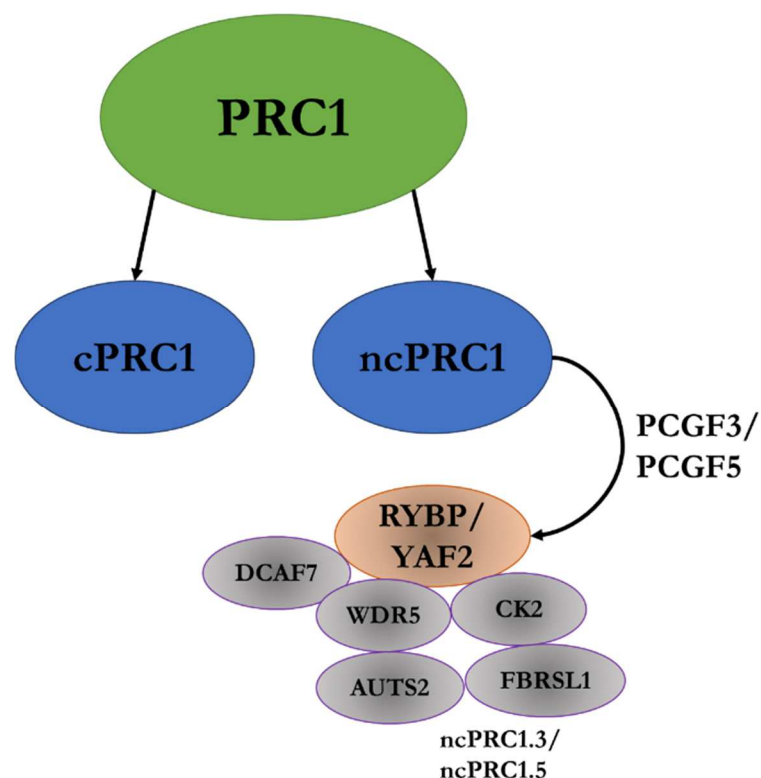
## 1.3 ZMAT5

### 1.3.1 AUTS2 und FBRSL1 – zwei paraloge Polycomb-Komplex-Proteine

Das *autism susceptibility candidate 2*(AUTS2)-Protein zählt zu den Polycomb-Komplex-Proteinen, welche durch epigenetische Modifizierung und Transkriptionsregulierung eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung und Stammzellendifferenzierung einnehmen (Aranda et al. 2015; Chittock et al. 2017; Scelfo et al. 2015; Ufartes et al. 2020). Die zwei großen Polycomb-Komplexe *polycomb repressive complex* (PRC) PRC1 und PRC2 regulieren über Chromatinmodifizierung und Histonmethylierung die Zellentwicklung, -differenzierung und

-proliferation (Aranda et al. 2015; Scelfo et al. 2015; Simon und Kingston 2013). Der PRC1-Komplex wird durch die Assoziation mit verschiedenen *polycomb group RING finger* (PCGF)-Proteinen in *canonical*-PRC1 (cPRC1)- und *noncanonical*-PRC1 (ncPRC1)-Komplexe unterteilt (Schuettengruber et al. 2017). Es erfolgt eine weitere Unterteilung in Subkomplexe. AUTS2 ist eine Komponente der Polycomb-Subkomplexe ncPRC1.3 und ncPRC1.5 (Abbildung 5) (Aranda et al. 2015; Gao et al. 2014; Schuettengruber et al. 2017). Die Subkomplexe ncPRC1.3 und ncPRC1.5 werden definiert durch PCGF3 und PCGF5 und der Präsenz von *RING1 and YY1 binding protein/YY1 associated factor 2* (RYBP/YAF2) (Schuettengruber et al. 2017). AUTS2 kann mit PRC1 einen AUTS2-PRC-Komplex bilden. Dieser rekrutiert die Histon-Acetyltransferase p300, ein Transkriptions-Coaktivator, und die Casein-Kinase 2 (CK2), welche die hemmende Funktion von PRC1 unterbindet; dadurch wirkt der AUTS2-PRC-Komplex als Transkriptionsaktivator (Gao et al. 2014; Hori und Hoshino 2017; Ufartes et al. 2020).

Ein weiteres Protein, das zu den ncPRC1.1- und ncPRC1.3-Komplexen gehört, ist *fibrosin like 1* (FBRSL1), ein Paralog von AUTS2 (Abbildung 5). Die Wirkung, die FBRSL1 auf den PRC-Komplex ausübt, ist noch unbekannt (Gao et al. 2012).

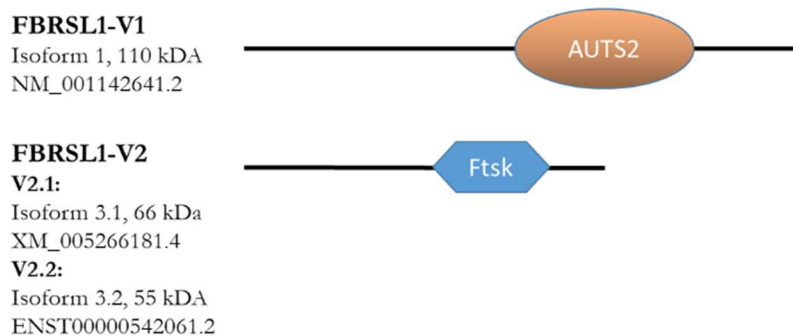


**Abbildung 5: AUTS2 und FBRSL1 im Polycomb-Komplex.** Der *polycomb repressive complex 1* (PRC1)-Komplex wird je nach Komplexpartnern unterteilt in *canonical*-PRC1 (cPRC1)- und *noncanonical*-PRC1 (ncPRC1)-Komplex. Die Assoziation mit den *polycomb group RING finger 3* (PCGF3)- und PCGF5-Proteinen und die Präsenz von *RING1 and YY1 binding protein/YY1 associated factor 2* (RYBP/YAF2) definieren die Polycomb-Subkomplexe ncPRC1.3 und ncPRC1.5 (Schuettengruber et al. 2017). Nebst *DDB1 and CUL4 associated factor 7* (DCAF7), *WD repeat domain 5* (WDR5) und Casein-Kinase 2 (CK2) sind auch *autism susceptibility candidate 2* (AUTS2) und *fibrosin like 1* (FBRSL1) Teil der Subkomplexe ncPRC1.3 und ncPRC1.5. (Aranda et al. 2015; Gao et al. 2012)

AUTS2 wird auf Proteinebene von dem Zinkfinger-Protein *zinc finger matrin-type 3* (ZMAT3), auch wig1 genannt, reguliert (Oksenberg und Ahituv 2013; Sedaghat et al. 2012). ZMAT3 kodiert für ein RNA-bindendes Zinkfinger-Protein, das mit p53 interagiert; einerseits stabilisiert ZMAT3 die p53-mRNA, indem es diese vor einer Deadenylierung schützt und so das p53-mRNA- und Protein-Level erhöht, und andererseits ist p53 ein upstream-Regulator von ZMAT3 (Bersani et al. 2014; Sedaghat et al. 2012; Vilborg et al. 2011). Durch die Hochregulierung von ZMAT3 kommt es zu einer p53-abhängigen Herunterregulierung des Zellzyklus und folglich zu einem inhibierten Tumorwachstum (Bersani et al. 2014; Vilborg et al. 2011).

Mutationen von *AUTS2* führen zu dem gleichnamigen AUTS2-Syndrom (Beunders et al. 2013; Ufartes et al. 2020). Dieses Krankheitsbild ist geprägt von einer mentalen Retardierung und Entwicklungsverzögerung, sowie autistischen Verhaltensweisen, Mikrozephalie, Kleinwuchs, Skelettanomalien und Herzfehlern (Beunders et al. 2016; Hori und Hoshino 2017; Jolley et al. 2013; Oksenberg und Ahituv 2013).

Zu einem ähnlichen Phänotyp wie das AUTS2-Syndrom führen Mutationen in dem *AUTS2*-Paralog *FBRSL1*, über dessen Funktion bisher noch sehr wenig bekannt ist (Sellers et al. 2020; Ufartes et al. 2020). Von *FBRSL1* existieren mehrere Isoformen. Im Weiteren wird auf drei Isoformen genauer eingegangen, die den N-Terminus abdecken (Abbildung 6). Die *FBRSL1*-Isoform 1 (hier genannt *FBRSL1*-Variante 1 (*FBRSL1*-V1), NM\_001142641.2) hat ein geschätztes Molekulargewicht von 110 kDa, wohingegen die kürzere Isoform 3.1 (hier genannt *FBRSL1*-V2.1, XM\_005266181.4) ein geschätztes Molekulargewicht von 66 kDa hat. Die *FBRSL1*-Isoform V2.1 enthält im Gegensatz zu *FBRSL1*-V1 die Exons 1 und 2, sowie ein alternatives Exon 3 mit einem Stopcodon. Darüber hinaus existiert noch eine weitere kurze Isoform 3.2 (hier genannt *FBRSL1*-V2.2, ENST00000542061.2) mit einem geschätzten Molekulargewicht von 55 kDa. Diese enthält nur das Exon 2 mit einem in-frame ATG und das alternative Exon 3 (Ufartes et al. 2020). Die *FBRSL1*-Isoformen V2.1 und V2.2, Varianten derselben Isoform, enthalten eine *filament temperature sensitive mutant K* (Ftsk) DNA Translokase-Domäne. In dieser Arbeit wird bei den Experimenten nicht zwischen den Isoformen *FBRSL1*-V2.1 und *FBRSL1*-V2.2 unterschieden, weshalb sie im Folgenden zusammenfassend als *FBRSL1*-V2 bezeichnet werden. Im Gegensatz zu der Isoform *FBRSL1*-V2 enthält die *FBRSL1*-Isoform V1 keine Ftsk-Domäne, sondern eine AUTS2-Domäne, welche man eine homologe Region zu dem namensgebenden AUTS2-Protein darstellt (Sellers et al. 2020; Ufartes et al. 2020).



**Abbildung 6: Modelle der FBRSL1-Isoformen V1 und V2.** Es sind drei FBRSL1-Isoformen bekannt, die den N-Terminus abdecken. Die Isoform 1 (hier genannt FBRSL1-V1, 110 kDa) besitzt eine AUTS2-Domäne. Die Isoform 3.1 (hier genannt FBRSL1-V2.1, 66 kDa) und die Isoform 3.2 (hier genannt FBRSL1-V2.2, 55 kDa) sind Varianten der Isoform FBRSL1-V2 und enthalten eine Ftsk DNA Translokase-Domäne. (nach Ufartes et al. 2020)

Bisher sind Fälle von drei Patient:innen bekannt, bei denen Deletionen und Nonsense-Mutationen im N-terminalen Bereich von *FBRSL1* zu einem dem AUTS2-Syndrom ähnlichen Phänotyp führten. Die Symptome der Patient:innen umfassten ein Atemnotsyndrom, postnatalen Kleinwuchs und Mikrozephalie, eine globale Entwicklungsverzögerung, sowie faziale Dysmorphien. Zwei der drei Patient:innen wiesen zudem postnatal ausgeprägte Hautfalten vornehmlich im Bereich des Rückens auf, die sich im Laufe des ersten Lebensjahres zurückbildeten (Ufartes et al. 2020).

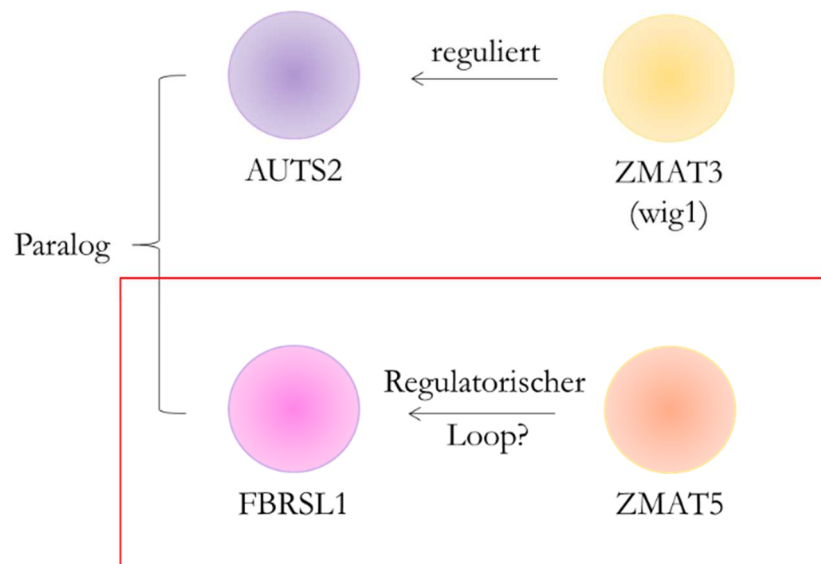
Bei den betroffenen Kindern konnte an RNA, isoliert aus Blut, eine Überexpression der ribosomalen Proteine *RPS7*, *RPS28*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL18A*, *RPL36A* und *RPL38* identifiziert werden (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe). Ein Zusammenhang zwischen der Expression von Polycomb-Komplex-Proteinen und RPs ist bekannt; so führt ein Mangel an *B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1* (*Bmi1*), ein weiteres Polycomb-Komplex-Protein, mitunter zu einer verminderten Transkription verschiedener RPs (*Rps14*, *Rps19*, *Rps27*, *Rpl11*) (Gao et al. 2015). Daher stellt sich die Frage, ob das neue Krankheitsbild zur Gruppe der Ribosomopathien gezählt werden kann.

### 1.3.2 Detektion einer Mikrodeletion mit *ZMAT5* als betroffenes Gen

Der Patient, welcher der Ausgangspunkt für diesen Themenkomplex war, zeigte phänotypisch starke Ähnlichkeit zu den Patient:innen mit pathogener FBRSL1-Variante. Besonders prägnant waren bei dem Patienten die stark ausgeprägten Hautfalten, die auch bei zwei der drei Patient:innen mit FBRSL1-Varianten auftraten (Ufartes et al. 2020). Im Rahmen der Diagnostik wurde eine Mikrodeletion im Chromosom 22 (del(22q12.1-q12.2)) detektiert. Insgesamt liegen in dem 2,5 mbp großen Bereich 32 Gene, unter anderem *zinc finger matrin-type 5* (*ZMAT5*). *ZMAT5* gehört ebenso wie *ZMAT3* zu Proteinen der Zinkfingerfamilie, welches

wiederum ein Regulator von *AUTS2*, dem Paralog von *FBRSL1*, ist (Oksenberg und Ahituv 2013; Ufartes et al. 2020). Eine Mutation in *FBRSL1* wurde bei dem Patienten ausgeschlossen.

Aufgrund der klinischen Ähnlichkeit des Patienten mit der Mikrodeletion (del(22q12.1-q12.2)) zu den Patient:innen mit pathogener *FBRSL1*-Variante, sollte eine mögliche Regulation von *FBRSL1* durch *ZMAT5* (NM\_001003692) untersucht werden (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Parallelen zwischen *AUTS2*/*ZMAT3* und *FBRSL1*/*ZMAT5*.** *ZMAT3*, welches ebenso wie *zinc finger matrin-type 5* (*ZMAT5*) zu der Zinkfingerfamilie zählt, reguliert die Expression von *AUTS2*. Fehlregulationen von *FBRSL1*, einem Paralog von *AUTS2*, führen zu einem ähnlichen Phänotyp wie Dysregulationen in der Expression von *AUTS2*. Aufgrund der Ähnlichkeiten des Patienten mit der Mikrodeletion (del(22q12.1-q12.2)) zu den Kindern mit Variante im *FBRSL1*-Gen soll ein möglicher regulatorischer Loop von *ZMAT5*, welches in dem Bereich der Mikrodeletion liegt, und *FBRSL1* untersucht werden.

Zudem sollte untersucht werden, ob die Mikrodeletion (del(22q12.1-q12.2)) zu einer Dysregulation der Gene ribosomaler Proteine *RPS7*, *RPS28*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL18A*, *RPL36A* und *RPL38* führt, ähnlich wie bei den Patient:innen mit einer *FBRSL1*-Variante. Es wurde zu Forschungszwecken eine Hautstanze genommen. Die Patienten-Fibroblasten wurden vom Institut für Humangenetik (Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen) kultiviert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

## 1.4 Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit ist es anhand funktioneller Analysen unterschiedlicher Krankheitsbilder zweier Patienten festzustellen, ob die zugrundeliegenden genetischen Mutationen im Zusammenhang mit einer Dysfunktion bzw. Fehlregulation ribosomaler Proteine stehen.

Diese experimentelle Arbeit soll mehr Klarheit in die Pathophysiologie zweier unterschiedlicher Krankheitsbilder bringen. Diesen liegen die VUS c.335G>A (p.G112D) im *RPS27A*-Gen und eine Mikrodeletion im Bereich 22q12.1-q12.2, in welchem unter anderem das Gen *ZMAT5* liegt, zugrunde. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob *RPS27A* als weiteres DBA-Gen etabliert werden kann. Des Weiteren sollen Erkenntnisse über eine mögliche Regulation von *FBRSL1* durch *ZMAT5* gewonnen werden sowie Auswirkungen auf die Genexpression der ribosomalen Proteine *RPS7*, *RPS28*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL18A*, *RPL36A* und *RPL38*. Darüber hinaus soll der Einfluss der VUS c.335G>A (p.G112D) im *RPS27A*-Gen bzw. der Mikrodeletion (del(22q12.1-q12.2)) auf die Expression von p53, als wichtigster Tumorsuppressor, eingehender untersucht werden. Im Falle der *RPS27A*-Variante c.335G>A (p.G112D) soll der Signalweg RP-MDM2-p53 betrachtet werden, um mehr Erkenntnisse über den Zusammenhang einer Dysregulation ribosomaler Proteine und dem Entstehen von Tumoren zu gewinnen. Eine Einordnung der in dieser Arbeit aufgezeigten Krankheitsbilder in die Gruppe der Ribosomopathien könnte dazu beitragen gezieltere molekulargenetische Untersuchungen und Behandlungsmethoden dieser Erkrankungen aufzuzeigen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Technisches Equipment

**Tabelle 1: Technisches Equipment**

| <b>Technisches Equipment</b>                  | <b>Hersteller</b>                         |
|---|---|
| 27020 Thermal Cycler                          | Applied Biosystems, Darmstadt             |
| 3500xL Genetic Analyzer                       | Applied Biosystems, Darmstadt             |
| 6-Tube Magnetic Separation Rack               | New England Biolabs, Frankfurt/M          |
| 7900HT Fast Real-Time PCR System              | Applied Biosystems, Darmstadt             |
| Accu-jet®                                     | Sartorius, Göttingen                      |
| Autoklaven                                    |   |
| DX-150  | Systec, Linden                            |
| FVS/2   | Fedegari, Bedano (CHE)                    |
| VX-95   | Systec, Linden                            |
| Azure c300                                    | Azure Biosystems, Dublin (USA)            |
| Balance CP3202S                               | Sartorius, Göttingen                      |
| Bunsenbrenner                                 | Campingaz®, Hattersheim                   |
| Drucksystem (Gelelektrophorese Dokumentation) |   |
| Doc print™ VX2                                | Peqlab, Erlangen                          |
| P95   | Mitsubishi Electric, Tokyo (JPN)          |
| Eisflockenbereiter                            | Scotsman® Ice Systems, Mailand (Italien)  |
| AF 156 X Safe                                 |   |
| Elektrophoresekammer                          | Central workshop, University of Göttingen |
| Gefrierschrank                                |   |
| −20°C   | Beko, Neu-Isenburg                        |
| −80°C   | Sanyo, Moriguchi (JPN)                    |
| Herasafe™ (biological safety cabinet)         | Thermo Electron LED, Langenselbold        |



| <b>Technisches Equipment</b>             | <b>Hersteller</b>                          |
|--|--|
| Kamera (Gelelektrophorese Dokumentation) | Vilbert Lourmat, Eberhardzell              |
| Kühlschränke                             | Liebherr, Ochsenhausen<br>Bosch, Stuttgart |
| Magnetrührwerk                           | IKA Labortechnik, Staufen                  |
| Mikroskope                               |  |
| Confocal laser scanning microscope IX81  | Olympus, Hamburg                           |
| Inverted routine microscope Primovert    | Zeiss, Göttingen                           |
| Stereo microscope Stemi SV 11            | Zeiss, Göttingen                           |
| Microwave OMW 310-S                      | Ok. / Venalisia Import, Ingolstadt         |
| Mini Protean® II Cell                    | Bio-Rad, München                           |
| NanoDrop 2000c                           | Peqlab, Erlangen                           |
| Netzteile                                |  |
| Apelex PS 304 minipac II                 | Biostep, Jahnsdorf                         |
| PowerPac™ 3000                           | Bio-Rad, München                           |
| Novex® Mini-Cell Electrophoresis System  | Invitrogen Karlsruhe                       |
| pH-Meter PB-11                           | Sartorius, Göttingen                       |
| Pipetten                                 |  |
| Multipette® M4                           | Eppendorf, Hamburg                         |
| Pipetman                                 | Gilson, Limburg-Offheim                    |
| Research                                 | Eppendorf, Hamburg                         |
| Transferpette®-8                         | Brand, Wertheim                            |
| ErgoOne® Einkanal-Pipetten               | Starlab, Hamburg                           |
| Roll Shaker RM5 Assistent 348            | Karl Hecht, Sondheim                       |
| Scheren                                  |  |
| HSB 006-10                               | Hammacher, Solingen                        |
| HSB 530-08                               | Hammacher, Solingen                        |
| Semi-Automatic Sheet Heat Sealer         | 4titude, Berlin                            |

| <b>Technisches Equipment</b>              | <b>Hersteller</b>                       |
|---|---|
| Schüttler                                 | IKA Labortechnik, Staufen               |
| Innova® 40                                | New Brunswick Scientific, Nürtingen     |
| Sterilisator                              | Memmert, Schwabach                      |
| Stuart® SB2 rotator                       | Bibby Scientific, Staffordshire (GBR)   |
| Synergy™ Mx plate reader                  | BioTek, Bad Friedrichshall              |
| Tank Blotting-System MiniProtean® II Cell | Bio-Rad, Hercules (USA)                 |
| Thermomixer 5436 / compact                | Eppendorf, Hamburg                      |
| Trockenschrank                            | Memmert, Schwabach                      |
| UVsolo TS Imaging System                  | Biometra, Göttingen                     |
| UV-Lichttisch ECX-F20.M                   | PeqLab, Erlangen                        |
| Vortex-Genie® 2                           | Scientific Industries, New York (USA)   |
| Wasserbad                                 | GFL, Großburgwedel                      |
| Zentrifugen                               |   |
| 4K15                                      | Sigma, Osterode                         |
| Herasus™ Biofuge™ Primo                   | Thermo Electron LED, Osterode           |
| Heraeus™ Fresco™                          | Thermo Electron LED, Osterode           |
| Heraeus™ Megafuge™ 16                     | Thermo Electron LED, Osterode           |
| Micro Centrifuge IR                       | Carl Roth, Karlsruhe                    |
| Microfuge 1 – 15                          | Sigma, München                          |
| Sprout® Minizentrifuge                    | Heathrow Scientific, Vernon Hills (USA) |

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

| <b>Produktname</b>   | <b>Hersteller</b>    |
|----------------------|----------------------|
| Blottingpapier       | Sartorius, Göttingen |
|                      | Hahnemühle, Dassel   |
| Deckgläser (Ø 12 mm) | Carl Roth, Karlsruhe |

| <b>Produktname</b>                                  | <b>Hersteller</b>                         |
|---|---|
| Einwegspritzen (2 mL, 5 mL, 20 mL)                  | BD Biosciences, Heidelberg                |
| Falkons (15 mL, 50 mL)                              | Greiner Bio-One, Frickenhausen            |
| Gaskartusche (Propan/Butan)                         | Campingaz®, Hattersheim                   |
| Gele  |   |
| NuPAGE™ 3 – 8% Tris-Acetat Gele,<br>1,0 mm, 12 well | Invitrogen, Karlsruhe                     |
| SurePAGE™ 4 – 12% Bis-Tris Gele,<br>1,0 mm, 12-well | Genscript®, Piscataway (USA)              |
| SurePAGE™ 4 – 12% Bis-Tris Gele,<br>1,0 mm, 15-well | Genscript®, Piscataway (USA)              |
| Küvetten, 10 mm                                     | Sarstedt, Nümbrecht                       |
| Membranen   |   |
| Nitrozellulose 0,45 µm                              | GE Healthcare, Little Chalfont (GBR)      |
| Immun-Blot® PVDF 0,2 µm                             | Bio-Rad, Hercules (USA)                   |
| Mr. Frosty™ Freezing Container                      | Kisker, Steinfurt                         |
| MultiScreen® PCR96 Filter Platten                   | Merck Millipore, Darmstadt                |
| Pasteurpipetten                                     | Th. Geyer, Renningen                      |
| Parafilm® „M“                                       | Pechinery Plastic Packagin, Chicago (USA) |
| Papiertücher  |   |
| KIMTECH Science 200/280                             | Kimberly-Clark, Koblenz-Rheinhafen        |
| PCR cups (0,2 mL)                                   | Sarstedt, Nümbrecht                       |
| Petrischalen  | Sarstedt, Nümbrecht                       |
| Pipettenspitzen                                     |   |
| mit Filter (10 µL/200 µL/1000 µL)                   | Starlab, Hamburg                          |
| ohne Filter<br>(10 µL/20 µL/200 µL/1000 µL)         | Kisker, Steinfurt                         |
| qRT-PCR Adhesive Clear Seals                        | 4titude, Berlin                           |
| qRT-PCR Platten (384-well)                          | 4titude, Berlin                           |
| Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL)                      | Sarstedt, Nümbrecht                       |

| <b>Produktname</b>                                 | <b>Hersteller</b>               |
|--|---------------------------------|
| Serologische Pipetten                              |                                 |
| CELLSTAR® (5 mL/10 mL/25 mL)                       | Greiner Bio-One, Frickenhausen  |
| 2 mL, 5 mL   | Sarstedt, Nümbrecht             |
| Skalpell   | B. Braun, Dublin (IRL)          |
| Transferringpipetten (3,5 mL)                      | Sarstedt, Nümbrecht             |
| Zählkammer, hellinig (Neubauer)                    | Sarstedt, Nümbrecht             |
| Zellkulturflaschen                                 |                                 |
| 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> mit Filter | Greiner Bio-One, Frickenhausen  |
| 75 cm <sup>2</sup> ohne Filter                     | Sarstedt, Nümbrecht             |
| Zellkulturplatten                                  |                                 |
| 96-well  | Nuclon A/S, Roskilde (Dänemark) |
| 24-well  | Greiner Bio-One, Frickenhausen  |
| 12-well  | Greiner Bio-One, Frickenhausen  |
| 6-well   | Greiner Bio-One, Frickenhausen  |

### 2.1.3 Chemikalien, Biochemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien, Biochemikalien, Reagenzien

| <b>Chemikalie/Biochemikalie/Reagenz</b> | <b>Hersteller</b>                   |
|---|-------------------------------------|
| 1-Thioglycerol                          | Sigma-Aldrich, Deisenhofen          |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT)                | AppliChem, Darmstadt                |
| Actinomycin D (Act D)                   | Digma-Aldrich, Deisenhofen          |
| Agar-Agar, Kobe I                       | Carl Roth, Karlsruhe                |
| Agarose                                 | Peqlab, Erlangen                    |
| Ampicillin-Natriumsalz                  | Carl Roth, Karlsruhe                |
| Ampuwa®                                 | Fresenius, Bad Homburg              |
| Barricidal®                             | Interchem Hygiene, Zürich (Schweiz) |
| Borsäure                                | ICN Biomedicals, Eschwege           |

| <b>Chemikalie/Biochemikalie/Reagenz</b>                       | <b>Hersteller</b>                   |
|---|-------------------------------------|
| Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V                         | PAA Laboratories, Linz (Österreich) |
| Bovine Serum Albumin Standard Ampules<br>(2 mg/mL)            | Thermo Scientific, Rockford (USA)   |
| Bromphenolblau  | Carl Roth, Karlsruhe                |
| Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )                           | Carl Roth, Karlsruhe                |
| cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail<br>Tabletten            | Roche, Penzberg                     |
| Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)                           | Bio-Budget Technologies, Krefeld    |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                                       | Carl Roth, Karlsruhe                |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | Carl Roth, Karlsruhe                |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium<br>(DMEM)                    | PAN-Biotech, Aidenbach              |
| Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline<br>(DPBS)                | PAN-Biotech, Aidenbach              |
| Essigsäure  | Merck, Darmstadt                    |
| Ethanol (EtOH)  | J.T. Baker, Griesheim               |
| Ethidiumbromid 0,07% (EtBr)                                   | Inno-Train Diagnostik, Kronberg/Ts. |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA)                               | AppliChem, Darmstadt                |
| Fetales bovines Serum, SeraPlus (FBS)                         | PAN-Biotech, Aidenbach              |
| Fluoroshield™ mit DAPI  | Sigma-Aldrich, Deisenhofen          |
| Glycerol  | Carl Roth, Karlsruhe                |
| Glycin  | Carl Roth, Karlsruhe                |
| Halt™ Protease Inhibitor Single-Use cock-<br>tail (100 ×)     | Thermo Scientific, Rockford (USA)   |
| Hefeextrakt   | Carl Roth, Karlsruhe                |
| Immersionol™ 518F   | Zeiss, Oberkochen                   |
| Isopropanol   | J.T. Baker, Griesheim               |
| Kaliumchlorid (KCl)   | Carl Roth, Karlsruhe                |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )   | Carl Roth, Karlsruhe                |

| <b>Chemikalie/Biochemikalie/Reagenz</b>  | <b>Hersteller</b>                |
|--|----------------------------------|
| Kanamycin-Sulfat                         | Carl Roth, Karlsruhe             |
| Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent | Invitrogen, Karlsruhe            |
| Lithiumacetat (LiAc)                     | Carl Roth, Karlsruhe             |
| Methanol                                 | J.T.Baker, Griesheim             |
| MG-132 (26S Proteasom Inhibitor)         | InvivoGen, San Diego (USA)       |
| Milchpulver                              | Carl Roth, Karlsruhe             |
| MEM Non-Essential Amino Acids (NEAA)     | PAN Biotech, Aidenbach           |
| Natriumacetat                            | Sigma-Aldrich, Deisenhofen       |
| Natriumchlorid (NaCl)                    | AppliChem, Darmstadt             |
| Natriumhydroxid (NaOH)                   | Merck Millipore, Darmstadt       |
| NuPAGE® LDS Sample Buffer (4 ×)          | Invitrogen, Karlsruhe            |
| Opti-MEM® I Reduced Serum Medium         | Gibco, Eggenstein                |
| Paraformaldehyd (PFA)                    | Carl Roth, Karlsruhe             |
| Penicillin-Streptomycin                  | PAN Biotech, Aidenbach           |
| Pepton aus Casein                        | Carl Roth, Karlsruhe             |
| Polyethylenglycol 4000 (PEG4000)         | Carl Roth, Karlsruhe             |
| Protein G Magnetic Beads                 | New England Biolabs, Frankfurt/M |
| Random Hexamers (50 µM)                  | Invitrogen, Karlsruhe            |
| Restriktionsendonukleasen                | Invitrogen, Karlsruhe            |
|  | New England Biolabs, Frankfurt/M |
| Roti®-Nanoquant                          | Carl Roth, Karlsruhe             |
| Salzsäure (HCl)                          | Merck Millipore, Darmstadt       |
| S.O.C. Medium                            | Invitrogen, Karlsruhe            |
| TE Puffer                                | Invitrogen, Karlsruhe            |
| Thimerosal                               | Sigma-Aldrich, Deisenhofen       |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)    | AppliChem, Darmstadt             |
| Tris-MES-SDS Running Buffer Powder       | GenScript, Piscataway (USA)      |

| <b>Chemikalie/Biochemikalie/Reagenz</b> | <b>Hersteller</b>                               |
|---|---|
| Triton-X-100                            | Serva, Heidelberg                               |
| TrypLE™ Express                         | Gibco, Eggenstein                               |
| Tween®20 (Polysorbat)                   | Merck Millipore, Darmstadt                      |
| Xylencyanol                             | Sigma-Aldrich, Deisenhofen                      |
| Yeastmaker™ Carrier DNA                 | Clontech, Saint-Germain-en-Laye<br>(Frankreich) |

#### 2.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Tabelle 4: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

| <b>Reaktionssystem</b>                                     | <b>Hersteller</b>                 |
|--|-----------------------------------|
| Immobilon™ Western Chemiluminescent<br>HRP Substrat        | Merck Millipore, Darmstadt        |
| In-Fusion® HD Cloning Kit                                  | Takara Bio, Kusatsu (Japan)       |
| MSB® Spin PCRapace Kit                                     | Invitex, Berlin                   |
| NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic<br>Extraction Reagents Kit | Thermo Scientific, Rockford (USA) |
| NucleoSpin® RNA Kit  | Macherey-Nagel, Düren             |
| NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up                           | Macherey-Nagel, Düren             |
| Superscript™ II Reverse Transcriptase Kit                  | Invitrogen, Karlsruhe             |
| Q5® High-Fidelity DNA Polymerase                           | New England Biolabs, Frankfurt/M  |
| QIAquick® Gel Extraction Kit                               | Qiagen, Hilden                    |
| QuantiTect® SYPR® Green PCR Kit                            | Qiagen, Hilden                    |

### 2.1.5 Sterilisation

Wenn nicht anders angegeben, wurden Puffer und Lösungen für 20 min bei 120°C und 10<sup>5</sup> Pa mit Dampf autoklaviert. Hitzeinstabile Lösungen wurden mittels Filtereinheiten von 0,2 bis 0,45 µm Porengröße steril filtriert. Das Laborequipment wurde entweder wie oben beschrieben mit Dampf autoklaviert oder bei 180°C über Nacht (ÜN) hitzesterilisiert.

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

**Tabelle 5: Puffer und Lösungen**

| <b>Puffer / Lösung</b>                         | <b>Zusammensetzung</b>  |                                      |
|--|-------------------------|--------------------------------------|
| 1 × Transferpuffer (kleine Protein, < 150 kDa) | 8%                      | Transferpuffer (10 ×, ohne Methanol) |
|  | 20%                     | Methanol                             |
|  | in ddH <sub>2</sub> O   |                                      |
| 3% BSA   | 3%                      | BSA                                  |
|  | in PBST (0,1% Triton)   |                                      |
| 4% PFA   | 4%                      | PFA                                  |
|  | in PBS                  |                                      |
|  | auf pH 6 – 7 einstellen |                                      |
| 5 × TBE Puffer                                 | 450 mM                  | Tris-Base                            |
|  | 450 mM                  | Borsäure                             |
|  | 20 mM                   | EDTA                                 |
|  | in ddH <sub>2</sub> O   |                                      |
| 10 × PBS                                       | 1,4 M                   | NaCl                                 |
|  | 90 mM                   | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>     |
|  | 27 mM                   | KCl                                  |
|  | 15 mM                   | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      |
|  | in ddH <sub>2</sub> O   |                                      |
|  | auf pH 7,4 einstellen   |                                      |
| Ampicillin                                     | 50 mg/mL                | Ampicillin                           |
|  | in Ampuwa®              |                                      |



| <b>Puffer/Lösung</b>                                     | <b>Zusammensetzung</b>   |  |
|--|--|--|
| Antikörperverdünnungslösung<br>(Immunfluoreszenzfärbung) | 3%   | BSA<br>in PBST (0,1% Triton)   |
| Antikörperverdünnungslösung I<br>(Western Blot-Analyse)  | 2,5%   | Milchpulver<br>in TBST   |
| Antikörperverdünnungslösung II<br>(Western Blot-Analyse) | 0,1%   | Casein Lösung<br>in TBST   |
| Blockierungslösung<br>(Western Blot-Analyse)             | 5%   | Milchpulver<br>in TBST   |
| Casein Lösung (10%)                                      | Western Blockierungsreagenz (mit 10%<br>Casein)<br>1% Thimerosal |  |
| Co-IP Lysepuffer   | 0,1%   | Triton-X-100<br>50 mM Tris-HCl pH 7,4<br>300 mM NaCl<br>5 mM EDTA<br>in ddH <sub>2</sub> O<br>1 Tbl./50 mL Proteaseinhibitor |
| dNTPs Lösung   | 10 mM  | dATPs<br>10 mM dCTPs<br>10 mM dGTPs<br>10 mM dTTPs<br>in Ampuwa®   |
| DPBS mit 0,1% Tween 20 (DPBST)                           | 0,1%   | Tween 20<br>in DPBS  |
| Glycerollösung (50%)                                     | 50%  | Glycerol<br>in ddH <sub>2</sub> O  |
| Kanamycin  | 50 mg/mL   | Kanamycin<br>in Ampuwa   |

| <b>Puffer/Lösung</b>                      | <b>Zusammensetzung</b>             |                      |
|---|------------------------------------|----------------------|
| LiAc-Lösung (10 ×)                        | 100 mM                             | LiAc                 |
|   | in ddH <sub>2</sub> O              |                      |
|   | auf pH 7,5 einstellen              |                      |
|   | autoklavieren für 15 min bei 121°C |                      |
| Ladepuffer<br>(Agarose-Gelelektrophorese) | 50%                                | Glycerol             |
|   | 0,1 M                              | EDTA                 |
|   | 0,02%                              | Xylenzyanol          |
|   | 0,02%                              | Bromphenolblau       |
|   | 0,02%                              | SDS                  |
|   | in ddH <sub>2</sub> O              |                      |
| Modifizierter RIPA Lysepuffer             | 50 mM                              | Tris-HCl pH7,4       |
|   | 1%                                 | NP-40                |
|   | 0,25%                              | Natrium-Desoxycholat |
|   | 150 mM                             | NaCl                 |
|   | 1 mM                               | EDTA                 |
|   | in ddH <sub>2</sub> O              |                      |
|   | 1 Tbl./50 mL                       | Proteaseinhibitor    |
| P1 (Resuspensionspuffer)                  | 10 mM                              | EDTA                 |
|   | 100 µg/mL                          | RNAse A              |
|   | 50 mM                              | Tris pH 8,0          |
|   | in ddH <sub>2</sub> O              |                      |
| P2 (Lysepuffer)                           | 300 mM                             | NaOH                 |
|   | 1%                                 | SDS                  |
|   | in ddH <sub>2</sub> O              |                      |
| P3 (Neutralisationspuffer)                | 3 M                                | KOAc pH 5,5          |
|   | in ddH <sub>2</sub> O              |                      |
| PBST (0,1% Triton)                        | 0,1%                               | Triton-X-100         |
|   | in PBS                             |                      |

| <b>Puffer/Lösung</b>                 | <b>Zusammensetzung</b> |   |
|--------------------------------------|------------------------|---|
| PBST (0,5% Triton)                   | 0,5%                   | Triton-X-100<br>in PBS  |
| PEG 4000 Lösung (50%)                | 50%                    | PEG 4000<br>in ddH <sub>2</sub> O<br>autoklavieren für 15 min bei 121°C |
| PEG/LiAc Lösung                      | 1 mL<br>1 mL<br>8 mL   | TE Puffer (1 ×)<br>LiAc Lösung (10 ×)<br>PEG 4000 Lösung (50%)          |
| TBS Puffer                           | 154 mM<br>10 mM        | NaCl<br>Tris-HCl pH 7,4<br>in ddH <sub>2</sub> O                        |
| Transferpuffer (10 ×, ohne Methanol) | 1,92 M<br>250 mM       | Glycin<br>Tris<br>in ddH <sub>2</sub> O                                 |

### 2.1.7 Plasmide und Vektoren

Tabelle 6: Plasmide und Vektoren

| <b>Plasmid/Vektor</b> | <b>Quelle</b>   |
|-----------------------|---|
| MDM2-pCMV             | Prof. Dr. med. Dobbstein (Göttingen Center of Molecular Biosciences), Göttingen |
| MDM2-pGBKT7           | Prakash Arumugam (Bioinformatics Institute, A*STAR), Singapur                   |
| pCMV-HA               | Clontech, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)                                    |
| pGADT7                | Clontech, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)                                    |

| Plasmid/Vektor                         | Quelle   |
|--|--|
| pcDNA3.1(+)-N-HA                       | Institut für Humangenetik (Universitätsmedizin Göttingen), Göttingen |
| RPS27A-cmyc terminal-pCMV-HA           | Institut für Humangenetik (Universitätsmedizin Göttingen), Göttingen |
| RPS27A-Gly112Asp-cmyc terminal-pCMV-HA | Institut für Humangenetik (Universitätsmedizin Göttingen), Göttingen |

### 2.1.8 Bakterienstämme

Tabelle 7: Bakterienstämme

| Bakterienstamm   | Quelle                |
|--|-----------------------|
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ kompetente Zellen<br>(Subcloning Efficiency™ DH5 $\alpha$ ™,<br>Chemically Competent Cells) | Invitrogen, Karlsruhe |

#### 2.1.8.1 Medien und Agarplatten für Bakterienkulturen

Tabelle 8: Puffer und Lösungen

| Puffer/Lösung | Zusammensetzung  |
|---------------|--|
| LB Medium     | 1% NaCl<br>1% Pepton aus Casein<br>0,5% Hefeextrakt<br>in ddH <sub>2</sub> O |
| LB/Ampicillin | 0,1% mg/mL Ampicillin<br>in LB Medium  |
| LB/Kanamycin  | 0,1% mg/mL Kanamycin<br>in LB Medium   |

## 2.1.9 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 9: Eukaryotische Zelllinien

| Zelllinie   | ID                | Beschreibung                                    | Quelle  | Kulturmedium |
|-------------|-------------------|---|---|--------------|
| HEK293      | ATCC®<br>CRL-1573 | Human Embryonic Kidney 293 Zellen               | LGC Standards,<br>Wesel   | FB Medium    |
| HeLa        | ATCC®<br>CCL-2    | Menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms | LGC Standards,<br>Wesel   | FB Medium    |
| K562        | ATCC®<br>CCL-243  | Humane erythro-leukämische Zelllinie            | LGC Standards,<br>Wesel   | FB Medium    |
| Lymphozyten |                   | Humane Lymphozyten                              | Institut für Human-genetik (Universitätsmedizin Göttingen) Göttingen  | FB Medium    |
| Gö1301      | GM05658A          | Menschliche primäre Fibroblasten                | Coriell Institute,<br>Camden (USA)                                    | FB Medium    |
| Gö1303      | GM02936C          | Menschliche primäre Fibroblasten                | Coriell Institute,<br>Camden (USA)                                    | FB Medium    |
| Gö1307      | GM05659F          | Menschliche primäre Fibroblasten                | Coriell Institute,<br>Camden (USA)                                    | FB Medium    |
| Gö1310      | GM05381C          | Menschliche primäre Fibroblasten                | Coriell Institute,<br>Camden (USA)                                    | FB Medium    |
| Gö651       |                   | Menschliche primäre Fibroblasten                | Institut für Human-genetik (Universitätsmedizin Göttingen), Göttingen | FB Medium    |

| Zelllinie | ID | Beschreibung                     | Quelle  | Kulturmedium |
|-----------|----|----------------------------------|---|--------------|
| ZMAT5     |    | Menschliche primäre Fibroblasten | Institut für Human-genetik (Universitätsmedizin Göttingen), Göttingen | FB Medium    |

In dieser Arbeit werden zur vereinfachten Lesbarkeit Gö1301 als WT-1, Gö1303 als WT-3, Gö1307 als WT-7 und Gö1310 als WT-10 bezeichnet. Die Gö651-Fibroblasten bezeichnen Fibroblasten des Patienten mit der Variante c.335G>A (p.G112D) im RPS27A-Gen. Bei den ZMAT5-Fibroblasten handelt es sich um Fibroblasten des Patienten mit einer Deletion im Bereich 22q12.1-q12.2.

#### 2.1.9.1 Medium für eukaryotische Zellkultur

**Tabelle 10: Medium für eukaryotische Zelllinien**

| Medium           | Zusammensetzung   |
|------------------|---|
| Zellkulturmedium | 10% FBS<br>1% NEAA<br>100 U/mL/0,1 mg/mL Penicillin/Streptomycin<br>in DMEM |

#### 2.1.9.2 Einfriermedium

**Tabelle 11: Einfriermedium**

| Medium         | Zusammensetzung                 |
|----------------|---------------------------------|
| Einfriermedium | 60% DMEM<br>20% FBS<br>20% DMSO |

### 2.1.10 Genomische DNA

Tabelle 12: Genomische DNA

| Genomische DNA | Quelle   |
|----------------|--|
| K4117          | Institut für Humangenetik (Universitätsmedizin Göttingen), Göttingen |
| K4118          | Institut für Humangenetik (Universitätsmedizin Göttingen), Göttingen |
| ZMAT5          | Institut für Humangenetik (Universitätsmedizin Göttingen), Göttingen |

### 2.1.11 Hefestämme

Tabelle 13: Hefestämme

| Hefestamm | Quelle  |
|-----------|---|
| Y2HGold   | Clontech, Saint-Germain-en-Laye<br>(Frankreich) |

#### 2.1.11.1 Medien und Agarplatten für Hefekulturen

Tabelle 14: Medien und Agarplatten für Hefekulturen

| Medium/Agarplatte | Zusammensetzung   |
|-------------------|---|
| YPDA Agarplatten  | 50 g YPDA Medium<br>in 1 L ddH <sub>2</sub> O<br>autoklavieren für 15 min<br>20 g Agar-Agar |
| YPDA Medium       | 50 g YPDA Medium<br>in 1 L ddH <sub>2</sub> O<br>autoklavieren für 15 min                   |

| Medium/Agarplatte | Zusammensetzung  |
|-------------------|--|
| -LTHA             | 1 Beutel SD/-Ade/-His/-Leu/<br>-Trp with Agar (Takara)<br>in 500 mL ddH <sub>2</sub> O<br>autoklavieren für 15 min |
| -LT               | 1 Beutel SD/-Leu/-TRP with<br>Agar (Takara)<br>in 500 mL ddH <sub>2</sub> O<br>autoklavieren für 15 min            |

### 2.1.12 Antikörper

#### 2.1.12.1 Primäre Antikörper

Tabelle 15: Primäre Antikörper

| Antigen           | Ursprung | WB Verdün-<br>nung | IF Verdün-<br>nung | Hersteller                                       | Code    |
|-------------------|----------|--------------------|--------------------|--|---------|
| $\alpha$ -Tubulin | Mouse    | 1:10.000           |                    | Sigma-Aldrich,<br>Deisenhofen                    | T5168   |
| $\beta$ -Actin    | Mouse    | 1:2.000            |                    | Abcam,<br>Cambridge (GB)                         | Ab8226  |
| Npm1<br>(B23)     | Mouse    |                    | 1:300              | Abcam,<br>Cambridge (GB)                         | Ab10530 |
| C-Myc-<br>Tag     | Mouse    | 1:2.000            | 1:100              | Cell Signaling<br>Technology, Dan-<br>vers (USA) | #2276S  |
| HA-Tag            | Mouse    |                    | 1:100              | Covance, Prince-<br>ton (USA)                    | #901501 |
| MDM2              | Mouse    | 1:400              |                    | Santa Cruz, Hei-<br>delberg                      | Sc-965  |
| p53               | Mouse    | 1:500, 1:400       |                    | Santa Cruz, Hei-<br>delberg                      | Sc-126  |



| <b>Antigen</b> | <b>Ursprung</b> | <b>WB Verdün-<br/>nung</b> | <b>IF Verdün-<br/>nung</b> | <b>Hersteller</b>                             | <b>Code</b> |
|----------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|---|-------------|
| RPS27A         | Rabbit          | 1:400                      | 1:50                       | OriGene Techno-<br>logies, Rockville<br>(USA) | TA342609    |
|                | Rabbit          | 1:400                      |                            | Addgene, Water-<br>house (USA)                | A2027       |
| ZMAT5          | Rabbit          | 1:400                      | 1:100                      | Invitrogen, Karls-<br>ruhe                    | #PA5-52123  |

### 2.1.12.2 Sekundäre Antikörper

**Tabelle 16: Sekundäre Antikörper**

| <b>Antigen</b> | <b>Ursprung</b> | <b>Konjugat</b>               | <b>WB Ver-<br/>dünnung</b> | <b>IF Verdün-<br/>nung</b> | <b>Hersteller</b>                    | <b>Code</b> |
|----------------|-----------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-------------|
| Mouse          | Goat            | Alexa<br>Fluor®<br>488        |                            | 1:800                      | Invitrogen,<br>Karlsruhe             | A11001      |
|                | Goat            | Alexa<br>Fluor®<br>546        |                            | 1:800                      | Invitrogen,<br>Karlsruhe             | A11003      |
| Rabbit         | Goat            | Peroxi-<br>dase-kon-<br>jugat | 1:10.000                   |                            | Sigma-Ald-<br>rich, Dei-<br>senhofen | A8275       |
|                | Goat            | Alexa<br>Fluor®<br>488        |                            | 1:800                      | Invitrogen,<br>Karlsruhe             | A11070      |
| Rabbit         | Sheep           | Cy3 Kon-<br>jugat             |                            | 1:800                      | Sigma-Ald-<br>rich, Dei-<br>senhofen | C2306       |

### 2.1.13 Synthetische Oligonukleotide

#### 2.1.13.1 Primer für Kontroll-PCR nach cDNA-Synthese

**Tabelle 17: Primer für Kontroll-PCR und cDNA-Synthese**

| Name  | Sequenz (5' → 3')      |
|-------|------------------------|
| TBP-F | AGCCTGCCACCTTACGCTCAG  |
| TBP-R | TGCTGCCTTTGTTGCTCTTCCA |

#### 2.1.13.1.1 Primer für Sequenzanalysen

**Tabelle 18: Primer für Sequenzanalysen**

| Name              | Sequenz (5' → 3')          |
|-------------------|----------------------------|
| MDM2-R1           | TTTGATCACTCCCACCTTCA       |
| MDM2-F2           | TGCCAAGCTTCTCTGTGAAA       |
| MDM2-R2           | CCTGATCCAACCAATCACCT       |
| MDM2-F3           | CGGATCTTGATGCTGGTGTA       |
| MDM2-R3           | TCCTCAACACATGACTCTCTGG     |
| MDM2-F4           | TCTGAGAAAGCCAAACTGGAA      |
| pGADT7-Seq-F      | TCGATGATGAAGATACCCACCAAACC |
| pGADT7-Seq-R      | AGATGGTGCACGATGCACAG       |
| pCMV-F            | CTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCT  |
| pCMV-R            | AAGCAATAGCATCACAAATTTTACA  |
| pGBKT7-Seq-R      | TTTTCGTTTAAAACCTAAGAGTC    |
| RPS27A-Wang2015-F | AGAAGAAGTCTTACACCACTCCC    |
| RPS27A-Wang2015-R | TGCCATAAACACCCCAGC         |
| seqZMAT5-Ex3-F    | CCCTCAGGAAGCATTTCAGTG      |
| seqZMAT5-Ex3-R    | GCCTCCCTCTCTTTTGATCC       |
| seqZMAT5-Ex4-F    | ACTTCCTGCCTCCTTTGGTG       |
| seqZMAT5-Ex4-R    | CTGGCCAGTCAGCTGGAG         |
| seqZMAT5-Ex5-F    | ATTCTGGGATCCCTCATCTG       |

| Name           | Sequenz (5' → 3')     |
|----------------|-----------------------|
| seqZMAT5-Ex5-R | GGGAGATAGGGAGGCATAGG  |
| seqZMAT5-Ex6-F | TGCTTTGTGAGAGGGTAGGG  |
| seqZMAT5-Ex6-R | TGGGCAGTTCATGGAGATTC  |
| seqZMAT5-Ex7-F | GCCTTCCAGAAAAGTCATGC  |
| SeqZMAT5-Ex7-R | GGCTTGGCTTCCTATTGTGAC |
| T7-Seq-F       | TAATACGACTCACTATAGGGC |

### 2.1.13.2 Primer für PCR

**Tabelle 19: Primer für PCR**

| Name           | Sequenz (5' → 3')                            |
|----------------|--|
| TBP-F          | AGCCTGCCACCTTACGCTCAG                        |
| TBP-R          | TGCTGCCITTGTTGCTCTTCCA                       |
| MDM2-NdeI-F    | AGGAGGACCTGCATATGATGTGCAATACCAACAT-<br>GTCTG |
| RPS27A-BamHI-R | CGAGCTCGATGGATCCCAGATCCTCTTCTGAGAT-<br>GAGT  |
| RPS27A-F       | GGCCAAGATCCAGGATAAAGG                        |
| RPS27A-R       | ATCAGAAGGGCACTCTCGAC                         |
| RPS27A-NdeI-F  | CAGATTACGCTCATATGATGCAGATTTTCGT-<br>GAAAACCT |

### 2.1.13.3 Primer für qPCR

**Tabelle 20: Primer für qPCR**

| Name   | Sequenz (5' → 3')        |
|--------|--------------------------|
| TBP-F  | AGCCTGCCACCTTACGCTCAG    |
| TBP-R  | TGCTGCCITTGTTGCTCTTCCA   |
| PBGD-F | GCAATGCGGCTGCAACGGCGGAGG |

| Name          | Sequenz (5' → 3')        |
|---------------|--------------------------|
| PBGD-R        | CCTGTGGTGGACATAGCAATGATT |
| SDHA-F        | GCTTGCGAGCTGCATTTG       |
| SDHA-R        | CATCTCCAGTTGTCTCTTCC     |
| FBRSL1_2-2F   | CATGAGCGGAAGGAGAAGTG     |
| FBRSL1_Ex3L-R | ACGCTGTCGTCGTCACTGTC     |
| FBRSL1_Del1R2 | GCCCAGGGTCCGGGAGTGC      |
| PPI-A-F       | GACTGAGTGGTTGGATGGCA     |
| PPI-A-R       | TCGAGTTGTCCACAGTCAGC     |
| PPI-B-F       | GCACAGGAGGAAAGAGCATC     |
| PPI-B-R       | TGAAGAACTGGGAGCCGTG      |
| RPL5-F        | TGGCCTGACAAATATGCTG      |
| RPL5-R        | ATAACCAGGGAATCGTTTGG     |
| RPL11-F       | CACCCAAGGAGGCTATTGAGG    |
| RPL11-R       | GTCTCGGCGGATGACAATGG     |
| RPL18a-F      | TTGTCTACTGTGGGCAGGTG     |
| RPL18a-R      | GTCGTGGAAGTCTTGACAG      |
| RPL36A-F      | AGCACCAACCCCATAAAGTG     |
| RPL36-R       | ACGCACTCAAGCCTTAGCAC     |
| RPL38         | AAGGACTTCCTGCTCACAGC     |
| RPL38         | GCAGGGACTGCTTCAGTTTC     |
| RPS7-F        | GTCGTCTTATCGCTCAGAG      |
| RPS7-R        | TGTCAGAGTACGGCTCCTG      |
| RPS27A-F      | GGCCAAGATCCAGGATAAGG     |
| RPS27A-R      | ATCAGAAGGGCACTCTCGAC     |
| RPS28-F       | CGTGTGCAGCCTATCAAGC      |
| RPS28-R       | CTCGCTCTGACTCCAAAAGG     |
| ZMAT5-F       | CTCAAGGCCAAGAAGGTCTG     |
| ZMAT5-R       | GTGGTTCTGATGGGTTTCAGC    |

## 2.1.13.4 Oligonukleotide für siRNA

Tabelle 21: Oligonukleotide für siRNA

| Name        | Sequenz (5' → 3')    |
|-------------|----------------------|
| ZMAT5-si-1  | GCCCGGUUCCUGCUACGCC  |
| ZMAT5-si-2  | GGCUCCGAGACCAUCUGCC  |
| Scramble-si | AAGCGCGCUUUGUAGGAUUC |

## 2.1.14 Enzyme

## 2.1.14.1 Restriktionsenzyme und Puffer

Tabelle 22: Restriktionsenzyme und Puffer

| Enzyme/Puffer                       | Quelle                              |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| BamHI                               | Invitrogen, Karlsruhe               |
| NdeI                                | New England Biolabs, Frankfurt a.M. |
| CutSmart™ Restriction Enzyme Buffer | New England Biolabs, Frankfurt a.M. |

## 2.1.15 Molekulargewichtstandards

Tabelle 23: Molekulargewichtstandards

| Anwendung | Produktname                                | Hersteller                              |
|-----------|--|---|
| Protein   | PageRuler™ Plus Prestrained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |
|           | SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard        | Life Technologies™, Carlsbad (USA)      |
| DNA       | 1 kb Plus DNA Ladder                       | Invitrogen, Karlsruhe                   |
|           | 100 bp DNA Ladder                          | Invitrogen, Karlsruhe                   |

### 2.1.16 Patientenprobe

Die genomische DNA der Patientenproben wurde von dem Institut für Humangenetik (Universitätsmedizin Göttingen) zur Verfügung gestellt. Die Ethikkommission der Universität Göttingen hat die ethische Zustimmung gegeben.

### 2.1.17 Datenbank / Online-Tools / Programme

**Tabelle 24: Datenbanken, Online-Tools, Programme**

| <b>Datenbank / Online-Tool / Programm</b>  | <b>Firma</b>   |
|--|--|
| AlphaView™-FluorChem Q                     | PorteinSimple, Santa Clara (USA)   |
| blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi           | National Center For Biotechnology Information, Bethesda (USA)  |
| ensembl.org/index.html                     | Elixir, Hinxton (UK)   |
| FV10-ASW1.7 software                       | Olympus, Hamburg   |
| genome.ucsc.edu/                           | UCSC Genomics Institute, Santa Cruz (USA)  |
| Gen5™                                      | BioTek, Bad Friedrichshall   |
| Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) v4.0.3 | Broad Institute, Cambridge (USA)   |
| GraphPad PRISM 9.1.0.221                   | Graphpad Software, Inc.  |
| ImageJ v1.53c                              | Laboratory for optical and Computational Instrumentation (LOCI) of the University of Wisconsin-Madison (USA) |
| Microsoft Office365®                       | Microsoft Corporation, Redmond (USA)   |
| OMIM®                                      | Johns Hopkins University, Baltimore (USA)  |
| Primer3web 4.1.0                           | Elicir, Hinxton (UK)   |
| Proteinatlas.org/                          |  |
| SnapGene® 4.3.11                           | GSL Biotech LLC, Chicago (USA)   |

### 2.1.18 Statistische Analyse

Zur Berechnung der Signifikanz der Ergebnisse der qRT-PCR Analysen wurden der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test oder der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test verwendet. Der berechnete  $p$ -Wert zeigt die Wahrscheinlichkeit an, dass die Ergebnisse sich nicht unterscheiden. Ein  $p$ -Wert größer als  $p > 0,05$  bedeutet nicht signifikant, kleiner als \*  $p \leq 0,05$  bedeutet statistisch signifikant, \*\*  $p \leq 0,01$  bedeutet sehr signifikant, \*\*\*  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  bedeuten extrem signifikant.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Isolierung von Nukleinsäuren

##### 2.2.1.1.1 Miniaufbereitung von Plasmid-DNA

Es wurden kleine Mengen von Plasmid-DNA mithilfe der selbst hergestellten Puffer (P1/P2/P3) verwendet. 7 mL LB Medium wurden mit Ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) bzw. Kanamycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) versetzt und mit *E. coli* DH5 $\alpha$  kompetenten Zellen beimpft. Die Suspension wurde ÜN bei 37°C und moderatem Schütteln inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden 500  $\mu\text{L}$  zur Herstellung eines Glycerinstocks verwendet (Kapitel 2.2.1.2). Die Suspension wurde bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. 120  $\mu\text{L}$  P1 Puffer wurden verwendet, um das Zellpellet zu resuspendieren und in ein 1,5 mL Reaktionsröhrchen zu überführen. Es wurden 120  $\mu\text{L}$  P2 Puffer hinzugefügt und die Röhrchen 10-mal zum Mischen invertiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur (RT) wurden 120  $\mu\text{L}$  P3 Puffer beigegeben und die Röhrchen zum Mischen 10-mal invertiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsröhrchen überführt. Die DNA wurde präzipitiert, indem 360  $\mu\text{L}$  100% EtOH (gelagert bei -20°C) hinzugefügt und die Röhrchen zum Mischen 10-mal invertiert wurden. Die Probe wurde bei maximaler Geschwindigkeit für 30 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Waschen des DNA-Pellets wurden 800  $\mu\text{L}$  70% EtOH hinzugegeben und bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min bei RT zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das DNA Pellet in einer angemessenen Menge Ampuwa® (50 – 80 $\mu\text{L}$ ) resuspendiert. Schließlich wurde das geöffnete Röhrchen bei 60°C für 5 min inkubiert, um den restlichen EtOH zu beseitigen. Die Plasmid DNA wurde bei -20°C gelagert.

#### 2.2.1.1.2 Midiaufbereitung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung großer Mengen an Plasmid-DNA wurde das PureLink™ Fast Low-Endotoxin Midi Plasmid Purification Kit nach Herstellerangaben angewendet. 50 mL LB-Medium mit Antibiotika wurden mit *E. coli* DH5 $\alpha$  kompetenten Zellen beimpft und ÜN bei 37°C und moderatem Schütteln inkubiert. Am Folgetag wurden 500  $\mu$ L der Kultur für einen Glycerinstock (Kapitel 2.2.1.2) verwendet. Die Übernachtskultur wurde für 15 min bei 3.500  $\times g$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 8 mL Resuspension Buffer resuspendiert. 8 mL Lysis Buffer wurden zu der Mischung dazu gegeben und durch sechsmaliges Invertieren gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 3 min wurden 8 mL Precipitation Buffer hinzugegeben und durch sechsmaliges Invertieren vermischt. Das Zellysate wurde auf einen Syringe Filter überführt und für 5 min bei RT inkubiert. Mithilfe einer Spritze wurde die Mischung in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach dem zugeben von 8 L Binding Buffer wurde die Mischung 10-mal invertiert und in zwei Schritten auf eine Säule übertragen. Im Anschluss wurde die Probe für 2 min bei 500  $\times g$  zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die gebundene DNA wurde mit 800  $\mu$ L Wash Buffer 1 und zweimal mit 800  $\mu$ L Wash Buffer 3 gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die Probe für 2 min bei 500  $\times g$  zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Säule auf ein neues 2 mL Reaktionsröhrchen gesetzt, für 1 min bei 11.000  $\times g$  zentrifugiert und die Säule auf ein neues 1,5 mL Reaktionsröhrchen gesetzt. Es wurden 100  $\mu$ L bei 50°C vorgewärmter Elution Buffer auf die Probe gegeben, um die Plasmid-DNA auszuwaschen. Die Probe wurde für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurde die Probe für 1 min bei 1.000  $\times g$  zentrifugiert. Die extrahierte Plasmid-DNA wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.1.1.3 Extraktion von RNA aus kultivierten Zellen

Mithilfe des NucleoSpin® RNA Kits wurde RNA nach den Herstellerangaben isoliert. Durch vortexen wurde ein frisches oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagertes Zellpellet in 350  $\mu$ L RA1 Puffer und 3,5  $\mu$ L  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) resuspendiert. Anschließend wurde das Lysat durch den NucleoSpin® Filter in ein neues 2 mL Sammelröhrchen filtriert und für 1 min bei 11.000  $\times g$  zentrifugiert. Der Filter wurde entleert, 350  $\mu$ L 70% EtOH hinzugefügt und die Probe durch mindestens fünfmaliges hoch und herunter pipettieren gemischt. Eine NucleoSpin® Säule wurde mit dem Lysat beladen und für 30 s bei 11.000  $\times g$  zentrifugiert, um die RNA zu binden. Der Durchfluss wurde verworfen und es wurden 350  $\mu$ L Membrane Desalting Buffer (MDB) auf die Säule gegeben. Durch Zentrifugieren für 1 min bei 11.000  $\times g$  wurde die Membran getrocknet. In einem Reaktionsröhrchen wurde eine DNase Reaktionsmischung vorbereitet, bestehend aus 10  $\mu$ L konstituierter DNase und 90  $\mu$ L Reaktionspuffer. 95  $\mu$ L dieser DNase Reaktionsmischung wurde direkt auf die Membran der Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 200  $\mu$ L RAW2 Puffer



hinzugegeben und die Säule für 30 s bei  $11,000 \times g$  zentrifugiert, um die Membran zu waschen und zu trocknen. Nach dem Entfernen des Durchflusses wurde 600  $\mu\text{L}$  RA3 Puffer hinzugefügt und die Säule wurde wieder für 30 s bei  $11,000 \times g$  zentrifugiert. Als letzter Waschschrift wurden 250  $\mu\text{L}$  RA3 Puffer hinzugefügt und die Säule wurde für 2 min bei  $11,000 \times g$  zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Säule auf ein neues 1,5 mL Reaktionsröhrchen überführt und die RNA wurde mit 30  $\mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser und durch Zentrifugieren für 1 min bei  $11,000 \times g$  herausgelöst. Durch photometrische Messung (Kapitel 2.2.1.1.4) wurde die RNA Konzentration gemessen und mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.1.4) kontrolliert.

#### 2.2.1.1.4 Bestimmung der Nukleinsäure Konzentration

Nukleinsäure Konzentrationen wurden durch das Messen von UV-Licht Absorptionsmessungen bei 260 nm ermittelt. Dazu wurde der NanoDrop® 2000c Spektrophotometer laut den Herstellerangaben verwendet. Durch die Absorptionsverhältnisse  $A_{260/280}$  und  $A_{260/230}$  wurden Kontaminationen mit Salz oder Ethanol abgeschätzt.

#### 2.2.1.2 Erstellung eines Glycerinstocks

Um transformierte Bakterienstämme zu lagern, wurden zu 500  $\mu\text{L}$  einer Bakterienkultur-Suspension 320  $\mu\text{L}$  50% Glycerin hinzugefügt.

#### 2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion

##### 2.2.1.3.1 Amplifizierung von DNA

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Standardmethode, um eine spezifische DNA-Sequenz *in vitro* exponentiell zu amplifizieren. Bei  $94^\circ\text{C}$  wird das doppelsträngige DNA-Template denaturiert und Primer hybridisieren mit der einsträngigen DNA bei einer niedrigeren Temperatur (Annealing). Primer sind kurze Oligonukleotide, welche komplementär zu einer bestimmten Region des Template sind. Bei der Elongation werden die gebundenen Oligonukleotide durch eine Polymerase verlängert. Um diesen neuen, komplementären DNA-Strang zu synthetisieren, werden Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) verwendet. Aus der periodischen Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Elongation folgt ein exponentielles Wachstum von spezifischen DNA-Fragmenten.

## 2.2.1.3.1.1 Standard PCR

Die Standard PCR wurde mit Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase nach den Herstellerangaben durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde, wie in Tabelle 25 angegeben, in PCR-Reaktionsröhrchen pipettiert.

Tabelle 25: Pipettierschema für Standard PCR

| Reagenz                                   | Volumen            |
|---|--------------------|
| Q5® Reaktionspuffer (5 ×)                 | 5 µL               |
| Q5® High GC Enhancer (5 ×)                | 5 µL               |
| dNTPs (10 mM)                             | 0,5 µL             |
| Primer vorwärts (10 mM)                   | 1 µL               |
| Primer rückwärts (10 mM)                  | 1 µL               |
| Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µL) | 0,25 µL            |
| DNA                                       | Variabel           |
| Ampuwa®                                   | bis 25 µL ergänzen |
| Total                                     | 25 µL              |

Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler mit folgendem Standard PCR Programm inkubiert (Tabelle 26):

Tabelle 26: Thermocycler-Programm für Standard PCR

| Schritt           | Temperatur | Zeit  | Wiederholungen |
|-------------------|------------|-------|----------------|
| Aktivierung       | 98°C       | 30 s  | 1              |
| Denaturierung     | 95°C       | 15 s  | 40             |
| Annealing         | 58°C       | 30 s  |                |
| Elongation        | 72°C       | 30 s  |                |
| Finale Elongation | 72°C       | 120 s | 1              |
| Lagerung          | 4°C        | ∞     |                |

Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.1.4) kontrolliert. Die Lagerung des PCR-Produkts erfolgte bei  $-4^{\circ}\text{C}$  über kurze und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über lange Zeiträume.

#### 2.2.1.3.1.2 Touchdown PCR

Bei der Touchdown PCR waren die Komponenten des Reaktionsansatzes prinzipiell die gleichen wie bei der Standard PCR (Kapitel 2.2.1.3.1.1).

Je nach Folgeversuch wurden die jeweiligen Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Touchdown PCR Programmen in einem Thermocycler inkubiert. Die entsprechenden Programme waren wie folgt:

**Tabelle 27: Thermocycler-Programm für Touchdown PCR zur Amplifizierung von cDNA G6651 für Sequenzanalyse**

| Schritt                | Temperatur                               | Zeit     | Wiederholungen |
|------------------------|--|----------|----------------|
| Initiale Denaturierung | $98^{\circ}\text{C}$                     | 30 s     | 1              |
| Denaturierung          | $98^{\circ}\text{C}$                     | 10 s     | 5              |
| Annealing              | $65^{\circ}\text{C} - 1^{\circ}\text{C}$ | 30 s     |                |
| Elongation             | $72^{\circ}\text{C}$                     | 20 s     |                |
| Denaturierung          | $98^{\circ}\text{C}$                     | 10 s     | 35             |
| Annealing              | $60^{\circ}\text{C}$                     | 30 s     |                |
| Elongation             | $72^{\circ}\text{C}$                     | 20 s     |                |
| Finale Elongation      | $72^{\circ}\text{C}$                     | 120 s    | 1              |
| Lagerung               | $4^{\circ}\text{C}$                      | $\infty$ |                |

Touchdown PCR zur Amplifizierung von gDNA 51836 zur Sequenzanalyse:

**Tabelle 28: Thermocycler-Programm für Touchdown PCR zur Amplifizierung von gDNA 51836 zur Sequenzanalyse**

| Schritt                | Temperatur | Zeit  | Wiederholungen |
|------------------------|------------|-------|----------------|
| Initiale Denaturierung | 98°C       | 30 s  | 1              |
| Denaturierung          | 98°C       | 10 s  | 8              |
| Annealing              | 63°C –1°C  | 30 s  |                |
| Elongation             | 72°C       | 20 s  |                |
| Denaturierung          | 98°C       | 10 s  | 32             |
| Annealing              | 55°C       | 30 s  |                |
| Elongation             | 72°C       | 20 s  |                |
| Finale Elongation      | 72°C       | 120 s | 1              |
| Lagerung               | 4°C        | ∞     |                |

**Tabelle 29: Thermocycler-Programm für Touchdown PCR zur Herstellung der Inserts in Vorbereitung einer Transformation kompetenter Zellen**

| Schritt                | Temperatur | Zeit  | Wiederholungen |
|------------------------|------------|-------|----------------|
| Initiale Denaturierung | 98°C       | 30 s  | 1              |
| Denaturierung          | 98°C       | 10 s  | 6              |
| Annealing              | 64°C –1°C  | 30 s  |                |
| Elongation             | 72°C       | 60 s  |                |
| Denaturierung          | 98°C       | 10 s  | 34             |
| Annealing              | 58°C       | 30 s  |                |
| Elongation             | 72°C       | 60 s  |                |
| Finale Elongation      | 72°C       | 120 s | 1              |
| Lagerung               | 4°C        | ∞     |                |

Nach der Beendigung der Inkubation im Thermocycler wurden 4 – 5  $\mu\text{L}$  Ladepuffer zu der Reaktionsmischung hinzugefügt und auf ein 2% Agarose-Gel aufgetragen, ebenso wie 4  $\mu\text{L}$  eines 100 bp Markers (Tabelle 23) (Kapitel 2.2.1.4)

### 2.2.1.3.2 Reverse Transkription

Für die Synthese komplementärer DNA (cDNA) wurde zuerst ein Reaktionsgemisch wie in Tabelle 30 beschrieben pipettiert:

**Tabelle 30: Pipettierschema für reverse Transkription**

| Reagenz         | Volumen                       |
|-----------------|-------------------------------|
| RNA             | 500 ng/ $\mu\text{L}$         |
| Random Hexamers | 1 $\mu\text{L}$               |
| dNTPs           | 1 $\mu\text{L}$               |
| Ampuwa®         | Ergänzen bis 13 $\mu\text{L}$ |
| Total           | 13 $\mu\text{L}$              |

Dieser Ansatz wurde in einem Thermocycler bei 65°C für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 2  $\mu\text{L}$  von 0,1 M DTT und 4  $\mu\text{L}$  von 5  $\times$  First-Strand Buffer hinzugefügt und mit der Pipette vermischt. Nach der darauffolgenden Inkubation für 2 min bei 42°C wurde 1  $\mu\text{L}$  von SuperScript II Reverse Transkriptase beigegeben. Die Lösung wurde durch Pipettieren gemischt und für 50 min bei 42°C inkubiert. Um die Reaktion durch Enzyminaktivierung zu stoppen, folgte eine Inkubation für 15 min bei 70°C. Bei 5 min auf Eis wurde die amplifizierte cDNA abgekühlt und schließlich bei –20°C gelagert.

Zur Überprüfung der Effizienz der cDNA Synthese wurde eine PCR Analyse mit dem Housekeeping Gen *TATA-Box Bindeprotein (TBP)* und SYBR® Green Mix von QuantiTect SYBR® Green PCR Kit durchgeführt.

Der Reaktionsansatz war wie in folgender Tabelle 31:

**Tabelle 31: Pipettierschema für Kontroll-PCR nach cDNA Synthese**

| Reagenz                              | Volumen     |
|--------------------------------------|-------------|
| cDNA (1:10)                          | 2,5 $\mu$ L |
| Primer vorwärts + rückwärts (100 nM) | 2,5 $\mu$ L |
| SYBR® Green Mix                      | 5 $\mu$ L   |
| Total                                | 10 $\mu$ L  |

Der Ansatz wurde in einem Thermocycler, wie in der Tabelle 32 dargestellt, inkubiert:

**Tabelle 32: Thermocycler-Programm für Kontroll-PCR nach cDNA Synthese**

| Schritt       | Temperatur | Zeit     | Wiederholungen |
|---------------|------------|----------|----------------|
| Aktivierung   | 95°C       | 15 min   | 1              |
| Denaturierung | 95°C       | 15 s     | 40             |
| Annealing     | 60°C       | 30 s     |                |
| Elongation    | 72°C       | 30 s     |                |
| Lagerung      | 4°C        | $\infty$ |                |

Das Ergebnis der PCR wurde schließlich mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.1.4) kontrolliert.

### 2.2.1.3.3 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) wurde zur Quantifizierung des relativen mRNA Expressionslevels zu untersuchender Gene durchgeführt. Mithilfe der Interkalation des fluoreszierenden Farbstoffs SYBR® Green und doppelsträngiger DNA wurden die PCR Produkte nach jedem PCR Zyklus bestimmt. Dafür wurde das 7900HT Fast Real-Time PCR System verwendet. Dabei korreliert die Menge des PCR Produkts mit dem detektierten Fluoreszenzsignal. Während der Exponentialphase der PCR wurde ein Schwellenwert ( $C_T$ -Wert) bestimmt, welcher den PCR Zyklus mit den optimalen PCR Bedingungen definiert. Dieser  $C_T$ -Wert wurde für die weiteren Rechnungen zur Quantifizierung mithilfe der SDS 2.2.1 Software und Excel (Microsoft®Office365) verwendet.

Vor der qRT-PCR Analyse wurde durch die Kombination gleicher Mengen verschiedener cDNA-Proben eine Mischung dieser erstellt. Anschließend wurde eine serielle Verdünnung (1/5, 1/10, 1/20, 1/40 und 0) dieses cDNA-Pools mit Ampuwa® vorbereitet. Dies diente zur Erstellung einer Standardkurve für jedes Primerpaar. Der Reaktionsansatz für die qRT-PCR wurde wie in Tabelle 31 abgebildet pipettiert. Dafür wurde mit Ampuwa® 1:10 verdünnte cDNA verwendet, sowie eine Lösung aus Vorwärts- und Rückwärtsprimern (100 nM) und SYBR® Green. Zur Normierung wurde die mRNA Expression von verschiedenen Housekeeping Genen *SDHA*, *PBGD*, *PPI-A*, *PPI-B* und *TBP* verwendet.

Die Reaktionen wurden in dreifacher Ausfertigung mit einer entsprechenden Standardkurve auf einer 384-well Platte pipettiert. Es wurde das in Tabelle 33 beschriebene Programm verwendet:

**Tabelle 33: Thermocycler-Programm für qRT-PCR**

| Schritt       | Temperatur | Zeit   | Wiederholungen |
|---------------|------------|--------|----------------|
| Aktivierung   | 98°C       | 15 min | 1              |
| Denaturierung | 98°C       | 15 s   | 40             |
| Annealing     | 58°C       | 30 s   |                |
| Elongation    | 72°C       | 30 s   |                |
| Elongation    | 72°C       | 120 s  | 1              |
| Dissoziierung | 95°C       | 15 s   | 1              |
|               | 60°C       | 15 s   |                |
|               | 95°C       | 15 s   |                |

Im Anschluss an das qRT-PCR Programm wurde die relative Genexpression kalkuliert. Dafür wurde entweder die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode oder die Standardkurven-Methode mit den jeweiligen Formeln verwendet:

$\Delta\Delta C_t$ -Methode:

$$\Delta C_t = C_{t(\text{zu bestimmendes Gen})} - C_{t(\text{Housekeeping Gen})}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t(\text{behandelte Probe})} - C_{t(\text{Referenzprobe})}$$

Standardkurven-Methode:

$$A = \frac{(C_t - y)}{m}$$

$$c_{(\text{Gen})} = 10^A$$

$$B = \frac{c_{(\text{Zielgen})}}{c_{(\text{Housekeeping Gen})}}$$

$$C = \frac{B}{\text{Mittelwert Kontrolle}}$$

#### 2.2.1.3.4 Sequenzanalysen

Die Sequenzen bestimmter DNA-Fragmente wurden mithilfe einer modifizierten Methode der Sanger-Sequenzierung bestimmt (Sanger et al. 1977). Statt des Gebrauchs von Desoxynukleotiden (dNTPs) wurden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) für die PCR verwendet, welche zu Strangbrüchen führen. Daraufhin wurden die DNA-Fragmente ihrer Länge nach separiert. Mittels Kapillarelektrophorese wurden die Nukleotide schließlich anhand des detektierten Farbstoffs bestimmt.

Das hergestellte PCR Produkt oder Plasmid wurde vor der Sequenzierung aufgereinigt. Dies wurde mithilfe des gebrauchsfertigen Reaktionssystems MSB® Spin PCRapace Kit (Invitex, Berlin) nach Herstelleranleitung durchgeführt.

Zur Sequenzanalyse wurde das BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Herstellerangaben verwendet. Der Reaktionsansatz wurde wie in Tabelle 34 angegeben pipettiert.

**Tabelle 34: Pipettierschema für Sequenzanalyse**

| Reagenz                                | Volumen            |
|--|--------------------|
| Primer vorwärts oder rückwärts (10 nM) | 1 µL               |
| BigDye®                                | 1 µL               |
| Puffer (5 ×)                           | 2 µL               |
| DNA                                    | 1/10 ng pro bp     |
| Ampuwa®                                | Bis 10 µL ergänzen |
| Total                                  | 10 µL              |



Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler bei dem in Tabelle 35 angegebenen Programm inkubiert.

**Tabelle 35: Thermocycler-Programm für Sequenzanalysen**

| Schritt       | Temperatur | Zeit  | Wiederholungen |
|---------------|------------|-------|----------------|
| Denaturierung | 95°C       | 20 s  | 30             |
| Annealing     | 60°C       | 120 s |                |
| Lagerung      | 4°C        | ∞     |                |

Im Anschluss wurden dem PCR Produkt 10 µL Ampuwa® hinzugefügt. Die Sequenzanalyse wurde von der DNA-Diagnostik des Instituts für Humangenetik (Universitätsmedizin, Göttingen) durchgeführt.

#### 2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophoresen von DNA und RNA

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Separierung von DNA- und RNA-Fragmenten durchgeführt in Abhängigkeit ihrer Größe. Je nach erwarteter Größe der Fragmente wurden Gele mit Agarosekonzentrationen von 1 bis 2% vorbereitet. Die entsprechende Menge an Agarose wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle in 0,5 × Tris-Borat EDTA (TBE) Puffer gelöst. Der Lösung wurde ein Tropfen Ethidiumbromid zur späteren Visualisierung der DNA unter UV-Licht hinzugefügt. Diese Mischung wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem vollständigen Aushärten des Gels wurden 1 – 6 µL der DNA- bzw. RNA-Probe mit 3 – 6 µL Ladepuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden 6 µL eines angemessenen DNA Längenstandards (Tabelle 23) auf das Gel getragen, um die Länge der DNA- bzw. RNA-Fragmente bestimmen zu können. Die Auftrennung der DNA- bzw. RNA-Fragmente erfolgte in einem elektrischen Feld von 130 V und wurden anschließend mithilfe des UV-Lichttischs ECX-F20 M (Peqlab, Erlangen) sichtbar gemacht.

#### 2.2.1.5 Klonierungstechniken

##### 2.2.1.5.1 Restriktionsverdau von DNA-Plasmiden

Die Plasmid-DNA wurde mithilfe der Restriktionsendonukleasen BamHI und NdeI enzymatisch gespalten. Der Reaktionsansatz wurde wie in folgender Tabelle 36 angegeben pipettiert:

**Tabelle 36: Reaktionsansatz für Restriktionsverdau von DNA-Plasmiden**

| Reagenz                 | Volumen            |
|-------------------------|--------------------|
| Plasmid                 | 10 µg              |
| Enzym 1                 | 2 µL               |
| Enzym 2                 | 2 µL               |
| CutSmart® Puffer (10 ×) | 4 µL               |
| Ampuwa®                 | Bis 40 µL ergänzen |
| Total                   | 40 µL              |

Der Reaktionsansatz wurde für 3 h bei 37°C inkubiert. In Vorbereitung auf die Gel-Extraktion zur Isolierung der Plasmid-DNA (Kapitel 2.2.1.5.2) wurde der vollständige Verdau der Plasmid DNA mit 10 µL Ladepuffer (Tabelle 5, Tabelle 4) auf ein großtaschiges 1% Agarose-Gel aufgetragen (Kapitel 2.2.1.4). Anschließend wurde eine Gel-Extraktion (Kapitel 2.2.1.5.2) durchgeführt.

#### 2.2.1.5.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

##### 2.2.1.5.2.1 Aufreinigung von Vektoren für In-Fusion®

Zur Gel-Extraktion zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Reaktionssystem nach Herstellerangaben verwendet. Vorbereitend wurde das Produkt des Restriktionsverdaus unter Zuhilfenahme eines Transilluminators mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel (Kapitel 2.2.1.4) ausgeschnitten und das Gelstück in ein 1,5 mL Reaktionsröhrchen überführt. Nachdem das Gelstück gewogen wurde, wurden 300 µL NTI Puffer pro 100 mg Gel hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 12 min bei 50°C und maximaler Schüttelfrequenz inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf eine Säule überführt und für 30 s bei 11.000 × g und RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 100 µL NT3 Puffer hinzugegeben. Darauffolgend wurde die Probe für 30 s bei 11.000 × g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und erneut für 1 min bei 11.000 × g zentrifugiert. Dann wurde die Säule auf ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß gesetzt und 20 µL NE Puffer hinzugefügt. Nach einer Inkubation bei 50°C für 5 min wurde das Reaktionsröhrchen für 1 min bei 11.000 × g zentrifugiert. Danach wurden 10 µL NE Puffer hinzugefügt und die Probe für 3 min bei 70°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 1 min bei 11.000 × g wurde die Konzentration mittels des NanoDrop® 2000c Photometers (Kapitel 2.2.1.1.4) bestimmt.

#### 2.2.1.5.2.2 Aufreinigung von Inserts für In-Fusion®

Zur Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarose-Gel (Kapitel 2.2.1.4) wurde das QIAquick® Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die DNA-Fragmente wurden mithilfe eines 1% Agarose-Gels aufgetrennt. Anschließend wurden bestimmte DNA-Fragmente mithilfe eines Skalpellens aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Das Gel-Stück wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, gewogen und in der dreifachen Menge QG Puffer gelöst. Daraufhin wurde die Probe für 10 min bei 50°C in einem Thermomixer bei maximaler  $\times g$  inkubiert. Als nächstes wurde die einfache Menge Isopropanol hinzugefügt und die Mischung auf eine Säule übertragen. Das Reaktionsröhrchen wurde für 1 min bei 16.000  $\times g$  zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurden 500  $\mu\text{L}$  QG Puffer hinzugefügt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 16.000  $\times g$  für 1 min, wurde der Durchfluss verworfen und 750  $\mu\text{L}$  PE Puffer hinzugefügt. Die Mischung wurde für 5 min bei RT inkubiert und dann bei 16.000  $\times g$  für 1 min zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, wurde erneut für 1 min bei 16.000  $\times g$  zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule auf ein neues Reaktionsröhrchen gesetzt und 20  $\mu\text{L}$  Ampuwa® hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 2 min bei RT wurde die DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 13.000  $\times g$  aus der Säule eluiert. Die Nukleinsäure-Konzentration des Extrakts wurde anhand des NanoDrop® 2000c Photometers (Kapitel 2.2.1.1.4) bestimmt.

#### 2.2.1.5.3 Klonierung von DNA-Fragmenten mittels In-Fusion® HD Cloning Kit

Um DNA-Fragmente zu klonieren wurde das In-Fusion® HD Cloning Kit nach Herstellerangaben verwendet. Für die In-Fusion® wurden der linearisierte Vektor (Kapitel 2.2.1.5.1), die aufgereinigten PCR-Fragmente (Kapitel 2.2.1.5.2) und 2  $\mu\text{L}$  des 5  $\times$  In-Fusion® HD Enzym Vormischung mit Ampuwa® auf ein gesamtes Reaktionsvolumen von 10  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Die Reaktionsmischung wurde für 15 min bei 37°C und dann für weitere 15 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden 25  $\mu\text{L}$  TE Puffer hinzugefügt. 10  $\mu\text{L}$  der Reaktionsmischung wurden mit *E. coli* DH5 $\alpha$  kompetenten Zellen transformiert (Kapitel 2.2.1.5.4).

#### 2.2.1.5.4 Transformation kompetenter Zellen

Für die Transformation kompetenter Zellen mit der In-Fusion® Reaktionsmischung wurden 50  $\mu\text{L}$  DH5 $\alpha$ -kompetente Zellen aufgetaut und mit 10  $\mu\text{L}$  der Reaktionsmischung versetzt. Die Mischung wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend ein Hitzeschock für 30 s bei 42°C durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 2 min auf Eis gestellt. Dann wurden 200  $\mu\text{L}$  S.O.C. Medium für 45 min bei 37°C und moderatem Schütteln inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde auf je einer Agarplatten mit LB Medium mit angemessenem Antibiotikum bei 37°C ÜN inkubiert.

## 2.2.2 Methoden der Proteinmanipulation

### 2.2.2.1 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

#### 2.2.2.1.1 Pelletieren von eukaryotischen Zellen mittels Trypsinierung

Zur Gewinnung eines Zellpellets zur späteren Extraktion eines Komplettlysats (Kapitel 2.2.2.1.2) wurden die eukaryotischen Zellen einmal mit DPBS gewaschen und mit einer angemessenen Menge von TrypLE™ Express für 4 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von den Zellkulturflaschen gelöst und die dreifache Menge von neuem Zellkulturmedium hinzugefügt, was die proteolytische Aktivität von TrypLE™ Express stoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL Falcon überführt und für 5 min bei  $1.000 \times g$  zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet mit 1 mL DPBS gewaschen und in ein 1,5 mL Reaktionsröhrchen überführt. Dieses wurde für 5 min bei  $1.000 \times g$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Es wurde dann zur Extraktion von Komplettlysat (Kapitel 2.2.2.1.2) verwendet.

#### 2.2.2.1.2 Proteinextraktion aus Zellpellets als Komplettlysat

Zur Proteinextraktion als Komplettlysat wurden die eukaryotischen Zellen einmal mit DPBS gewaschen und mit einer angemessenen Menge von TrypLE™ Express für 4 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von den Zellkulturflaschen gelöst und die dreifache Menge von neuem Zellkulturmedium hinzugefügt, was die proteolytische Aktivität von TrypLE™ Express stoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL Falcon überführt und für 5 min bei  $1.000 \times g$  zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet mit 1 mL DPBS gewaschen und in ein 1,5 mL Reaktionsröhrchen überführt. Dieses wurde für 5 min bei  $1.000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 50 – 300  $\mu\text{L}$  modifizierter RIPA Puffer wurden hinzugefügt (Tabelle 5). Das Zellpellet wurde vorsichtig resuspendiert und bei 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Reaktionsröhrchen für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das extrahierte Protein befindet sich im Überstand, welcher in ein neues 1,5 mL Reaktionsröhrchen überführt wurde. Mithilfe des Bradford Assays (Kapitel 2.2.2.2) wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Das isolierte Protein wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.2.1.3 Herstellung von Direktlysat eukaryotischer Zellen

Zur Herstellung von Direktlysat wurde das Medium, in dem die Zellen in T25 Zellkulturflaschen gewachsen sind, abgesaugt. Die Zellen wurden mit 3 mL DPBS gewaschen, welches dann sehr gründlich abgesaugt wurde. Anschließend wurden 100  $\mu\text{L}$  modifiziertes RIPA zur Proteinisolierung hinzugefügt und für 5 min bei RT geschwenkt. Anschließend wurden die

Zellen durch Kratzen mit einem Schaber von dem Boden der Zellflasche gelöst und in ein 1,5 mL Reaktionsröhrchen überführt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde die Probe für 20 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford Assay (Kapitel 2.2.2.2) bestimmt. Das Protein wurde bei -20°C gelagert.

#### 2.2.2.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Die verwendete Lösung Roti®-Nanoquant (5 ×) besteht aus Coomassie Brilliant Blue Farbstoff. Dieses besitzt die Eigenschaft unspezifische Proteine in einer sauren Lösung zu binden, welches zu einem Shift seiner Absorption von 465 nm zu 595 nm führt.

Um Standardproteinkonzentrationen für eine Kalibrierungskurve zu erstellen, wurde eine Bovine Serum Albumin Standard Ampulle gelöst. Durch Ableitung von der Kalibrierungskurve wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Dafür wurde 5 × Roti®-Nanoquant mit ddH<sub>2</sub>O auf eine 1 × Konzentration verdünnt. So wurde es bei 4°C für drei Monate gelagert. Die Proteinprobe wurde in einem Verhältnis von 1:100 mit Ampuwa® verdünnt. Von dieser Probe wurden 50 µL in eine 96-well Platte in dreifacher Ausfertigung pipettiert. Als Kontrolle wurde Ampuwa® verwendet. Jede der verdünnten Proteinproben wurde mit je 200 µL des 1 × Roti®-Nanoquant vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Mithilfe des Synergy™ Mx plate reader wurde die Absorption bestimmt und mit der Gen5™ Software berechnet.

#### 2.2.2.3 Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation (Co-IP) ist eine Technik, um Protein-Protein Interaktionen zu bestimmen. Dabei wird ein Zielprotein-Antikörper verwendet, um indirekt Proteine zu detektieren, die an das Zielprotein gebunden sind. Mittels Western Blot-Analyse (Kapitel 2.2.2.5) können diese unbekanntene Komplexbestandteile identifiziert werden.

800 µg des extrahierten Proteins wurden mit Co-IP Lysepuffer und 20 µL Protein G Magnetic Beads bis zu einem Totalvolumen von 500 µL vorgereinigt. Die Proben wurden für eine Stunde bei 4°C mithilfe des Stuart® SB2 Rotators gemischt. Mithilfe des 6-Tube Magnetic Separation Racks wurden die Magnetic Beads entfernt und der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde zur Immunpräzipitation der Zielproteine bei 4°C mit 2 µg des entsprechenden Antikörpers (Tabelle 14) ÜN inkubiert. Bevor der Antikörper hinzugefügt wurde, wurden 16 µL der Reaktionsmischung in ein neues Reaktionsgefäß zur Kontrolle des Inputs überführt. Als Negativkontrolle dienen Proteinextraktionen von Zellen, die mit leeren pCMV-HA Plasmiden transfiziert waren. Am Folgetag wurden der

Probe 25  $\mu\text{L}$  Protein G Magnetic Beads hinzugefügt und für eine Stunde bei  $4^\circ\text{C}$  mittels des Rotators gemischt. Nach kurzem Zentrifugieren wurde für 2 min das magnetische Feld angewandt und anschließend der Überstand verworfen. Zum Waschen wurden 500  $\mu\text{L}$  Lysepuffer zu der Probe hinzugefügt und diese für 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  rotiert. Die Probe wurde kurz zentrifugiert und der Waschschrift weitere vier Male wiederholt. Für den letzten Waschschrift wurden 500  $\mu\text{L}$  TBS Puffer verwendet. Anschließend wurde das magnetische Feld für 2 min verwendet, der Überstand verworfen und das Bead-Pellet mit 16,3  $\mu\text{L}$  Lysepuffer, 6,25  $\mu\text{L}$  NuPAGE® LDS Sample Buffer (4  $\times$ ) und 2,5  $\mu\text{L}$  1 M DTT vermischt. Die Proteine wurden für 10 min bei  $70^\circ\text{C}$  denaturiert und diese in der Zwischenzeit von den Beads separiert. Die Mischung wurde danach für 5 min auf Eis gestellt. Nachdem das magnetische Feld für 2 min angewandt wurde, wurde der komplette Überstand für eine SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.2.4) verwendet.

#### 2.2.2.4 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde verwendet, um Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu trennen. Es wurde eine Mischung aus 30  $\mu\text{g}$  Protein, 0,25 Volumen NuPAGE® LDS Sample Buffer (4  $\times$ ), 10% 1 M DTT und Ampuwa® bis zu einem Gesamtvolumen von 20 bis 25  $\mu\text{L}$  vermischt. Die Proteine wurden für 10 min bei  $70^\circ\text{C}$  denaturiert und anschließend für 5 min auf Eis gestellt. Die Proben wurden auf ein Gradienten-Gel (SurePAGE™ 4 – 12% Bis-Tris-Gel) aufgetragen. 6  $\mu\text{L}$  PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder wurde zusätzlich auf das Gel aufgetragen, um das Molekulargewicht der separierten Proteine bestimmen zu können. Die Gelelektrophorese wurde in  $1 \times$  MES SDS Running Buffer für 10 min bei 80 V und danach bei 130 V durchgeführt. Im Anschluss daran folgte eine Western Blot-Analyse (Kapitel 2.2.2.5).

#### 2.2.2.5 Western Blot-Analyse

##### 2.2.2.5.1 Proteintransfer von Polyacrylamid Gel auf Membran

Die Western Blot-Analyse wurde durchgeführt, um das Molekulargewicht der durch SDS-PAGE getrennten Proteine (Kapitel 2.2.2.4) bestimmen zu können. Dafür wurden die Proteine auf eine Immun-Blot® PVDF-Membran transferiert.

Eine Membran und vier Blottingpapiere auf die Größe des Gradienten-Gels zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde für 2 min in 100% Methanol aktiviert und dann für 5 min in Transferpuffer (Tabelle 5) inkubiert. Das Blottingpapier und die Schaumstoffkissen wurden in Transferpuffer eingeweicht. Für den Proteintransfer wurde das Tank Blotting-System MiniProtean® II Cell verwendet. Dabei wurden die folgenden Komponenten in einer Kassette übereinandergeschichtet und zwischen die Schaumstoffkissen gelegt: Blottingpapier, PVDF-

Membran, Polyacrylamid Gel, Blottingpapier. Eventuelle Luftbläschen wurden vorsichtig entfernt und die Kassette so in den Tank eingesetzt, dass das Gel nahe der Kathode des Blottingsystems ausgerichtet war. Der Tank wurde zusätzlich mit gekühltem Transferpuffer gefüllt. Der Proteintransfer erfolgte für 15 min bei 150 mA und für 1 h bei 250 mA bei 4°C.

#### 2.2.2.5.2 Proteindetektion auf Membranen mittels Antikörper

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran, wurden unspezifische Bindestellen geblockt. Dafür wurde die Membran in 5 mL 5% Milch in TBST (0,1% Tween) für 1 h bei RT rotierend inkubiert. Der primäre Antikörper (Tabelle 15) wurde entweder in Verdünnungslösung I oder II (Tabelle 8) verdünnt und die Membran darin entweder ÜN bei 4°C oder für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Dann wurde die Membran mit dem in Verdünnungslösung I gelöstem sekundärem Antikörper (Tabelle 16) für 1 h bei RT auf dem Rotator inkubiert. Schließlich wurde die Membran wie zuvor beschrieben gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Zur Visualisierung der gebundenen Proteine wurde die Membran mit dem Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrat bedeckt und für einige Minuten inkubiert. Mithilfe des bildgebenden Systems Azure 300c konnte das chemilumineszente Signal der zu bestimmenden Proteine detektiert werden.

### 2.2.3 Yeast two-Hybrid

Yeast two-Hybrid (Y2H) Versuche wurden durchgeführt, um neue Protein-Protein-Interaktionen aufzudecken. Dafür wurden das Matchmaker® Gold Yeast two-Hybrid System und der Hefestamm Y2HGold verwendet.

Von einer YPDA Agar-Platte wurden zwei bis vier Hefekolonien entnommen und 50 mL YPDA Medium damit beimpft. Nach einer Inkubation bei 30°C und moderatem Schütteln von 16 bis 18 h ÜN wurden 4 – 8 mL der Kultur ( $OD_{600} > 1,5$ ) in 300 mL YPDA Medium ( $OD_{600} \sim 0,3$ ) überführt. Diese Mischung wurde für 3 – 4 h bei 30°C und moderatem Schütteln bis zu einem  $OD_{600}$  zwischen 0,4 – 0,6 inkubiert. Nach dem Aufteilen der Zellsuspension auf 50 mL Falkons wurden diese bei  $1.000 \times g$  für 5 min bei RT zentrifugiert. Zwischenzeitlich wurde die Yeastmaker™ Carrier DNA (10 mg/mL) bei 95°C für 10 min denaturiert und anschließend für 5 min auf Eis gestellt. Jedes der Zellpellets wurde in 30 mL Ampuwa® resuspendiert und dann für 5 min bei  $1.000 \times g$  bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden je 1,5 mL frisch vorbereitete TE/LiAc Lösung verwendet, um jedes Zellpellet zu resuspendieren. Zu je 1 µg jeden Plasmids wurden 10 µL der denaturierten Carrier DNA gegeben und vermischt. Dann wurden 600 µL frisch vorbereiteter PEG/LiAc-Lösung zu der Mischung hinzugefügt, vermischt und für 30 min bei 30°C bei moderatem Schütteln inkubiert. Danach

wurden 70  $\mu\text{L}$  DMSO-Lösung hinzugefügt und durch Invertieren vermischt, gefolgt von einem Hitzeschock für 15 min bei 42°C. Nach der anschließenden Inkubation für 2 min auf Eis, wurde die Probe bei  $16.000 \times g$  für 1 min zentrifugiert. Jedes Hefepellet wurde in 300  $\mu\text{L}$  Ampuwa® gelöst und in je 10  $\mu\text{L}$  großen Tropfen auf –LT und –LTHA Agar-Platten aufgetragen. Die Agar-Platten wurden für fünf bis sieben Tage bei 30°C inkubiert.

## 2.2.4 Zellkulturmethoden

### 2.2.4.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Es wurden adhärent wachsende HEK293, HeLa, K562 und humane Fibroblasten verwendet. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium kultiviert, welches kommerziell erworbenes DMEM, 10% fetal bovines Serum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) und 1% nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA) enthielt. Die Zellen wurden in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5%  $\text{CO}_2$  bei 37°C kultiviert. Beim Erlangen einer Zelldichte von 80 bis 90% wurden die Zellen je nach ihrer Proliferationsrate gesplittet. Dafür wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen in DPBS gewaschen. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit 1 – 4 mL TrypLE™ Express, je nach Größe des Kulturgefäßes, für 3 – 5 min inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Kulturgefäß wurde die dreifache Menge Kulturmedium hinzugegeben, um die proteolytische Aktivität des TrypLE™ Express zu stoppen. Anschließend wurden die Zellen in einer angemessenen Menge neuen Kulturmediums verdünnt.

### 2.2.4.2 Kryokonservierung und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die eukaryotischen Zellen bis zu einer Dichte von 80% kultiviert. Dann wurden sie mit DPBS gewaschen, mittels TrypLE™ Express den Zellkulturflaschen gelöst und es wurde Kulturmedium beigelegt (Kapitel 2.2.2.1.1). Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 mL Falcon überführt und für 5 min bei  $1.000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde 1:1 in Einfrier- und Zellkulturmedium resuspendiert. 1 mL der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde infolgedessen auf Trockeneis platziert. Die Zellpellets wurden bei –80°C gelagert.

Um die Kryoröhrchen aufzutauen, wurden diese in einem Wasserbad von 37°C inkubiert, bis die Zellen fast gänzlich aufgetaut waren. Anschließend wurden die Zellen in ein 15 mL Falcon mit 8 mL warmem Zellkulturmedium überführt. Nach dem Zentrifugieren bei  $1.000 \times g$  für 5 min wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 10 mL Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine angemessene neue Zellkulturflasche



überführt und bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> für eine Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die nicht-adhärenen Zellen durch Wechsel des Kulturmediums abgesaugt.

### 2.2.4.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

#### 2.2.4.3.1 Transfektion von Plasmiden in eukaryotische Zellen

Um bestimmte Proteine zu überexprimieren wurden eukaryotische Zellen mit Plasmiden transfiziert.

Die Plasmid-DNA wurde mittels jetPRIME® und jetOPTIMUS® Transfektionsreagenz nach Herstellerangaben transfiziert. Ein Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und trypsiniert (Kapitel 2.2.2.1.1). Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Konzentration der Zellsuspension bestimmt. Dann wurden die Zellen der Tabelle 37 entsprechend in eine angemessene Zellkulturflasche überführt.

**Tabelle 37: Zellkonzentrationen für Transfektion**

| Kulturgefäß | HEK293<br>[Zellen/well] | Fibroblasten<br>[Zellen/well] | Volumen (max.) |
|-------------|-------------------------|-------------------------------|----------------|
| 12-well     |                         | $3,3 \times 10^4$             | 1 mL           |
| T75         | $5 \times 10^6$         |                               | 10 mL          |

Am Folgetag wurde in Abhängigkeit von den verwendeten Zellkulturflaschen und der Transfektionsreagenz eine Reaktionsmischung vorbereitet (Tabelle 38).

**Tabelle 38: Reaktionsmischung zur Transfektion mit jetPRIME®, jetOPTIMUS®**

|             |             | jetOPTIMUS®         |         | jetPRIME®        |         |
|-------------|-------------|---------------------|---------|------------------|---------|
| Kulturgefäß | Plasmid DNA | jetOPTI-MUS® Puffer | Reagenz | jetPRIME®-Puffer | Reagenz |
| 12-well     | 0,8 µg      | 200 µL              | 0,8 µL  |                  |         |
| T75         | 5 µg        |                     |         | 500 µL           | 20 µL   |

Nachdem die Plasmid DNA in der entsprechenden Menge an Transfektionspuffer gelöst wurde, wurde die Probe für 10 s durch vortexen gemischt und kurz zentrifugiert. Dann folgte

eine Inkubation von 10 min bei RT. Das Zellmedium wurde aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Nachdem frisches Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben wurde, wurde die Transfektionsmischung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Durch leichtes Mischen wurde die Reaktionsmischung in dem Zellmedium verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37°C und einer befeuchteten Atmosphäre bei 5% CO<sub>2</sub> wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und neues Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Die Proteine wurden nach einer Inkubationszeit von insgesamt 24 h seit der Transfektion bei 37°C in befeuchteter Atmosphäre bei 5% CO<sub>2</sub> isoliert (Kapitel 2.2.2.1).

#### 2.2.4.3.2 Transfektion von *short interfering*-RNAs

*Short interfering*-RNAs (siRNAs) werden zum Knockdown spezifischer Gene verwendet, indem sie an spezifische mRNA bindet und diese so zur Degradation markiert. So kann man eine verminderte Expression eines bestimmten Zielgens erreichen. Es wurden zwei verschiedene siRNAs gegen *ZMAT5* verwendet – siRNA 1 (si1) und siRNA 2 (si2). Als Kontrolle wurde eine siRNA gebraucht, dessen Sequenz kein Genprodukt als Ziel hat, hier bezeichnet als *scramble*-siRNA. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine® 2000 verwendet. Die so gebildeten Komplexe aus Lipiden und siRNA-Oligonukleotiden ermöglichten die Aufnahme der siRNA-Moleküle in die Zellen.

Am Vortag der Transfektion wurden humane Fibroblasten in T25 Zellkulturflaschen mit einer Dichte von 60% ausplattiert. Am nächsten Tag wurde die Transfektionsmischung vorbereitet. Dazu wurden 1 µL von *scramble*-siRNA (100 pmol/µL) bzw. je 0,6 µL von siRNA si1 + si2 mit 499 µL Opti-MEM™ vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Des Weiteren wurden 10 µL Lipofectamine® 2000 mit 490 µL Opti-MEM™ gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die *scramble*-siRNA (*scram*) und die siRNAs si1 + si2 jeweils mit einer Lipofectamine® 2000-Mischung kombiniert, vorsichtig vermischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und 4 mL Zellkulturmedium wurde hinzugegeben. 1.000 µL der Transfektionsmischung wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben und vorsichtig mit dem Zellmedium vermischt. Die Zellen wurden für 72 h bei 37°C in befeuchteter Atmosphäre bei 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die RNA wurde nach der Inkubationszeit aus den transfizierten Zellen isoliert (Kapitel 2.2.1.1.3).

#### 2.2.4.4 Behandlung eukaryotischer Zellen

Am Vortag der Behandlung wurden humane Fibroblasten in T25 Zellkulturflaschen mit einer Dichte von 60% ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Behandlung begonnen. Jede Zelllinie wurde entweder mit 5 nm Actinomycin D (in 4 mL) oder mit DMSO für 24 h

bei 37°C und befeuchteter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> behandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und dieses anschließend wieder abgesaugt. Das Protein wurde mittels Herstellung eines Direktlysats (Kapitel 2.2.2.1.3) aus den Zellen isoliert.

#### 2.2.4.5 Fixierung von Zellen auf Coverslips

Eukaryotische Zellen wurden auf Objektträgern (Ø 12 mm) ausplattiert und mit 0,5 mL 4% PFA für 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 mL DPBS gewaschen. Die Objektträger mit den fixierten Zellen wurden in einer 12-well Platte, die mit Parafilm abgedichtet wurde, bei 4°C gelagert.

#### 2.2.4.6 Immunfluoreszenzfärbung

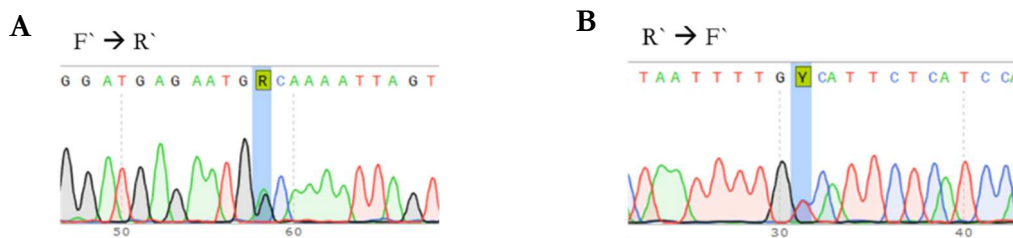
Vor der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen fixiert (Kapitel 2.2.4.12.2.4.5) und einmal mit 600 µL DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 600 µL 0,5% Triton X-100 in PBS für 10 min permeabilisiert. Die Zellen wurden zweimal für 5 min mit 600 µL 0,1% Triton X-100 in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blocken, wurden die Zellen in 600 µL 3% BSA in PBST (0,1% Triton X-100) für 1 h inkubiert. Auf Parafilm in einer Nasskammer wurden die Zellen ÜN bei 4°C mit 12 µL der entsprechenden Antikörperlösung (Tabelle 15) inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen zweimal gewaschen, wie zuvor beschrieben. In einer Nasskammer wurden die Zellen mit 12 µL der Lösung mit dem 2. Antikörper (Tabelle 16) auf Parafilm für 45 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal, wie zuvor beschrieben, im Dunklen gewaschen. Schließlich wurden die Zellen mit Fluoroshield™ mit DAPI eingedeckt und bei 4°C im Dunklen gelagert. Um die Immunfluoreszenzfärbung sichtbar zu machen, wurde das Konfokal Laser Scanning Mikroskop IX81 mit der zur Verfügung gestellten Software FV10-ASW1.7 verwendet. Mit der ImageJ v1.53c Software wurden die Bilder aufbereitet und die Dichte analysiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Führen pathogene Varianten im *RPS27A*-Gen zum Phänotyp der Diamond-Blackfan-Anämie

##### 3.1.1 Nachweis der *RPS27A*-Variante c.335G>A in Patienten-Fibroblasten

Zum Nachweis der *RPS27A*-Variante c.335G>A (p.G112D) in den Patienten-Fibroblasten wurde zuerst die RNA isoliert, cDNA synthetisiert und der entsprechende Bereich mittels PCR amplifiziert. Mittels Sanger-Sequenzierung ließ sich die Variante in den Patienten-Fibroblasten nachweisen (Abbildung 8). Die Patienten-Fibroblasten wurden für nachfolgende Versuche verwendet.

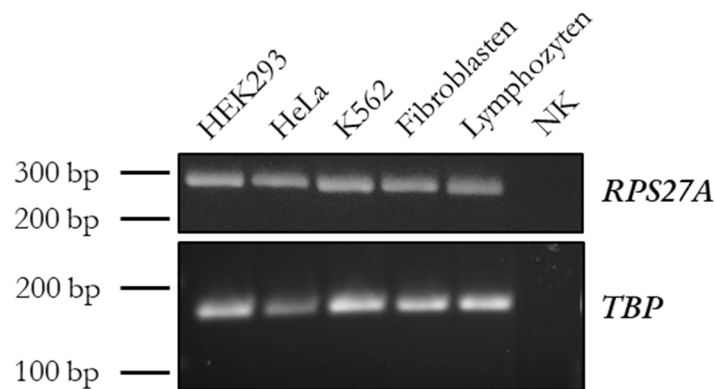


**Abbildung 8: VUS *RPS27A* c.335G>A (p.G112D) in Patienten-Fibroblasten nachgewiesen.** Es wurden Fibroblasten einer Hautstanze des Patienten, welcher den Phänotyp einer DBA aufweist, kultiviert. Zum Nachweis der *RPS27A*-Variante c.335G>A wurde die RNA aus den Patienten-Fibroblasten isoliert und cDNA generiert. Mittels Sequenzierung wurde die Missense-Variante (c.335G>A) in der cDNA nachgewiesen. **A** Forward. **B** Reverse.

##### 3.1.2 *RPS27A* wird in verschiedenen Zelllinien auf RNA- und Proteinebene exprimiert

Zur Expressionsanalyse von *RPS27A* auf RNA-Ebene wurde eine PCR mit Primern für *RPS27A* an der cDNA von HEK293, HeLa, K562, Fibroblasten und Lymphozyten durchgeführt (Abbildung 9). Die Banden mit einer Größe von 292 bp entsprechen der Größe des erwarteten PCR-Produktes. Zum Normalisieren und um eventuelle Unterschiede im Expressionslevel von *RPS27A* zwischen den verschiedenen Zelllinien zu detektieren, wurden zusätzlich eine PCR mit Primern für das Housekeeping-Gen (HKG) *TATA box binding-Protein* (*TBP*) verwendet. Die Banden mit einer Größe von ~170 bp entsprechen der Größe des erwarteten PCR-Produktes für das HKG *TBP*. H<sub>2</sub>O wurde als Negativkontrolle verwendet.

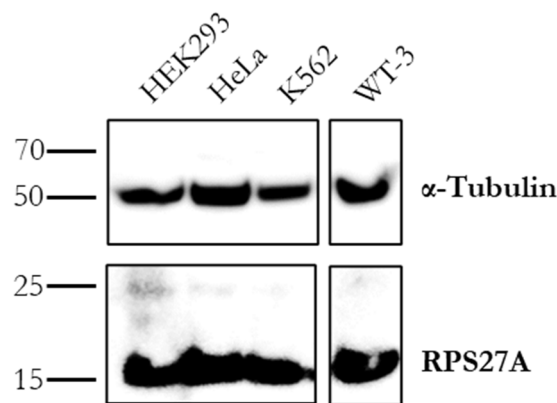
Mittels PCR wurde gezeigt, dass *RPS27A* in den untersuchten Zelllinien HEK293, HeLa, K562, Fibroblasten und Lymphozyten exprimiert wird. Des Weiteren lässt sich kein Unterschied im Expressionslevel von *RPS27A* zwischen den verschiedenen Zelllinien erkennen.



**Abbildung 9: Expressionsanalyse von *RPS27A* in verschiedenen Zelllinien.** Mittels PCR wurde die Expression von *RPS27A* in den Zelllinien HEK293, HeLa, K562, Fibroblasten und Lymphozyten untersucht. Dafür wurden Primer für *RPS27A* verwendet. Die Banden mit einer Größe von 292 bp entsprechen der Größe des erwarteten PCR-Produkts. Zur Untersuchung eventueller Unterschiede im Expressionslevel zwischen den untersuchten Zelllinien und zur Normalisierung wurden Primer für das HKG *TBP* verwendet. Die Banden mit einer Größe von ~170 bp entsprechen dem PCR-Produkt von *TBP*. *RPS27A* wurde in allen untersuchten Zelllinien etwa gleich stark exprimiert. Marker: 100 bp DNA-Marker; NK: Negativkontrolle

Des Weiteren wurde die Expression von *RPS27A* in o.g. Zelllinien auf Proteinebene untersucht. Das Protein von HEK293, HeLa, K562 und Wildtyp (WT)-Fibroblasten (WT-3) wurde isoliert und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Zum Untersuchen von *RPS27A* wurde die Probe mit einem Antikörper gegen endogenes *RPS27A* inkubiert (Abbildung 10). Die Banden mit einer Größe von ~17 kDa entsprechen der Größe von *RPS27A*. Zur Normalisierung und Vergleichbarkeit der Expressionslevel von *RPS27A* zwischen den verschiedenen Zelllinien wurde ein Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin verwendet. Die Banden mit einer Größe von ~50 kDa entsprechen der Größe von  $\alpha$ -Tubulin.

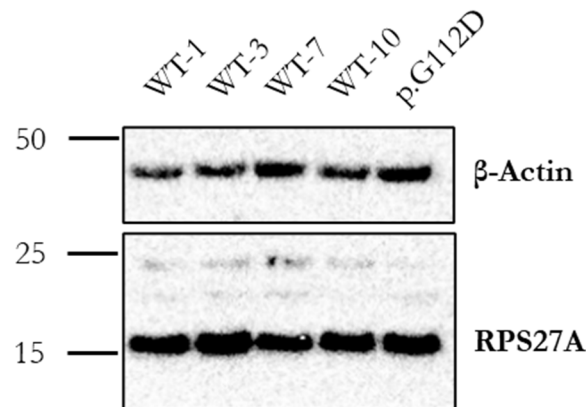
*RPS27A* wird in den Zelllinien HEK293, HeLa, K562 und WT-Fibroblasten auf Proteinebene exprimiert. Ein signifikanter Unterschied im Expressionslevel von *RPS27A* zwischen den verschiedenen Zelllinien konnte nicht festgestellt werden.



**Abbildung 10: Nachweis von RPS27A in verschiedenen Zelllinien auf Proteinebene.** Die Expression von RPS27A auf Proteinebene wurde mittels Western Blot-Analyse in den Zelllinien HEK293, HeLa, K562 und WT-Fibroblasten (WT-3) untersucht. Die Proben wurden mit einem Antikörper gegen endogenes RPS27A inkubiert. Die Banden mit einer Größe von  $\sim 17$  kDa entsprechen der Größe von RPS27A. Ein Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin diente der Normalisierung und dem Vergleich der Expressionslevel von RPS27A zwischen den verschiedenen Zelllinien. Die Banden mit einer Größe von  $\sim 50$  kDa entsprechen der Größe von  $\alpha$ -Tubulin. Es ist kein signifikanter Unterschied in den Expressionslevel von RPS27A in den untersuchten Zelllinien zu sehen. Marker: PageRuler™ Plus Prestrained Protein Marker; Größenangabe in kDa.

Überdies wurde untersucht, ob die *RPS27A*-VUS einen Einfluss auf die Detektion von RPS27A auf Proteinebene hat. Dafür wurde nach Proteinextraktion eine Western Blot-Analyse an vier WT-Fibroblastenlinien (WT-1, WT-3, WT-7, WT-10) sowie an den Patienten-Fibroblasten mit dem RPS27A-Antikörper durchgeführt (Abbildung 11). Die Proben wurden mithilfe von  $\beta$ -Actin ( $\sim 42$  kDa) normalisiert und die Stärke der Banden von RPS27A ( $\sim 17$  kDa) verglichen.

RPS27A wurde in allen Fibroblasten-Zelllinien gleich stark exprimiert. Es ließ sich kein Unterschied in der Expression von RPS27A auf Proteinebene erkennen.

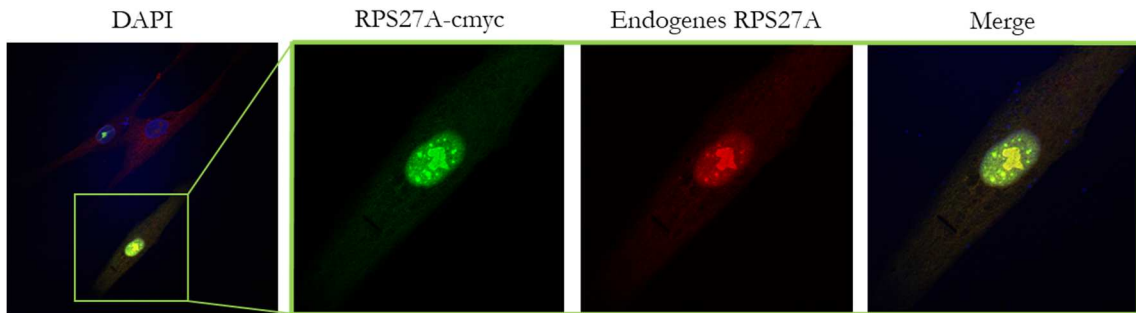


**Abbildung 11: Nachweis von RPS27A in WT- und Patienten-Fibroblasten auf Proteinebene.** Mittels Western Blot-Analyse wurde die Expression von RPS27A auf Proteinebene untersucht. Die vier WT-Fibroblastenlinien (WT-1, WT-3, WT-7, WT-10) dienen als Kontrollen zu den Patienten-Fibroblasten (p.G112D). Nach der Proteinextraktion wurden die Proben mit dem RPS27A-Antikörper inkubiert. RPS27A entspricht den Banden mit einer Größe von  $\sim 17$  kDa. Zur Normalisierung wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ -Actin ( $\sim 42$  kDa) verwendet. Es wurde kein Unterschied zwischen der Expression von RPS27A in WT- und Patienten-Fibroblasten festgestellt. Marker: PageRuler™ Plus Prestrained Protein Marker; Größenangabe in kDa.

### 3.1.3 RPS27A zeigt keine Auffälligkeiten in der zellulären Lokalisation

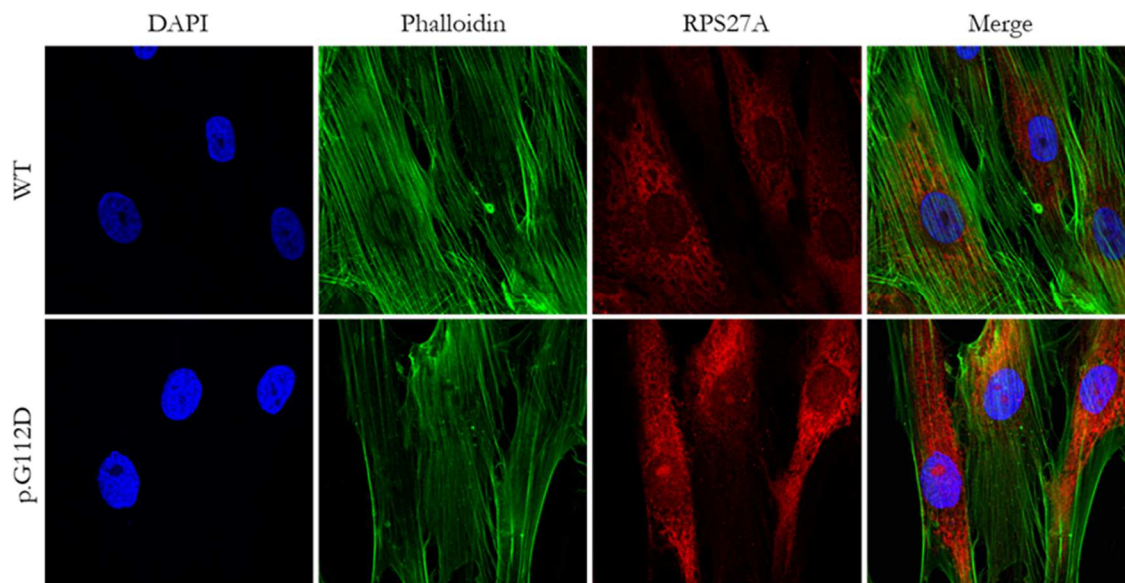
Um zu untersuchen, ob die Variante RPS27A (p.G112D) einen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von RPS27A hat, wurden verschiedene Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt.

Als erstes wurden WT-Fibroblasten mit dem RPS27A-cmyc Plasmid transfiziert. Anschließend wurde die zelluläre Lokalisation von RPS27A-cmyc und RPS27A mit fluoreszierenden Antikörpern gegen cmyc und endogenem RPS27A überprüft (Abbildung 12). Neben den transfizierten Zellen waren auch nicht-transfizierte Zellen zu sehen. Es konnte eine Co-Lokalisation von RPS27A-cmyc und dem endogenen RPS27A im Nukleus und Nukleolus beobachtet werden.



**Abbildung 12: Zelluläre Lokalisation von RPS27A-cmyc und RPS27A in transfizierten Fibroblasten.** WT-Fibroblasten wurden mit dem RPS27A-cmyc Plasmid transfiziert und mit Antikörpern gegen cmyc (grün) und endogenes RPS27A (rot) inkubiert. RPS27A wurde in den transfizierten Zellen sowohl mit dem cmyc- als auch mit dem endogenen RPS27A-Antikörper detektiert, wobei RPS27A vor allem in Nukleus und Nukleolus lokalisiert ist. Der Zellkern wurde in allen Zellen mit DAPI gefärbt (blau). Die Aufnahmen wurden mit einem Laser Mikroskop mit 600facher Standardvergrößerung und 3fachem Zoom gemacht.

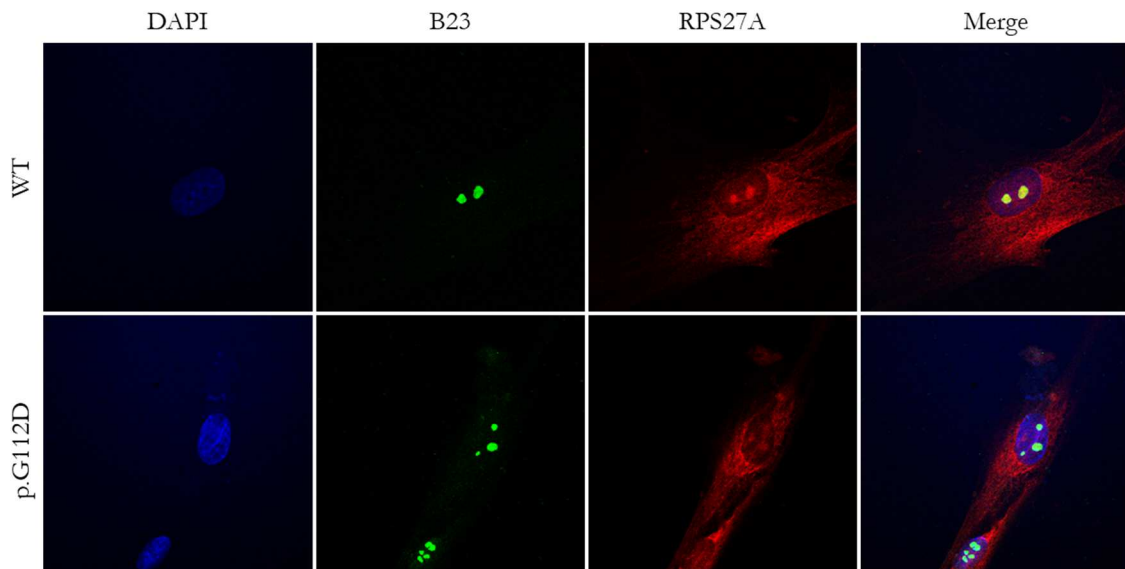
An WT- und Patienten-Fibroblasten (p.G112D) wurde eine Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen endogenes RPS27A durchgeführt (Abbildung 13). Das endogene RPS27A wurde in allen Zellen im Zytosol detektiert. Zusätzlich wurde eine Expression in der Region des Nukleolus, vor allem in den Fibroblasten mit der Variante p.G112D, gesehen.



**Abbildung 13: Zelluläre Lokalisation von RPS27A in WT- und Patienten-Fibroblasten.** Zur Überprüfung der zellulären Lokalisation von RPS27A wurde eine Immunfluoreszenz an WT- und Patienten-Fibroblasten (p.G112D) durchgeführt. Endogenes RPS27A wird in allen Zellen im Zytosol und in den Patienten-Fibroblasten mit der Variante p.G112D zusätzlich im Nukleolus detektiert (rot). Phalloidin färbt in allen Zellen das F-Aktin des Zytoskeletts an (grün). Der Zellkern wurde in allen Zellen mit DAPI gefärbt (blau). Die Aufnahmen wurden mit einem Laser Mikroskop mit 600facher Standardvergrößerung und 3fachem Zoom gemacht.



Um die Lokalisation im Nukleolus zu bestätigen, wurde eine Immunfluoreszenz an WT- und Patienten-Fibroblasten mit Antikörpern gegen endogenes RPS27A und B23 (Nukleophosmin) zur Detektion des Nukleolus durchgeführt (Abbildung 14). Eine Co-Lokalisation zwischen RPS27A und B23 im Nukleolus konnte beobachtet werden.



**Abbildung 14: Zelluläre Lokalisation von B23 und endogenem RPS27A in WT- und Patienten-Fibroblasten.** Zur Bestätigung der Lokalisation von endogenem RPS27A im Nukleolus wurde eine Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen endogenes RPS27A (rot) an WT- und Patienten-Fibroblasten (p.G112D) durchgeführt. Ein Antikörper gegen B23 wurde zur Detektion des Nukleolus verwendet (grün). Sowohl bei den WT- als auch bei den Patienten-Fibroblasten konnte eine Co-Lokalisation von endogenem RPS27A und B23 beobachtet werden. Die Zellkerne aller Zellen wurden mit DAPI gefärbt (blau). Die Aufnahmen wurden mit einem Laser Mikroskop mit 600facher Standardvergrößerung und 3fachem Zoom gemacht.

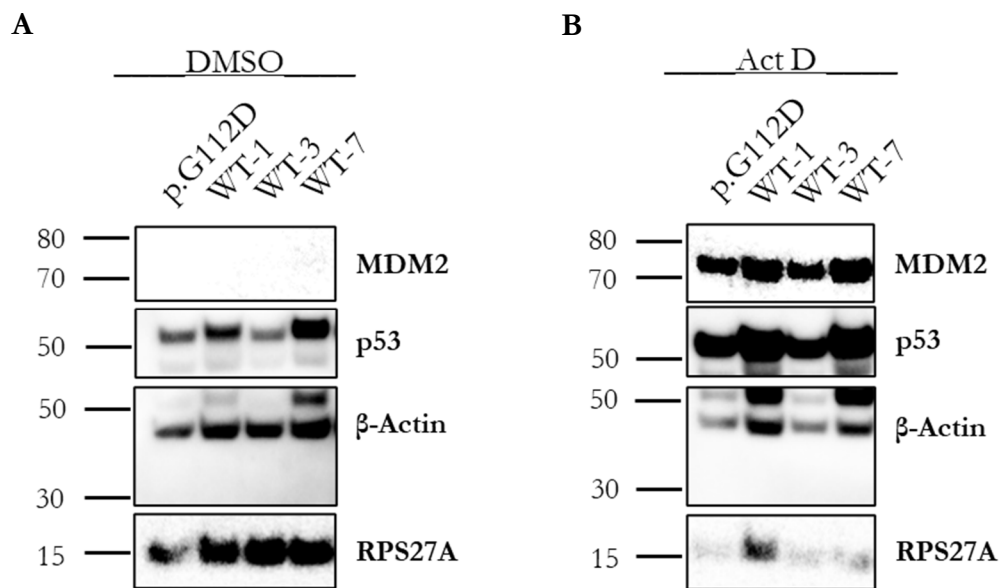
#### 3.1.4 Die *RPS27A*-VUS hat keinen Einfluss auf die Proteinmenge von RPS27A, MDM2 und p53 unter Actinomycin D-Behandlung

Um zu untersuchen, ob die RPS27A-Variante (p.G112D) einen Einfluss auf die Proteinmenge von RPS27A, MDM2 oder p53 hat, wenn die Fibroblasten einer Stresssituation durch die Behandlung mit Actinomycin (Act D) ausgesetzt sind, wurden Western Blot-Analysen nach einer Behandlung der Zellen von 24 h mit 5 nm Act D bzw. zur Kontrolle mit DMSO durchgeführt. Als Kontrollen zu den Patienten-Fibroblasten wurden drei WT-Fibroblastenlinien (WT-1, WT3, WT-7) verwendet. Zur Normalisierung wurde  $\beta$ -Actin (~42 kDa) verwendet. Es wurden je zwei technische und drei biologische Replikate durchgeführt.

RPS27A (~17 kDa) wurde in den Patienten-Fibroblasten in Bezug auf das HKG-Protein  $\beta$ -Actin genauso stark exprimiert, wie in den WT-Fibroblasten (Abbildung 15A). Ebenso wurde p53 (~53 kDa) in allen DMSO-behandelten Fibroblasten im Durchschnitt gleich stark

exprimiert, wohingegen die MDM2-zugehörigen Banden (70 – 80 kDa) in den DMSO-behandelten Proben nur sehr schwach bis gar nicht zu sehen waren (Abbildung 15B).

Die Banden von RPS27A (~17 kDa) bei den Act D-behandelten Patienten-Zellen sowie WT-Zellen waren im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen schwächer ausgeprägt (Abbildung 15B). Sowohl die Banden von p53 (~53 kDa) als auch die von MDM2 (70 – 80 kDa) waren deutlich ausgeprägter im Falle einer Behandlung mit Act D. Ein Unterschied in den Banden von RPS27A, p53 oder MDM2 vom Protein der Act D-behandelten Zellen zwischen den Patienten- und den WT-Fibroblasten ließ sich nicht detektieren.

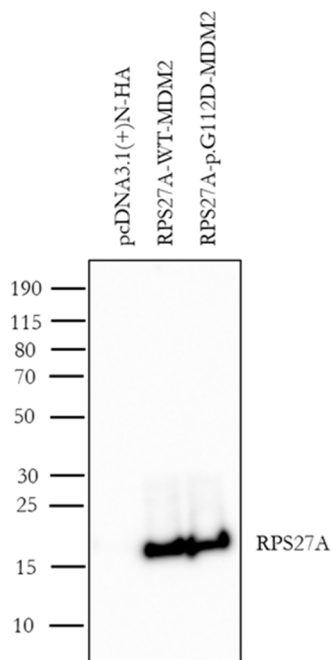


**Abbildung 15: Nachweis von RPS27A, p53 und MDM2 auf Proteinebene unter der Behandlung von Actinomycin D.** Zur Untersuchung des Einflusses von Actinomycin D (Act D) auf die Expression von RPS27A, MDM2 und p53 wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Dafür wurden die Patienten-Fibroblasten (p.G112D) und drei WT-Fibroblastenlinien (WT-1, WT-3, WT-7) als Kontrollen für 24 h mit 5 nm Act D bzw. DMSO zur Kontrolle behandelt. Zur Normalisierung wurde β-Actin (~42 kDa) verwendet. RPS27A (~17 kDa) wurde in den Patienten-Fibroblasten in Bezug auf das HKG-Protein β-Actin etwa genauso stark wie in den WT-Fibroblasten exprimiert (**A**, **B**). In den DMSO-behandelten Fibroblasten wurde p53 (~53 kDa) im Durchschnitt etwa gleichstark exprimiert, die MDM2-zugehörigen Banden (70 – 80 kDa) waren hingegen sehr schwach bis gar nicht zu sehen (**A**). Im Falle einer Behandlung mit Act D war die Expression von p53 und MDM2 deutlich stärker und die von RPS27A deutlich schwächer ausgeprägt (**B**) als in den DMSO-behandelten Zellen. Es konnte kein Unterschied in der Expression von RPS27A, MDM2 und p53 zwischen den WT- und den Patienten-Fibroblasten unter Normalbedingungen (DMSO) und unter Act D-Behandlung festgestellt werden. Marker: PageRuler™ Plus Prestrained Protein Marker; Größenangabe in kDa.

Zusammengefasst zeigte sich mittels Western Blot-Analyse ein vergleichbares Ergebnis bezüglich der Proteinmengen von RPS27A, p53 und MDM2 der Patienten-Fibroblasten im Vergleich zu den WT-Fibroblasten unter Normalbedingungen (DMSO) und unter Act D-Behandlung.

### 3.1.5 MDM2 co-immunpräzipitiert mit RPS27A-WT und RPS27A (p.G112D)

Verschiedene ribosomale Proteine interagieren mit MDM2 im RP-MDM2-p53-Signalweg. Um zu bestätigen, dass RPS27A als weiteres ribosomales Protein mit MDM2 interagiert und um zu untersuchen, ob die RPS27A-Variante p.G112D einen Einfluss auf die Interaktion von RPS27A mit MDM2 hat, wurde eine Co-Immunpräzipitation (Co-IP) durchgeführt. HEK293-Zellen wurden mit a) den Wildtyp-Plasmiden RPS27A-cmyc terminal-pCMV-HA und MDM2-pCMV und mit b) den Plasmiden RPS27A-G112D-cmyc terminal-pCMV-HA und MDM2-pCMV doppelt transfiziert. Als Negativkontrolle (NK) wurden HEK293-Zellen mit dem leeren Plasmid pcDNA3.1(+)-N-HA einfach transfiziert. Nach 24 h wurde das Protein isoliert. Zur Überprüfung, ob die Transfektion erfolgreich war, wurde eine Western Blot-Analyse mit einem RPS27A-Antikörper gegen endogenes RPS27A durchgeführt (Abbildung 16). Die detektierten Banden mit einer Größe von ~18kDa entsprechen der Größe von RPS27A.

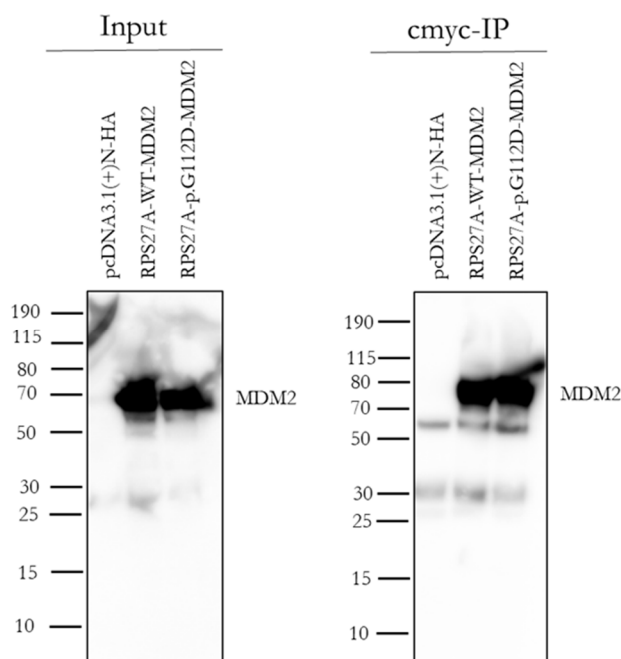


**Abbildung 16: Transfektion von RPS27A-WT-MDM2 und RPS27A-p.G112D-MDM2 Plasmiden in HEK293-Zellen.** HEK293-Zellen wurden einfach transfiziert mit dem Plasmid pcDNA3.1(+)-N-HA als Negativkontrolle und doppelt transfiziert mit a) den Plasmiden RPS27A-cmyc terminal-pCMV-HA und MDM2-pCMV und b) den Plasmiden RPS27A-G112D-cmyc terminal-pCMV-HA und MDM2-pCMV. Nach 24 h wurde das Protein isoliert. Mit 8 µg jeder Probe wurde eine Western Blot-Analyse zur Kontrolle einer erfolgreichen Transfektion durchgeführt. Die Proben wurden mit einem Antikörper gegen endogenes RPS27A inkubiert. Die Banden mit einer Größe von ~18 kDa entsprechen der Größe von RPS27A. Marker: PageRuler™ Plus Prestrained Protein Marker; Größenangabe in kDa

Die Proben RPS27A-WT-MDM2, RPS27A-p.G112D-MDM2 und NK wurden, nach der Abnahme des Inputs, mit einem cmyc-Antikörper über Nacht immunpräzipitiert (cmyc-

IP). Am Folgetag wurde mit den Proben des Inputs und mit je 16  $\mu$ L der cmyc-IP-Proben eine Western Blot-Analyse durchgeführt (Abbildung 17). Die bei einer Größe von  $\sim 70 - 80$  kDa sichtbaren Banden entsprechen MDM2.

Das Ergebnis der Co-IP zeigt eine Interaktion von RPS27A-WT mit MDM2. Durch die RPS27A-Variante RPS27A p.G112D wird in der Co-IP die Interaktion mit MDM2 nicht aufgehoben.



**Abbildung 17: Co-Immunpräzipitation von MDM2 und RPS27A-WT- und RPS27A (p.G112D)-Varianten in HEK293-Zellen.** Jeder Probe wurden 3,2% des Gesamtvolumens als Input entnommen. Dann wurden die Proben mit cmyc-Antikörper inkubiert. Es wurde eine Western Blot-Analyse mit dem Input und mit je 16  $\mu$ L der cmyc-IP-Proben durchgeführt. Anschließend wurden die Proben jeweils mit einem AK gegen MDM2 inkubiert. Die Banden mit der Größe von  $\sim 70 - 80$  kDa entsprechen MDM2. Marker: Page-Ruler™ Plus Prestrained Protein Marker; Größenangabe in kDa

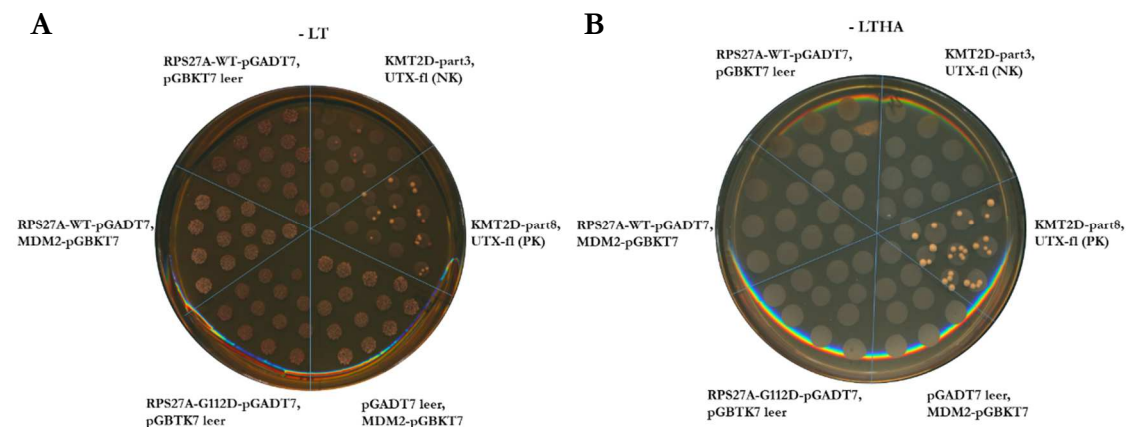
### 3.1.6 MDM2 interagiert nicht direkt mit RPS27A-WT und RPS27A (p.G112D)

Mittels Co-Immunpräzipitation konnte nachgewiesen werden, dass RPS27A und MDM2 miteinander interagieren. Um zwischen einer direkten und indirekten Interaktion zu differenzieren, wurde ein direkter Protein-Protein-Interaktionsnachweis mittels Yeast two-Hybrid Experimente (Y2H) durchgeführt. Des Weiteren wurden so eventuelle Einflüsse der RPS27A-Variante p.G112D auf die direkte Interaktion von RPS27A und MDM2 untersucht.

Zur Durchführung des Y2H-Versuchs wurden als *prey*-Plasmide die RPS27A-WT-pGADT7 und RPS27A-G112D-pGADT7 Plasmide verwendet. Das Plasmid MDM2-pGBKT7 diente

als *bait*-Plasmid. Auf  $-LT$  Agarplatten konnten Hefekolonien als Zeichen für eine erfolgreiche Transformation festgestellt werden (Abbildung 18A). Zwischen dem leeren pGADT7 Plasmid und MDM2-pGBKT7 als *bait*-Plasmid, sowie zwischen dem leeren pGBKT7 Plasmid und den *prey*-Plasmiden RPS27A-WT-pGADT7 bzw. RPS27A-G112D-pGADT7 konnte auf  $-LTHA$  Agarplatten keine Autoaktivierung der Reportergene nachgewiesen werden (Abbildung 18B). Als Positivkontrolle wurden das *prey*-Plasmid KMT2D-part8 und das *bait*-Plasmid UTX-fl. Das *prey*-Plasmid KMT2D-part3 und das *bait*-Plasmid UTX-fl dienten als Negativkontrolle. Positiv- und Negativkontrollen wurden aus früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe übernommen.

Mit dem Y2H-Versuch unter Verwendung der *prey*-Plasmide RPS27A-WT-pGADT7 bzw. RPS27A-G112D-pGADT7 und dem *bait*-Plasmid MDM2-pGBKT7 konnte kein Wachstum der Hefekolonien gesehen werden. Somit konnte keine direkte Protein-Protein-Interaktion nachgewiesen werden.



**Abbildung 18: Yeast two-Hybrid Versuch.** Der Y2H-Versuch wurde mit den Plasmiden RPS27A-WT-pGADT7 und RPS27A-G112D-pGADT7 als *prey* und MDM2-pGBKT7 als *bait* durchgeführt. Hefekolonien auf  $-LT$  Agarplatten indizierten eine erfolgreiche Transformation (**A**). Als Positivkontrolle (PK) wurde das *bait*-Plasmid UTX-fl und das *prey*-Plasmid KMT2D-part8 verwendet (**A**, **B**). Die *prey*-Plasmide RPS27A-WT-pGADT7 bzw. RPS27A-G112D-pGADT7 wurden mit dem leeren pGBKT7-Plasmid und das *bait*-Plasmid MDM2-pGBKT7 wurde mit dem leeren pGADT7-Plasmid auf Autoaktivierung der Reportergene getestet (**B**). Das *prey*-Plasmid KMT2D-part3 und das *bait*-Plasmid UTX-fl dienten als Negativkontrolle (NK). Der Yeast two-Hybrid Versuch zeigte keine direkte Interaktion zwischen RPS27A-WT mit MDM2 (**B**).

## 3.2 ZMAT5

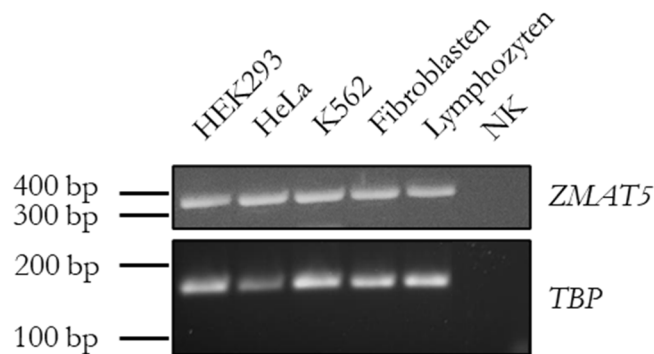
### 3.2.1 Kein Nachweis einer Mutation in *ZMAT5* im zweiten Allel

Bei einem Patienten mit einer Symptomatik ähnlich den Kindern mit dem FBRSL1-Syndrom wurde im Rahmen der diagnostischen Abklärung eine heterozygote Mikrodeletion im Bereich 22q12.1-q12.2 gefunden, welche sich auf einem Allel des Chromosoms 22 befindet. In dem 2,5 mbp großen Bereich liegen 32 Gene, unter anderem das Gen *ZMAT5*. Zum Ausschluss einer Mutation oder Deletion von *ZMAT5* auf dem nicht betroffenen Allel wurden PCRs durchgeführt und die Produkte anschließend mittels einer Sanger-Sequenzierung an der genomischen DNA (gDNA) des Patienten durchgeführt. Als Kontrolle dienten die gDNA-Proben der gesunden Kontrollen K4118 (Exon 3 bis Exon 5) und K4117 (Exone 6 und 7). In keinem der Exone lag eine Mutation vor.

### 3.2.2 *ZMAT5* wird in verschiedenen Zelllinien auf RNA- und Protein-Ebene exprimiert

Um zu überprüfen, ob *ZMAT5* in verschiedenen Zelllinien exprimiert wird, wurde eine PCR an cDNA isoliert aus den Zelllinien HEK293, HeLa, K562, Fibroblasten und Lymphozyten durchgeführt (Abbildung 19). Die Banden mit einer Größe von 314 bp entsprechen dem PCR-Produkt von *ZMAT5*. Zur Normalisierung und um eventuelle Unterschiede im Expressionslevel von *ZMAT5* zwischen den verschiedenen Zelllinien zu detektieren, wurden zusätzlich PCRs für das HKG *TBP* durchgeführt. Die Banden mit einer Größe von ~170 bp entsprechen dem PCR-Produkt von *TBP*. H<sub>2</sub>O wurde als Negativkontrolle verwendet.

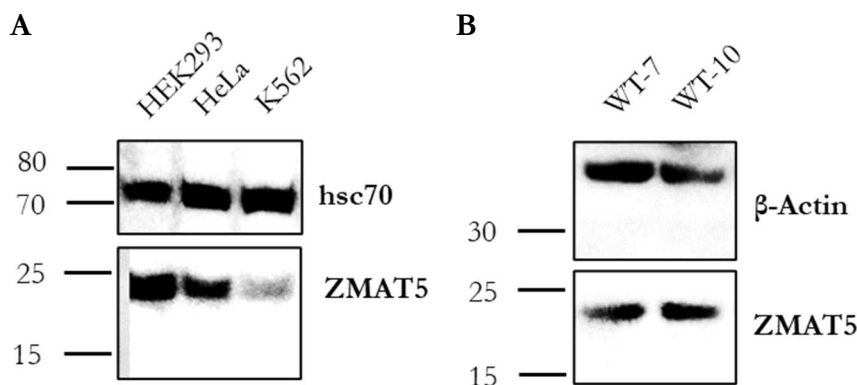
Zusammengefasst ließ sich mittels PCR feststellen, dass *ZMAT5* in den untersuchten Zelllinien HEK293, HeLa, K562, Fibroblasten und Lymphozyten exprimiert wird. Überdies ließ sich kein Unterschied im Expressionslevel von *ZMAT5* zwischen den verschiedenen Zelllinien erkennen.



**Abbildung 19: Expressionsanalyse von *ZMAT5* in verschiedenen Zelllinien.** Mittels PCR wurde die Expression von *ZMAT5* in den Zelllinien HEK293, HeLa, K562, Fibroblasten und Lymphozyten untersucht. Die Banden mit einer Größe von 314 bp entsprechen dem PCR-Produkt von *ZMAT5*. Zur Normalisierung und Untersuchung eventueller Unterschiede im Expressionslevel zwischen den verschiedenen Zelllinien, wurden zusätzlich PCRs für das HKG *TBP* verwendet. Die Banden mit einer Größe von ~170 bp entsprechen dem PCR-Produkt von *TBP*. Marker: 100 bp DNA-Marker; NK: Negativkontrolle.

Um zu überprüfen, ob *ZMAT5* auf Proteinebene nachweisbar ist, wurden die Zelllinien HEK293, HeLa, K562 (Abbildung 20A) und zwei WT-Fibroblastenlinien (WT-3, WT-7) (Abbildung 20B) untersucht. Dafür wurde das Protein isoliert und eine Western Blot-Analyse mit 30 µg Protein je Probe der verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Die Proben wurden mit einem Antikörper gegen *ZMAT5* inkubiert. Die Banden mit einer Größe von ~18 kDa entsprechen *ZMAT5*. Antikörper gegen die HKG-Proteine hsc70 (70 kDa) und  $\beta$ -Actin (~42 kDa) wurden zur Normalisierung verwendet.

Die Banden, die *ZMAT5* entsprechen, waren bei den Zelllinien HEK293 und HeLa etwa gleich stark, die Bande der Zelllinie K562 war im Vergleich zu HEK293 und HeLa schwächer. In den WT-Fibroblasten WT-3 und WT-7 wurde ebenfalls *ZMAT5* auf Proteinebene nachgewiesen.

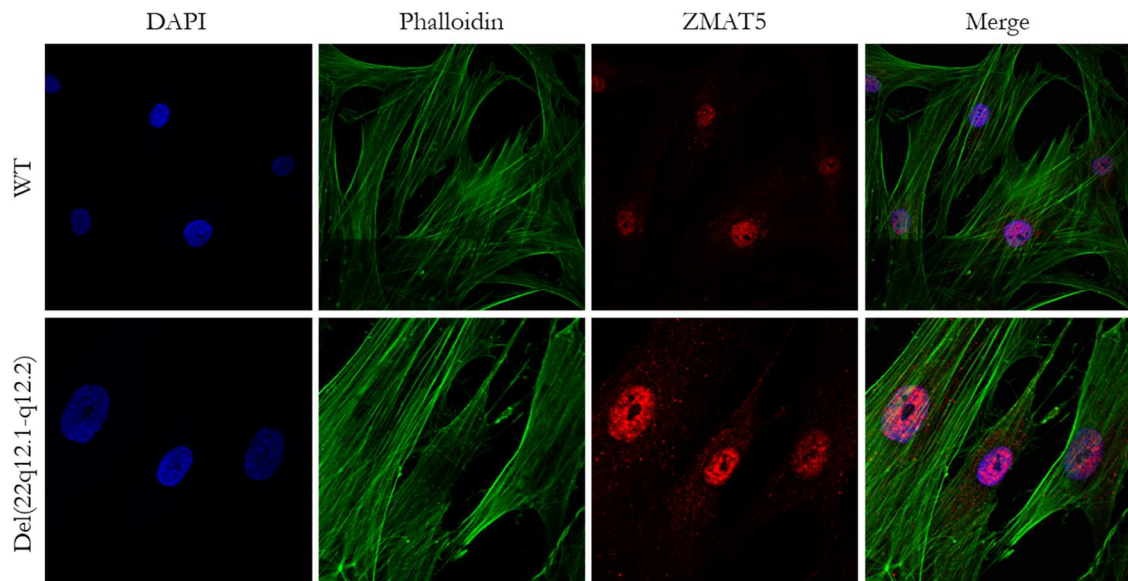


**Abbildung 20: Nachweis von ZMAT5 in verschiedenen Zelllinien auf Proteinebene.** Die Expression von ZMAT5 auf Proteinebene wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht. **A** 30 µg Protein von Proben der Zelllinien HEK293, HeLa und K462 wurden auf ein 4 – 12% Gel aufgetragen. Die Banden mit einer Größe von ~18 kDa entsprechen der Größe von ZMAT5. Das HKG-Protein Hsc70 (70 kDa) diente der Normalisierung. ZMAT5 wurde in den Zelllinien HEK293 und HeLa etwa gleich stark exprimiert, in der Zelllinie K562 vergleichsweise schwächer. **B** Zwei WT-Fibroblastenlinien (WT-7, WT-10) wurden auf die Expression von ZMAT5 hin untersucht. 30 µg Protein wurden auf ein 4 – 12% Gel aufgetragen. Die Banden mit einer Größe von ~18 kDa entsprechen der Größe von ZMAT5. Zur Normalisierung wurde das HKG-Protein β-Actin (~42 kDa) verwendet. ZMAT5 wird in beiden WT-Fibroblasten detektiert. Marker: Page-Ruler™ Plus Prestrained Protein Marker; Größenangabe in kDa

### 3.2.3 Die Mikrodeletion 22q12.1-q12.2 hat keinen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von ZMAT5

Es wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt, um den Effekt der Deletion 22q12.1-q12.2 auf die zelluläre Lokalisation von ZMAT5 und das Zellskelett zu untersuchen. Dazu wurden WT- und Patienten-Fibroblasten (del(22q12.1-q12.2)) auf Coverslips fixiert und mit fluoreszierendem Antikörper gegen endogenes ZMAT5 inkubiert (Abbildung 21). Das endogene ZMAT5 wurde sowohl in den WT- wie auch in den Patienten-Fibroblasten im Nukleus detektiert. Das Zytoskelett wurde sowohl in den WT- als auch in den Patienten-Fibroblasten mit Phalloidin gefärbt und zeigte keine Auffälligkeiten.



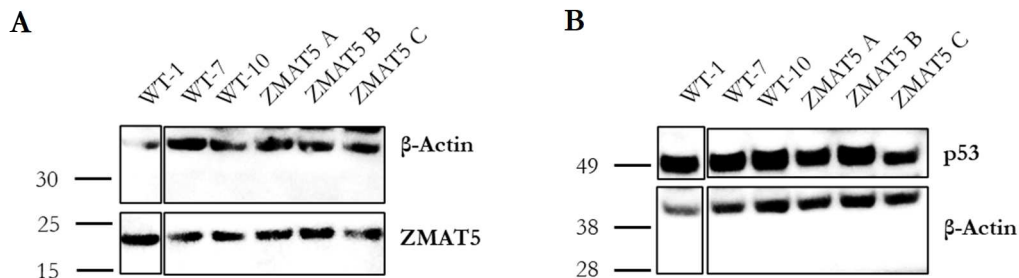


**Abbildung 21: Zelluläre Lokalisation von ZMAT5 in Fibroblasten.** Um den Einfluss der Mikrodeletion 22q12.1-q12.2 auf die zelluläre Lokalisation von ZMAT5 zu untersuchen, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung an WT- und Patienten-Fibroblasten (del(22q12.1-q12.2)) durchgeführt. Endogenes ZMAT5 wurde in allen Zellen vornehmlich im Nukleus exprimiert (rot). Phalloidin färbte das F-Aktin des Zytoskeletts aller Zellen an, wobei kein Unterschied zwischen WT- und Patienten-Fibroblasten (del(22q12.1-q12.2)) zu erkennen war (grün). Alle Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit einem Laser Mikroskop mit 600facher Standardvergrößerung und 3fachem Zoom gemacht.

### 3.2.4 Die Mikrodeletion 22q12.1-q12.2 zeigt keinen Einfluss auf ZMAT5 und p53 auf Proteinebene

Um den Einfluss der Mikrodeletion 22q12.1-q12.2 auf ZMAT5 und p53 auf Proteinebene zu untersuchen wurde eine Western Blot-Analyse am Protein dreier WT-Fibroblastenlinien (WT-1, WT-7, WT-10) und dreier Klone der Patienten-Fibroblasten (ZMAT5 A, ZMAT5 B, ZMAT5 C) durchgeführt. Nachdem das Protein isoliert wurde, erfolgte eine Inkubation der Proben mit Antikörpern gegen ZMAT5 und p53. Die Banden, die ZMAT5 (~18 kDa) entsprechen, wurden in allen Fibroblasten-Zelllinien etwa gleich stark detektiert (Abbildung 22A). Die Banden mit einer Größe von 53 kDa entsprechen der erwarteten Größe von p53 (Abbildung 22B). Zur Normalisierung wurde das HKG-Protein  $\beta$ -Actin (~42 kDa) verwendet. Eine Auswertung des Western Blots zur Expressionsanalyse von ZMAT5 mittels ImageJ v1.53c und AlphaView™-FluorChem Q Software ergab keine verminderte Dichte der Banden und somit der Proteinmenge von ZMAT5.

Es konnte keine verringerte Proteinmenge von ZMAT5 in den Patienten-Fibroblasten mit der Mikrodeletion 22q12.1-q12.2 im Vergleich zu den WT-Fibroblasten festgestellt werden. Ein Unterschied in der Proteinmenge von p53 in den WT- und den Patienten-Fibroblasten konnte mittels Western Blot-Analyse nicht festgestellt werden.



**Abbildung 22: Nachweis von ZMAT5 und p53 in WT- und Patienten-Fibroblasten auf Proteinebene.** Der Einfluss der Mikrodeletion 22q12.1-q12.2 auf ZMAT5 und p53 wurde auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse untersucht. Dafür wurde das Protein dreier WT-Fibroblastenlinien (WT-1, WT-7, WT-10) sowie das Protein dreier Klone der Patienten-Fibroblasten (ZMAT5 A, ZMAT5 B, ZMAT5 C) isoliert. Es wurden jeweils 30  $\mu$ g Protein auf ein 4 – 12% Gel aufgetragen. **A** Die Proben wurden mit einem Antikörper gegen ZMAT5 inkubiert. Die Banden mit einer Größe von  $\sim$ 18 kDa entsprechen der Größe von ZMAT5. Zur Normalisierung wurde ein Antikörper gegen das HKG-Protein  $\beta$ -Actin ( $\sim$ 42 kDa) verwendet. Es liegt kein Unterschied in der Proteinmenge von ZMAT5 zwischen WT- und Patienten-Fibroblasten vor. **B** Die Proben der WT- und Patienten-Fibroblasten wurden mit einem Antikörper gegen p53 inkubiert. Ein Antikörper gegen  $\beta$ -Actin ( $\sim$ 42 kDa) wurde zur Normalisierung verwendet. P53 (53 kDa) wurde in den WT- und ZMAT5-Patienten-Fibroblasten in gleicher Stärke detektiert. Marker: Standard PageRuler™ Plus Prestrained Protein Marker (**A**), SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard PageRuler (**B**); Größenangabe in kDa

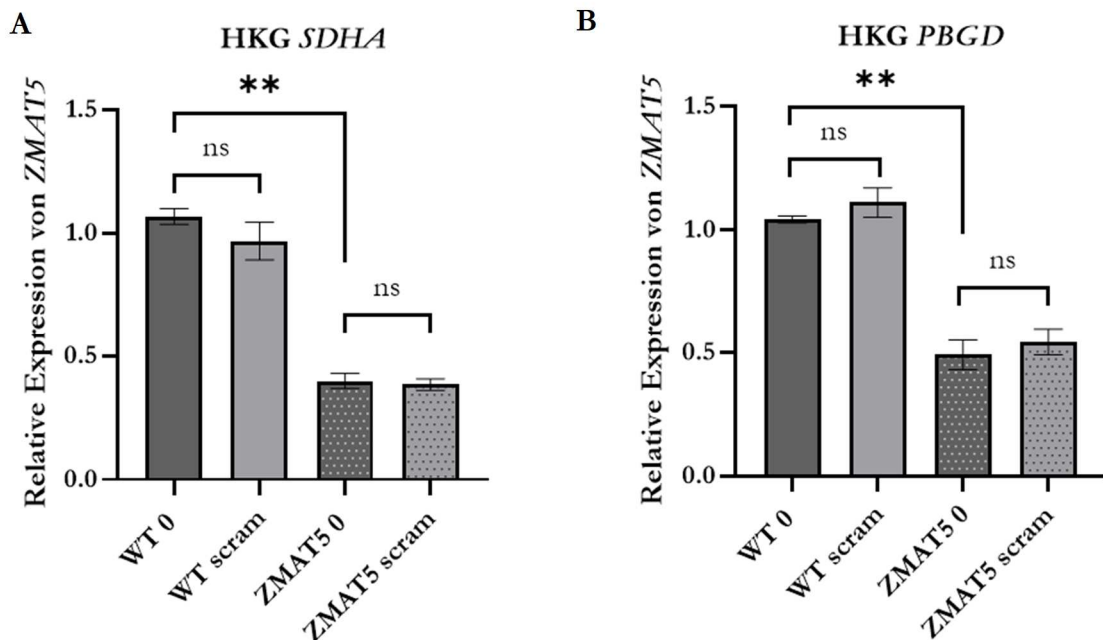
### 3.2.5 Einfluss der Herunterregulierung von *ZMAT5* auf die Expression von *FBRSL1-V1* und *FBRSL1-V2* in Fibroblasten

Eine RNA-Sequenzierung einer Blutprobe des Patienten mit der Mikrodeletion 22q12.1-q12.2 zeigte eine Herunterregulierung von *FBRSL1* in Blutzellen. Um herauszufinden, ob eine Herunterregulierung von *ZMAT5* einen Einfluss auf das Expressionslevel von *FBRSL1* hat, wurde *ZMAT5* in WT- und Patienten-Fibroblasten mittels *short interfering*-RNA (siRNA) herunterreguliert und die Expressionslevel mithilfe einer qRT-PCR gemessen. Als Referenz zu der Transfektion mit siRNA wurden alle Zelllinien mit einer *scramble*-siRNA (scram) transfiziert.

Um zunächst einen Einfluss der *scramble*-siRNA auf die Expression von *ZMAT5* auszuschließen, wurden WT- und Patienten-Fibroblasten mit *scramble*-siRNA transfiziert (WT scram, ZMAT5 scram) und die Expression von *ZMAT5* in den mit *scramble*-siRNA transfizierten Fibroblasten mit den unbehandelten WT-Fibroblasten (WT 0) und unbehandelten Patienten-Fibroblasten (ZMAT5 0) verglichen. Mittels qRT-PCR und unter Verwendung von *succinate*

*dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA)* (Abbildung 23A) und *porphobilinogen-desaminase (PBGD)* (Abbildung 23B) als HKG wurde die Expression von *ZMAT5* in den unbehandelten und transfizierten Fibroblastenlinien verglichen. Die Daten der drei biologischen mit jeweils zwei technischen Replikaten wurden mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet.

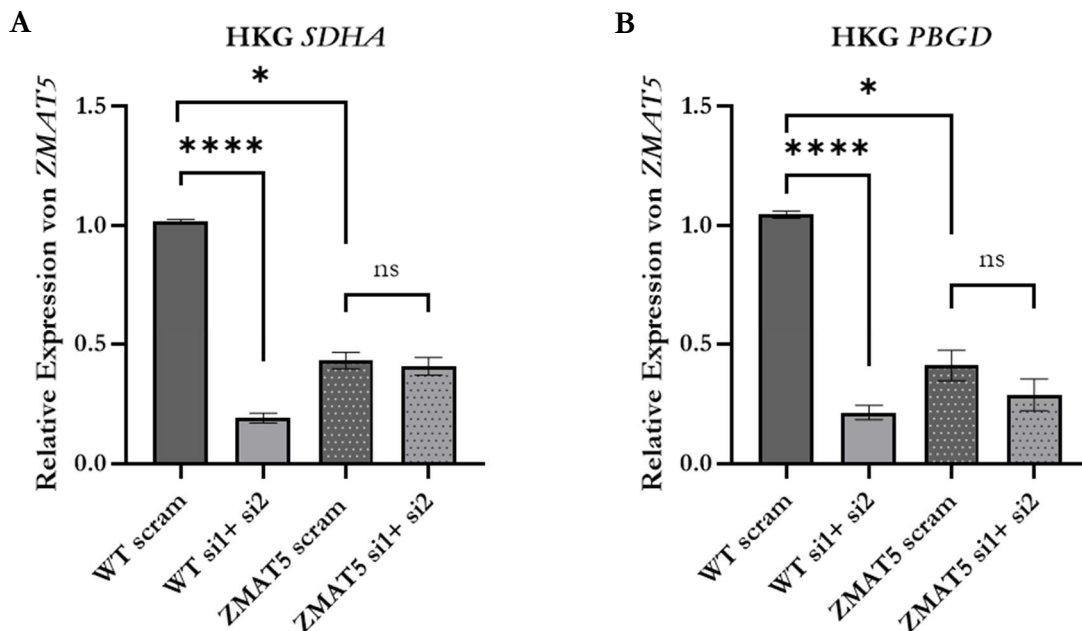
Die Expression von *ZMAT5* in den mit *scramble*-siRNA-transfizierten WT- und Patienten-Fibroblasten (WT scam, *ZMAT5* scam) unterscheidet sich nicht signifikant von der Expression in den unbehandelten WT- und Patienten-Fibroblasten (WT 0, *ZMAT5* 0) (Abbildung 23). Die *scramble*-siRNA hat somit keinen Einfluss auf die Expression von *ZMAT5* und wird in folgenden Experimenten als Referenz verwendet. Darüber hinaus ist die Expression von *ZMAT5* in den Patienten-Fibroblasten (*ZMAT5* 0, *ZMAT5* scam) im Vergleich zu den WT-Fibroblasten (WT 0, WT scam) um ca. 50% reduziert.



**Abbildung 23: Expressionsanalyse von *ZMAT5* in WT- und Patienten-Fibroblasten vor und nach Transfektion mit *scramble*-siRNA.** Unbehandelte WT- und Patienten-Fibroblasten (WT 0, *ZMAT5* 0) und *scramble*-siRNA-transfizierte WT- und Patienten-Fibroblasten (WT scam, *ZMAT5* scam) wurden auf die Expression von *ZMAT5* hin analysiert. Mithilfe von qRT-PCR wurde die Expression von *ZMAT5* mit den HKG *SDHA* (A) und *PBGD* (B) untersucht. Es ist kein Unterschied im Expressionslevel von *ZMAT5* in den *scramble*-siRNA-transfizierten Fibroblasten (WT scam, *ZMAT5* scam) im Vergleich zu den nicht-transfizierten Fibroblasten (WT 0, *ZMAT5* 0) feststellbar. Somit hat die Transfektion von *scramble*-siRNA keinen Einfluss auf die Expression von *ZMAT5* und kann in den folgenden Experimenten als Referenz verwendet werden. Die Patienten-Fibroblasten (*ZMAT5* 0, *ZMAT5* scam) haben 50 – 60% weniger *ZMAT5*-Expression als die WT-Fibroblasten (WT 0, WT scam). Relative Genexpression mit Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte. Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn-Test (ns:  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ )

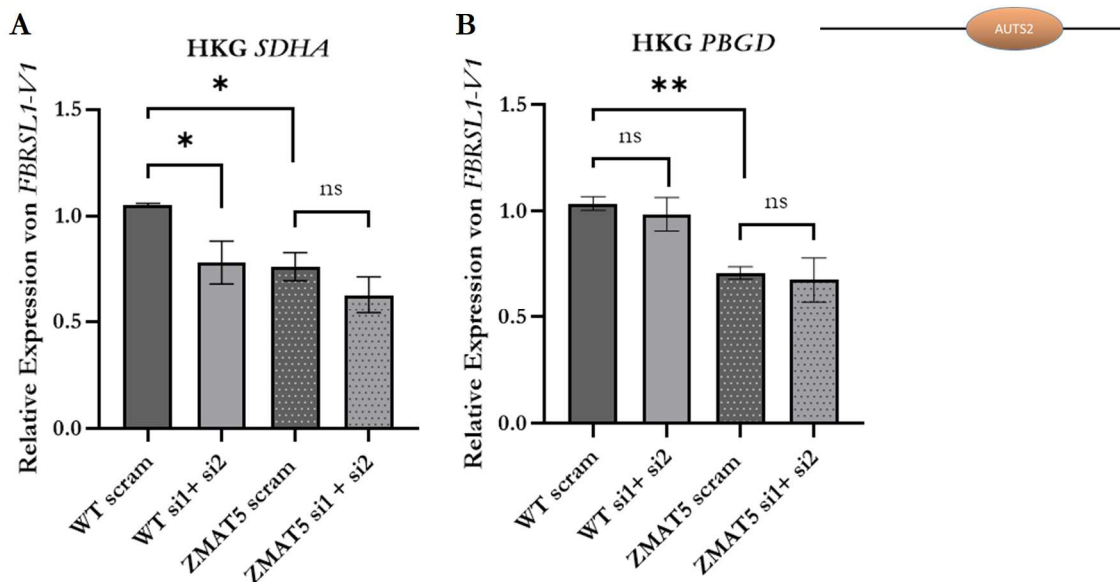
Nachdem gezeigt wurde, dass eine Transfektion mit *scramble*-siRNA keinen Einfluss auf die Expression von *ZMAT5* hat, wurde *ZMAT5* in Patienten- und WT-Fibroblasten herunterreguliert. Dafür wurden die Patienten-Fibroblasten mit siRNAs (siRNAs 1 und 2) gegen *ZMAT5* transfiziert, ebenso wie drei Kontroll-WT-Fibroblastenlinien (WT-1, WT-3, WT-7). Als Referenz zu der Transfektion mit siRNA wurden alle Zelllinien mit einer *scramble*-siRNA transfiziert.

Durch die Transfektion von siRNA 1 und 2 (si1 + si2) in WT-Fibroblasten ließ sich die Expression von *ZMAT5* um etwa 80% reduzieren (Abbildung 24). Im Falle der *scramble*-siRNA-transfizierten Fibroblasten zeigten Patienten-Fibroblasten (*ZMAT5* scram) im Vergleich zu den WT-Fibroblasten (WT scram) eine reduzierte Expression von *ZMAT5* von über 50%. Durch eine Transfektion von siRNA 1 und 2 in Patienten-Fibroblasten (*ZMAT5* si1 + si2) wurde die Expression von *ZMAT5* im Vergleich zu den mit *scramble*-siRNA-transfizierten Patienten-Fibroblasten nicht weiter reduziert.



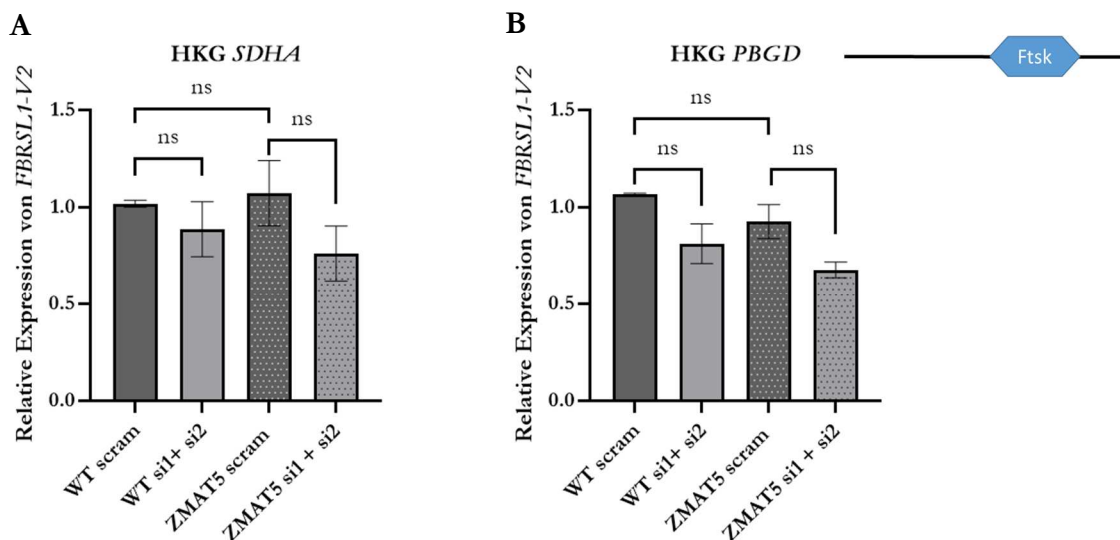
**Abbildung 24: Expressionsanalyse von *ZMAT5* in WT- und Patienten-Fibroblasten nach Knockdown von *ZMAT5* mit siRNA.** WT- und Patienten-Fibroblasten (del(22q12.1-q12.2)) wurden mit *ZMAT5*-spezifischer siRNA (WT si1 + si2, *ZMAT5* si1 + si2) oder einer *scramble*-siRNA (WT scram, *ZMAT5* scram) transfiziert. Mittels qRT-PCR wurde die Expression von *ZMAT5* mithilfe der HKG *SDHA* (A) und *PBGD* (B) untersucht. Die verminderte Expression von *ZMAT5* in WT si1 + si2 im Vergleich zu den WT scram zeigen die Effektivität des Knockdowns mittels siRNA 1 und 2. Die Expression konnte auf ~20% gesenkt werden. Die nicht-Knockdown Patienten-Fibroblasten (*ZMAT5* scram) exprimierten ~70% weniger *ZMAT5* als die mit *scramble*-siRNA transfizierten WT-Fibroblasten. Durch die Transfektion der Patienten-Fibroblasten mit siRNA 1 und 2 (*ZMAT5* si1 + si2) konnte die Expression von *ZMAT5* im Vergleich zu *ZMAT5* scram nicht signifikant weiter reduziert werden. Relative Genexpression mit Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte. Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn-Test (ns:  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $\leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ )

Nach dem Nachweis eines Knockdowns von *ZMAT5* in WT- und Patienten-Fibroblasten (del(22q12.1-q12.2)) wurde die Expression der *FBRSL1*-Isoform *FBRSL1-V1* untersucht (Abbildung 25). Durch die Transfektion mit siRNA 1 und 2 in WT-Fibroblasten (WT si1 + si2) ließ sich, unter der Verwendung des HKG *SDHA*, eine Herunterregulierung von *FBRSL1-V1* feststellen, welche die statistische Signifikanz erreichte. Im Falle des HKG *PBGD* konnte eine Reduktion von *FBRSL1-V1* in den WT-Fibroblasten (WT si1 + si2) hingegen nicht festgestellt werden. Im Falle der *scramble*-siRNA-transfizierten Patienten-Fibroblasten (*ZMAT5* scram) ließ sich, unabhängig vom verwendeten HKG, eine verminderte Expression von *FBRSL1-V1* von über 20% im Vergleich zu den Referenz-WT-Fibroblasten nachweisen. Nach einer Transfektion mit siRNA 1 und 2 wurde keine weitere Reduktion in der Expression von *FBRSL1-V1* in den Patienten-Fibroblasten (*ZMAT5* si1 + si2) beobachtet.



**Abbildung 25: Expressionsanalyse von *FBRSL1-V1* in WT- und Patienten-Fibroblasten nach Knockdown von *ZMAT5* mit siRNA.** Zum Knockdown von *ZMAT5* wurden WT- und Patienten-Fibroblasten mit siRNA 1 und 2 (WT si1 + si2, ZMAT5 si1 + si2) transfiziert. Als Referenz dienten WT- und Patienten-Fibroblasten (del(22q12.1-q12.2)), welche mit *scramble*-siRNA (WT scram, ZMAT5 scram) transfiziert wurden. Mittels qRT-PCR wurde die Expression der *FBRSL1*-Isoform *FBRSL1-V1* mithilfe der HKG *SDHA* (A) und *PBGD* (B) untersucht. Unter Verwendung des HKG *SDHA* ist die Expression von *FBRSL1-V1* in WT si1 + si2 im Vergleich zu WT scram signifikant reduziert (A), wohingegen unter Verwendung des HKG *PBGD* kein signifikanter Unterschied zu erkennen ist (B). Im Falle der mit *scramble*-siRNA-transfizierten Patienten-Fibroblasten (ZMAT5 scram) konnte eine verminderte Expression von *FBRSL1-V1* von über 20% im Vergleich zu den Referenz-Fibroblasten (WT scram) unabhängig vom verwendeten HKG festgestellt werden. Durch eine Transfektion der Patienten-Fibroblasten mit siRNA 1 und 2 (ZMAT5 si1 + si2) ließ sich die Expression von *FBRSL1-V1* nicht weiter reduzieren. Relative Genexpression mit Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte. Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn-Test (ns:  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ )

Ebenso wie *FBRSL1-V1* wurde auch die Expression von *FBRSL1-V2* nach dem Nachweis eines erfolgreichen Knockdowns von *ZMAT5* untersucht. Die Expressionslevel von *FBRSL1-V2* wurden mittels qRT-PCR ermittelt. Die entsprechenden Primer binden so, dass die beiden Isoformen *FBRSL1-V2.1* und *FBRSL1-V2.2* abgedeckt werden. Somit wurde in dieser Arbeit nicht zwischen den beiden Varianten differenziert und sie wurden zusammenfassend als *FBRSL1-V2* bezeichnet. Zwischen den mit siRNA 1 und 2 transfizierten WT-Fibroblasten und den Kontroll-WT-Fibroblasten lässt sich bei der Auswertung mit den beiden HKG statistisch, aufgrund des großen Standardfehlers, kein signifikanter Unterschied in der Expression von *FBRSL1-V2* erkennen (Abbildung 26). Zwischen den Kontroll-Patienten-Fibroblasten und den WT-Kontroll-Fibroblasten gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Expression von *FBRSL1-V2*. Die Transfektion mit siRNA 1 und 2 gegen *ZMAT5* bewirkte keinen signifikanten Unterschied in der Expression von *FBRSL1-V2* in den Patienten-Fibroblasten.



**Abbildung 26: Expressionsanalyse von *FBRSL1-V2* in WT- und Patienten-Fibroblasten nach Knockdown von *ZMAT5* mit siRNA.** *ZMAT5* wurde in WT- und Patienten-Fibroblasten (del(22q12.1-q12.2)) mittels siRNA 1 und 2 herunterreguliert (WT si1 + si2, ZMAT5 si1 + si2). Als Referenz dienen mit *scramble*-siRNA transfizierte Fibroblasten (WT scam, ZMAT5 scam). Mittels qRT-PCR und mithilfe der HKG *SDHA* (A) und *PBGD* (B) wurde die Expression von *FBRSL1-V2* untersucht. Die Expression von *FBRSL1-V2* ist in den mit siRNA 1 und 2 transfizierten WT-Fibroblasten nicht signifikant verringert. Das Expressionslevel von *FBRSL1-V2* in ZMAT5 scam ist nicht signifikant verändert im Vergleich zu WT scam. Zudem liegt kein signifikanter Unterschied in den Expressionslevel von *FBRSL1-V2* zwischen ZMAT5 si1 + si2 und WT scam vor (A, B). Relative Genexpression mit Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte. Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn-Test (ns:  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ )

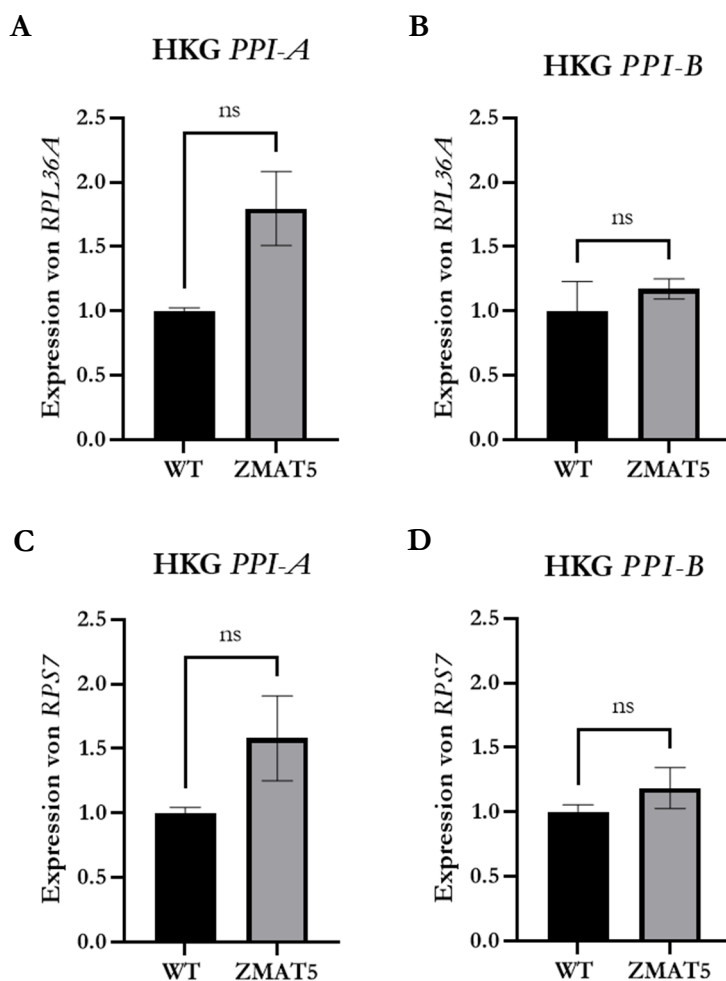
Zusammengefasst, ist die Expression von *ZMAT5* in den Patienten-Fibroblasten (del(22q12.1-12.2)) im Vergleich zu den WT-Fibroblasten mit einer reduzierten Expression von über 50% signifikant verringert. Mittels Knockdown von *ZMAT5* konnte eine Reduktion von ca. 80% in der Expression von *ZMAT5* in den WT-Fibroblasten erreicht werden. In Patienten-Fibroblasten ließ sich die Expression von *ZMAT5* mittels siRNA-Knockdown nicht wesentlich weiter senken. Eine Reduktion in der Expression von *ZMAT5* bewirkte ein verringertes Expressionslevel von *FBRSL1-V1* in WT-Fibroblasten, was jedoch nur unter Verwendung des HKG *SDHA* die statistische Signifikanz erreichte. In Patienten-Fibroblasten konnte eine reduzierte Expression von *FBRSL1-V1* von über 20% in *scramble*-siRNA-transfizierten Patienten-Fibroblasten nachgewiesen werden. Der Knockdown von *ZMAT5* hatte keinen Einfluss auf die Expression von *FBRSL1-V2* in WT- und Patienten-Fibroblasten.

### 3.2.6 Effekt der Mikrodeletion 22q12.1-q12.2 auf das Expressionslevel verschiedener *Ribosomal Protein*-Gene in Blutzellen und in Fibroblasten

Mittels RNA-Sequenzierung einer Blutprobe des Patienten mit der Mikrodeletion 22q12.1-q12.2 (durchgeführt vom Institut für Humangenetik, Göttingen) wurde eine Dysregulation von verschiedenen RP-Genen festgestellt.

Um zu überprüfen, ob *ZMAT5*, als ein in der Mikrodeletion 22q12.1-q12.2 befindliches Gen, an der Regulation von RP-Genen beteiligt ist, wurden Expressionsanalysen mittels qRT-PCR durchgeführt. Da nur eine begrenzte Menge Blutprobe des zu dem Zeitpunkt bereits verstorbenen Patienten vorlag wurden die weiteren Experimente an Patienten-Fibroblasten durchgeführt. Als Referenz dienten vier WT-Fibroblastenlinien (WT-1, WT-3, WT-7, WT-10). Die *Peptidylprolyl Isomerase-A* (*PPI-A*) und *Peptidylprolyl Isomerase-B* (*PPI-B*) wurden als HKG verwendet und die Daten wurden mittels Standardkurven-Methode ausgewertet.

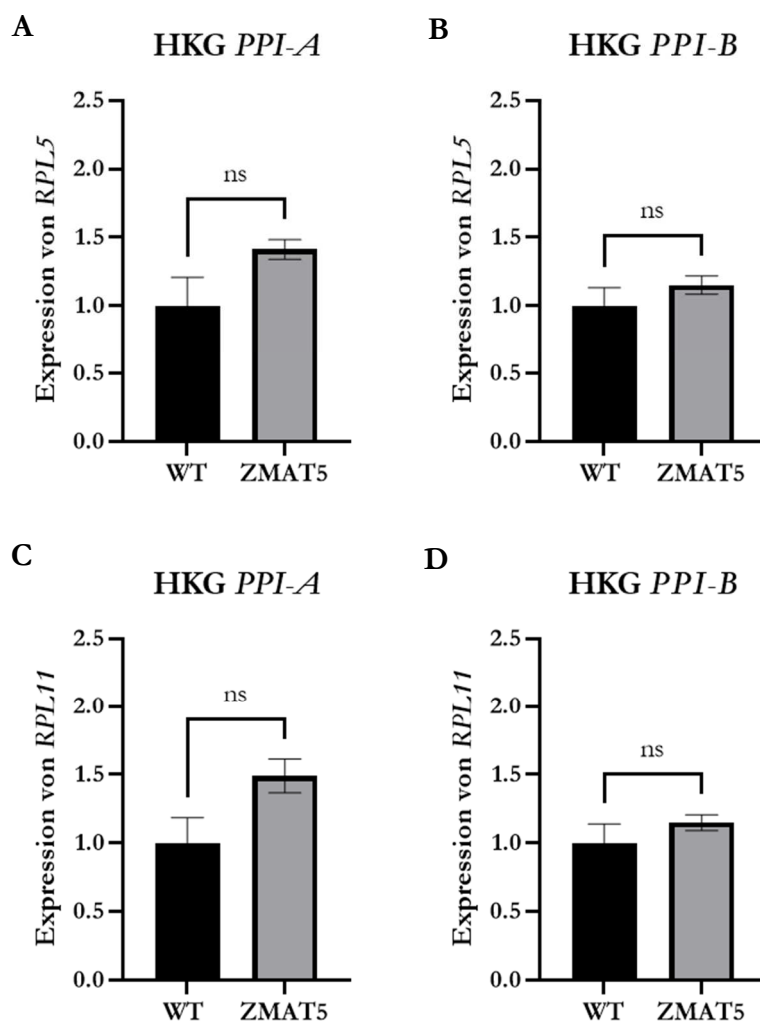
Die Gene *RPL36A* (Abbildung 27A, B) und *RPS7* (Abbildung 27C, D), die in den Lymphozyten überexprimiert wurden, waren in den Patienten-Fibroblasten nicht signifikant heraufreguliert.



**Abbildung 27: Expressionsanalyse von *RPL36A* und *RPS7* in Fibroblasten.** Die Expression der Gene *RPL36A* (A, B) und *RPS7* (C, D) in Patienten-Fibroblasten (ZMAT5) wurde mithilfe einer qRT-PCR untersucht. Als Kontrolle dienen vier WT-Fibroblastenlinien (WT-1, WT-3, WT-7, WT-10) (WT). Die Auswertung erfolgte mithilfe der HKG *PPI-A* (A, C) und *PPI-B* (B, D). In keinem der untersuchten RP-Gene liegt ein signifikanter Unterschied in der Expression in Patienten-Fibroblasten im Vergleich zu den WT-Fibroblasten vor. Relative Genexpression mit Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte. Signifikanz mittels Mann-Whitney-Test (ns:  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ )

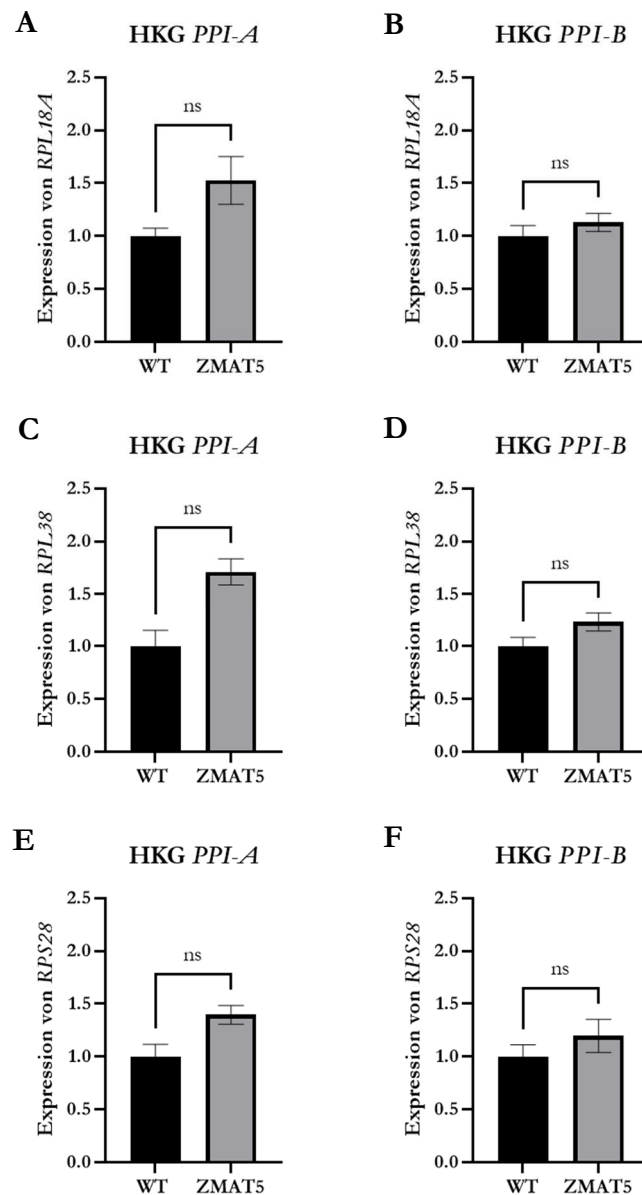


Die Gene *RPL5* (Abbildung 28A, B) und *RPL11* (Abbildung 28C, D) waren in den Lymphozyten nicht dysreguliert. In den Patienten-Fibroblasten war im Vergleich zu den WT-Fibroblasten ebenfalls keine signifikante Dysregulation mittels qRT-PCR erkennbar.



**Abbildung 28: Expressionsanalyse von *RPL5* und *RPL11* in Fibroblasten.** Die Expression der Gene *RPL5* (A, B) und *RPL11* (C, D) in Patienten-Fibroblasten (ZMAT5) wurde mithilfe einer qRT-PCR untersucht. Als Kontrolle dienten vier WT-Fibroblastenlinien (WT-1, WT-3, WT-7, WT-10) (WT). Die Auswertung erfolgte mithilfe der HKG *PPI-A* (A, C) und *PPI-B* (B, D). In keinem der untersuchten RP-Gene liegt ein signifikanter Unterschied in der Expression in Patienten-Fibroblasten im Vergleich zu den WT-Fibroblasten vor. Relative Genexpression mit Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte. Signifikanz mittels Mann-Whitney-Test (ns:  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ )

Die Gene *RPL18A* (Abbildung 29A, B), *RPL38* (Abbildung 29C, D) und *RPS28* (Abbildung 29E, F), welche in den Patienten-Lymphozyten vermindert exprimiert waren, wiesen keine signifikante Dysregulation in den Patienten-Fibroblasten auf.



**Abbildung 29: Expressionsanalyse von *RPL18A*, *RPL38* und *RPS28* in Fibroblasten.** Die Expression der Gene *RPL18A* (A, B), *RPL38* (C, D) und *RPS28* (E, F) in Patienten-Fibroblasten (ZMAT5) wurde mithilfe einer qRT-PCR untersucht. Als Kontrolle dienen vier WT-Fibroblastenlinien (WT-1, WT-3, WT-7, WT-10) (WT). Die Auswertung erfolgte mithilfe der HKG *PPI-A* (A, C, E) und *PPI-B* (B, D, F). In keinem der untersuchten RP-Gene liegt ein signifikanter Unterschied in der Expression in Patienten-Fibroblasten im Vergleich zu den WT-Fibroblasten vor. Relative Genexpression mit Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte. Signifikanz mittels Mann-Whitney-Test (ns:  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ )

Zusammengefasst wurde bei keinem der untersuchten RP-Gene eine Dysregulation in den Patienten-Fibroblasten im Vergleich zu den WT-Fibroblasten mittels qRT-PCR festgestellt, unabhängig vom verwendeten HKG.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es anhand zweier Krankheitsbilder mehr Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen genetischen Varianten und Dysfunktionen bzw. Fehlregulationen ribosomaler Proteine zu gewinnen. Es sollte überprüft werden, ob *RPS27A* als mögliches neues DBA-Gen etabliert werden kann und wie sich die VUS c.335G>A (p.G112D) im *RPS27A*-Gen auf den RP-MDM2-p53-Signalweg auswirkt. Darüber hinaus sollten Erkenntnisse über eine eventuelle Regulation von *FBRSL1* durch *ZMAT5* gewonnen und Auswirkungen einer Fehlregulation dieser beiden Gene auf die Expression ribosomaler Proteine untersucht werden.

Insgesamt konnte kein Einfluss der Missense-Variante *RPS27A* c.335G>A (p.G112D) auf die Expression oder Lokalisation von *RPS27A* und p53 festgestellt werden. Bei der Überprüfung der Interaktion von *RPS27A* und MDM2 konnte ebenfalls kein Einfluss der VUS c.335G>A (p.G112D) im *RPS27A*-Gen auf die indirekte Interaktion der beiden Proteine festgestellt werden.

Im Falle der Mikrodeletion (del(22q12.1-q12.2)), in welcher unter anderem das Gen *ZMAT5* liegt, konnte auf RNA-Ebene sowohl ein Einfluss der Deletion im Bereich 22q12.1-q12.2 auf die Expression von *ZMAT5* als auch eine Regulation von *FBRSL1-V1* durch *ZMAT5* nachgewiesen werden. Eine Dysregulation der Gene *RPS7*, *RPS28*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL18A*, *RPL36A* und *RPL38* in den Patienten-Fibroblasten konnte nicht nachgewiesen werden.

## 4.2 RPS27A

### 4.2.1 Variante c.335G>A (p.G112D) im *RPS27A*-Gen als neue pathogene DBA-Variante?

Die Diamond-Blackfan-Anämie (DBA) ist eine Ribosomopathie, welche durch pathogene Varianten in RP-Genen verursacht wird, u.a. *RPS7*, *RPL5* und *RPL11* (Akram et al. 2020; Boria et al. 2010; Draptchinskaia et al. 1999; Quarello et al. 2010). Bei der DBA handelt es sich um eine hereditäre erythrozytäre Anämie auf Knochenmarkebene, mit einem meist autosomal-dominanten und seltener autosomal-rezessiven Erbgang (Draptchinskaia et al. 1999; Engidaye et al. 2019). Es gibt bisher keine Hinweise auf eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation bzw. einem Zusammenhang zwischen der DBA-Variante und der hämatologischen Schwere der Erkrankung (Campagnoli et al. 2004; Engidaye et al. 2019). So konnten Mirabello et al. (2014) zeigen, dass Mutationen im DBA-Gen *RPS29* eine inkomplette Penetranz und variable Expressivität aufweisen, sodass auch asymptomatische Familienmitglieder Träger derselben Mutation sein können.

*RPS27A* ist bisher noch nicht als weiteres DBA-Gen etabliert. Gazda et al. (2008) haben bei einem Kind mit der klinischen Diagnose einer DBA die *RPS27A*-Variante c.169T>C (p.Ser57Pro) detektiert, wobei eine definitive Pathogenität der Missense-Variante nicht bestätigt werden konnte. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die *RPS27A*-Variante c.335G>A (p.G112D), die bei einem Patienten mit der klinischen Diagnose einer DBA detektiert wurde, ursächlich für die Erkrankung sein kann.

Die *RPS27A*-Variante c.335G>A (p.G112D) wurde nicht nur bei dem Patienten, sondern auch bei dessen Vater und Onkel detektiert. Der Onkel erkrankte zu Lebzeiten an einem Rhabdomyosarkom und einem Glioblastom und verstarb im Alter von 19 Jahren. Weder bei ihm noch beim Vater des Patienten wurde eine DBA diagnostiziert. Aufgrund der bekannten unvollständigen Penetranz beschriebener DBA-Varianten bedeutet dies keinen Ausschluss einer möglichen Pathogenität der *RPS27A*-Variante c.335.G>A (p.G112D).

### 4.2.2 Einfluss der Variante *RPS27A* (p.G112D) auf die zelluläre Lokalisation und Protein-Expression

Ein funktionsfähiges Ribosom wird während der ribosomalen Biosynthese aus vier reifen rRNAs und etwa 80 RPs geformt (Fatica und Tollervey 2002; Venema und Tollervey 1999). Dazu kommen weitere 200 Transaktionsfaktoren, wie Helikasen, snoRNAs, Chaperone und Transporter, die an der Ribosombildung beteiligt sind (Sulima et al. 2019). Obwohl die ribosomale Biosynthese ein Prozess ist, der in allen Zellen des Organismus stattfindet, führen bestimmte Mutationen in RPs zu gewebspezifischen Defekten in der post-embryonalen Entwicklung (Yelick und Trainor 2015).

Die RPs sind bei der ribosomalen Biosynthese wichtig für die korrekte rRNA-Faltung, -spaltung und -prozessierung, sowie für die Formierung des Ribosoms (Nakhoul et al. 2014; Scull und Schneider 2019; Sloan et al. 2017). Im Falle einer DBA kommt es aufgrund der mutierten RPs zu einer verminderten ribosomalen Biogenese und Akkumulation spezifischer rRNA-Vorläufer, oder zu einer verminderten rRNA-Synthese (Aspesi et al. 2017; Boria et al. 2010).

Da Costa et al. (2003) haben am Beispiel von RPS19 mittels Immunfluoreszenz (IF) die Lokalisation von RPs untersucht und bestätigt, dass diese in gesunden Zellen zuerst im Nukleus und v.a. im Nukleolus exprimiert werden und später in Ribosomen aufgenommen werden. Dabei gilt: je geringer die Stabilität des ribosomalen Proteins, desto häufiger ist dieses nicht mehr im Nukleus detektierbar und die Expression insgesamt verringert (Da Costa et al. 2003). So führen Varianten im *RPS19*-Gen, u.a. die Missense-Varianten p.Val115Phe und p.Gly127Gln, aufgrund einer verminderten Stabilität des Proteins häufig zu einer verminderten Detektion auf Proteinebene oder zu einer Fehllokalisierung auf zellulärer Ebene (Angelini et al. 2007; Da Costa et al. 2003).

In dieser Arbeit konnte mittels IF das endogene RPS27A im Nukleus und v.a. im Nukleolus detektiert und kein Einfluss der Variante *RPS27A* c.335G>A (p.G112D) auf die zelluläre Lokalisation festgestellt werden. Mittels PCR und Western Blot-Analyse wurde zunächst gezeigt, dass RPS27A sowohl auf RNA- als auch Protein-Ebene in HEK293-, HeLa-, K562-Zelllinien, Lymphoblasten und verschiedenen WT-Fibroblasten exprimiert wird. Auch in den Patienten-Fibroblasten mit der Variante RPS27A (p.G112D) wurde RPS27A weiterhin detektiert.

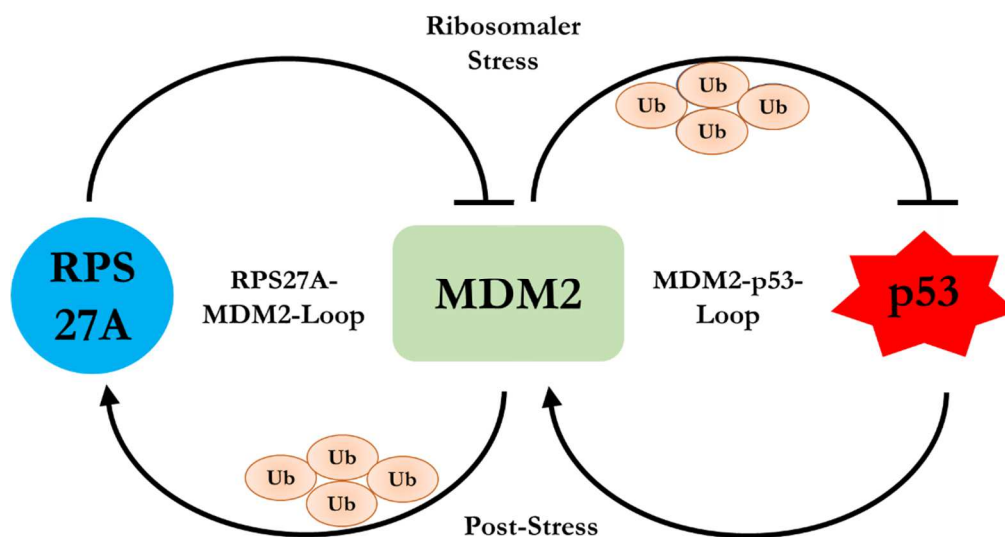
Bei bereits bestätigten DBA-Varianten konnte festgestellt werden, dass es stabilere RP-Varianten gibt, bei denen kein Effekt auf die Proteinmenge festzustellen ist. Auch auf die Lokalisation des ribosomalen Proteins im Nukleolus wurden Unterschiede zwischen verschiedenen DBA-Varianten festgestellt. Als Ursache für die unterschiedliche Stabilität der RPs wird der Einfluss weiterer Interaktionspartner diskutiert (Angelini et al. 2007). Es wäre möglich, dass auch RPS27A weitere Interaktionspartner hat, welche das Protein stabilisieren. Dies könnte erklären, warum RPS27A trotz der Variante RPS27A (p.G112D) weiterhin auf Proteinebene detektierbar und auch kein Einfluss auf die Lokalisation von RPS27A zu beobachten ist.

Angelini et al. (2007) untersuchten die Lokalisation von RPS19-Varianten bei DBA-Patient:innen und stellten fest, dass keine der betroffenen RPs ins Ribosom aufgenommen wurden. Auch bei den stabileren RP-Varianten führten die Mutationen dazu, dass eine Aufnahme ins Ribosom ausblieb (Angelini et al. 2007). Ziel zukünftiger Arbeiten kann es sein, den Einfluss der RPS27A-Variante (p.G112D) auf die Lokalisation von RPS27A im Ribosom zu überprüfen.

### 4.2.3 Einfluss der Variante RPS27A (p.G112D) auf den RP-MDM2-p53-Signalweg

Fehlregulationen des Tumorsuppressors p53 begünstigen das Entstehen von DBA-assoziierten Tumorerkrankungen (Keersmaecker et al. 2015; Sulima et al. 2019). Unter Stressbedingungen sorgt p53 für einen Zellzyklusarrest und führt infolgedessen zur Apoptose (Nishimura et al. 2015). Eine solche Stresssituation kann im Rahmen einer gestörten ribosomalen Biogenese auftreten (Nakhoul et al. 2014; Nishimura et al. 2015). Ein weiterer Stressor stellt die Behandlung von Zellen mit Actinomycin (Act D) dar (Deisenroth et al. 2016; Robles und Adami 1998). MDM2 sorgt in normalem Zellzustand durch eine Bindung an p53 für dessen Ubiquitinierung und folglich für dessen Abbau (Deisenroth et al. 2016; Penzo et al. 2019; Sun et al. 2011). Während normalerweise nur eine geringe Anzahl ribosomaler Proteine zur Verfügung stehen, um mit MDM2 zu interagieren, führt eine große Anzahl freier RPs zu einer vermehrten Bindung von MDM2 (Penzo et al. 2019; Sulima et al. 2019). P53 wird folglich nicht mehr ubiquitiniert und stattdessen stabilisiert; die Zelle geht in den Zellzyklusarrest (Keersmaecker et al. 2015; Xu et al. 2016). Bekannte Interaktionspartner von MDM2 sind die RPs RPL5 und RPL11 (Dai et al. 2006; Marechal et al. 1994; Zhang et al. 2003).

Sun et al. (2011) konnten zeigen, dass RPS27A als weiteres RP mit MDM2 interagiert und die Expression von RPS27A, MDM2 und p53 unter Act D-Behandlung ansteigt. Zudem stellten Sun et al. (2011) das Modell eines Feedback-Loops auf (Abbildung 30), wonach MDM2 in der post-Stressphase durch p53 stabilisiert wird und für eine Ubiquitinierung von RPS27A sorgt, sodass das Expressionslevel von RPS27A nach etwa 12 h beginnt zu sinken.



**Abbildung 30: RPS27A-MDM2-p53 Feedback-Loop.** In normalem Zellzustand sorgt MDM2 über eine Bindung an p53 für dessen Ubiquitinierung und Abbau. Im Falle ribosomalen Stresses führt eine vermehrte Akkumulation von RPS27A zur Unterbindung der Interaktion zwischen MDM2 und p53, da RPS27A selbst mit MDM2 interagiert. Durch die fehlende Ubiquitinierung von p53 wird dieses stabilisiert und liegt somit in einer größeren Proteinmenge vor. In der post-Stressphase wird MDM2 durch p53 stabilisiert und MDM2 sorgt für eine Ubiquitinierung von RPS27A. Dies führt zum Abbau und sinkender Proteinmenge von RPS27A. (nach Sun et al. 2011)

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 24 h nach einer Behandlung der Fibroblasten mit Act D die Proteinmenge von RPS27A geringer, die von MDM2 und p53 dahingegen höher ist als in den DMSO-behandelten Zellen. Dieses Ergebnis unterstützt die These von Sun et al. (2011), wonach Stress den RPS27A-MDM2-Feedback-Loop aktiviert und nach einer Latenz von mindestens 12 h die Proteinmenge von RPS27A in einer post-Stressphase wieder sinkt. Dabei bleiben die Proteinmenge von MDM2 und p53 länger erhöht. Die VUS c.335G>A (p.G112D) im *RPS27A*-Gen zeigte hierbei keinen Einfluss auf diesen Feedback-Loop und die Proteinmenge von RPS27A, MDM2 und p53.

Darüber hinaus wurde die Interaktion von RPS27A und MDM2 eingehender untersucht. Sun et al. (2011) konnten bereits nachweisen, dass RPS27A mit MDM2 co-immunpräzipitiert. In dieser Arbeit wurde diese Interaktion mittels Co-Immünpräzipitation (Co-IP) bestätigt. Überdies wurde mittels Co-IP gezeigt, dass die Variante RPS27A (p.G112D) keinen Einfluss auf die Interaktion mit MDM2 hat. Bei der Co-IP handelt es sich um einen indirekten Interaktionsnachweis, d.h. dass einzelne Komponenten eines Protein-Komplexes identifiziert werden können (Free et al. 2009). Jedoch kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese direkt oder indirekt über Brückenproteine miteinander verbunden sind. Mithilfe des Yeast two Hybrid-Versuchs (Y2H) kann eine Klassifizierung als direkte Protein-Protein-Interaktion unter Ausschluss weiterer Interaktionspartner erfolgen (Brückner et al. 2009; Rao et al. 2014; van Crielinge und Beyaert 1999). Das dreimalige negative Ergebnis des in dieser Arbeit durchgeführten Y2H-Versuchs lässt den Schluss zu, dass RPS27A und MDM2 indirekt miteinander interagieren und weitere Komponenten an der Interaktion beteiligt sein müssen (Abbildung 31). Im Falle von RPL5 und RPL11 ist bekannt, dass sie im Rahmen des RP-MDM2-p53 Signalwegs zusammen mit 5S rRNA einen Interaktionskomplex mit MDM2 bilden (Donati et al. 2013; Marechal et al. 1994; Penzo et al. 2019). In zukünftigen Arbeiten kann mittels Proteomik untersucht werden, welche weiteren Komponenten im RPS27A-MDM2-Komplex interagieren.



**Abbildung 31: RPS27A-MDM2-Interaktionskomplex.** Bei einer Hemmung der ribosomalen Biosynthese kommt es zu einer Akkumulation von RPS27A, welches daraufhin vermehrt mit MDM2 interagiert. Dadurch wird die Bindung von MDM2 an p53 verhindert und es kommt zu einem verminderten Abbau von p53 und folglich zu dessen Ansammlung und zur Apoptose. RPS27A und MDM2 interagieren indirekt miteinander. Welche weiteren Komponenten zu dem RPS27A-MDM2-Interaktionskomplex gehören, ist noch unbekannt. (nach Penzo et al. 2019)

#### 4.2.4 Ausblick

Ob die bei dem DBA-Patienten detektierte VUS c.335G>A (p.G112D) im *RPS27A*-Gen ursächlich für den klinischen Phänotyp ist und *RPS27A* somit als weiteres DBA-Gen etabliert werden kann, bleibt weiterhin noch zu klären.

Ein möglicher Signalweg, der von der *RPS27A*-Variante c.335G>A (p.G112D) betroffen sein könnte, ist der RP-MDM2-p53-Signalweg. Zwar konnte im Rahmen der Doktorarbeit gezeigt werden, dass *RPS27A* und MDM2 miteinander interagieren, durch Yeast two Hybrid-Experimente wurde die Interaktion jedoch als indirekte Interaktion klassifiziert. Daraus ergeben sich folgende Fragen:

- Welche Proteine bilden zusammen mit *RPS27A* und MDM2 einen Interaktionskomplex?
- Hat die VUS c.335G>A (p.G112D) im *RPS27A*-Gen einen Einfluss auf diese Komponenten des Interaktionskomplexes?

Um diesen Fragen nachzugehen und neue Erkenntnisse über die Protein-Protein-Interaktion von *RPS27A* und MDM2 zu gewinnen, könnte man mittels massenspektrometrischer Analysen unbekannte Proteininteraktionen identifizieren und mit Hilfe weiterer Y2H-Experimente die neuen Interaktionspartner als direkte oder indirekte klassifizieren. Im Falle eines direkten Interaktionspartners kann im Y2H-Experiment überprüft werden, ob die direkte Interaktion durch die VUS c.335G>A (p.G112D) im *RPS27A*-Gen aufgehoben wird, was funktionell einen pathogenen Charakter der Variante nachweisen würde.

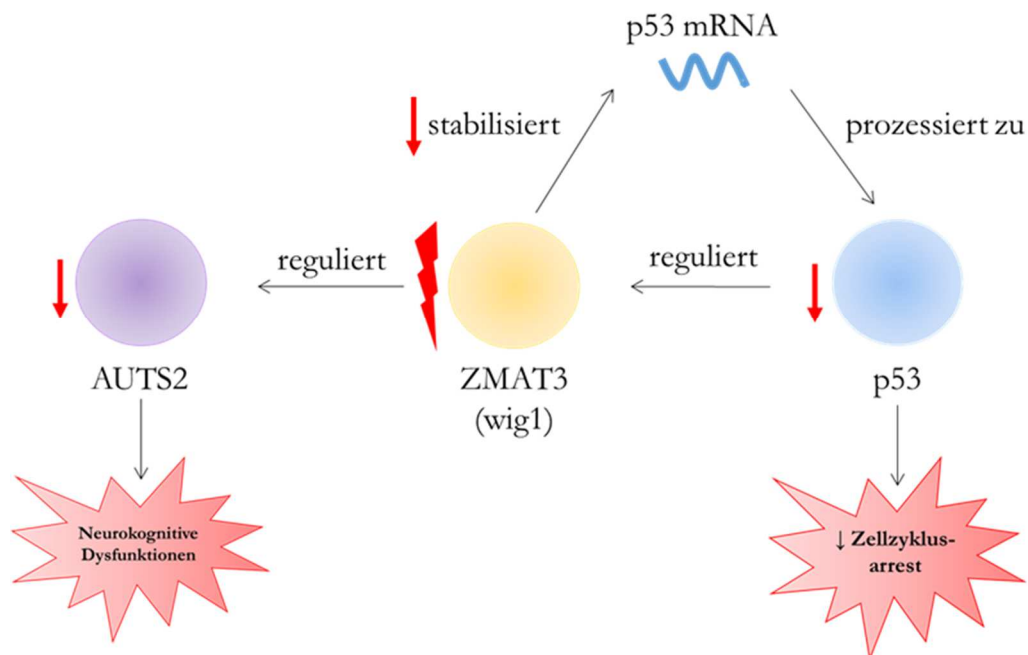
Überdies kann man die Partizipation von *RPS27A* an weiteren Signalwegen überprüfen, zum Beispiel am Apoptose-/p21-Signalweg. Im Falle von DNA-Schäden kommt es über eine Aktivierung von p53 zu einer Akkumulation von p21 und einem G0/G1-Zellzyklus-Arrest (Dulić et al. 1994). Auch Dysfunktionen in den DBA-Genen *RPS19* und *RPS24* führen zu einer Akkumulation von p21 und im Falle von *RPS19* auch zu einem vermehrten G0/G1-Zellzyklus-Arrest (Badhai et al. 2009; Miyake et al. 2008). Richtungsweisend bei der Untersuchung der Rolle von *RPS27A* in verschiedenen Signalwegen kann zudem eine Ranking-Principal Component (PCA)-Analyse sein. Aspesi et al. (2014) führten eine Ranking-PCA durch, auf der Suche nach dem Einfluss des DBA-Gens *RPS19* auf Gene, die in die Zellproliferation oder Apoptose involviert sind. Dabei fand sich eine Heraufregulierung des *PYCARD*-Gens, welches eine Rolle in der Aktivierung von Caspasen spielt. In Mäusen führt die Überexpression von *Pycard* zur Inhibierung der Proliferation von Erythrozyten und nimmt Einfluss auf ihre Enddifferenzierung (Aspesi et al. 2014). Ob die *RPS27A*-Variante c.335G>A (p.G112D) auch Einfluss auf solche und weitere Zellfunktionen und Signalwege wie den Apoptose-/p21-Signalweg nimmt, gilt es noch zu untersuchen.



## 4.3 ZMAT5

### 4.3.1 ZMAT5 – Regulator des Polycomb-Komplex-Proteins FBRS1?

Die zwei Polycomb-Komplexe PRC1 und PRC2 spielen durch epigenetisches *Silencing* und Histonmodifikation eine wichtige Rolle in der Zellentwicklung, -differenzierung und -proliferation (Schuettengruber et al. 2017; Simon und Kingston 2013). AUTS2, das nebst den Proteinen CK2, WDR5, FBRS1 und DCAF7 zu den Polycomb-Subkomplexen ncPRC1.3 und ncPRC1.5 zählt, ist ein nukleäres Protein, dass sich vor allem in sich entwickelnden Neuronen des frontalen Cortex und Cerebellum wiederfindet (Aranda et al. 2015; Schuettengruber et al. 2017; Sedaghat et al. 2012). In Zebrafischen haben verminderte Expressionslevel von *auts2* während der Embryonalentwicklung eine Mikrozephalie zur Folge (Beunders et al. 2013). Von *AUTS2* existieren verschiedene Isoformen (Kondrychyn et al. 2017). Beim Menschen sind vor allem ein kurzes und ein langes Haupttranskript von *AUTS2* von Bedeutung (Beunders et al. 2015). Unter Bildung eines AUTS2-PRC1-Komplexes kommt es zur Inhibierung der transkriptionshemmenden Wirkung von PRC1 und der AUTS2-PRC1-Komplex agiert als Transkriptionsaktivator (Gao et al. 2014). Dysfunktionen und Deletionen des *AUTS2*-Gens führen darüber hinaus zu dem namensgebenden AUTS2-Syndrom, einer Autismus-Spektrum-Störung, die mit einer neurokognitiven Entwicklungsstörung und weiteren Fehlbildungen assoziiert sein kann (Abbildung 32) (Beunders et al. 2013; Oksenberg und Ahituv 2013). AUTS2 wird von dem RNA-bindenden Zinkfinger-Matrin-Protein ZMAT3 (*wig1*) reguliert, welches über post-transkriptionelle Regulierung an der Expression verschiedener Gene beteiligt ist (Best et al. 2020; Oksenberg und Ahituv 2013; Vilborg et al. 2011). Im Falle einer Dysfunktion von ZMAT3 kommt es aufgrund des Wegfalls seiner Stabilisierung der p53-mRNA zu einer verminderten Expression von p53 (Bersani et al. 2014; Vilborg et al. 2011). Dies führt zu einem verminderten p53 vermittelten Zellzyklusarrest und begünstigt die Tumorgenese (Abbildung 32) (Bersani et al. 2014; Madar et al. 2013; Vilborg et al. 2011). Eine verminderte Expression von p53 hat wiederum ein Ausbleiben der upstream-Regulation von ZMAT3 zur Folge (Vilborg et al. 2011). Die verminderte Expression von ZMAT3 führt schließlich auch zur Herunterregulierung von AUTS2 (Sedaghat et al. 2012).



**Abbildung 32: Auswirkungen einer Dysregulation von ZMAT3 auf p53 und AUTS2.** ZMAT3 (*wig1*), das die p53-mRNA stabilisiert, wird selber von p53 reguliert und ist zusätzlich ein Regulator von AUTS2. Bei einer Dysfunktion von ZMAT3 wird weniger p53-mRNA stabilisiert, was eine verminderte Expression von p53 und somit auch eine verminderte upstream-Regulation von ZMAT3 durch p53 zur Folge hat. Die verminderte Expression von p53 hat einen verminderten Zellzyklusarrest zur Folge und begünstigt somit die Tumorgenese. Durch dysfunktionales ZMAT3 und dessen verminderte Expression kommt es überdies zu einer Herunterregulierung von AUTS2. Dysfunktionen und eine verminderte Expression von AUTS2 sind mit neurokognitiven Dysfunktionen, sowie dem AUTS2-Syndrom, welches zu den Autismus-Spektrum-Störungen zählt, vergesellschaftet.

FBRSL1, ein Paralog zu AUTS2, ist ebenfalls ein Protein der Polycomb-Subkomplexe ncPRC1.3 und ncPRC1.5 (Kondrychyn et al. 2017; Schuettengruber et al. 2017; Ufartes et al. 2020). Von dem Polycomb-Komplex-Protein FBRSL1 existieren verschiedene Isoformen (Ufartes et al. 2020); in dieser Arbeit wurde auf die Isoformen FBRSL1-V1 und FBRSL1-V2 eingegangen. Die drei bisher bekannten Fälle mit pathogener FBRSL1-Variante wiesen Ähnlichkeiten zum AUTS2-Syndrom auf (Ufartes et al. 2020), ebenso wie der Patient mit einer heterozygoten Mikrodeletion im Bereich 22q12.1-q12.2, bei dem jedoch keine Variante im *FBRSL1*-Gen detektiert wurde. In dem Bereich 22q12.1-q12.2 ist unter anderem das Gen *ZMAT5* lokalisiert. In dieser Arbeit wurde mittels Sanger-Sequenzierung nachgewiesen, dass das zweite, nicht von der Mikrodeletion betroffene Allel keine Mutation im *ZMAT5*-Gen aufweist. Über die Funktion von *ZMAT5* ist bisher noch nicht viel bekannt. Einerseits liegen klinische Parallelen zwischen dem AUTS2-Syndrom und den Patient:innen mit einer Variante im *FBRSL1*-Gen vor. Andererseits sind *ZMAT5* und *ZMAT3* beides Zinkfinger-Matrin-Proteine der gleichen Proteinfamilie. Deshalb wurde eine Regulierung von *FBRSL1* durch *ZMAT5* sowie der Einfluss auf die Expression von p53 überprüft.

Nach dem Expressionsnachweis von *ZMAT5* auf RNA- und Protein-Ebene in den Zelllinien HEK293, HeLa, K562, Fibroblasten und Lymphozyten mittels PCR und Western Blot-Analyse, wurde zunächst die Lokalisation von *ZMAT5* in verschiedenen WT- und den Patienten-Fibroblasten überprüft. *ZMAT5* wird vornehmlich im Nukleus exprimiert, wie es auch bei *ZMAT3* der Fall ist (Méndez-Vidal et al. 2002). Erwartungsgemäß hat die Mikrodeletion (del(22q12.1-q12.2)) keinen Einfluss auf die Lokalisation von *ZMAT5*. Dahingegen zeigte eine Expressionsanalyse mittels qRT-PCR an Patienten-Fibroblasten im Abgleich zu WT-Fibroblasten, dass die Mikrodeletion auf RNA-Ebene zu einer verringerten Expression von *ZMAT5* führt. Durch die heterozygote Deletion von *ZMAT5* war eine Verringerung der Expression von *ZMAT5* um mindestens 50% zu erwarten, was in dieser Arbeit auf RNA-Ebene bestätigt wurde. Die Expression von *ZMAT5* war in den Patienten-Fibroblasten bereits deutlich reduziert, weshalb vermutlich kein wesentlich zusätzlicher Effekt eines Knock-downs zu beobachten war. Eine erwartungsgemäße Reduktion der Proteinmenge von *ZMAT5* in den Patienten-Fibroblasten von ebenfalls mindestens 50% im Vergleich zu den WT-Fibroblasten konnte mittels Western Blot-Analyse nicht bestätigt werden. Diese Diskrepanz in der Expression von *ZMAT5* auf RNA- und Proteinebene ist am ehesten durch eine methodische Ungenauigkeit der Western Blot-Analysen zu erklären. Als weitere Methode der quantitativen Bestimmung der Expression von *ZMAT5* auf Proteinebene könnte die Durchführung einer ELISA-Analyse sinnvoll sein (Carlsson et al. 1972). Um auszuschließen, dass das HKG-Protein  $\beta$ -Actin von einem Gen, welches in der Mikrodeletion (del(22q12.1-q12.2)) liegt, reguliert wird und somit zu falsch-erhöhten Messungen der Proteinmenge von *ZMAT5* führt, könnte darüber hinaus die Western Blot-Analyse mit einem anderen HKG-Protein wiederholt werden.

Nach dem erfolgten Nachweis einer verminderten Expression von *ZMAT5* auf RNA-Ebene, wurde dessen Einfluss auf die Expression von *FBRSL1-V1* und *FBRSL1-V2* mittels Knockdown von *ZMAT5* mit siRNA überprüft. Im Falle von *FBRSL1-V1* konnte mittels qRT-PCR unter Verwendung des HKG *SDHA* eine statistisch signifikante Herunterregulierung von *FBRSL1-V1* in den Knockdown-WT-Fibroblasten beobachtet werden. Dies war unter Verwendung des HKG *PBGD* nicht der Fall, weshalb die Ergebnisse zu einem gewissen Grad HKG-abhängig sind. Darüber hinaus wurde unabhängig vom verwendeten HKG eine verminderte Expression von *FBRSL1-V1* von über 20% in den Patienten-Fibroblasten im Vergleich zu den WT-Fibroblasten festgestellt. Die reduzierte Expression von *FBRSL1-V1* beim Patienten könnte somit die klinische Überlappung der Symptomatik zu Patienten mit pathogener *FBRSL1*-Variante erklären.

#### 4.3.2 ZMAT5 und FBRSL1 – Krankheitsbild einer neuen Ribosomopathie?

Bei den Patient:innen mit einer Variante im *FBRSL1*-Gen wurde an RNA isoliert aus Blut eine Überexpression von *RPS7*, *RPS28*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL18A*, *RPL36A* und *RPL38* detektiert (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe). Auch bei dem Polycomb-Komplex-Protein BMI1 ist ein Zusammenhang zur Dysregulation ribosomaler Proteine bekannt. Humanes BMI1 spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung der Selbsterneuerung hämatopoetischer Stammzellen (Lessard und Sauvageau 2003; Park et al. 2003). Gao et al. (2015) konnten zeigen, dass durch den Wegfall von *BMI1* die RP-Transkription verhindert und die ribosomale Biosynthese vermindert wird. In erythrozytären Vorläuferzellen führt eine vermehrte Expression von *BMI1* hingegen zu einer positiven Regulation von RPs und der ribosomalen Biosynthese. Dysregulierte RPs infolge eines Knockdowns von *BMI1* sind unter anderem *RPS5*, *RPS11*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL18A*, welche herunterreguliert sind, und *RPS7*, welches überexprimiert wird (Gao et al. 2015). Über die genaue Funktion von *FBRSL1* ist noch nicht viel bekannt. Jedoch könnten BMI1 und *FBRSL1* gegensätzlich agieren – eine verminderte Expression von BMI1 führt zu einer verminderten RP-Transkription, eine verminderte Expression *FBRSL1* scheint tendenziell zu einer Überexpression von RP-Genen zu führen.

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob das neue Krankheitsbild durch Fehlregulierung von *ZMAT5* und infolgedessen einer verminderten Expression des Polycomb-Komplex-Gens *FBRSL1* gekennzeichnet ist. Da ein Zusammenhang zwischen Polycomb-Komplex-Genen und RP-Genen bekannt ist, wie im Falle von *BMI1*, ist darüber hinaus eine Einordnung des Krankheitsbildes der Patient:innen mit fehlreguliertem *FBRSL1* in die Gruppe der Ribosomopathien denkbar. Um die Auswirkungen einer verminderten Expression von *FBRSL1* weitergehend zu untersuchen, wurde ein Zusammenhang zwischen dem von *ZMAT5* fehlreguliertem *FBRSL1* und den Genen *RPS7*, *RPS28*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL18A*, *RPL36A* und *RPL38* überprüft.

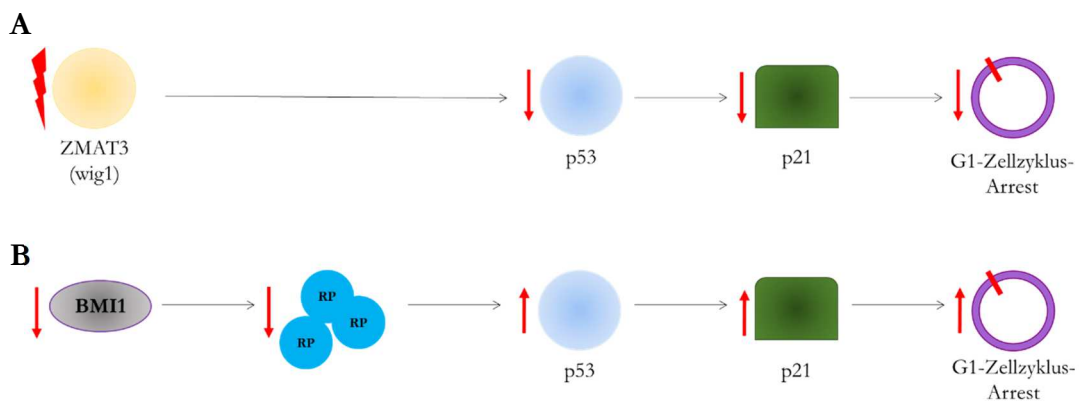
An RNA isoliert aus Patientenblut wurde festgestellt, dass *RPL18A*, *RPL38* und *RPS28* herunterreguliert waren, wohingegen *RPL36A* und *RPS7* überexprimiert wurden. Die RP-Gene *RPL5* und *RPL11* wiesen keine Auffälligkeiten in der Expression auf. Da der Patient mit der Mikrodeletion (del(22q12.1-q12.2)) verstorben und nur eine geringe Blutmenge vorhanden ist, wurde die Expression der RPs weitergehend an RNA isoliert aus Patienten-Fibroblasten überprüft. Es wurden einmalig qRT-PCRs mit zwei unterschiedlichen HKG, *PPI-A* und *PPI-B*, durchgeführt. Keines der untersuchten RP-Gene war in den Patienten-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten gesunder Kinder signifikant über- oder unterexprimiert. Somit unterscheiden sich die Ergebnisse der RP-Expression auf RNA-Ebene in Fibroblasten zu denen in Blut. Es ist bekannt, dass Ribosomopathien zwar auf Dysregulationen in RPs beruhen können, diese aber zu sehr gewebsspezifischen Veränderungen führen

(Danilova und Gazda 2015; Wang et al. 2015). Die Expression ribosomaler Proteine in verschiedenen Geweben ist sowohl während der Organogenese als auch im Erwachsenen heterogen (Kondrashov et al. 2011; Sahin et al. 2005). Darüber hinaus liegen auch innerhalb von Zellen verschiedene Expressionslevel von Ribosomen und RPs vor (Nakhoul et al. 2014). Auch im Falle des Patienten mit der Mikrodeletion im Bereich 22q12.1-q12.2 ist die Vielfalt in der Expression ribosomaler Proteine eine mögliche Erklärung für die vorliegenden unterschiedlichen Expressionslevel der RPs in Fibroblasten und in Blut. Ein Einfluss von *ZMAT5* und *FBRSL1* auf die Expression von ribosomalen Proteinen in bestimmten Geweben und die Definition des Krankheitsbildes als Ribosomopathie ist somit weiterhin möglich.

#### 4.3.3 Auswirkung von *ZMAT5* und *FBRSL1* auf den p53-/Apoptose-Signalweg

Im Zusammenhang mit dem AUTS2-Syndrom sind bisher noch keine Fälle von Tumoren bei den betroffenen Patient:innen beschrieben. Im Falle einer Herunterregulierung von *ZMAT3* führt der Wegfall dessen stabilisierender Funktion hingegen zu einer verminderten Expression von p53. Dies hat einen verminderten Zellzyklusarrest zur Folge (Abbildung 33A) (Bersani et al. 2014; Hellborg et al. 2001; Vilborg et al. 2011). Dies begünstigt die Tumorgenese, beispielsweise von Leukämien und kolorektalen Karzinomen (Best et al. 2020; Muys et al. 2021; Gao et al. 2012). Untersuchungen von Best et al. (2020) ergaben, dass ein Verlust von *ZMAT3* nur bei gleichzeitigem Funktionsverlust von p53, *p53 upregulated modulator of apoptosis* (*PUMA*) und *p21* zur Leukämie führt. *PUMA* ist ein pro-apoptotisches Protein, dessen Transkription durch p53 induziert werden kann (Li 2021; Yang et al. 2019). *P21* (auch genannt *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>*) spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Apoptose, indem es einen G1-Zellzyklus-Arrest induziert (Deng et al. 1995; Wade Harper 1993).

Anders als bei *ZMAT3*, dessen Verlust zu einer Induktion von p53 führt, kommt es durch Knockdown von *BMI1*, wie *FBRSL1* ein Polycomb-Komplex-Protein, zur Stabilisierung von p53 (Gao et al. 2015; Vilborg et al. 2011). Gao et al. (2015) diskutieren als Ursache dafür den RP-MDM2-p53 Signalweg, wonach ein Verlust von *BMI1* über eine verminderte RP-Biogenese zu ribosomalem Stress und folglich zur Aktivierung des RP-MDM2-p53 Signalwegs führen könnte. Die Stabilisierung von p53 hat wiederum eine vermehrte Expression und Akkumulation von *p21* zur Folge, welches einen G1-Zellzyklus-Arrest triggert (Abbildung 33B).



**Abbildung 33: Einfluss von ZMAT5 und BMI1 auf p53 und den Zellzyklus-Arrest.** **A** Eine Dysfunktion des Zinkfinger-Matrin-Proteins ZMAT3 führt aufgrund einer verminderten Stabilisierung der p53-mRNA zu einer verminderten Expression von p53. Durch gleichzeitigen Funktionsverlust von *PUMA* und *p21* kommt es zu einer verminderten Induktion des G1-Zellzyklus-Arrests. **B** Ein Knockdown von *BMI1*, ein weiteres Polycomb-Komplex-Protein-Gen, führt zu einer vermehrten Expression von p53. Als Ursache dafür wird die verminderte Expression von RPs diskutiert, welche zu ribosomalem Stress und folglich zu einer Aktivierung des RP-MDM2-p53 Signalwegs führt. Die Heraufregulierung von p53 führt zu einer Aktivierung des p21-Signalwegs. P21 triggert wiederum vermehrt den G1-Zellzyklus-Arrest.

Auch im Falle einer Dysregulation von ZMAT5 und FBRSL1 wäre aufgrund der Parallelen zu ZMAT3, als Zinkfinger-Matrin-Protein, und BMI1, als weiteres Polycomb-Komplex-Protein, ein Einfluss auf die Expression von p53 denkbar. Deshalb wurde in dieser Arbeit mittels Western Blot-Analyse die Expression von p53 auf Proteinebene überprüft, wobei kein Unterschied zwischen den Patienten-Fibroblasten mit der Mikrodeletion (del(22q12.1-q12.2)) und den WT-Fibroblasten erkennbar war. Somit scheint die hier nachgewiesene verminderte Expression von *ZMAT5* und *FBRSL1-V1* keinen Einfluss auf p53 auf Proteinebene zu haben. Auf RNA-Ebene wurde die Expression von *p53* nicht untersucht. Damit ist noch nicht abschließend geklärt, ob die verminderte Expression von *ZMAT5* und *FBRSL1-V1* bei dem Patienten mit einer Mikrodeletion im Bereich 22q12.1-q12.2 einen Einfluss auf p53 hat.

Neben der Tumorgenese, die durch einen p53-Verlust begünstigt wird, nimmt auch eine p53-Stabilisierung über einen vermehrten Zellzyklusarrest Einfluss auf Syndrome in der Embryonalentwicklung. Zu diesen zählen unter anderem die DBA, das CHARGE-Syndrom, das Treacher-Collins-Syndrom und das 5q-Syndrom (Choi und Donehower 1999; Hudson et al. 2017; Jones et al. 2008; Lee et al. 2019; Narla und Ebert 2010). Für eine korrekte embryonale Entwicklung ist mitunter eine MDM2-vermittelte Limitierung der p53-Expression notwendig (Choi und Donehower 1999; van Nostrand und Attardi 2014). Wird p53 vermehrt exprimiert, führt dies zu einem vermehrten Zellzyklusarrest und zur Apoptose (Dai et al. 2006; Wawryk-Gawda et al. 2014). So konnten van Nostrand und Attardi (2014) am Mausmodell zeigen, dass ein Unterbinden der Mdm2-p53-Interaktion und die daraus resultierende Stabilisierung und Akkumulation von p53 zu einer frühen embryonalen Letalität führen. Ziel

nachfolgender Arbeiten könnte es sein, die Interaktion von *ZMAT5* bzw. *FBRSL1* mit *p53*, sowie den Einfluss von *ZMAT5* und *FBRSL1* auf den p21/Apoptose-Signalweg zu untersuchen.

#### 4.3.4 Ausblick

Ob die Krankheitsbilder des Patienten mit der Mikrodeletion (del(22q12.1-q12.2)) und der Patient:innen mit einer Variante im *FBRSL1*-Gen zur Gruppe der Ribosomopathien zählen, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass *ZMAT5* die Expression der *FBRSL1*-Isoform *FBRSL1-V1* regulieren könnte. Dies wurde mittels eines Knockdown-Versuchs mit siRNA und anschließender qRT-PCR Analyse untersucht. Ein Nebeneffekt von Knockdown-Versuchen mit siRNA ist das Silencing von nicht-anvisierten Transkripten und den entsprechenden Proteinen (Jackson et al. 2006). Zur Absicherung dieser Ergebnisse sollte in nachfolgenden Arbeiten ein Rescue-Experiment durchgeführt werden.

Ob die an RNA isoliert aus Blut festgestellte Dysregulation von *RPS7*, *RPS28*, *RPL18A*, *RPL36A* und *RPL38* ein direkter Effekt einer verminderten Expression von *ZMAT5* oder indirekt über *FBRSL1* zustande kommt, ist unklar, da bei der Überprüfung der RP-Gene an RNA isoliert aus Fibroblasten keine Dysregulation feststellbar war. Dies ist am ehesten durch die Expressions-Heterogenität von RPs in verschiedenen Geweben erklärbar. Aufgrund des limitierten Probenmaterials des inzwischen verstorbenen Patienten ist eine Bestätigung der Ergebnisse der RNA-Proben aus Blut nicht möglich.

Ein Ziel nachfolgender Arbeiten kann sein, den p53-p21-Apoptose Signalweg im Zusammenhang mit einer Herunterregulierung von *ZMAT5* und *FBRSL1* näher zu untersuchen. Bei dem Patienten mit der Mikrodeletion im Bereich 22q12.1-q12.2 konnte auf Proteinebene keine veränderte Expression von p53 festgestellt werden. Ein Effekt einer veränderten Expression auf RNA-Ebene von *ZMAT5* und *FBRSL1* auf p53 und p21 ist jedoch nicht auszuschließen und gilt es noch zu untersuchen.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit zu funktionellen Analysen zu Erkrankungen, die zu einer Dysfunktion bzw. Fehlregulation ribosomaler Proteine führen, wurden zwei unterschiedliche Krankheitsbilder auf molekulargenetischer Ebene untersucht, um herauszufinden, ob die detektierten Varianten in den entsprechenden Genen zu einem Krankheitsbild im Rahmen einer Ribosomopathie gezählt werden können.

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob die *RPS27A*-Variante c.335G>A (p.G112D) als neue pathogene Variante der Diamond-Blackfan-Anämie etabliert werden kann. Darüber hinaus wurde ein Zusammenhang zwischen dem *ZMAT5*- und dem *FBRSL1*-Gen sowie die Auswirkungen dessen Herunterregulierung auf die Expression ribosomaler Proteine überprüft.

Immunfluoreszenz-Färbungen, PCR- und Western-Blot Analysen dienen der Überprüfung des Einflusses der Varianten auf die Expression und Lokalisation von RPS27A, ZMAT5 und p53. Mittels Co-Immunpräzipitation und Yeast two-Hybrid-Experimenten wurden die Interaktion von RPS27A und MDM2 und der Einfluss der RPS27A-Variante (p.G112D) auf diese Protein-Protein-Interaktion untersucht. QRT-PCRs dienen der Untersuchung einer Herunterregulierung von *ZMAT5* und *FBRSL1* in Fibroblasten des Patienten mit einer Mikrodeletion im Bereich 22q12.1-q12.2 mit und ohne Knockdown von *ZMAT5* durch *short interfering*-RNA. Darüber hinaus wurden qRT-PCRs zur Überprüfung einer Dysregulation verschiedener Gene ribosomaler Proteine durchgeführt.

Bei dem Patienten mit der klinischen Diagnose einer Diamond-Blackfan-Anämie wurde kein Einfluss der Variante *RPS27A* c.335G>A (p.G112D) auf die Expression oder Lokalisation von RPS27A festgestellt, noch wurde die Expression von p53 von der Variante beeinflusst. Es konnte eine indirekte Interaktion zwischen RPS27A und MDM2 bestätigt, eine direkte Protein-Protein-Interaktion hingegen ausgeschlossen werden, weshalb es weitere Komponenten im Rahmen eines RPS27A-MDM2-Interaktionskomplexes geben muss. Ein Einfluss der Variante RPS27A (p.G112D) auf die Interaktion mit MDM2 wurde nicht detektiert.

Bei dem Kind mit Ähnlichkeiten zu Patient:innen mit einer Variante im *FBRSL1*-Gen wurde erwartungsgemäß kein Einfluss der Mikrodeletion (del(22q12.1-q12.2)) auf die Lokalisation von ZMAT5 und p53 auf Proteinebene nachgewiesen. Auf RNA-Ebene konnte entsprechend dem heterozygoten Fehlen eines *ZMAT5*-Allels eine signifikant verringerte Expression von *ZMAT5* gezeigt werden. Der Verdacht auf einen regulatorischen Loop zwischen *ZMAT5* und *FBRSL1-V1* konnte erhärtet werden und sollte mittels Rescue-Experiment gesichert werden. Ein Einfluss auf die Expression von *FBRSL1-V2* durch eine Herunterregulierung von *ZMAT5* hingegen wurde nicht bestätigt. Die im Blut identifizierte Fehlregulation der Gene *RPS7*, *RPS28*, *RPL18A*, *RPL36A* und *RPL38* konnte an Patienten-Fibroblasten nicht bestätigt werden, was auf eine Expressions-Heterogenität von RPs und unterschiedliche Regulatoren in verschiedenen Geweben hindeutet.



## 6 Literaturverzeichnis

- Akram T, Fatima A, Klar J, Hoerber J, Zakaria M, Tariq M, Baig SM, Schuster J, Dahl N (2020): Aberrant splicing due to a novel RPS7 variant causes Diamond-Blackfan Anemia associated with spontaneous remission and meningocele. *Int J Hematol* **112**, 894–899
- Angelini M, Cannata S, Mercaldo V, Gibello L, Santoro C, Dianzani I, Loreni F (2007): Missense mutations associated with Diamond-Blackfan anemia affect the assembly of ribosomal protein S19 into the ribosome. *Hum Mol Genet* **16**, 1720–1727
- Aranda S, Mas G, Di Croce L (2015): Regulation of gene transcription by Polycomb proteins. *Sci Adv* **1**, e1500737
- Aspesi A, Monteleone V, Betti M, Actis C, Morleo G, Sculco M, Guarrera S, Wlodarski MW, Ramenghi U, Santoro C et al. (2017): Lymphoblastoid cell lines from Diamond Blackfan anaemia patients exhibit a full ribosomal stress phenotype that is rescued by gene therapy. *Sci Rep* **7**, 12010
- Aspesi A, Pavesi E, Robotti E, Crescitelli R, Boria I, Avondo F, Moniz H, Da Costa L, Mohandas N, Roncaglia P et al. (2014): Dissecting the transcriptional phenotype of ribosomal protein deficiency: implications for Diamond-Blackfan Anemia. *Gene* **545**, 282–289
- Badhai J, Frøjmark AS, J Davey E, Schuster J, Dahl N (2009): Ribosomal protein S19 and S24 insufficiency cause distinct cell cycle defects in Diamond-Blackfan anemia. *Biochim Biophys Acta* **1792**, 1036–1042
- Bersani C, Xu LD, Vilborg A, Lui WO, Wiman KG (2014): Wig-1 regulates cell cycle arrest and cell death through the p53 targets FAS and 14-3-3 $\sigma$ . *Oncogene* **33**, 4407–4417
- Best SA, Vandenberg CJ, Abad E, Whitehead L, Guiu L, Ding S, Brennan MS, Strasser A, Herold MJ, Sutherland KD et al. (2020): Consequences of Zmat3 loss in c-MYC- and mutant KRAS-driven tumorigenesis. *Cell Death Dis* **11**, 877
- Beunders G, Munnik SA de, van der Aa N, Ceulemans B, Voorhoeve E, Groffen AJ, Nillesen WM, Meijers-Heijboer EJ, Frank Kooy R, Yntema HG et al. (2015): Two male adults with pathogenic AUTS2 variants, including a two-base pair deletion, further delineate the AUTS2 syndrome. *Eur J Hum Genet* **23**, 803–807
- Beunders G, van de Kamp J, Vasudevan P, Morton J, Smets K, Kleefstra T, Munnik SA de, Schuurs-Hoeijmakers J, Ceulemans B, Zollino M et al. (2016): A detailed clinical analysis of 13 patients with AUTS2 syndrome further delineates the phenotypic spectrum and underscores the behavioural phenotype. *Journal of Medical Genetics* **53**, 523–532
- Beunders G, Voorhoeve E, Golzio C, Pardo LM, Rosenfeld JA, Talkowski ME, Simonic I, Lionel AC, Vergult S, Pyatt RE et al. (2013): Exonic deletions in AUTS2 cause a syndromic form of intellectual disability and suggest a critical role for the C terminus. *Am J Hum Genet* **92**, 210–220

- Boria I, Garelli E, Gazda HT, Aspesi A, Quarello P, Pavese E, Ferrante D, Meerpohl JJ, Kartal M, Da Costa L et al. (2010): The ribosomal basis of Diamond-Blackfan Anemia: mutation and database update. *Hum Mutat* 31, 1269–1279
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254
- Brückner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U (2009): Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int J Mol Sci* 10, 2763–2788
- Campagnoli MF, Garelli E, Quarello P, Carando A, Varotto S, Nobili B, Longoni D, Pecile V, Zecca M, Dufour C et al. (2004): Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: new findings from the Italian registry and a review of the literature. *Haematologica* 89, 480–489
- Carlsson HE, Lindberg AA, Hammarström S (1972): Titration of antibodies to salmonella O antigens by enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun* 6, 703–708
- Chittock EC, Latwiel S, Miller TCR, Müller CW (2017): Molecular architecture of polycomb repressive complexes. *Biochem Soc Trans* 45, 193–205
- Choi J, Donehower LA (1999): p53 in embryonic development: maintaining a fine balance. *Cell Mol Life Sci* 55, 38–47
- Da Costa L, Tchernia G, Gascard P, Lo A, Meerpohl J, Niemeyer C, Chasis JA, Fixler J, Mohandas N (2003): Nucleolar localization of RPS19 protein in normal cells and mislocalization due to mutations in the nucleolar localization signals in 2 Diamond-Blackfan anemia patients: potential insights into pathophysiology. *Blood* 101, 5039–5045
- Dai MS, Shi D, Jin Y, Sun XX, Zhang Y, Grossman SR, Lu H (2006): Regulation of the MDM2-p53 pathway by ribosomal protein L11 involves a post-ubiquitination mechanism. *J Biol Chem* 281, 24304–24313
- Dai M-S, Zeng SX, Jin Y, Sun XX, David L, Lu H (2004): Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol* 24, 7654–7668
- Danilova N, Gazda HT (2015): Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies. *Dis Model Mech* 8, 1013–1026
- Deisenroth C, Franklin DA, Zhang Y (2016): The Evolution of the Ribosomal Protein-MDM2-p53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, 12
- Deng C, Zhang P, Wade Harper J, Elledge SJ, Leder P (1995): Mice Lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675–684
- Donati G, Peddigari S, Mercer CA, Thomas G (2013): 5S ribosomal RNA is an essential component of a nascent ribosomal precursor complex that regulates the Hdm2-p53 checkpoint. *Cell Reports* 4, 87–98
- Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, Pettersson M, Willig TN, Dianzani I, Ball S, Tchernia G, Klar J, Matsson H et al. (1999): The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* 21, 169–175

- Dulić V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tisty TD, Lees E, Harper J, Elledge SJ, Reed SI (1994): p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76, 1013–1023
- Engidaye G, Melku M, Enawgaw B (2019): Diamond Blackfan Anemia: Genetics, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. *EJIFCC* 30, 67–81
- Fatica A, Tollervey D (2002): Making ribosomes. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 313–318
- Free RB, Hazelwood LA, Sibley DR (2009): Identifying novel protein-protein interactions using co-immunoprecipitation and mass spectroscopy. *Curr Protoc Neurosci* 5, 5.28
- Gao R, Chen S, Kobayashi M, Yu H, Zhang Y, Wan Y, Young SK, Soltis A, Yu M, Vemula S et al. (2015): Bmi1 promotes erythroid development through regulating ribosome biogenesis. *Stem Cells* 33, 925–938
- Gao Z, Lee P, Stafford JM, Schimmelmann M von, Schaefer A, Reinberg D (2014): An AUTS2-Polycomb complex activates gene expression in the CNS. *Nature* 516, 349–354
- Gao Z, Zhang J, Bonasio R, Strino F, Sawai A, Parisi F, Kluger Y, Reinberg D (2012): PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol Cell* 45, 344–356
- García-Cano J, Sánchez-Tena S, Sala-Gaston J, Figueras A, Viñals F, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL (2020): Regulation of the MDM2-p53 pathway by the ubiquitin ligase HERC2. *Mol Oncol* 14, 69–86
- Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, Choemmel V, O'Donohue M-F, Schneider H, Darras N, Hasman C, Sieff CA, Newburger PE et al. (2008): Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet* 83, 769–780
- Hellborg F, Qian W, Mendez-Vidal C, Asker C, Kost-Alimova M, Wilhelm M, Imreh S, Wiman KG (2001): Human wig-1, a p53 target gene that encodes a growth inhibitory zinc finger protein. *Oncogene* 20, 5466–5474
- Henras AK, Plisson-Chastang C, O'Donohue MF, Chakraborty A, Gleizes PE (2015): An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6, 225–242
- Hori K, Hoshino M (2017): Neuronal Migration and AUTS2 Syndrome. *Brain Sci* 7, 5
- Hudson A, Trider CL, Blake K (2017): CHARGE Syndrome. *Pediatr Rev* 38, 56–59
- Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, Linsley PS (2006): Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 12, 1179–1187
- Jolley A, Corbett M, McGregor L, Waters W, Brown S, Nicholl J, Yu S (2013): De novo intragenic deletion of the autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) gene in a patient with developmental delay: a case report and literature review. *Am J Med Genet A* 161A, 1508–1512

- Jones NC, Lynn ML, Gaudenz K, Sakai D, Aoto K, Rey JP, Glynn EF, Ellington L, Du C, Dixon J et al. (2008): Prevention of the neurocristopathy Treacher Collins syndrome through inhibition of p53 function. *Nat Med* 14, 125–133
- Kampen KR, Sulima SO, Vereecke S, Keersmaecker K de (2020): Hallmarks of ribosomopathies. *Nucleic Acids Res* 48, 1013–1028
- Keersmaecker K de, Sulima SO, Dinman JD (2015): Ribosomopathies and the paradox of cellular hypo- to hyperproliferation. *Blood* 125, 1377–1382
- Komander D, Clague MJ, Urbé S (2009): Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 550–563
- Kondrashov N, Pusic A, Stumpf CR, Shimizu K, Hsieh AC, Ishijima J, Shiroishi T, Barna M (2011): Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* 145, 383–397
- Kondrychyn I, Robra L, Thirumalai V (2017): Transcriptional Complexity and Distinct Expression Patterns of *auts2* Paralogs in *Danio rerio*. *G3 (Bethesda)* 7, 2577–2593
- Lee JH, List A, Sallman DA (2019): Molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes with deletion 5q. *Eur J Haematol* 102, 203–209
- Lessard J, Sauvageau G (2003): Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423, 255–260
- Li M (2021): The role of P53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) in ovarian development, cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Apoptosis* 26, 235–247
- Lipton JM, Atsidaftos E, Zyskind I, Vlachos A (2006): Improving clinical care and elucidating the pathophysiology of Diamond Blackfan anemia: an update from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Pediatr Blood Cancer* 46, 558–564
- Madar S, Harel E, Goldstein I, Stein Y, Kogan-Sakin I, Kamer I, Solomon H, Dekel E, Tal P, Goldfinger N et al. (2013): Mutant p53 attenuates the anti-tumorigenic activity of fibroblasts-secreted interferon beta. *PLoS One* 8, e61353
- Marechal V, Elenbaas B, Piette J, Nicolas JC, Levine AJ (1994): The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Mol Cell Biol* 14, 7414–7420
- Matsson H, Davey EJ, Fröjmark AS, Miyake K, Utsugisawa T, Flygare J, Zahou E, Byman I, Landin B, Ronquist G et al. (2006): Erythropoiesis in the Rps19 disrupted mouse: Analysis of erythropoietin response and biochemical markers for Diamond-Blackfan anemia. *Blood Cells Mol Dis* 36, 259–264
- Méndez-Vidal C, Wilhelm MT, Hellborg F, Qian W, Wiman KG (2002): The p53-induced mouse zinc finger protein wig-1 binds double-stranded RNA with high affinity. *Nucleic Acids Res* 30, 1991–1996
- Mirabello L, Macari ER, Jessop L, Ellis SR, Myers T, Giri N, Taylor AM, McGrath KE, Humphries JM, Ballew BJ et al. (2014): Whole-exome sequencing and functional studies identify RPS29 as a novel gene mutated in multicase Diamond-Blackfan anemia families. *Blood* 124, 24–32

- Miyake K, Utsugisawa T, Flygare J, Kiefer T, Hamaguchi I, Richter J, Karlsson S (2008): Ribosomal protein S19 deficiency leads to reduced proliferation and increased apoptosis but does not affect terminal erythroid differentiation in a cell line model of Diamond-Blackfan anemia. *Stem Cells* 26, 323–329
- Moll UM, Petrenko O (2003): The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* 1, 1001–1008
- Muys BR, Anastasakis DG, Claypool D, Pongor L, Li XL, Grammatikakis I, Liu M, Wang X, Prasanth KV, Aladjem MI et al. (2021): The p53-induced RNA-binding protein ZMAT3 is a splicing regulator that inhibits the splicing of oncogenic CD44 variants in colorectal carcinoma. *Genes Dev* 35, 102–116
- Nag S, Qin J, Srivenugopal KS, Wang M, Zhang R (2013): The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res* 27, 254–271
- Nakhoul H, Ke J, Zhou X, Liao W, Zeng SX, Lu H (2014): Ribosomopathies: mechanisms of disease. *Clin Med Insights Blood Disord* 7, 7–16
- Narla A, Ebert BL (2010): Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 115, 3196–3205
- Nishimura K, Kumazawa T, Kuroda T, Katagiri N, Tsuchiya M, Goto N, Furumai R, Murayama A, Yanagisawa J, Kimura K (2015): Perturbation of ribosome biogenesis drives cells into senescence through 5S RNP-mediated p53 activation. *Cell Reports* 10, 1310–1323
- Oksenberg N, Ahituv N (2013): The role of AUTS2 in neurodevelopment and human evolution. *Trends in Genetics* 29, 600–608
- Orgebin E, Lamoureux F, Isidor B, Charrier C, Ory B, Lézot F, Baud'huin M (2020): Ribosomopathies: New Therapeutic Perspectives. *Cells* 9, 9
- Oyarbide U, Topczewski J, Corey SJ (2019): Peering through zebrafish to understand inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica* 104, 13–24
- Park I, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF (2003): Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 302–305
- Penzo M, Montanaro L, Treré D, Derenzini M (2019): The Ribosome Biogenesis-Cancer Connection. *Cells* 8, 1
- Perry RP (1963): Selective effects of actinomycin D on the intracellular distribution of RNA synthesis in tissue culture cells. *Experimental Cell Research* 29, 400–406
- Quarello P, Garelli E, Carando A, Brusco A, Calabrese R, Dufour C, Longoni D, Misuraca A, Vinti L, Aspesi A et al. (2010): Diamond-Blackfan anemia: genotype-phenotype correlations in Italian patients with RPL5 and RPL11 mutations. *Haematologica* 95, 206–213
- Rao VS, Srinivas K, Sujini GN, Kumar GNS (2014): Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *Int J Proteomics* 2014, 147648
- Redman KL, Rechsteiner M (1989): Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. *Nature* 338, 438–440

- Robles SJ, Adami GR (1998): Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16, 1113–1123
- Sahin F, Qiu W, Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Grosmark A, Su GH (2005): RPL38, FOSL1, and UPP1 are predominantly expressed in the pancreatic ductal epithelium. *Pancreas* 30, 158–167
- Sakamoto KM, Narla A (2018): Perspective on Diamond-Blackfan anemia: lessons from a rare congenital bone marrow failure syndrome. *Leukemia* 32, 249–251
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463–5467
- Scelfo A, Piunti A, Pasini D (2015): The controversial role of the Polycomb group proteins in transcription and cancer: how much do we not understand Polycomb proteins? *FEBS J* 282, 1703–1722
- Schuettengruber B, Bourbon HM, Di Croce L, Cavalli G (2017): Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell* 171, 34–57
- Scully CE, Schneider DA (2019): Coordinated Control of rRNA Processing by RNA Polymerase I. *Trends in Genetics* 35, 724–733
- Sedaghat Y, Mazur C, Sabripour M, Hung G, Monia BP (2012): Genomic analysis of wig-1 pathways. *PLoS One* 7, e29429
- Sellers RA, Robertson DL, Tassabehji M (2020): Ancestry of the AUTS2 family-A novel group of polycomb-complex proteins involved in human neurological disease. *PLoS One* 15, e0232101
- Simon JA, Kingston RE (2013): Occupying chromatin: Polycomb mechanisms for getting to genomic targets, stopping transcriptional traffic, and staying put. *Mol Cell* 49, 808–824
- Sloan KE, Warda AS, Sharma S, Entian KD, Lafontaine DLJ, Bohnsack MT (2017): Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biol* 14, 1138–1152
- Stark AR, Carlo WA, Tyson JE, Papile LA, Wright LL, Shankaran S, Donovan EF, Oh W, Bauer CR, Saha S et al. (2001): Adverse effects of early dexamethasone treatment in extremely-low-birth-weight infants. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *N Engl J Med* 344, 95–101
- Sulima SO, Kampen KR, Keersmaecker K de (2019): Cancer Biogenesis in Ribosomopathies. *Cells* 8, 3
- Sun XX, DeVine T, Challagundla KB, Dai MS (2011): Interplay between ribosomal protein S27a and MDM2 protein in p53 activation in response to ribosomal stress. *J Biol Chem* 286, 22730–22741
- Uechi T, Kenmochi N (2019): Zebrafish Models of Diamond-Blackfan Anemia: A Tool for Understanding the Disease Pathogenesis and Drug Discovery. *Pharmaceuticals (Basel)* 12, 4

- Ufartes R, Berger H, Till K, Salinas G, Sturm M, Altmüller J, Nürnberg P, Thiele H, Funke R, Apeshiotis N et al. (2020): De novo mutations in FBRSL1 cause a novel recognizable malformation and intellectual disability syndrome. *Hum Genet* 139, 1363–1379
- Ulirsch JC, Verboon JM, Kazerounian S, Guo MH, Yuan D, Ludwig LS, Handsaker RE, Abdulhay NJ, Fiorini C, Genovese G et al. (2018): The Genetic Landscape of Diamond-Blackfan Anemia. *Am J Hum Genet* 103, 930–947
- van Crielinge W, Beyaert R (1999): Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol Proced Online* 2, 1–38
- van Nostrand JL, Attardi LD (2014): Guilty as CHARGED: p53's expanding role in disease. *Cell Cycle* 13, 3798–3807
- Venema J, Tollervey D (1999): Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 33, 261–311
- Vilborg A, Bersani C, Wilhelm MT, Wiman KG (2011): The p53 target Wig-1: a regulator of mRNA stability and stem cell fate? *Cell Death Differ* 18, 1434–1440
- Vlachos A, Muir E (2010): How I treat Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 116, 3715–3723
- Wade Harper J (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805–816
- Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki R et al. (2015): Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 168, 854–864
- Wawryk-Gawda E, Chylińska-Wrzos P, Lis-Sochocka M, Chłapek K, Bulak K, Jędrych M, Jodłowska-Jędrych B (2014): P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. *Protoplasma* 251, 525–533
- Xu X, Xiong X, Sun Y (2016): The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity. *Sci China Life Sci* 59, 656–672
- Yang T, Zhang W, Wang L, Xiao C, Guo B, Gong Y, Liang X, Huang D, Li Q, Nan Y et al. (2019): Long intergenic noncoding RNA-p21 inhibits apoptosis by decreasing PUMA expression in non-small cell lung cancer. *J Int Med Res* 47, 481–493
- Yelick PC, Trainor PA (2015): Ribosomopathies: Global process, tissue specific defects. *Rare Dis* 3, e1025185
- Zhang Y, Lu H (2009): Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer cell* 16, 15
- Zhang Y, Wolf GW, Bhat K, Jin A, Allio T, Burkhardt WA, Xiong Y (2003): Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* 23, 8902–8912
- Zhu Y, Poyurovsky MV, Li Y, Biderman L, Stahl J, Jacq X, Prives C (2009): Ribosomal protein S7 is both a regulator and a substrate of MDM2. *Mol Cell* 35, 316–326

## Danksagung

Ich möchte mich bei Professor Dr. Silke Pauli bedanken, die mir das Schreiben dieser Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe und den Einblick in ein sehr spannendes wissenschaftliches Feld ermöglicht hat. Sie hat mich in dieser Zeit gut unterstützt und war immer für Fragen und Anregungen offen.

Ich bedanke mich bei Professor Dr. Christoph Kramm, dass er die Zweitbetreuung meines Projekts übernommen hat und mir bei unseren Besprechungen Hintergrundwissen aus der Klinik verschafft hat.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Roser Ufartes-Mas für ihre wundervolle und geduldige Betreuung im Labor, für die gute Einarbeitung und die stete Bereitschaft, Fragen zu beantworten und über Probleme zu diskutieren.

Ich möchte Jannik Johannes danken, der mir durch sein stets freundliches Zuarbeiten im Labor eine große Unterstützung war.

Ich danke Dr. Jessica Nolte-Kaitschick, Professor Dr. Peter Burfeind, Dr. Loukas Argyriou, Regina Grün, Dr. Gesa Werner, Britta König und Carolin Stecker, die mir durch die herzliche Atmosphäre im Institut ein Arbeiten mit Freude und Motivation ermöglicht haben.