

**FAAP100,  
DER FA/BRCA-SIGNALWEG FÜR GENOMISCHE STABILITÄT UND  
DAS DNA-REPARATUR-NETZWERK**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von

**JULIA KÜHL**

GEBOREN IN BAMBERG

Würzburg, 2018

Eingereicht am: .....

**Mitglieder der Promotionskommission:**

Vorsitzender: .....

Gutachter: Prof. Dr. Detlev Schindler (Institut für Humangenetik)

Gutachter: Prof. Dr. Christian Wegener (Lehrstuhl für Neurobiologie und Genetik)

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## **Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie**

### **Affidavit**

I hereby declare that my thesis entitled: „FAAP100, der FA/BRCA-Signalweg für genomische Stabilität und das DNA-Reparatur-Netzwerk“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „FAAP100, der FA/BRCA-Signalweg für genomische Stabilität und das DNA-Reparatur-Netzwerk“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Würzburg, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>I</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 FANCONI-ANÄMIE .....	1
1.1.1 Erstbeschreibung und Häufigkeit.....	1
1.1.2 Klinischer FA-Phänotyp .....	1
1.1.3 Zellulärer FA-Phänotyp und FA-Diagnosemöglichkeiten.....	3
1.1.4 Somatisches Mosaik .....	4
1.1.5 Therapiemöglichkeiten .....	5
1.2 GENETISCHER HINTERGRUND DER FA .....	6
1.2.1 Bekannte FA- und FA-assoziierte Gene .....	6
1.2.2 FA-Gene als Gene zur Verhinderung von Krebs .....	9
1.3 DER FA/BRCA-REPARATUR-SIGNALWEG.....	9
1.4 NUKLEOTID-EXZISIONS-REPARATUR (NER).....	13
1.5 REPARATUR DURCH HOMOLOGE REKOMBINATION .....	15
1.6 WEITERE REPARATURMECHANISMEN VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN .....	17
1.6.1 Non-homologous end joining.....	18
1.6.2 Alternatives end joining .....	19
1.7 FA-MAUSMODELLE .....	20
1.8 FANCONI-ANÄMIE ASSOZIIERTES PROTEIN 100 kDa.....	23
1.9 ZIEL DER ARBEIT .....	24
<b>2 MATERIALIEN.....</b>	<b>25</b>
2.1 ANTIBIOTIKA .....	25
2.2 ANTIKÖRPER.....	25
2.3 CHEMIKALIEN, KULTURMEDIEN PUFFER UND REAGENZIEN .....	26
2.3.1 Kommerziell erworbene Reagenzien.....	26
2.3.2 Selbst hergestellte Reagenzien.....	28
2.4 ENZYME.....	28
2.5 GRÖßENSTANDARDS.....	29
2.6 GEN-ID DER VERWENDETEN TRANSKRIPTE.....	29
2.7 GERÄTE UND HILFSMITTEL.....	29
2.8 KITS.....	31
2.9 KOMPETENTE BAKTERIENSTÄMME .....	32
2.10 OLIGONUKLEOTIDE .....	32
2.10.1 Primer.....	32
2.10.2 Protospacer-Elemente.....	32
2.10.3 Sonstige Oligonukleotide.....	32
2.11 PLASMIDE .....	32

2. 12	TRANSFEKTIONSREAGENZIEN.....	33
2. 13	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	33
2. 14	DATENBANKEN UND SOFTWAREPROGRAMME .....	34
2. 15	ZELLINIEN .....	36
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>37</b>
3. 1	ZELLKULTUR.....	37
3. 1. 1	Kultivierung von Zelllinien .....	37
3. 1. 2	Kryokonservierung von Zellen.....	38
3. 1. 3	Bestimmung der Zellzahl.....	38
3. 2	GENTRANSFER.....	38
3. 2. 1	Klonierung.....	39
3. 2. 1. 1	Restriktionsverdau.....	39
3. 2. 1. 2	Ligation.....	40
3. 2. 2	Transformation.....	40
3. 2. 3	Transfektion .....	41
3. 2. 4	Transduktion .....	41
3. 3	POSTTRANSKRIPTIONELLES GEN-SILENCING MITTELS RNA-INTERFERENZ .....	41
3. 4	CHROMOSOMENBRUCHANALYSE .....	42
3. 5	ZELLZYKLUSANALYSE .....	43
3. 6	ANFERTIGUNG VON ÜBERLEBENSKURVEN .....	43
3. 6. 1	HEK293T-, HAP1-, transformierte Fibroblasten- bzw. Amnionzellen.....	43
3. 6. 2	DT40-Zellen.....	44
3. 7	INDIREKTE IMMUNFLUORESZENZ.....	44
3. 8	MOLEKULARGENETISCHE METHODEN.....	45
3. 8. 1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	45
3. 8. 1. 1	gDNA .....	45
3. 8. 1. 2	RNA.....	45
3. 8. 1. 3	cDNA-Synthese .....	45
3. 8. 1. 4	Plasmid-DNA.....	45
3. 8. 2	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	45
3. 8. 3	Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion.....	46
3. 8. 3. 1	Standard-PCR.....	46
3. 8. 3. 2	Kolonie-PCR .....	46
3. 8. 3. 3	Quantitative Real-Time PCR.....	46
3. 8. 3. 4	Mutagenese-PCR .....	49
3. 8. 4	Gelelektrophorese .....	50
3. 8. 5	Aufreinigung von DNA .....	50
3. 8. 5. 1	Enzymatische Aufreinigung.....	50
3. 8. 5. 2	Aufreinigung über eine Silica-Membran.....	50
3. 8. 6	Sanger-Sequenzierung.....	50
3. 8. 7	Exom-Sequenzierung durch <i>Next-Generation Sequencing</i> .....	51
3. 9	<i>FAAP100</i> -EDITIERUNG DURCH DAS CRISPR/CAS9-SYSTEM.....	52

3. 10	AUTOZYGOTIE-KARTIERUNG .....	56
3. 11	PROTEINANALYTISCHE METHODEN.....	56
3. 11. 1	Isolierung von Proteinen .....	56
3. 11. 1. 1	Isolierung von Gesamtprotein .....	56
3. 11. 1. 2	Fraktionierung.....	57
3. 11. 2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	57
3. 11. 3	Immunblot.....	57
3. 11. 3. 1	SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese .....	57
3. 11. 3. 2	Proteintransfer .....	58
3. 11. 3. 3	Immunblotanalyse .....	58
3. 11. 3. 4	Entfernung von Antikörpern .....	59
3. 11. 4	Untersuchungen zu Proteininteraktionen .....	59
3. 11. 4. 1	Mammalian Two/Three-Hybrid System.....	59
3. 11. 4. 2	Co-Immunpräzipitation.....	62
3. 11. 5	Biochemische Analyse der FANCD2-Monoubiquitinierung .....	62
3. 11. 5. 1	Expression und Aufreinigung der Proteine .....	62
3. 11. 5. 2	Nachstellung der FANCD2-Monoubiquitinierung .....	63
3. 12	GENERIERUNG VON TIERMODELLEN .....	64
3. 12. 1	$\Delta$ FAAP100-DT40-Zellen .....	64
3. 12. 2	Faap100 <sup>-/-</sup> -Mäuse .....	64
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>68</b>
4. 1	<i>FAAP100</i> ALS KAUSALES GEN FÜR FA .....	68
4. 1. 1	Falldarstellung, Stammbaumanalyse und Einordnung im FA-Signalweg.....	68
4. 1. 2	Autozygotie-Kartierung.....	70
4. 1. 3	Sequenzanalysen, Segregation und proteinanalytische Untersuchungen.....	72
4. 1. 4	Konservierung von Threonin an Position 542 in FAAP100.....	77
4. 1. 5	Posttranskriptionelles Gen-Silencing mittels RNA-Interferenz .....	78
4. 1. 6	Generierung von FAAP100-defizienten Zelllinien .....	79
4. 1. 7	Komplementation und Charakterisierung FAAP100-defizienter Zelllinien.....	84
4. 1. 7. 1	Überprüfung der Komplementation per Sanger-Sequenzierung .....	84
4. 1. 7. 2	Zellzyklusanalyse.....	85
4. 1. 7. 3	Chromosomenbruchanalyse .....	88
4. 1. 7. 4	Überlebenskurven.....	96
4. 1. 8	Funktionelle Analysen von p.T542P und p.L543_S551del in FAAP100.....	98
4. 1. 8. 1	Kern- und Chromatinlokalisierung von FAAP100 .....	99
4. 1. 8. 2	Interaktionsstudien zur Komplexbildung von LBP100 .....	102
4. 1. 8. 3	Funktionelle Komplementation von FAAP100-defizienten Zellen.....	105
4. 1. 8. 4	Bildung von FANCD2-Foci.....	108
4. 1. 8. 5	Biochemische Analyse der FANCD2-Monoubiquitinierung .....	110
4. 2	TIERMODELLE .....	112
4. 2. 1	$\Delta$ FAAP100-DT40-Zellen .....	112
4. 2. 2	Faap100 <sup>-/-</sup> -Mausmodell.....	114
4. 3	ALTERNATIVE SPLEIBVARIANTEN VON <i>FAAP100</i> .....	124
4. 3. 1	Identifizierung zweier <i>FAAP100</i> -Isoformen.....	124

4.3.2	Expressionsanalyse von <i>FAAP100</i> <sup>Δ138</sup> mittels qPCR.....	129
4.3.3	Proteinanalytische Untersuchungen von FAAP100 <sup>Δ138</sup> .....	131
4.3.4	FAAP100 <sup>Δ138</sup> -Komplementationsstudien an FAAP100-defizienten Zelllinien .....	133
4.3.4.1	Zellzyklus- und Chromosomenbruchanalyse .....	134
4.3.4.2	Überlebenskurven.....	140
4.3.5	Funktionelle Analyse des Proteins FAAP100 <sup>Δ138</sup> .....	141
4.3.5.1	Kern- und Chromatinlokalisierung von FAAP100 <sup>Δ138</sup> .....	141
4.3.5.2	Interaktionsstudien zur Komplexbildung von LBP100 <sup>Δ138</sup> .....	142
4.3.5.3	Monoubiquitinierung von FANCD2 .....	144
4.3.5.4	Bildung von FANCD2-Foci.....	145
4.3.5.5	Degradierung von FANCD2 durch FAAP100 <sup>Δ138</sup> .....	146
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>148</b>
5.1	<i>IN VITRO</i> KNOCKDOWN UND KNOCKOUT VON FAAP100 .....	148
5.1.1	Keine FANCD2-Monoubiquitinierung nach Knockdown von FAAP100 .....	148
5.1.2	Zellulärer FA-Phänotyp der ΔFAAP100-DT40-Zellen .....	149
5.1.3	<i>FAAP100</i> -Editierung durch das CRISPR/Cas9-System .....	149
5.1.3.1	Generierung von <i>FAAP100</i> -Mutationen in HEK293T-Zellen.....	149
5.1.3.2	Zellulärer FA-Phänotyp der FAAP100-CRISPR/Cas9-Zellen und Komplementationsanalyse .....	152
5.2	VALIDIERUNG VON ANTIKÖRPERN .....	154
5.3	<i>FAAP100</i> ALS FA-GEN .....	156
5.3.1	Typischer FA-Phänotyp durch c.1624A>C in <i>FAAP100</i> bei Fetus 1176.....	156
5.4	AUSWIRKUNGEN VON FAAP100-MUTATIONEN AUF DEN FA-SIGNALWEG SOWIE DIE DNA-SCHADENSREPARATUR.....	158
5.4.1	Fehlende Komplexbildung von LBP100 bei mutiertem FAAP100 .....	158
5.4.2	Degradierung von FANCB und FANCL durch mutiertes FAAP100.....	159
5.4.3	Kein Nukleustransport von mutiertem FAAP100 .....	160
5.4.4	Keine Aktivierung der DNA-Schadensreparatur durch mutiertes FAAP100 .....	161
5.5	<i>IN VIVO</i> KNOCKOUT VON FAAP100 ANHAND EINES MAUSMODELLS .....	162
5.5.1	Schwerer klinischer FA-Phänotyp der Faap100 <sup>-/-</sup> sowie Faap100 <sup>+/-</sup> -Mäuse .....	163
5.5.2	Typischer zellulärer FA-Phänotyp der Faap100 <sup>-/-</sup> -Mäuse.....	165
5.6	IDENTIFIZIERUNG ALTERNATIVER <i>FAAP100</i> -SPLAISPRODUKTE.....	165
5.6.1	Expression und Translation von FAAP100 <sup>Δ138</sup> .....	166
5.6.2	Dysfunktionalität von FAAP100 <sup>Δ138</sup> im FA/BRCA-Signalweg.....	167
5.6.3	Dominant-negativer Effekt von FAAP100 <sup>Δ138</sup> auf den FA/BRCA-Signalweg.....	168
5.7	FAZIT.....	169
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>170</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>181</b>
7.1	PRIMERSEQUENZEN.....	181
7.1.1	Spezies Mensch.....	181
7.1.2	Spezies Maus .....	184
7.2	VEKTORKARTEN .....	186
7.2.1	Vektoren für die Komplementationsstudien.....	186

7.2.2	Vektoren für das Mammalian Two- bzw. Three-Hybrid System .....	186
7.2.3	Vektoren für das CRISPR/Cas9-System .....	187
7.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	188



## ZUSAMMENFASSUNG

Die Fanconi-Anämie (FA) ist eine seltene, heterogene Erbkrankheit. Sie weist ein sehr variables klinisches Erscheinungsbild auf, das sich aus angeborenen Fehlbildungen, hämatologischen Funktionsstörungen, einem erhöhten Risiko für Tumorentwicklung und endokrinen Pathologien zusammensetzt. Die Erkrankung zählt zu den genomischen Instabilitätssyndromen, welche durch eine fehlerhafte DNA-Schadensreparatur gekennzeichnet sind. Bei der FA zeigt sich dies vor allem in einer charakteristischen Hypersensitivität gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen (z. B. Mitomycin C, Cisplatin). Der zelluläre FA-Phänotyp zeichnet sich durch eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit und einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase aus. Diese Charakteristika sind bereits spontan vorhanden und werden durch Induktion mit DNA-quervernetzenden Substanzen verstärkt. Der Gendefekt ist dabei in einem der 22 bekannten FA-Gene (*FANCA*, *-B*, *-C*, *-D1*, *-D2*, *-E*, *-F*, *-G*, *-I*, *-J*, *-L*, *-M*, *-N*, *-O*, *-P*, *-Q*, *-R*, *-S*, *-T*, *-U*, *-V*, *-W*) oder in noch unbekanntem FA-Genen zu finden. Die FA-Gendefekte werden mit Ausnahme von *FANCR* (dominant-negative *de novo* Mutationen) und *FANCB* (X-chromosomal) autosomal rezessiv vererbt. Die FA-Genprodukte bilden zusammen mit weiteren Proteinen den FA/BRCA-Signalweg. Das Schlüsselereignis dieses Signalwegs stellt die Monoubiquitinierung von FANCD2 und FANCI (ID2-Komplex) dar. Ausgehend davon lässt sich zwischen *upstream*- und *downstream*-gelegenen FA-Proteinen unterscheiden. Letztere sind direkt an der DNA-Schadensreparatur beteiligt. Zu den *upstream*-gelegenen Proteinen zählt der FA-Kernkomplex, der sich aus bekannten FA-Proteinen und aus FA-assoziierten-Proteinen (FAAPs) zusammensetzt und für die Monoubiquitinierung des ID2-Komplexes verantwortlich ist. Für FAAPs wurden bisher keine pathogenen humanen Mutationen beschrieben. Zu diesen Proteinen gehört auch FAAP100, das mit *FANCB* und *FANCL* innerhalb des FA-Kernkomplexes den Subkomplex LBP100 bildet.

Durch die vorliegende Arbeit wurde eine nähere Charakterisierung dieses Proteins erreicht. In einer Amnion-Zelllinie konnte eine homozygote Missense-Mutation identifiziert werden. Der Fetus zeigte einen typischen FA-Phänotyp und auch seine Zellen wiesen charakteristische FA-Merkmale auf. Der zelluläre Phänotyp ließ sich durch FAAP100<sup>WT</sup> komplementieren, sodass die Pathogenität der Mutation bewiesen war. Unterstützend dazu wurden mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems weitere FAAP100-defiziente Zelllinien generiert. Diese zeigten ebenfalls einen typischen FA-Phänotyp, welcher sich durch FAAP100<sup>WT</sup> komplementieren ließ. Die *in vitro*-Modelle dienen als Grundlage dafür, die Funktion des FA-Kernkomplexes im Allgemeinen und die des Subkomplexes LBP100 im Besonderen besser zu verstehen. Dabei kann nur durch intaktes FAAP100 das LBP100-Modul gebildet und dieses an die DNA-Schadensstelle transportiert werden. Dort leistet FAAP100 einen essentiellen Beitrag für den FANCD2-Monoubiquitinierungsprozess und somit für die Aktivierung der FA-abhängigen DNA-Schadensreparatur. Um die Funktion von FAAP100 auch *in vivo* zu untersuchen, wurde ein *Faap100*<sup>-/-</sup>-Mausmodell generiert, das einen mit anderen FA-Mausmodellen vergleichbaren, relativ schweren FA-Phänotyp aufwies. Aufgrund der Ergebnisse

lässt sich *FAAP100* als neues FA-Gen klassifizieren. Zudem wurde die Rolle des Subkomplexes LBP100 innerhalb des FA-Kernkomplexes weiter aufgeklärt. Beides trägt zu einem besseren Verständnis des FA/BRCA-Signalweges bei. Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung von FAAP100<sup>Δ138</sup>, einer bisher nicht validierten Isoform von FAAP100. Durch dieses Protein konnte der zelluläre FA-Phänotyp von FAAP100-defizienten Zelllinien nicht komplementiert werden, jedoch wurden Hinweise auf einen dominant-negativen Effekt von FAAP100<sup>Δ138</sup> auf den FA/BRCA-Signalweg gefunden. Dies könnte zu der Erklärung beitragen, warum und wie der Signalweg, beispielsweise in bestimmtem Gewebearten, herunterreguliert wird. Zudem wäre eine Verwendung in der Krebstherapie denkbar.

## SUMMARY

Fanconi Anemia (FA) is a rare heterogeneous hereditary disease. It shows a highly variable clinical presentation including congenital malformations, bone marrow failure and increased risk for cancer and endocrine pathologies. The disease is classified as one of the genomic instability disorders that are characterized by failure of DNA damage repair processes. FA shows a typical hypersensitivity toward DNA crosslinking agents (e.g. Mitomycin C, cisplatin). There is an increased rate of chromosomal breakage and cell cycle arrest in the G2 phase. These characteristics are present spontaneously and after incubation with DNA crosslinking agents. The genetic defect can be found in one of the 22 reported FA genes (*FANCA*, *-B*, *-C*, *-D1*, *-D2*, *-E*, *-F*, *-G*, *-I*, *-J*, *-L*, *-M*, *-N*, *-O*, *-P*, *-Q*, *-R*, *-S*, *-T*, *-U*, *-V*, *-W*) or yet unknown FA genes. FA gene defects are inherited in an autosomal recessive way with the exceptions of *FANCR* (dominant negative *de novo* mutations) and *FANCB* (X-linked). Together with other proteins, the FA gene products establish the FA/BRCA pathway. The key event of this pathway is the monoubiquitination of FANCD2 and FANCI (ID2 complex). From this point it is possible to differentiate between upstream and downstream FA proteins. The latter are directly involved in FA-dependent DNA repair processes. The upstream positioned FA proteins form the FA core complex that includes FA and FA-associated proteins (FAAPs). The FA core complex is responsible for the monoubiquitination of FANCD2 and FANCI. To date no pathogenic human mutations of the FAAPs have been described. Among these proteins is FAAP100 which together with FANCB and FANCL forms the subcomplex LBP100 within the FA core complex.

In the present thesis a closer characterization of this protein has been achieved. In an amniotic cell line a homozygous missense mutation could be identified. The affected fetus displayed a typical FA phenotype and the cells also showed characteristics of FA. The cellular phenotype was complemented by FAAP100<sup>WT</sup>, thus proving the pathogenicity of the mutation. Supporting this result, additional FAAP100-deficient cell lines have been generated using the CRISPR/Cas9 system. These also exhibited a typical FA cellular phenotype which could be complemented by FAAP100<sup>WT</sup>. *In vitro* models served as a basis for better understanding the function of the FA core complex in general and of the LBP100 subcomplex in particular. Only in the presence of an intact FAAP100 the LBP100 module can be formed and transported to sites of DNA interstrand crosslinks. There, FAAP100 significantly contributes to the FANCD2 monoubiquitination process and thus to the activation of FA-dependent DNA damage repair. In order to also examine the function of FAAP100 *in vivo*, an *Faap100*<sup>-/-</sup> mouse model has been generated which shows a relatively severe FA phenotype comparable to other FA mouse models. Because of these results *FAAP100* can be categorized as a new FA gene. Moreover, the role of the LBP100 subcomplex within the FA core complex was further elucidated and a better understanding of the FA/BRCA pathway was achieved. Another part of this thesis deals with the characterization of FAAP100<sup>Δ138</sup>,

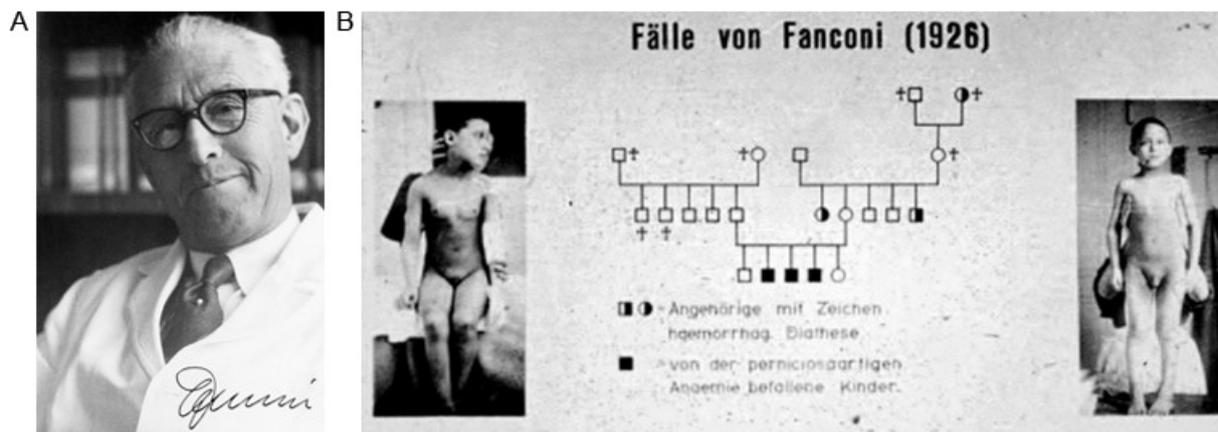
a hitherto not validated isoform of FAAP100. The cellular FA phenotype of FAAP100-deficient cell lines could not be complemented by this isoform. However, there are clues pointing to a dominant negative effect of FAAP100<sup>Δ138</sup> on the FA/BRCA pathway. This finding could serve as a potential explanation of how and why the FA signaling pathway is downregulated in certain tissues. A therapeutic application for cancer of FAAP100<sup>Δ138</sup> appears possible.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Fanconi-Anämie

### 1.1.1 Erstbeschreibung und Häufigkeit

„Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution)“ – so lautete 1927 der Titel eines Fallberichtes über eine zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt konstitutionelle Anämie (Fanconi 1927). Der Schweizer Kinderarzt Guido Fanconi (Abbildung 1A) beschrieb eine Familie mit fünf Kindern, von denen drei Brüder neben Anämie auch Mikrozephalie, Pigmentierungsstörungen der Haut, Herzanomalien, Blutungen, einwärts schielende Augen und Hypoplasie der Hoden aufwiesen (Abbildung 1B). Die Erkrankung verlief für alle drei Brüder letal (Fanconi 1927). Einen weiteren Fall eines 7-jährigen Jungen publizierte Erwin Uehlinger 1929 (Uehlinger 1929). Der Arzt Otto Naegeli schlug 1931 den Begriff „Fanconi-Anämie“ für diese seltene genetisch bedingte Erkrankung vor (Naegeli 1931).



**Abbildung 1: Erstbeschreibung der Fanconi-Anämie. A: Fotografie des Schweizer Kinderarztes Guido Fanconi, ca. 1959. Quelle: Ze'ev Aleksandromicz (CC BY-SA 3.0). B: Zwei der ersten drei FA-Patienten mit Stammbaum. Nachdruck von (Lobitz & Velleuer 2006) mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. Felix H. Sennhauser.**

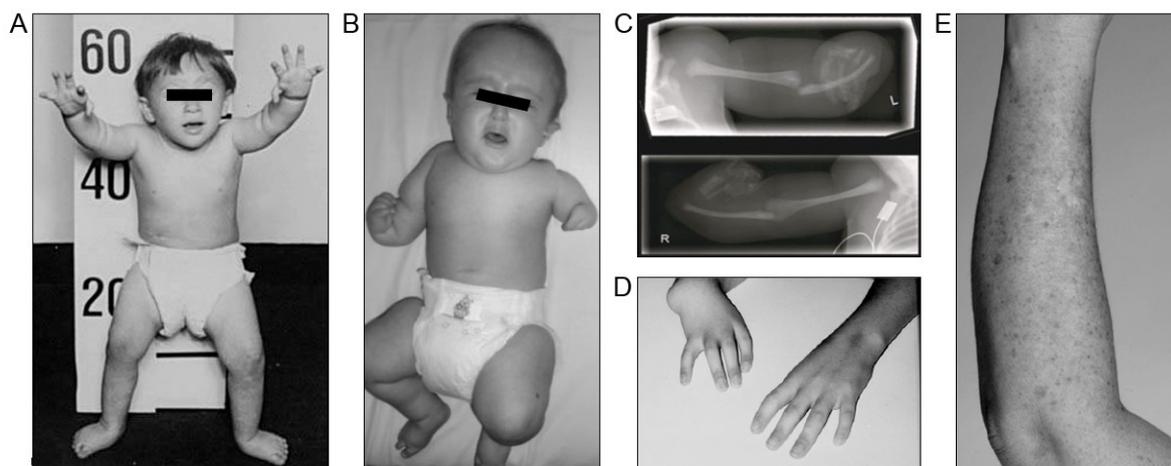
Fanconi-Anämie (FA) weist eine Inzidenz von ca. 1:131 044 auf bei einer Heterozygotenfrequenz in der US-Bevölkerung von 1:181 (Rosenberg et al. 2011). FA kommt in allen Bevölkerungsgruppen vor, allerdings kann die Häufigkeit in bestimmten ethnischen Gruppen bedingt durch Gründereffekte weitaus höher liegen. So beträgt die Heterozygotenfrequenz bei der Afrikaans sprechenden Bevölkerung in Südafrika 1:83 (Rosendorff et al. 1987), bei spanischen Roma für eine *FANCA*-Mutation 1:64-1:70 (Callen et al. 2005) und bei aschkenasischen Juden für eine *FANCC*-Mutation 1:89 bzw. für bestimmte *BRC4*-Mutationen 1:50 bis 1:100 (Verlander et al. 1995, Roa et al. 1996, Struewing et al. 1997).

### 1.1.2 Klinischer FA-Phänotyp

FA wird in einem medianen Alter von ca. 6,5 Jahren diagnostiziert (Shimamura & Alter 2010). Dabei kann die Erkrankung allerdings auch vor der Geburt sowie erst im mittleren

Erwachsenenalter erkannt werden. Das mediane Überlebensalter liegt dank des medizinischen Fortschrittes mittlerweile bei etwa 39 Jahren (Alter et al. 2018).

Die erste Beschreibung der FA schloss bereits einige typische Merkmale ein. Heute ist bekannt, dass sich der klinische Phänotyp sehr variabel äußert. Selbst innerhalb einer Familie können die Symptome unterschiedlich ausgeprägt sein (Glanz & Fraser 1982). Bei etwa einem Drittel aller Patienten werden keine angeborenen Fehlbildungen beobachtet (Giampietro et al. 1997). Klassische Merkmale der FA sind in Abbildung 2 zu sehen. Diese sind unter anderem prä- oder postnataler Minderwuchs, bi- oder unilaterale Radialstrahlanomalien, Hypo- oder Aplasie der Daumen sowie Anomalien des Kopfes (Mikrozephalus, Hydrozephalus) wie auch der inneren und äußeren Organe (z. B. Augen, Ohren, Gonaden, Nieren, Herz). Des Weiteren kann Hyper- oder Hypopigmentierung der Haut (z. B. Café-au-lait-Flecken) auftreten. (Glanz & Fraser 1982, Shimamura & Alter 2010) In manchen Fällen wird die FA auch mit einer VACTERL(-H)-Assoziation (vertebrale Anomalien, **A**nalatresie, kardiale Fehlbildungen (*cardial*), tracheo-ösophageale Fisteln, Ösophagusatresie (*esophageal atresia*), renale Strukturanomalien, Gliedmaßenanomalien (*limb*), **H**ydrozephalus) in Verbindung gebracht, welche eine Kombination verschiedener angeborener Fehlbildungen darstellt (Alter & Rosenberg 2013). Auch Endokrinopathien (z. B. Dysfunktion des Glukose- bzw. Insulinmetabolismus, Schilddrüsenunterfunktion, Wachstumshormondefizienz) werden bei FA-Patienten beschrieben (Giri et al. 2007).



**Abbildung 2: Klinischer FA-Phänotyp.** Gezeigt werden ein 3-jähriger (A) und ein 2-jähriger Junge (B) mit Minderwuchs. Der Junge in A weist zudem einen Mikrozephalus, der Junge in B einen Hydrozephalus und Radialstrahlanomalien auf. Das Fehlen der Radii ist auf Röntgenaufnahmen in C sowie bei dem rechten Arm in D zu sehen. D zeigt eine beidseitige Aplasie der Daumen und E Hyper- sowie Hypopigmentierungen der Haut. *Quellen:* A: Veränderter Nachdruck von (Nathan et al. 2003) mit freundlicher Genehmigung von Elsevier. B und C: Veränderter Nachdruck von (McCauley et al. 2011) mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons. D: Veränderter Nachdruck von (Auerbach 2009) mit freundlicher Genehmigung von Elsevier. E: Veränderter Nachdruck von (Knoch et al. 2012) mit freundlicher Genehmigung von JOHN/LIBBEY EUROTTEXT; Genehmigung übertragen durch das Copyrights Clearance Center, Inc.

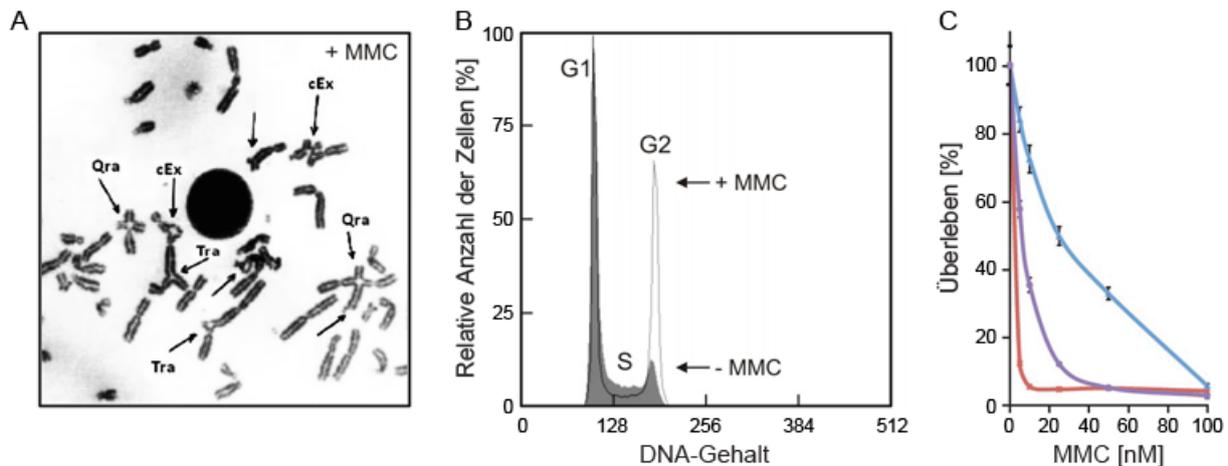
Sind keine oder nur wenige Fehlbildungen vorhanden, kann FA oft erst durch ihr namensgebendes Merkmal, der Störung des hämatologischen Systems, diagnostiziert werden, welches in einem medianen Alter von sieben Jahren auftritt (Butturini et al. 1994). Das Risiko, ein progressives

Versagen des Knochenmarks (*bone marrow failure*, BMF) zu entwickeln, liegt für 40-jährige FA-Patienten bei über 90 % (Butturini et al. 1994). Es kann sich anfangs nur als Thrombozytopenie, später als Panzytopenie zeigen. Als Folge der aplastischen Anämie ist unter anderem mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen und Blutungen zu rechnen (Auerbach & Allen 1991, Butturini et al. 1994).

FA-Patienten weisen eine besonders hohe Krebsprädisposition in Form von hämatologischen und soliden Malignomen auf. Dabei kann ein Patient nur an einer oder auch an mehrere Tumorarten erkranken. Viele FA-Patienten entwickeln ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) und/oder eine akute myeloische Leukämie (AML). Solide Tumore können in fast allen Körperbereichen (z. B. Leber) auftreten. In den meisten Fällen jedoch entwickeln sich Plattenepithelkarzinome im Hals- und Kopfbereich des oberen Verdauungs- und Atmungstraktes (*head and neck squamous cell carcinomas*; HNSCCs). (Alter 2003) Dabei ist das Risiko für HNSCCs bei FA-Patienten etwa 527-fach höher als in der Normalbevölkerung (Alter et al. 2018).

### 1. 1. 3 Zellulärer FA-Phänotyp und FA-Diagnosemöglichkeiten

Ein entscheidender Durchbruch gelang 1964 Schroeder et al., als sie erstmals spontane Chromosomenaberrationen im Zusammenhang mit FA nachweisen konnten (Schroeder et al. 1964). Auf diese Weise war eine erste zellulär basierte Diagnosemöglichkeit für FA und eine Zugehörigkeit zu den Chromosomeninstabilitätssyndromen, zu denen auch Xeroderma pigmentosum oder das Bloom-Syndrom zählen, geschaffen. Etwa zehn Jahre später wurde gezeigt, dass die chromosomale Instabilität bei FA durch DNA-quervernetzende Substanzen (*Interstrand-Crosslinks*, ICLs; z. B. Diepoxybutan (DEB), Mitomycin C (MMC), Cisplatin (CDDP)) überproportional verstärkt wird und eine besondere Empfindlichkeit gegenüber diesen Agenzien besteht (Abbildung 3A) (Sasaki & Tonomura 1973). Folglich konnte FA mit dem ICL-Reparaturmechanismus verknüpft werden. Aufgrund der gestörten Reparatur werden mehr FA-Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus arretiert als nicht-FA-Zellen. Dieser Arrest, welcher ebenfalls durch ICL-induzierende Agenzien bei FA-Zellen verstärkt wird, kann nach DNA-Färbung mithilfe einer durchflusszytometrischen Messung nachgewiesen werden (Abbildung 3B) (Kubbies et al. 1985, Seyschab et al. 1995). Die Hypersensitivität gegenüber MMC, Cisplatin oder DEB kann zudem für sogenannte Überlebenskurven herangezogen werden (Weksberg et al. 1979). Aus diesen geht hervor, dass die Vitalität von FA-Zellen nach Behandlung mit ICL-induzierenden Substanzen deutlich herabgesetzt ist im Vergleich zu nicht FA-Zellen (Abbildung 3C).



**Abbildung 3: Zellulärer FA-Phänotyp. A: Ausschnitt einer FA-Metaphase von MMC-behandelnten Blutlymphozyten.** Die Pfeile weisen auf Chromosomenaberrationen hin. Qra: Quadriradialfigur, Tra: Triradialfigur, cEX: komplexere Figur (*complex exchange*). *Quelle: (Mozdarani et al. 2011) (CC BY-NC-SA 3.0).* **B: Zellzyklusprofil lymphoblastoider Zellen eines FA-Patienten mit und ohne MMC-Behandlung.** Nach MMC-Behandlung kommt es zu einer überstarken Erhöhung des G2-Phase-Anteils. **C: Überlebenskurven von FA-Fibroblastenzelllinien nach 8-tägiger MMC-Inkubation.** In Rot und Lila sind die Kurven von FA-Zellen zu sehen, die sensitiv auf MMC reagieren und eine geringere Überlebensfähigkeit im Vergleich zur blauen Kurve (komplementierte FA-Zellen) zeigen. *Veränderter Nachdruck (B und C) von (Kim et al. 2011, Stoepker et al. 2011) mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.*

Die spontane genomische Instabilität steht im Einklang mit der Beobachtung, dass FA-Zellen eine langsamere Proliferation zeigen als nicht FA-Zellen (Elmore & Swift 1975, Weksberg et al. 1979). Es wird vermutet, dass der oxidative Metabolismus die Ausbildung des zellulären und klinischen FA-Phänotyps beeinflusst (Pagano et al. 2005). Beispielsweise wird das schlechte Wachstum von FA-Fibroblasten unter hypoxischen Bedingungen (5 % v/v Oxygen) aufgehoben, sodass sie fast eine normale Proliferation zeigen (Schindler & Hoehn 1988). Auch die spontane Chromosomenbrüchigkeit und der G2-Phase-Arrest scheinen von der Oxygenkonzentration abhängig und unter hypoxischen Bedingungen weniger stark ausgeprägt zu sein (Joenje et al. 1981).

Für die heutige FA-Routinediagnostik werden Zellen mit ICL-induzierenden Substanzen behandelt und anschließend mithilfe eines zytogenetischen Tests und/oder einer Zellzyklusmessung analysiert. Fällt ein Befund, der auf Messungen an Blutlymphozytenmaterial beruht, bei Vorliegen klinischer FA-Merkmale negativ aus, sollten zusätzlich Fibroblastenzellen zur Untersuchung herangezogen werden. In solch einem Fall könnte ein somatisches Mosaik vorliegen, wodurch der FA-Phänotyp in Blutzellen verloren gegangen ist.

#### 1.1.4 Somatisches Mosaik

Ein somatisches Mosaik im hämatopoetischen System liegt vor, wenn sich bei FA-Patienten im Blut Zellen mit und ohne ursächliche Mutationen befinden. Durch verschiedene Mechanismen (intragenisches Crossing-over, Rückmutation oder Genkonversion) kann in einer Stamm- oder Progenitorzelle die ursächliche Mutation in einem Allel zum Wildtyp revertieren, sodass in dieser Zelle eine vollständige Korrektur des zellulären Phänotyps vorliegt (Gross et al. 2002). Daneben

kann auch eine zweite, in einem *cis*-Bereich des Gens lokalisierte Mutation (kompensatorische Mutation) nahe der konstitutiven Mutation auftreten, wodurch die Auswirkung der eigentlichen Variante ausgeglichen wird (Waisfisz et al. 1999, Gross et al. 2002). Die neue Erbinformation wird an die Tochterzellen weitergegeben, die durch diese „Selbstkorrektur“ einen Wachstumsvorteil gegenüber den nicht korrigierten FA-Zellen erhalten. Bei Vorliegen eines hämatopoetischen Mosaiks können die Blutwerte verbessert und der zelluläre FA-Phänotyp in Blutlymphozyten abgeschwächt bzw. bei vollständigem Mosaik aufgehoben werden (Gross et al. 2002). In diesem Zusammenhang wird von einer „natürlichen Gentherapie“ gesprochen (Youssofian 1996).

Außerhalb des hämatopoetischen Systems liegt jedoch weiterhin die ursächliche FA-Genvariante vor. So bleibt beispielsweise das erhöhte Risiko für die Entwicklung von soliden Tumoren bestehen, ähnlich wie auch nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT).

### 1. 1. 5 Therapiemöglichkeiten

Chirurgische Eingriffe können angeborene Fehlbildungen korrigieren oder zumindest einen Beitrag zur Funktionsverbesserung leisten (Alter 2007). Auch bei Tumoren kommen Operationen vorrangig zum Einsatz, um eine Behandlung mit Chemo- oder Strahlentherapien zu vermeiden, welche durch die beträchtlichen Nebenwirkungen bei FA-Patienten oftmals zum Tode führen würden (Alter 2003, Velleuer & Dietrich 2014). Da es sich bei FA um eine Multisystemerkrankung handelt, sollten Patienten bestimmte Vorsorgemaßnahmen einhalten. Dazu gehören beispielsweise regelmäßige Kontrollen des Blutbildes bzw. des Knochenmarks, der Leberfunktion und die Krebsvorsorge. Generell wird hinsichtlich der Tumorentwicklung empfohlen, aufmerksam seinen Körper zu beobachten und karzinogene Faktoren wie z. B. Alkohol, Tabakrauch oder Sonnenstrahlung zu meiden. (Alter 2003, Velleuer & Dietrich 2014)

Um Minderwuchs entgegenzuwirken, werden Wachstums- bzw. bei gleichzeitiger Schilddrüsenunterfunktion Schilddrüsenhormone verabreicht (Wajnrajch et al. 2001, Eyal et al. 2008). Hämatopoetische Anomalien können mit einer Androgen- (z. B. Oxymetholon, Danazol) oder Wachstumsfaktorentherapie (z. B. Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor, GM-CSF) behandelt werden. Auf diese Weise kann die Produktion der Blutzellen stimuliert und die Blutwerte können verbessert werden (Guinan et al. 1994, Scheckenbach et al. 2012, Paustian et al. 2016). Jedoch sprechen nicht alle FA-Patienten gleich gut auf diese Medikamente an (Shimamura & Alter 2010). Nebenwirkung der Therapie scheint ein erhöhtes Risiko für Leberkrebs (Androgene) oder für Leukämie (Wachstumshormone) zu sein (Wada et al. 1989, Wajnrajch et al. 2001, Alter 2003).

Eine Behandlung, die hinsichtlich der hämatologischen Funktionsstörung Erfolgschancen bietet, ist eine allogene Transplantation von Blutstammzellen (HSZT). Diese kann anhand der Stammzellen aus dem Knochenmark, dem Nabelschnurblut oder dem peripheren Blut erfolgen. Dabei sind die Überlebenschancen bei jüngeren Patienten in gutem Gesundheitszustand und bei

vorhandenem Spendermaterial eines HLA-identischen Geschwisterkindes am größten (Peffault de Latour et al. 2013). Mittlerweile werden auch Erfolge verzeichnet, wenn das Material von einem alternativen Spender stammt. Dabei spielen bei haploidentischen Verwandten die Entfernung der T-Lymphozyten durch eine CD34+-Selektion und eine vorangegangene Fludarabin-basierte Konditionierung eine entscheidende Rolle, einer Graft-versus-Host-Reaktion (*Graft-versus-Host-Disease*, GvHD), einer gegen den Wirtsorganismus gerichteten Immunreaktion des Transplantats, entgegenzuwirken (Wagner et al. 2007, Zecca et al. 2014). Nach einer HSZT ist die hämatologische Krebsdisposition geringer, aber nicht gänzlich verschwunden. Die Krebsprädisposition im restlichen Körper besteht unverändert oder ist aufgrund der vorangegangenen Konditionierung sogar erhöht (Deeg et al. 1996).

Noch in der Entwicklungsphase befindet sich die Möglichkeit einer Gentherapie (Navarro et al. 2015). Es können induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen), die mithilfe künstlicher Reprogrammierung aus somatischen Zellen hergestellt werden, oder retroviraler Gentransfer in körpereigene Knochenmarkstammzellen genutzt werden. Hierbei wird der FA-Phänotyp durch Einschleusen einer Wildtyp-Kopie des defekten Gens korrigiert (Walsh et al. 1994, Raya et al. 2009). Vielversprechende Aussichten innerhalb der Gentherapie bietet eine noch relativ junge Methode, die Genom-Editierung durch das CRISPR/Cas9-System (Jinek et al. 2012, Cong et al. 2013).

## 1. 2 Genetischer Hintergrund der FA

### 1. 2. 1 Bekannte FA- und FA-assozierte Gene

Aktuell zählt man 22 Gene, die ursächlich für FA sein können. Dabei handelt es sich um *FANCA*, *-B*, *-C*, *-D1*, *-D2*, *-E*, *-F*, *-G*, *-I*, *-J*, *-L*, *-M*, *-N*, *-O*, *-P*, *-Q*, *-R*, *-S*, *-T*, *-U*, *-V* und *-W* (Knies et al. 2017). Eine genauere Bezeichnung sowie die Erstbeschreibung dieser Gene ist in Tabelle 1 dargestellt. Den meisten dieser Gene liegt ein autosomal-rezessiver Erbgang zugrunde, Ausnahmen bilden hierbei nur *FANCB*, das auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, und *FANCR*, in dem dominant-negative *de novo* Mutationen beschrieben wurden (Meetei et al. 2004, Ameziane et al. 2015, Wang et al. 2015). Des Weiteren scheint *FANCM* eine Sonderstellung unter den FA-Genen einzunehmen. Zellen des einzigen bisher identifizierten FA-M-Patienten, der einen klinischen FA-Phänotyp zeigte, konnten nicht mit der Wildtyp-Form von *FANCM* komplementiert werden (Meetei et al. 2005). Er wies zudem biallelische Mutationen in *FANCA* auf (Singh et al. 2009). Weiterhin ergab eine finnische Studie, dass Träger biallelischer *Loss-of-Function*-Mutationen in *FANCM* keine klinischen Auffälligkeiten im Sinne von FA zeigten (Lim et al. 2014). Zwei Veröffentlichungen berichteten zudem darüber, dass trunkierende biallelische *FANCM*-Mutationen zu keiner typischen FA mit BMF und angeborenen Fehlbildungen führen, sondern

eher eine frühe Manifestation von heterogenen Krebserkrankungen zur Folge haben (Bogliolo et al. 2017, Catucci et al. 2017).

FA-Patienten bzw. die von ihnen abstammenden Zelllinien werden in sogenannte Komplementationsgruppen eingeteilt. Hierbei legt der ursächliche Defekt für FA in genau einem Gen die Einordnung in eine der Gruppen fest. Die nachfolgenden Kriterien zur Eingruppierung (Joenje et al. 2000) haben teilweise jedoch nur noch historische Bedeutung:

- Mindestens zwei Patienten sollten einer bestimmten Gruppe zuordenbar sein.
- Für alle anderen Gene und somit Gruppen sollte der FA-Defekt ausgeschlossen werden.
- Das ursächliche Gen muss identifiziert und die Pathogenität der Mutationen bewiesen sein.

**Tabelle 1: Übersicht der FA- und FA-assoziierten Gene.**

Genname Alias	Häufigkeit bei FA	Gen- lokalisierung	Proteinfunktion im FA/BRCA-Signalweg	Referenz
<b>FA-Gene</b>				
<b>FANCA</b>	62,65 %	16q24.3	FA-Kernkomplex, Subkomplex AGP20	(Apostolou et al. 1996), (Lo Ten Foe et al. 1996)
<b>FANCB</b> <i>FAAP90</i> <i>FAAP95</i>	1,72 %	Xp22.2	FA-Kernkomplex, Subkomplex LBP100	(Meetei et al. 2004)
<b>FANCC</b>	9,71 %	9q22.3	FA-Kernkomplex, Subkomplex CEF	(Strathdee et al. 1992)
<b>FANCD1</b> <i>BRC42</i>	2,27 %	13q12.3	Homologe Rekombination	(Howlett et al. 2002)
<b>FANCD2</b>	2,52 %	3p25.3	ID2-Komplex	(Timmers et al. 2001)
<b>FANCE</b>	1,17 %	6p21.31	FA-Kernkomplex, Subkomplex CEF	(de Winter et al. 2000a)
<b>FANCF</b>	1,47 %	11p14.3	FA-Kernkomplex, Subkomplex CEF	(de Winter et al. 2000b)
<b>FANCG</b> <i>XRCC9</i>	9,58 %	9p13.3	FA-Kernkomplex, Subkomplex AGP20	(de Winter et al. 1998)
<b>FANCI</b> <i>KLAA1794</i>	1,29 %	15q26.1	ID2-Komplex	(Smogorzewska et al. 2007), (Dorsman et al. 2007), (Sims et al. 2007)
<b>FANCI</b> <i>BRIP1</i> <i>BACH1</i>	1,72 %	17q23.2	DNA-Helikase	(Levran et al. 2005), (Litman et al. 2005)
<b>FANCL</b> <i>PHF9</i> <i>FAAP43</i>	0,43 %	2p16.1	E3-Ubiquitin-Ligase, FA-Kernkomplex, Subkomplex LBP100	(Meetei et al. 2003a)
<b>FANCM</b> <i>FAAP250</i>	0,25 %	14q21.3	DNA-Translokase, FA-Kernkomplex, DNA-Remodellierungs-Komplex, wichtig für ATR-Aktivierung	(Meetei et al. 2005)
<b>FANCN</b> <i>PALB2</i>	3,99 %	16p12.2	Homologe Rekombination	(Xia et al. 2007), (Reid et al. 2007)
<b>FANCO</b> <i>RAD51C</i>	0,12 %	17q22	Homologe Rekombination	(Vaz et al. 2010)

Genname Alias	Häufigkeit bei FA	Gen- lokalisierung	Proteinfunktion im FA/BRCA-Signalweg	Referenz
<b>FANCP</b> <i>BTBD12</i> <i>SLX4</i>	0,43 %	16p13.3	Endonuklease, Entfernen des ICLs	(Stoepker et al. 2011), (Kim et al. 2011)
<b>FANCQ</b> <i>ERCC4</i> <i>XPF</i>	0,12 %	16p13.12	Endonuklease, Entfernen des ICLs	(Bogliolo et al. 2013)
<b>FANCR</b> <i>RAD51</i>	0,12 %	15q15.1	Homologe Rekombination	(Wang et al. 2015), (Ameziane et al. 2015)
<b>FANCS</b> <i>BRCA1</i>	0,06 %	17q21.31	Homologe Rekombination	(Sawyer et al. 2015)
<b>FANCT</b> <i>HSPC150</i> <i>UBE2T</i>	0,18 %	1q32.1	E2-konjugierendes Enzym	(Hira et al. 2015), (Rickman et al. 2015), (Virts et al. 2015)
<b>FANCU</b> <i>XRCC2</i>	0,06 %	7q36.1	Homologe Rekombination	(Park et al. 2016)
<b>FANCV</b> <i>MAD2L2</i> <i>REV7</i>	0,06 %	1p36.22	Translasionssynthese, Unterdrücken der DNA-Resektion	(Bluteau et al. 2016)
<b>FANCW</b> <i>RFWD3</i>	0,06%	16q23.1	Homologe Rekombination	(Knies et al. 2017)
<b>FA-assoziierte Gene</b>				
<b>FAAP100</b> <i>c17orf70</i>	–	17q25.3	FA-Kernkomplex, Subkomplex LBP100	(Ling et al. 2007)
<b>FAAP24</b> <i>c19orf40</i>	–	19q13.11	FA-Kernkomplex, DNA-Remodellierungs-Komplex	(Ciccia et al. 2007)
<b>FAAP20</b> <i>c1orf86</i>	–	1p36.33	FA-Kernkomplex, Subkomplex AGP20	(Kim et al. 2012)
<b>MHF1</b> <i>FAAP16</i> <i>CENPS</i>	–	1p36.22	FA-Kernkomplex, DNA-Remodellierungs-Komplex	(Yan et al. 2010), (Singh et al. 2010)
<b>MHF2</b> <i>FAAP10</i> <i>CENPX</i>	–	17q25.3	FA-Kernkomplex, DNA-Remodellierungs-Komplex	(Yan et al. 2010), (Singh et al. 2010)

DNA-Remodellierungs-Komplex → Lokalisierung des FA-Kernkomplexes zur DNA, FA- Kernkomplex → nötig für Monoubiquitinierung des ID2-Komplexes, Quelle: *Fanconi Anemia Mutation Database* (Stand April 2018)

Zusammen mit dem FA-Kernkomplex können neben den FA-Genprodukten weitere Proteine aufgereinigt werden, welche als FA-assoziierte Proteine (FAAPs) bezeichnet und mit ihrem jeweiligen Molekulargewicht in Kilodalton angegeben werden (Meetei et al. 2003b). Dies sind FAAP100, FAAP24, FAAP20, FAAP16/MHF1 und FAAP10/MHF2. Sie sind zwar fester Bestandteil des FA/BRCA-Signalweges, jedoch konnte bisher kein FA-Patient ermittelt werden, der in einem dieser Proteine pathogene Mutationen aufweist. Auch FANCB, FANCL und FANCM wurden vor der Identifizierung von FA-ursächlichen Mutationen in diesen Proteinen als FAAPs bezeichnet.

### 1. 2. 2 FA-Gene als Gene zur Verhinderung von Krebs

FA-Patienten weisen generell eine hohe Prädisposition gegenüber Krebs auf. Für biallelische Mutationen in *FANCM* wurde vor kurzem eine frühe Manifestation von heterogenen Krebserkrankungen wie z. B. HNSCCs, Endometriumkarzinom und Brustkrebs beschrieben, obwohl nur ein FA-ähnlicher Phänotyp bei den Patienten diagnostiziert werden konnte (Bogliolo et al. 2017, Catucci et al. 2017).

Ob auch monoallelische Mutationen in FA-Genen mit einer allgemein erhöhten Krebsprädisposition assoziiert sein können, untersuchte eine Studie aus dem Jahr 2007 an den Genen *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG* und *FANCI* (Berwick et al. 2007). Diese Hypothese konnte nicht bestätigt werden, wobei Brust- und/oder Eierstockkrebs jedoch eine Ausnahme darstellen.

So sind monoallelische Mutationen in einigen FA-Genen mit einer erhöhten Krebsprädisposition für Brust- und Ovarialkarzinome assoziiert. Hierzu zählen die Gene *BRCA1/FANCS*, *BRCA2/FANCD1*, *PALB2/FANCN*, *BRIP1/FANCI*, *RAD51C/FANCO* und *FANCM*, wobei *FANCM* vor allem mit einem dreifach negativem Mammakarzinom in Verbindung gebracht wird (Kiiski et al. 2014, Buys et al. 2017). Als weitere Kandidaten für eine erhöhte Prädisposition gegenüber familiärem Brust- und/oder Eierstockkrebs gelten zudem *XRCC2/FANCU*, *SLX4/FANCP*, *FANCA*, *FANCC* und *FANCD2* (im Fall von sporadischem Brustkrebs). Um dies zu bestätigen, sind allerdings noch weitere Studien nötig. (Barroso et al. 2006, Park et al. 2012, Thompson et al. 2012, Litim et al. 2013, Shah et al. 2013, Hilbers et al. 2016).

Somit liegt eine Verknüpfung zwischen dem FA- und dem BRCA-Signalweg vor, sodass man auch vom FA/BRCA-Signalweg oder -Netzwerk sprechen kann. Dieses spielt bei der Reparatur von DNA-Doppelstrang-Quervernetzungen eine entscheidende Rolle.

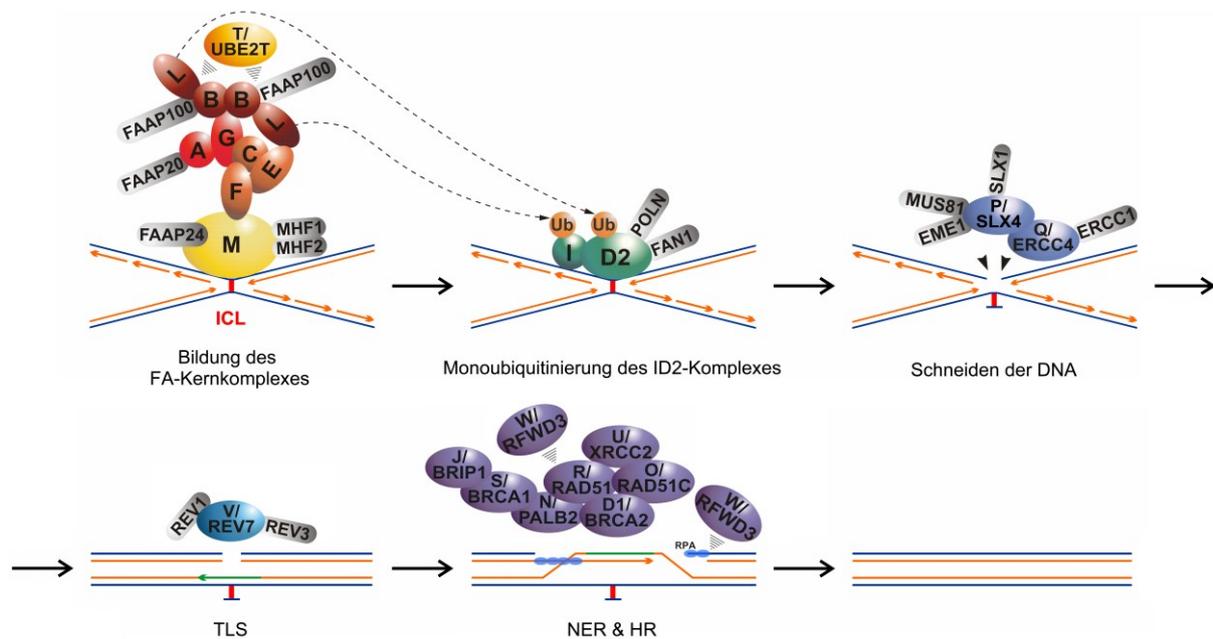
### 1. 3 Der FA/BRCA-Reparatur-Signalweg

Alle FA-Genprodukte bilden gemeinsam den FA/BRCA-Reparatur-Signalweg (Abbildung 4). Dieser ist für die Entfernung von ICLs und die anschließende Reparatur in der G2-Phase des Zellzyklus verantwortlich.

Er kann grob in drei Bereiche unterteilt werden: (1) den FA-Kernkomplex, bestehend aus dem DNA-Remodellierungs-Komplex *FANCM-FAAP24-MHF1-MHF2* sowie den Proteinen *FANCA*, -B, -C, -E, -F, -G, *FAAP20* und *FAAP100*, (2) den ID2-Komplex mit den Proteinen *FANCD2* und *FANCI* und (3) die *downstream* des ID2-Komplexes agierenden Proteine *FANCD1*, -J, -N, -O, -P, -Q, -R, -S, -U, -V und -W.

Neben dem Kernkomplex agiert ebenfalls *upstream* des ID2-Komplexes das E2-konjugierende Enzym *FANCT*. Allerdings wird es unabhängig vom Kernkomplex zur Schadensstelle rekrutiert,

wo es an FANCL, der funktionellen E3-Ligase des FA/BRCA-Signalweges, bindet (Alpi et al. 2007). Zusammen mit einem E1-aktivierenden Enzym bildet sich eine E1-E2-E3-Enzymkaskade, sodass es durch den FA-Kernkomplex zur Monoubiquitinierung von FANCD2 und FANCI kommt. Dies ist das Schlüsselereignis des FA-Signalweges, welches die ICL-Reparatur durch die *downstream*-Proteine einleitet. (Knies et al. 2017, van Twest et al. 2017)



**Abbildung 4: Der FA/BRCA-Signalweg.** Durch eine DNA-Quervernetzung (*Interstrand-Crosslink*, ICL) kommt es zur Stagnierung der Replikationsgabel. Dies wird durch den Komplex FANCM-FAAP24-MHF1-MHF2 (gelb, grau) erkannt und als Folge wird der FA-Kernkomplex (gelb, rot) am Schadensort ausgebildet. Er monoubiquitiniert zusammen mit FANCI (orange) den ID2-Komplex (grün), was zur Einleitung der Reparatur führt. Die Nukleasen FANCP und FANCD3 (blau) schneiden mithilfe ihrer Interaktionspartner die DNA, sodass ein Doppelstrang- sowie ein Einzelstrangbruch entstehen und der ICL nach außen geklappt wird. Durch Translasiönsynthese (TLS), in der FANCD3 (türkis) involviert ist, wird der Leitstrang über die Läsion hinweg verlängert. Der ICL wird durch Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) entfernt und die authentische Sequenz durch Homologe Rekombination (HR) wiederhergestellt. Hierbei sind weitere FA-Gene (lila) beteiligt. Farbig: FA-Proteine, Grau: FA-assoziierte Proteine. *Quelle: Veränderte Abbildung, mit freundlicher Genehmigung von Isabell Popp (unveröffentlichtes Material).*

Der FA/BRCA-Reparatur-Signalweg wird während des DNA-Replikationsprozesses in der S-Phase aktiviert, wenn Polymerasen auf eine DNA-Doppelstrang-Quervernetzung treffen und so die Replikationsgabeln blockiert werden. Der Leitstrang kommt dabei 20-40 Nukleotide vor dem ICL zum Stehen (Raschle et al. 2008). Nur bei vorliegender X-Struktur kann der CMG-Helikase-Komplex, welcher die Helix entwunden hat, durch den BRCA1/FANCS-BARD1-Komplex von der DNA entfernt werden (Long et al. 2014). Eine X-Struktur ist gegeben, wenn entweder zwei Replisome aufeinandertreffen oder „*replication traverse*“ vorliegt (Zhang et al. 2015). Dies ist der Vorgang, wenn die Replikationsmaschinerie auf die andere Seite des ICLs verlagert und dort die DNA-Synthese fortgesetzt wird. Er wird durch FANCM über eine Interaktion mit PCNA vermittelt (Rohleder et al. 2016). Bei Blockade der Replikationsgabeln lagert sich das Dimer ATR-ATRIP an Einzelstrang-bindendes RPA-Protein an, welches die entwundenen DNA-Stränge umhüllt und so stabilisiert (Seroussi & Lavi 1993, Acevedo et al. 2016). Über ATR-ATRIP kommt

es zu Phosphorylierungsprozessen der Proteine FANCA, FANCE, FANCG, FANCI, FANCD2 und FANCM, was vermutlich zur Aktivierung des FA-Signalweges führt (Andreassen et al. 2004, Ho et al. 2006, Smogorzewska et al. 2007, Wang et al. 2007, Ishiai et al. 2008, Kim et al. 2008, Wilson et al. 2008, Collins et al. 2009, Shigechi et al. 2012, Tomida et al. 2013).

Bei FANCM handelt es sich um ein Protein mit einer Helikase-Domäne, das zusätzlich eine DNA-Translokase-Aktivität besitzt (Meetei et al. 2005). Zusammen mit FAAP24 und dem Heterodimer MHF1-MHF2 bildet es den DNA-Remodellierungs-Komplex, welcher blockierte Replikationsgabeln erkennt und an diese binden kann. Dabei besitzt FANCM eine hohe Affinität gegenüber der verzweigten DNA-Struktur, wohingegen FAAP24 an Einzelstrang-DNA (ssDNA) und MHF1-MHF2 an Doppelstrang-DNA (dsDNA) binden kann (Yan et al. 2010). So wird der Komplex mitten in der blockierten Replikationsgabel gehalten und kann diese stabilisieren. Zudem ist FANCM in der Lage, DNA-Strukturen zu modellieren. So kann beispielsweise durch Zurücksetzen der Replikationsgabel verhindert werden, dass diese direkt in die Läsion fährt und dort zusammenbricht (Yan et al. 2010). Außerdem wird an der Schadensstelle Platz für die Reparatur geschaffen, deren Initiator der FA-Kernkomplex ist. Der Rekrutierungsmechanismus der übrigen Kernkomplexproteine zum Chromatin, dessen „Landeplattform“ FANCM darstellt, ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch spielen hierbei FANCM und vermutlich auch FANCI sowie FANCF eine entscheidende Rolle. (Kim et al. 2008, Huang et al. 2014, Castella et al. 2015)

Der Rekrutierungsprozess läuft dabei durch die Ausbildung dreier Subkomplexe (FANCA-FANCG-FAAP20: AGP20, FANCC-FANCE-FANCF: CEF, FANCL-FANCB-FAAP100: LBP100) sukzessiv ab. Die Proteine dieser Untereinheiten und auch die des DNA-Remodellierungs-Komplexes interagieren auf unterschiedliche Weise und Stärke miteinander, sodass sie gemeinsam als FA-Kernkomplex aufgereinigt werden können (Meetei et al. 2003b, Medhurst et al. 2006, Ali et al. 2012, Huang et al. 2014).

FANCC alleine liegt nur zytoplasmatisch vor und kann erst durch die Wechselwirkung mit FANCE in den Nukleus gelangen, wo der Komplex durch FANCF zu CEF vervollständigt wird (de Winter et al. 2000c, Pace et al. 2002). Im Kern bindet CEF über das „Adapterprotein“ FANCF an FANCM (Leveille et al. 2004, Deans & West 2009). AGP20 setzt sich zunächst im Zytoplasma aus den Proteinen FANCA und FANCG zusammen, welche durch FANCM in den Kern rekrutiert werden, und wird anschließend um FAAP20 erweitert (Medhurst et al. 2006, Ling et al. 2007). Ob FAAP20 bereits im Zytoplasma an die beiden Proteine bindet oder erst im Kern, ist noch nicht abschließend geklärt. Es wurde zwar in beiden Kompartimenten gefunden, allerdings scheint seine Lokalisation überwiegend im Kern zu liegen (Ali et al. 2012). Das LBP100-Modul der Proteine FANCL, FANCB und FAAP100 wird gänzlich im Zytoplasma ausgebildet und durch FANCM und FANCA in den Nukleus transportiert (Medhurst et al. 2006, Ling et al. 2007). AGP20 und LBP100 können sich nun an CEF anlagern, sodass der FA-Kernkomplex vollständig am Schadensort vorhanden ist (Huang et al. 2014). Dabei liegt der Subkomplex LBP100 als

symmetrisches Homodimer vor (Swuec et al. 2017). Es wird je ein CEF-Komplex an FANCL gebunden, sodass auch eine Symmetrie von LBP100-CEF gegeben ist. Ob AGP20 ebenfalls in zweifacher Ausführung an den LBP100 Komplex bindet, ist noch ungeklärt (Swuec et al. 2017, van Twest et al. 2017). Damit die Monoubiquitinierung des ID2-Komplexes stattfinden kann, muss der FA-Kernkomplex in seiner Gesamtheit vorliegen und das E2-konjugierende Enzym FANCT, welches unabhängig zum Chromatin rekrutiert wird, mit FANCL eine physische Bindung eingehen (Machida et al. 2006, Alpi et al. 2007, Longerich et al. 2009).

Der Monoubiquitinierungsprozess von FANCD2 und FANCI ist gegenseitig voneinander abhängig und kann erst erfolgen, wenn der ID2-Komplex – durch die FANCD2-Tower-Domäne vermittelt – an die DNA gebunden hat. Hier kommt es durch CEF zur Konformationsänderung des Komplexes, wodurch er stabilisiert wird. (Sato et al. 2012, Liang et al. 2016, Swuec et al. 2017) Es wird je ein Ubiquitinmolekül auf das Lysin 561 von FANCD2 bzw. auf das Lysin 523 von FANCI übertragen (Garcia-Higuera et al. 2001, Longerich et al. 2009).

Durch das modifizierte FANCD2 wird die Nuklease SLX4/FANCP rekrutiert, welche anschließend wiederum SLX1 sowie die Heterodimere XPF/FANCD1 und MUS81-EME1 rekrutiert (Munoz et al. 2009, Klein Douwel et al. 2014). FANCD1 schneidet nun auf einer Seite des ICLs, welcher die beiden DNA-Stränge kovalent und irreversibel verknüpft. Lange ging man davon aus, dass abhängig davon der zweite Einschnitt entweder auch durch FANCD1 oder durch eine bisher nicht genau identifizierte Endonuklease erfolgt (Klein Douwel et al. 2014). Eine neue Veröffentlichung jedoch zeigt, dass nach dem ersten Einschnitt durch FANCD1 die Exonuklease SNM1A rekrutiert wird, die den DNA-Strang über den ICL hinweg verdaut (Abdullah et al. 2017). Daraufhin wird der ICL nach außen geklappt, sodass nun ein DNA-Strang mit einem Einzelstrangbruch und der Läsion sowie ein Strang mit einem Doppelstrangbruch (DSB) vorliegen.

Die Entfernung des ICLs und die anschließende Reparatur erfolgen nun über eine Kombination der Transläsionssynthese (TLS), der Homologen Rekombination (HR) und der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER).

Gegenüber der vernetzten Base wird ein Nukleotid inseriert und der Leitstrang kann durch REV1-Polymerase  $\zeta$  über die Läsion hinweg verlängert werden (Raschle et al. 2008). Die katalytische Untereinheit der Polymerase  $\zeta$ , welche mit REV1 assoziiert, besteht dabei aus REV3 und REV7/FANCV. 2015 konnte gezeigt werden, dass für die Rekrutierung von REV1-Polymerase  $\zeta$  der FA-Kernkomplex eine größere Rolle innezuhaben scheint als ubiquitiniertes PCNA (Budzowska et al. 2015). Der neue, durch die Transläsionssynthese (TLS) entstandene Strang kann nun als Matrize für die HR verwendet werden. In diesem Mechanismus, der unter Abschnitt 1. 5 beschrieben wird, sind die restlichen FA-Gene involviert. Die Entfernung des ICLs wird anschließend über den NER-Signalweg (Abschnitt 1. 4) vermittelt. Als letzter Schritt erfolgt durch

USP1-UAF1 die Deubiquitinierung des ID2-Komplexes (Cohn et al. 2007), woraufhin die beteiligten Proteine von der ehemaligen Schadensstelle entlassen werden.

#### 1.4 Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)

Die Hauptaufgabe der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) (Abbildung 5) besteht darin, DNA-Läsionen zu entfernen, welche durch UV-Licht entstanden sind. Dies sind vor allem Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) und 6-4-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukte (6-4PPs). Zudem beseitigt der Reparaturmechanismus ICLs oder durch reaktive Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species*, ROS) induzierte Cyclopurine (Marteijn et al. 2014, Lefkofsky et al. 2015). Bei der Entfernung von ICLs ist er vor allem in der G1-Phase des Zellzyklus aktiv, wenn die Chromosomen nur als einzelne Chromatiden vorliegen (Sarkar et al. 2006). So kann dieser Mechanismus ein sehr breites Spektrum an DNA-Schäden reparieren und ist mit vielen anderen Signalwegen verknüpft wie beispielsweise dem FA/BRCA-Netzwerk.

Mutationen in Genen, die an der NER beteiligt sind, können Krankheiten wie z. B. das Cockayne-Syndrom oder Xeroderma Pigmentosum auslösen (Marteijn et al. 2014). Den Patienten ist vor allem eine Hypersensitivität gegenüber UV-Strahlen gemeinsam.

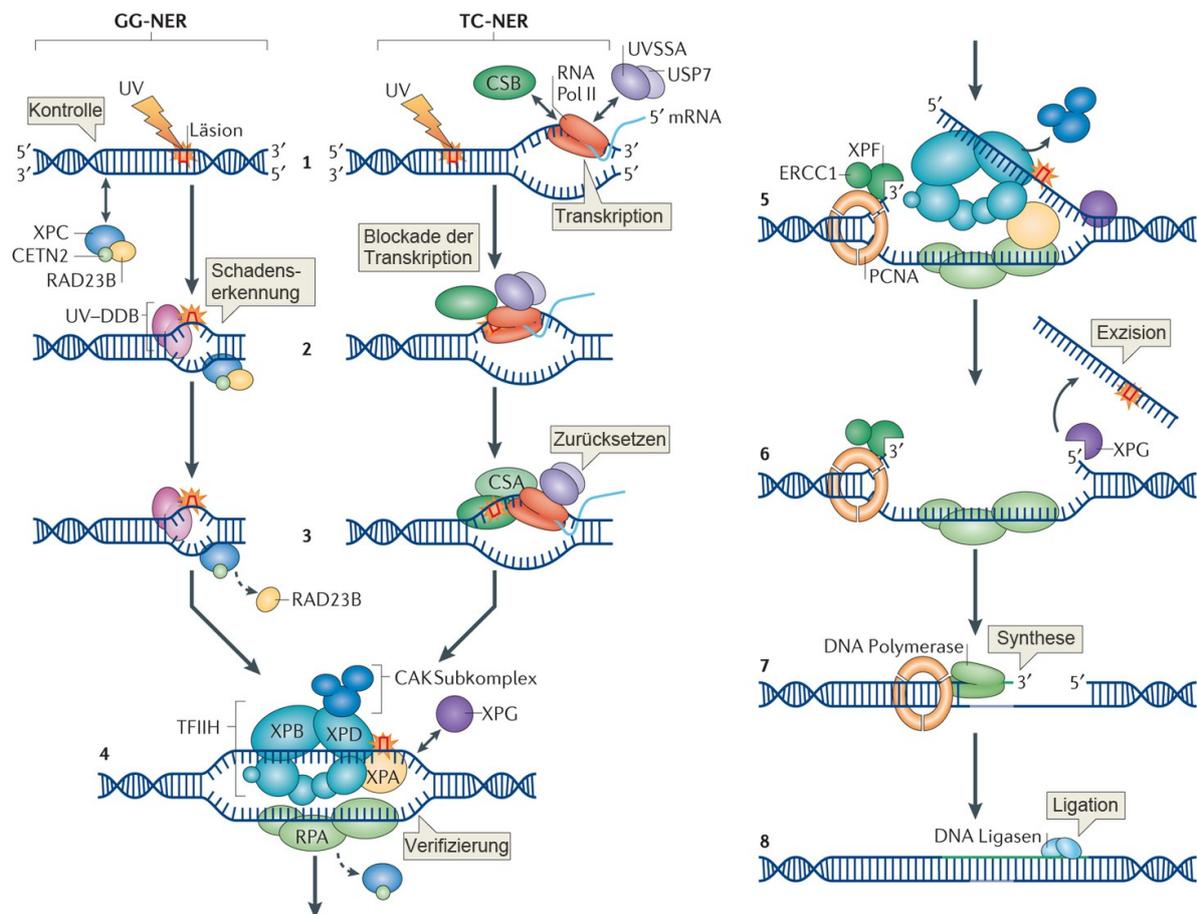
Die NER-Schadenserkenkung kann über zwei unterschiedliche Mechanismen ablaufen, den Globalen Genom-NER-Signalweg (GG-NER) oder den Transkriptions-gekoppelten-NER-Signalweg (TC-NER). Anders als der GG-NER, der für die Schadenserkenkung im gesamten Genom verantwortlich ist, kommt der TC-NER-Signalweg nur bei der Transkription zum Einsatz (Sugasawa et al. 1998, Lefkofsky et al. 2015).

Beim GG-NER wird der Schaden durch die Xeroderma pigmentosum Gruppe C (XPC), welche mit RAD23B und Centrin 2 (CETN2) im Komplex vorliegt, erkannt (Sugasawa et al. 1998, Nishi et al. 2005). Diese Proteine können dabei vom UV-DDB-Komplex (DDB1, DDB2) unterstützt werden (Moser et al. 2005). Nachdem sich der XPC-Komplex an die DNA angelagert hat, löst sich RAD23B ab (Bergink et al. 2012).

Dagegen wird der TC-NER-Signalweg aktiviert, sobald die RNA Polymerase II, welche mit UVSSA, USP7 und CSB interagiert, während der Elongation auf einen DNA-Schaden trifft und durch ihn blockiert wird. Dadurch erhöht sich die Affinität von CSB für die RNA Polymerase II und es wird ein Komplex mit CSA geformt (Fei & Chen 2012, Schwertman et al. 2012). Damit nun die Reparaturmaschinerie an den Schaden andocken kann, ist es nötig, dass die RNA Polymerase II den Schaden frei gibt. Dies kann entweder durch Zurücksetzen oder durch Ablösen der Polymerase geschehen (Borukhov et al. 1993, Fousteri et al. 2006).

Nach der unterschiedlichen Schadenserkenkung folgt ein gemeinsamer Reparaturweg. Abhängig von XPC-RAD23B im GG-NER bzw. CSB im TC-NER lagern sich der Transkriptions-Initiationsfaktor IIIH (TFIIH)-Komplex – zusammengesetzt aus XPB/ERCC3, XPD/ERCC2, CAK-Subkomplex u. a. – und XPA an die Läsion an (Araujo et al. 2000, Volker et al. 2001, Fousteri

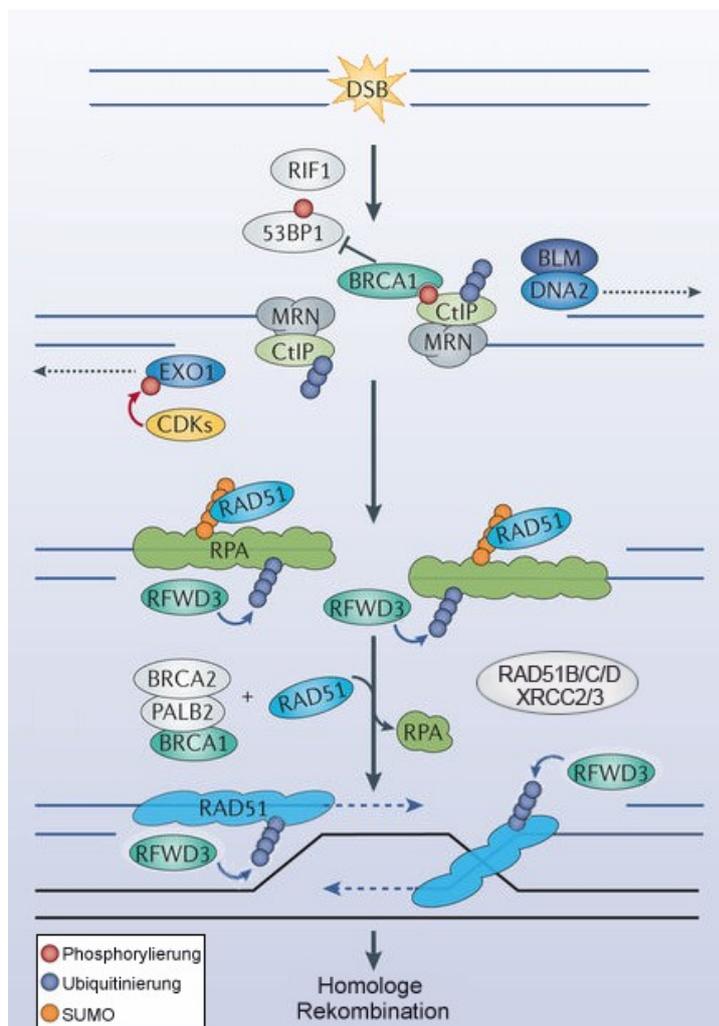
et al. 2006). Durch die zwei Helikasen XPB und XPD kann die Helix geöffnet werden (Laine et al. 2006). An den unbeschädigten DNA-Strang bindet RPA und an die NER-Maschinerie XPG. Durch XPA wird der CAK-Subkomplex entlassen und die strukturspezifische Endonuklease XPF/ERCC4-ERCC1 rekrutiert, welche den beschädigten DNA-Strang 5' zur Läsion schneidet (Coin et al. 2008, Staresincic et al. 2009). Nach Aktivierung von XPG schneidet diese Endonuklease auf der 3'-Seite des Schadens, sodass der Schaden zusammen mit etwa 22-30 Nukleotiden aus der Helix entfernt werden kann. Bereits während des 5'-Einschnittes hat sich ein Ring aus drei PCNA-Molekülen an die DNA angelagert (Staresincic et al. 2009). Anschließend katalysieren die DNA Polymerasen  $\delta$ ,  $\kappa$  oder  $\epsilon$  mithilfe von PCNA, RFC und RPA die Neusynthese des DNA-Strangs, dessen Enden schließlich durch die DNA-Ligase 1 oder 3 verbunden werden (Araujo et al. 2000, Moser et al. 2007, Ogi et al. 2010).



**Abbildung 5: Nukleotid-Exzisions-Reparatur.** Der Reparaturmechanismus gliedert sich für die Schadenserkennung zunächst in den Globalen Genom-NER-Signalweg (GG-NER) und den Transkriptionsgekoppelten-NER-Signalweg (TC-NER) auf. Die Reparatur erfolgt anschließend über einen gemeinsamen Weg. Die Läsion wird durch die Nukleasen XPF-ERCC1 und XPG herausgeschnitten und die entstandene Lücke durch DNA Polymerasen und Ligasen geschlossen. *Veränderter Nachdruck von (Martijn et al. 2014) mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.*

## 1.5 Reparatur durch Homologe Rekombination

Durch Homologe Rekombination können beispielsweise DSBs in der DNA fehlerfrei repariert werden (Abbildung 6). Da hierfür ein homologes Reparatur-Template vorliegen muss, ist der Mechanismus vorwiegend in der S- und G2-Phase aktiv, nachdem die Verdoppelung der Chromosomen stattfand.



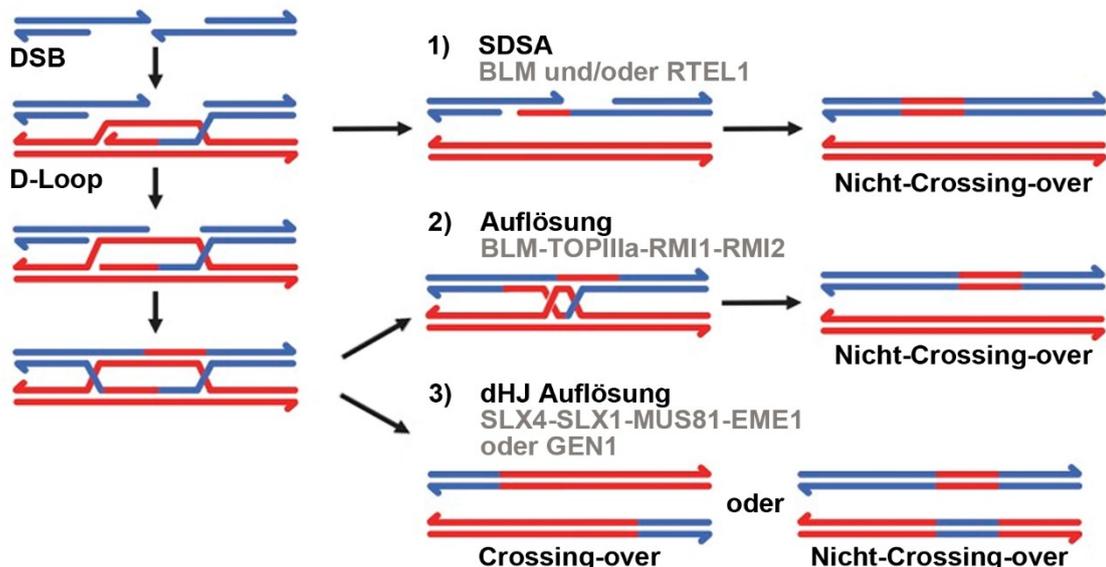
**Abbildung 6: Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) durch Homologe Rekombination.** Durch MRN und CtIP werden die freien 5'-DNA-Enden zunächst etwas und durch BLM-DNA2 bzw. BLM-EXO1 weiter abgebaut, sodass 3'-Überhänge entstehen. Diese Resektion ist notwendig, damit eine Reparatur über die Homologe Rekombination ablaufen kann. Die freien Enden werden durch RPA geschützt, welches von RFWD3/FANCD1 ubiquitiniert wird. Schließlich verdrängt RAD51 mithilfe von BRCA2/FANCD1-PALB2/FANCD1-BrCA1/FANCS und seinen Paralogen RAD51B, RAD51C/FANCO, RAD51D, XRCC2 und XRCC3 RPA von der einzelsträngigen DNA, indem es dort Nukleoproteinfilamente ausbildet. So kann ein Strang-austausch mit dem homologen Schwesterchromatid erfolgen und die Homologe Rekombination stattfinden. *Veränderter Nachdruck von (Schwertman et al. 2016) mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.*

BRCA1/FANCS, der MRN-Komplex – bestehend aus den Proteinen MRE11, RAD50 und NBS1 – und CtIP bilden eine Einheit, die an die Enden der DSBs binden können (Chen et al. 2008). Durch die Bindung des MRN-Komplexes wird ATM aktiviert, was zur Phosphorylierung zahlreicher Substrate führt. Ein Substrat ist CtIP, welches zuvor bereits durch Cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) phosphoryliert wurde (Wang et al. 2013b). Nun können der MRN-Komplex und CtIP die 5'-DNA-Enden resezeieren, sodass 3'-Überhänge entstehen (Anand et al. 2016). Durch phosphoryliertes CtIP wird weiterhin BLM-DNA2 oder BLM-EXO1 rekrutiert, welche die 5'-Überhänge noch zusätzlich verkürzen (Nimonkar et al. 2011). Diese werden durch RPA geschützt.

Über einen alternativen Weg, dem *single strand DNA annealing* (SSA), kann hier bereits eine Verknüpfung der DNA-Enden erfolgen. Bei diesem RAD51-unabhängigen Prozess sind vermutlich die Proteine RAD52 und XPF-ERCC1 sowie XRCC2, RAD51B und RAD51D involviert (Motycka et al. 2004, Serra et al. 2013).

Zwischen RPA und RAD51 wird durch den Komplex BRCA1/FANCS-BRCA2/FANCD1-PALB2/FANCN eine Interaktion vermittelt, wodurch RAD51/FANCR RPA von den DNA-Einzelsträngen verdrängt und dort Nukleoproteinfilamente ausbildet (Sy et al. 2009, Ma et al. 2017). Diese Anlagerung ist zusätzlich abhängig von den RAD51-Paralogen RAD51B, RAD51C/FANCO, RAD51D, XRCC2/FANCU und XRCC3. In für diese Proteine defiziente Zellen können keine oder nur in reduzierter Menge RAD51-Foci gebildet werden (Takata et al. 2000, Takata et al. 2001). Im Gegensatz dazu ist in FANCI-defizienten Zellen eine RAD51-Foci-Bildung nachweisbar (Litman et al. 2005). Es wird vermutet, dass die Helikase BRIP1/BACH1/FANCI, welche unter anderem mit FANCS, FANCD2 und BLM Proteininteraktionen eingeht, an der Entfernung der RAD51-Filamente beteiligt ist, damit die HR abgeschlossen werden kann (Sommers et al. 2009, Raghunandan et al. 2015). Ebenso werden in RFW3/FANCD3-Patientenzellen RAD51-Foci gebildet (Knies et al. 2017). RFW3 polyubiquitiniert als eine E3-Ligase RAD51, aber auch RPA, was vermutlich zur Ablösung und anschließenden Degradierung dieser beiden Proteine führt (Inano et al. 2017).

Zuvor allerdings katalysiert RAD51 die Suche nach homologen Sequenzen und die Anlagerung an das Schwesterchromatid, sodass ein Strangaustausch eingeleitet werden kann (Long et al. 2011).

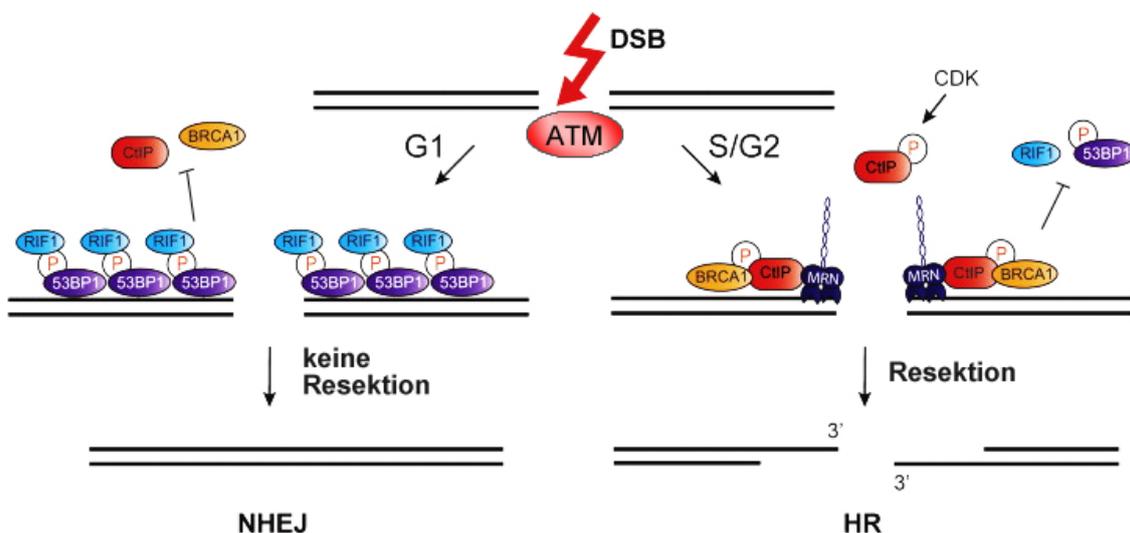


**Abbildung 7: Homologe Rekombination.** Nach einem Doppelstrangbruch (DSB) wird durch RAD51 ein Strangaustausch mit dem Schwesterchromatid vermittelt, sodass eine D-Loop-Struktur entsteht. Diese kann durch *synthesis-dependent strand annealing* (SDSA) – vermutlich mit Hilfe von BLM und/oder RTEL1 – aufgelöst werden (1). Dagegen werden doppelte Holliday-Junction-Strukturen (dHJ) über BLM-TOPIIIα-RMI1-RMI2 gelöst (2). Hier entstehen, wie bei SDSA auch, nur Nicht-Crossing-over-Produkte. Eine weitere Möglichkeit, dHJs zu lösen, besteht über die Proteine SLX4-SLX1-MUS81-EME1 oder GEN1. Hier können sich sowohl Crossing-over- als auch nicht-Crossing-over-Produkte bilden (3). *Veränderter Nachdruck von (Zapotoczny & Sekelsky 2017) (CC BY 4.0).*

Hierbei entsteht ein sogenannter *D-Loop* (*displacement loop*), der direkt über *synthesis-dependent strand annealing* (SDSA) ohne Crossing-over aufgelöst werden kann (Abbildung 7). Als beteiligte Proteine werden RTEL1 und BLM diskutiert (Zapotoczny & Sekelsky 2017). Aus einem *D-Loop* bilden sich allerdings meistens einfache sowie doppelte Holliday-Junction-Strukturen (dHJ). HJ und dHJ werden entweder durch SLX4-SLX1-MUS81-EME1 oder durch GEN1 aufgelöst, wobei bei beiden Mechanismen sowohl Crossing-over- als auch nicht-Crossing-over-Produkte entstehen können. Eine weitere Auflösungsmöglichkeit von dHJ besteht mithilfe von BLM-TOPIII $\alpha$ -RMI1-RMI2. Hieraus resultieren nur Nicht-Crossing-over-Produkte (Garner et al. 2013).

## 1.6 Weitere Reparaturmechanismen von DNA-Doppelstrangbrüchen

Alternativ zur fehlerfreien HRR können DSBs auch über das *Non-homologous end joinings* (NHEJ) oder das alternative *end joining* (alt-EJ) repariert werden. Diese Mechanismen sind jedoch fehlerbehaftet, sodass Insertionen, Deletionen oder andere Mutationsarten entstehen können (Ceccaldi et al. 2016). Beide Reparaturwege sind während des gesamten Zellzyklus aktiv, wobei das NHEJ in der G1-Phase dominiert. Die Wahl des DSB-Reparaturweges ist abhängig von der Zellzyklusphase bzw. den CDK/Cyclin-Komplexen. Diese steuern durch Phosphorylierungsprozesse die Einzelstrangresektion der DNA-Enden (Abbildung 8), wodurch die HR oder das alt-EJ angeschaltet wird (Ceccaldi et al. 2016).



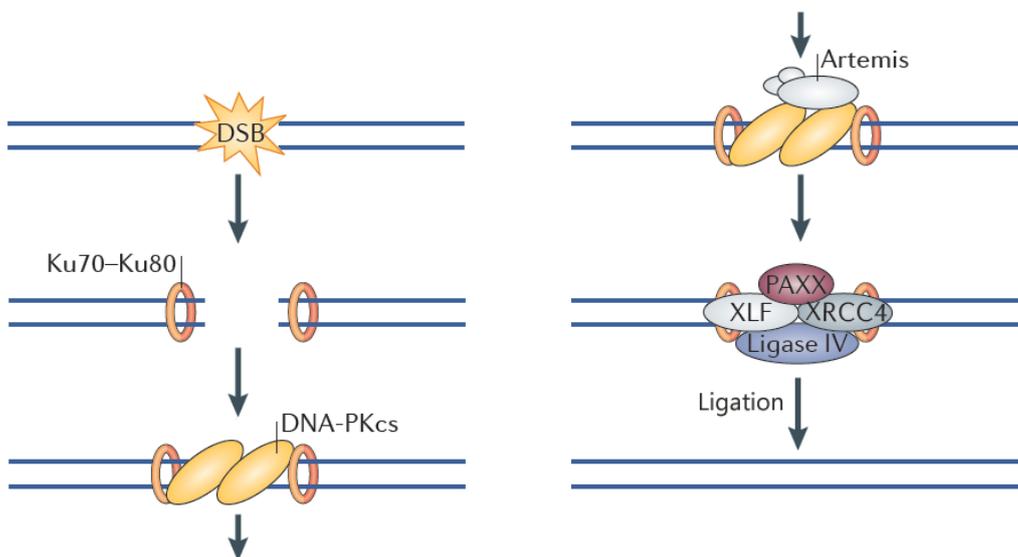
**Abbildung 8: Wahl zwischen dem NHEJ- und dem HR-Reparaturweg.** Während der G1-Phase wird, abhängig von ATM-vermittelten Phosphorylierungen, die Einzelstrangresektion der freien DNA-Enden durch 53BP1 und RIF1 unterdrückt, indem diese die Aktivität von BRCA1/FANCS und CtIP blockieren. Da keine Modifizierung der DNA-Enden stattfindet, wird der Schaden über *Non-homologous end joining* (NHEJ) repariert. Im Gegensatz dazu läuft die Reparatur in der S/G2-Phase über Homologe Rekombination (HR) ab. Hierfür ist eine durch BRCA1/FANCS, den MRN-Komplex und CtIP vermittelte Resektion der 5'-DNA-Enden nötig, sodass 3'-Überhänge entstehen. Werden die 5'-Enden anschließend noch weiter reseziert, erfolgt die Reparatur über HR. *Veränderter Nachdruck von (Daley & Sung 2013) mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.*

Findet keine Resektion statt, kommt es zur Reparatur durch das NHEJ. Im Allgemeinen wird die Einzelstrangresektion durch BRCA1/FANCS und CtIP eingeleitet, welche beim NHEJ durch Ku70-Ku80 (Ku) sowie durch 53BP1-RIF1 blockiert wird (Mansour et al. 2010, Bakr et al. 2016). Zusätzlich wird PTIP rekrutiert. Dieses kann mit Artemis eine Bindung eingehen, welches weiterhin die Resektion verhindert (Wang et al. 2014). Als ein weiterer Gegenspieler der DNA-Resektion wurde 2015 REV7/FANCV beschrieben (Xu et al. 2015).

Im Gegensatz dazu blockieren bei der Reparatur über HR der MRN-Komplex und CtIP das Heterodimer Ku und BRCA1/FANCS sorgt dafür, dass 53BP1 dephosphoryliert wird, wodurch RIF1 von den DSBs entfernt werden kann (Mimitou & Symington 2010, Isono et al. 2017). So kann die erste Modifizierung der DNA-Enden erfolgen. Für die weitere Resektion durch BLM-DNA2 oder BLM-EXO1 gibt es mit HELB wiederum einen Gegenspieler (Tkac et al. 2016). Dieses Protein scheint jedoch nicht für die Entscheidung „HR oder NHEJ“ zuständig zu sein, sondern vielmehr für eine regulierende Beschränkung der Einzelstrangresektion, welche schließlich zum alt-EJ-Reparaturweg führen kann (Bakr et al. 2016).

### 1. 6. 1 Non-homologous end joining

Der initiale Schritt des *Non-homologous end joinings* (NHEJ) (Abbildung 9) ist die Erkennung und Bindung des DSBs durch Ku, einem Heterodimer aus den Untereinheiten Ku70/XRCC6 und Ku80/XRCC5, welche sich als Ringstruktur um die DNA-Enden des DSBs legen (Walker et al. 2001).



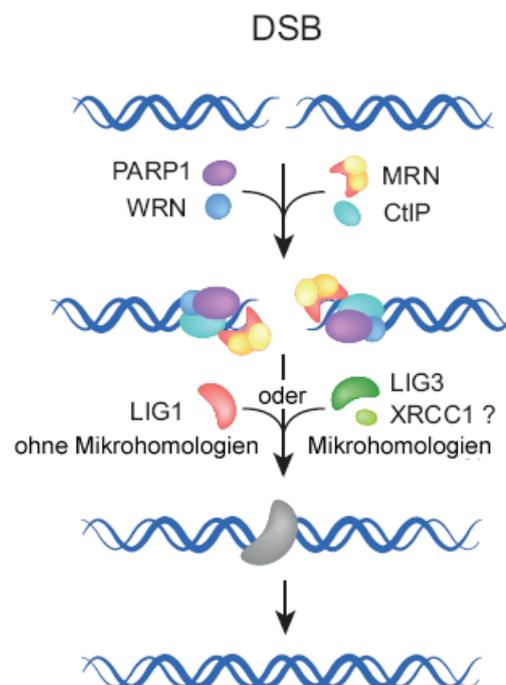
**Abbildung 9: Reparatur über *Non-homologous end joining*.** An Ku (Ku70-Ku80), welches DSBs erkennt und bindet, lagert sich DNA-PKcs an. Durch Autophosphorylierung rekrutiert dieses Artemis, welches DNA-Überhänge entfernt. Ebenso wird der XRCC4-Ligase IV-Komplex und XLF rekrutiert, welche zusammen mit PAXX die glatten DNA-Enden ligieren. *Veränderter Nachdruck von (Schwertman et al. 2016) mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.*

Durch Ku80 wird die DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) zum Schadensort rekrutiert (Gell & Jackson 1999). Falls am DSB DNA-Überhänge vorhanden sind, wird durch einen Autophosphorylierungsprozess von DNA-PKcs die Nuklease Artemis rekrutiert, welche die

Überhänge entfernt (Goodarzi et al. 2006). Durch weitere Phosphorylierungsereignisse bindet der XRCC4-Ligase IV-Komplex, welcher zusätzlich mit XLF interagiert, an Ku-PKcs (Critchlow et al. 1997, Ahnesorg et al. 2006). Zusammen mit PAXX, welches mit Ku interagiert, kommt es nun zur Ligation der glatten DNA-Enden (Ochi et al. 2015).

### 1. 6. 2 Alternatives end joining

Sowohl für das NHEJ als auch für die HR gibt es einen Backupmechanismus, das sogenannte alternative *end joining* (alt-EJ) (Abbildung 10). Zunächst findet eine Resektion der DNA-Enden durch den MRN-Komplex und CtIP statt. Anders als bei der Reparatur über die HR werden die 5'-Enden nicht zusätzlich abgebaut. Vermutlich ist dies auf einen defekten NHEJ- oder HR-Weg zurückzuführen, sodass keine Unterdrückung der Resektion, aber auch keine weitere Modifizierung der Enden erfolgen kann. Dies scheint zudem durch den Negativ-Regulator HELB ausgelöst zu werden (Bakr et al. 2016). Weiterhin haben verschiedene Studien gezeigt, dass die Proteine PARP1, WRN, XRCC1 und die Ligasen I oder III in dem Reparaturweg involviert sind (Wang et al. 2006, Liang et al. 2008, Sallmyr et al. 2008). Obwohl 1996 bereits beschrieben wurde, dass kurze homologe Enden für ein alternatives *end joining* nicht zwanghaft vorhanden sein müssen, sondern auch fehlen können, ging man lange nur von einer Variante der alternativen Reparatur aus (Mason et al. 1996). 2011 konnte allerdings von Simsek et al. gezeigt werden, dass bei vorhandenen Mikrohomologien am DSB die Ligase III (*microhomology-mediated end joining*, MMEJ) und ohne Sequenzhomologien die Ligase I genutzt wird (Simsek et al. 2011).



**Abbildung 10: Alternatives end joining (alt-EJ).** Durch MRN und CtIP werden kurze 3'-Überhänge geschaffen und es lagern sich die Proteine PARP1 und WRN an. Liegen keine Mikrohomologien vor, erfolgt die Ligation über die Ligase I (LIG1). Sind kurze Homologien vorhanden, verknüpft die Ligase III (LIG3) die freien DNA-Enden. *Veränderter Nachdruck von (Dueva & Iliakis 2013) mit freundlicher Genehmigung der Pioneer Bioscience Publishing Company; Genehmigung übertragen durch das Copyrights Clearance Center, Inc.*

## 1.7 FA-Mausmodelle

Mausmodelle spielen bei der Charakterisierung vieler Krankheiten eine große Rolle. Ebenso wie der Mensch ist die Maus ein Säugetier und somit zeigen beide Spezies unter anderem in der Entwicklung, dem Körperbau und der Physiologie Ähnlichkeiten. Zudem existieren für fast alle humanen Gene Orthologe bei Mäusen, was eine gute Grundlage für *in vivo* Untersuchungen darstellt. Ausgewählte Gene lassen sich relativ leicht und zielgerichtet verändern und darüber hinaus sind Mäuse aufgrund ihrer kleinen Größe sowie ihrer kurzen Generationszeit (Tragzeit 19-21 Tage, 10-12 Nachkommen pro Wurf) einfach und kostengünstig zu halten. (Suckow et al. 2001, Austin et al. 2004)

Mittlerweile sind für alle FA-Gene FA-Knockout-Mäuse verfügbar. *Fanci*<sup>-/-</sup>- sowie *Fanct*<sup>-/-</sup>-Mäuse werden allerdings nur in der Datenbank des International Mouse Phenotyping Consortiums (IMPC) aufgeführt. Tabelle 2 zeigt eine Zusammenfassung der Tiere und gibt die Referenz der Erstbeschreibung an. Im Vergleich zum Menschen ist der murine Phänotyp in der Regel schwächer ausgeprägt. So können nur bei wenigen Untergruppen Entwicklungsanomalien, Krebsprädisposition und das FA-charakteristische Merkmal der Anämie beobachtet werden. Murine embryonale Letalität trat nur für Knockouts der *downstream*-Gene *Fancl1*, *Fancn*, *Fanco*, *Fancr*, *Fancs* und *Fancu* auf (Tabelle 2). Dabei wurden mit Ausnahme von *Fancr* die Gene in den Mäusen auch konditional ausgeknockt (Jonkers et al. 2001, Ludwig et al. 2001, Orii et al. 2006, Kuznetsov et al. 2007, Drost et al. 2011, Bowman-Colin et al. 2013). So war sichergestellt, dass die Letalität nicht nur auf einen konstitutionellen Knockout zurückzuführen war. Des Weiteren geht man davon aus, dass bei der Phänotyp-Ausprägung der genetische Hintergrund eine wesentliche Rolle spielt. Beispielsweise konnte nach Ausschalten von *Fancl* ebenfalls keine Lebensfähigkeit festgestellt werden, allerdings nur wenn die erzeugte Knockout-Maus von einem reinen 129/Sv oder einem gekreuztem 129/Sv \* C57BL/6 F1 Hintergrund abstammte (Agoulnik et al. 2002). Bei *Fancl2*<sup>-/-</sup>-Mäusen gab es nur geringe Abweichungen der Genotypenverteilung von der Mendelschen Vererbungsregel, sofern sie vom genetischen 129S4/SvJae-Hintergrund abstammten. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse aus einem C57BL/6J-Stamm signifikante Abweichungen von den erwarteten 25 % für homozygote Knockout-Tiere. Tiere mit diesem genetischen Hintergrund wiesen außerdem Mikrophthalmie auf, welche bei *Fancl2*<sup>-/-</sup>-Mäusen aus anderen Stämmen in dieser Studie nicht auftrat. Es wird vermutet, dass solche Unterschiede auf *Modifier*-Gene in einem dieser Mausstämmen zurückzuführen sind, die die Penetranz der Phänotypen beeinflussen können (Houghtaling et al. 2003).

Gemeinsam ist fast allen FA-Knockout-Mäusen, dass sie aufgrund von Fehlbildungen in den Gonaden eine reduzierte Fertilität aufweisen bzw. infertil sind. Zudem reagieren murine embryonale Fibroblasten (MEFs) der Knockout-Mäuse, ähnlich wie humane FA-Zelllinien, sensitiv gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen, was sich in einem G2-Phase-Arrest, einer erhöhten Chromosomenbrüchigkeit sowie einer reduzierten Überlebensfähigkeit widerspiegelt.

Tabelle 2: Übersicht der FA-Knockout-Mauslinien.

FA-Gen	Mausstamm	FA-typischer Phänotyp	Referenz
<i>Fanca</i>	129P2/OlaHsd * FVB	HG, RF, geringe hämatologische Abweichungen	(Cheng et al. 2000)
	129P2/OlaHsd * FVB (Maus von Cheng et al.)	RF, Thrombozytopenie	(Pawlikowska et al. 2014)
	C57BL/6, 129S6/SvEvTac, 129S6/SvEvTac * CD-1	<b>C57BL/6:</b> HG, IF, WR, Mikrophthalmie, kraniofasziale Fehlbildungen <b>129S6/SvEvTac</b> bzw. <b>129S6/SvEvTac * CD-1:</b> Tumorbildung	(Wong et al. 2003)
<i>Fancb</i>	C57BL/6J-Fancb <sup>em1Shnk</sup>	testikuläre Atrophie, IF, WR, reduzierte Anzahl hämatopoetischer Stammzellen	(Du et al. 2015, Kato et al. 2015)
<i>Fancc</i>	129S4/SvJaeSor * C57BL/6	HG, RF, hämatologische Abweichungen	(Whitney et al. 1996)
	129S1/Sv * 129X1/SvJ * C57BL/6J	HG, RF	(Chen et al. 1996)
	C57BL/6 C57BL/6Ly-Pep3b	Mikrophthalmie <b>C57BL/6:</b> Tumorbildung	(Carreau 2004)
	C57BL/6J (2-Jahresstudie)	verkürzte Lebensspanne, Lymphome, AML, ALL, hämatologische und solide Tumorbildung	(Cerabona et al. 2016)
<i>Fancd1</i>	129S/SvEv * C57BL/6	embryonal letal, WR, Entwicklungsverzögerung	(Ludwig et al. 1997)
	129S2/SvPas * C57BL/10, 129S2/SvPas * C57BL/6 * DBA/2	z. T. lebensfähig, WR, HG, IF, Skelettanomalie, Thymuslymphom	(Connor et al. 1997)
	129P2/OlaHsd * C57BL/6N	lebensfähig, fertil, Tumorbildung	(McAllister et al. 2002)
	129P2/OlaHsd * C57BL/6N, 129P2/OlaHsd * BALB/c (Maus von McAllister et al.)	Leukopenie, Anämie, Thrombozytopenie	(Navarro et al. 2006)
<i>Fancd2</i>	129S4/SvJae-Fancd2 <sup>tm1Hou</sup> , B6.129S4-Fancd2 <sup>tm1Hou</sup> , 129S4/SvJae * C57BL/6J	Allgemein: HG, IF, WR <b>129S4/SvJae * C57BL/6J</b> und <b>129S4/SvJae:</b> Tumorbildung <b>C57BL/6J:</b> perinatale Letalität, Mikrophthalmie	(Houghtaling et al. 2003)
<i>Fance</i>	FVB/N	HG, RF, WR	(Fu et al. 2016a, Fu et al. 2016b)
<i>Fancf</i>	129P2/OlaHsd * FVB	verkürzte Lebensspanne, HG, IF, Tumorbildung	(Bakker et al. 2012)
<i>Fancg</i>	129S4/SvJae * C57BL/6	HG, RF	(Yang et al. 2001)
<i>Fanci</i>	C57BL/6N	z. T. embryonal letal	IMPC, MGI:2384790
<i>Fancj</i>	129P2/OlaHsd	HG, RF, Fettleber, Tumorbildung	(Matsuzaki et al. 2015)

FA-Gen	Mausstamm	FA-typischer Phänotyp	Referenz
<i>Fancl</i>	C57BL/6J * CBA/J, C57BL/6 * FVB, 129/Sv * C57BL/6, 129/Sv-Fancl <sup>tm1Ceb</sup>	Allgemein: HG, IF, WR <b>129/Sv und 129/Sv * C57BL/6: embryonal letal</b>	(Agoulnik et al. 2002)
<i>Fancm</i>	C57BL/6 * FVB	verkürzte Lebensspanne, HG, RF, weniger Weibchen, Tumorbildung	(Bakker et al. 2009)
<i>Fancn</i>	129P2/OlaHsd * C57BL/6N	embryonal letal, WR, Entwicklungsanomalien	(Rantakari et al. 2010)
<i>Fanco</i>	129/Sv * C57BL/6J * FVB/N	embryonal letal <i>Fanco</i> <sup>neo/neo</sup> : IF <i>Fanco</i> <sup>neo/ko</sup> : F1-Generation Entwicklungsanomalien	(Kuznetsov et al. 2007)
<i>Fancp</i>	C57BL/6N-Slx4 <sup>tm1a</sup> (EUCOMM) <sup>Wtsi</sup>	z. T. embryonal letal, RF/IF, WR, Entwicklungsanomalien, Hydrozephalus, Mikrophthalmie, Leukopenie, Thrombozytopenie,	(Crossan et al. 2011)
	C57BL/6N-Slx4 <sup>tm1a</sup> (EUCOMM) <sup>Wtsi</sup> (Maus von Crossan et al.; 2-Jahresstudie)	Tumorbildung, reduzierte Anzahl hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen	(Hodskinson et al. 2014)
<i>Fancq</i>	129S6/SvEvTac (Mausmodell für Xeroderma pigmentosum)	reduzierte Lebensspanne, WR, vergrößerte Leberzellkerne, kleinere Organe	(Tian et al. 2004)
<i>Fancr</i>	129S7/SvEvBrd * C57BL/6	embryonal letal, WR, Entwicklungsanomalien	(Lim & Hasty 1996)
<i>Fancs</i>	129P2/OlaHsd * C57BL/6 * DBA/2	embryonal letal, WR, Entwicklungsanomalien	(Gowen et al. 1996)
	129S/SvEv * C57BL/6	meist embryonal letal, IF (Männchen), WR, Entwicklungsanomalien, Skelettanomalien, Pigmentierungsauffälligkeiten, Tumorbildung	(Ludwig et al. 2001)
<i>Fanct</i>	C57BL/6N C57BL/6NTac	nicht angegeben	IMPC, MGI:1914446
<i>Fancu</i>	129S/SvEv * C57BL/6	embryonal letal, WR, Entwicklungsanomalien	(Deans et al. 2000)
<i>Fancv</i>	129 * C57BL/6J	z. T. embryonal letal, HG, IF, WR	(Watanabe et al. 2013)
<i>Fancw</i>	C57BL/6	z. T. embryonal letal, reduzierte Lebensspanne, HG, RF	(Knies et al. 2017)

HG: Hypogonadismus, IF: infertil, RF: reduzierte Fertilität, WR: Wachstumsretardierung, \*: gekreuzte Stämme, IMPC: International Mouse Phenotyping Consortium (<http://www.mousephenotype.org/>)

## 1. 8 Fanconi-Anämie assoziiertes Protein 100 kDa

Das Fanconi-Anämie assoziierte Protein mit einer Größe von etwa 100 kDa (FAAP100) konnte zum ersten Mal durch eine FANCA-Aufreinigung nachgewiesen werden (Meetei et al. 2003b). Eine genauere Charakterisierung ergab, dass FAAP100 einen festen Bestandteil des FA-Kernkomplexes darstellt und für dessen Stabilität mitverantwortlich ist (Ling et al. 2007). Das Protein ist, ähnlich wie die meisten der Kernkomplexproteine, in Vertebraten, nicht aber in Invertebraten und Hefen konserviert, was auf eine zeitgleiche Entstehung der Kernkomplexproteine während der Evolution schließen lässt (Ling et al. 2007). Innerhalb des FA-Kernkomplexes setzen sich jeweils zwei FAAP100-, FANCB- und FANCL-Proteine zu einem Subkomplex zusammen (Swuec et al. 2017). Dabei liegen zwei FANCB-Kopien im Zentrum und bilden zusammen mit zwei FAAP100-Proteinen das Gerüst für die exakte Positionierung und damit für die richtige Funktionsfähigkeit von FANCL. Die Interaktion zwischen FAAP100 und FANCB erfolgt direkt über vier Cross-Links (Inter-Links). Zwischen FAAP100 und FANCL konnten keine Inter-Links nachgewiesen werden, sodass eine Interaktion nur über FANCB aufgebaut werden kann (Ling et al. 2007, Swuec et al. 2017). Zudem wurde als mögliche FANCB-FAAP100-Interaktionsdomäne eine potentielle Coiled-Coil-Domäne beschrieben (Ling et al. 2007). So stabilisieren sich die Proteine des LBP100-Subkomplexes gegenseitig und schützen sich vor proteolytischer Degradierung (Ling et al. 2007). Die einzelnen Komponenten des Subkomplexes lagern sich bereits im Zytosol zusammen und werden als Einheit abhängig von FANCA und FANCM in den Zellkern transportiert (Ling et al. 2007). Dabei wurde nur für FANCB ein Kernlokalisierungssignal beschrieben (Meetei et al. 2004). Am Ort des DNA-Schadens finden sich schließlich alle Proteine des FA-Kernkomplexes zusammen, wobei LBP100 das Organisationszentrum für die richtige Bindung von CEF und AGP20 darstellt (Swuec et al. 2017, van Twest et al. 2017).

Für die Monoubiquitinierung des ID2-Komplexes ist das katalytische Modul LBP100 absolut essentiell (Huang et al. 2014, Rajendra et al. 2014). Anhand von DT40-Hühnerzellen konnte gezeigt werden, dass ein Knockout von FANCL, FANCB oder FAAP100 zu einem kompletten Verlust der FANCD2-Monoubiquitinierung führt (Rajendra et al. 2014). Im Gegensatz dazu war in den DT40-Knockout-Zellen der übrigen Kernkomplexproteine eine Restubiquitinierung für FANCD2 nachweisbar. Des Weiteren kann gegenüber allein vorliegendem FANCL die FANCD2-Monoubiquitinierung um das 5- bis 6-Fache gesteigert werden, wenn LBP100 als Einheit vorliegt (Rajendra et al. 2014). Durch eine Überexpression von FAAP100 wird zudem die Autoubiquitinierung von FANCL erhöht. Dies deutet darauf hin, dass FAAP100 FANCL in seiner Funktion als E3-Ligase unterstützt (Huang et al. 2014).

Obwohl bei keinem FA-Patienten bisher pathogene FAAP100-Mutationen identifiziert werden konnten, wurde sowohl durch Herunterregulierung des Proteins durch siRNA als auch bei  $\Delta$ FAAP100-DT40-Zellen ein typischer zellulärer FA-Phänotyp nachgewiesen (Ling et al. 2007). Dieser beinhaltete eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit, vor allem nach MMC-Behandlung, die

fehlende FANCD2-Monoubiquitinierung (mit und ohne MMC) sowie eine allgemeine Sensitivität gegenüber MMC und Cisplatin.

## 1.9 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, das Fanconi-Anämie assoziierte Protein FAAP100 näher zu charakterisieren. Es stellt ein festes Mitglied des FA/BRCA-Signalweges dar, konnte jedoch bisher nicht als FA-Gen eingestuft werden. Durch die Identifizierung einer homozygoten Missense-Mutation an Position c.1624A>C in *FAAP100* (Kuehl 2011) war hierfür die erste Grundlage geschaffen. Nun sollte durch Komplementationsstudien die Pathogenität dieser Mutation bewiesen und somit die Zuordnung zu einer neuen FA-Komplementationsgruppe erreicht werden. Unterstützend wurde angestrebt, durch das CRISPR/Cas9-System weitere FAAP100-defiziente Zelllinien zu generieren und diese anschließend ebenfalls zu komplementieren. Die FAAP100-defizienten Zelllinien würden somit als Grundlage für die nähere Charakterisierung des Gens dienen. Auf diese Weise sollte die Rolle von FAAP100 innerhalb des FA/BRCA-Signalweges im Allgemeinen und innerhalb des Subkomplexes LBP100 im Besonderen aufgeklärt werden.

Da die einzige FAAP100-Patientenzelllinie von einem Fetus abstammte, der aufgrund eines Aborts nicht zur Welt kam, wurde beabsichtigt, zusätzlich ein *in vivo* Modell herzustellen. Die Generierung und Phänotypisierung einer *Faap100*<sup>-/-</sup>-Maus wurde kommerziell in Auftrag gegeben. Die Charakterisierung der zellulären Merkmale und Komplementationsstudien sollten anschließend selbst durchgeführt werden. Anhand dieses Tiermodells wäre es möglich, ein besseres Verständnis des zellulären und vor allem des klinischen FAAP100-Phänotyps zu schaffen.

Zudem sollte eine alternative Spleißvariante von *FAAP100* (Kuehl 2011) hinsichtlich ihrer Funktion untersucht werden. Dabei standen ebenfalls die Stabilität des FA-Signalweges und die DNA-Reparatur im Zentrum der Untersuchungen.

## 2 MATERIALIEN

In diesem Abschnitt aufgelistetes Material wurde für eigene Untersuchungen verwendet. Auf Material der Experimente, die von Kooperationspartnern durchgeführt wurden, wird nicht eingegangen. Die Firma New England Biolabs wird im Folgenden mit NEB abgekürzt.

### 2.1 Antibiotika

Bezeichnung	Hersteller
Ampicillin (Stammlösung 10 mg/ml)	Carl Roth
Kanamycin (Stammlösung 50 mg/ml)	Carl Roth
Penicillin-Streptomycin (Stammlösung 10 000 U/ml)	Gibco
Puromycin Dihydrochlorid (Stammlösung 10 mg/ml)	Gibco
Zeocin (Stammlösung 100 mg/ml)	Gibco

### 2.2 Antikörper

Target-protein	Wirt	Artikelnummer	Hersteller	Verdünnung	Verdünnung des Sekundärantikörpers
<b>Primärantikörper</b>					
FAAP100	Kaninchen	ab1881185*	Abcam	1:500	1:2 000
	Kaninchen	ab155209	Abcam	1:500	1:2 000
	Kaninchen	ab80193	Abcam	1:200	1:2 000
	Kaninchen	abx124104	Abnova	1:200	1:2 000
	Kaninchen	NBP1-90469	Novus Biologicals	1:200	1:2 000
	Kaninchen	NBP1-90468	Novus Biologicals	1:200	1:2 000
	Kaninchen	orb183769	Biorbyt	1:200	1:2 000
	Kaninchen	STJ111323	St John's Laboratory	1:200	1:2 000
FANCB	Kaninchen	ab186729*	Abcam	1:1 000 (Immunblot) 1:30 (Co-IP)	1:5 000 –
	Kaninchen	HPA003124	Sigma-Aldrich	1:200	1:1 000
	Ziege	sc-131514	Santa Cruz	1:200	1:1 000
	Maus	H00002187-M01	Novus Biologicals	1:200	1:2 000
	Maus	H00002187-B01P	Novus Biologicals	1:200	1:2 000
	Kaninchen	14243S	Cell Signaling	1:1 000	1:5 000
	Kaninchen	abx029966	Abnova	1:1 000	1:5 000
	Kaninchen	Jordi Surrallés, Barcelona		1:800	1:3 000
FANCL	Kaninchen	AP19508b	Abgent	1:200	1:2 000
FANCD2	Maus	sc-20022	Santa Cruz	1:200 (Immunblot)	1:1 000
	Kaninchen	NB100-182	Novus Biologicals	1:800 (Foci)	1:2 000

GAPDH	Maus	NB300-221	Novus Biologicals	1:800	1:2 000
Histon H3	Kaninchen	ab1791	Abcam	1:600	1:2 000
Tubulin	Maus	ab44928	Abcam	1:1 000	1:5 000
Vinculin	Kaninchen	ab129002	Abcam	1:10 000	1:5 000
XPF	Maus	ab17798	Abcam	1:200	1:2 000
YY1	Kaninchen	ab199998	Abcam	1:5 000	–
Sekundärantikörper					
Maus	Ziege (HRP)	sc-2005	Santa Cruz	siehe Primärantikörper	–
	Ziege (HRP)	NBP1-73240	Novus Biologicals	siehe Primärantikörper	–
Kaninchen	Ziege (HRP)	sc-2004	Santa Cruz	siehe Primärantikörper	–
	Ziege (HRP)	ab97200	Abcam	siehe Primärantikörper	–
	Ziege (Alexa Fluor 594)	A-11072	Invitrogen	siehe Primärantikörper	–
Ziege	Esel (HRP)	sc-2020	Santa Cruz	siehe Primärantikörper	–

Falls es im Text nicht anders angegeben wird, wurde für Versuche der mit einem \* markierte  $\alpha$ -FANCB- bzw.  $\alpha$ -FAAP100-Antikörper genutzt.

## 2. 3 Chemikalien, Kulturmedien Puffer und Reagenzien

### 2. 3. 1 Kommerziell erworbene Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Accutase	PAN-Biotech
Agarose	Serva
Ampuwa (ddH <sub>2</sub> O)	Fresenius Kabi
Antarctic Phosphatase-Puffer	NEB
AQUACLEAN	Karl Hecht
Borsäure	Carl Roth
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
BSA (Restriktionsverdau)	NEB
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	AppliChem
Cisplatin	Apotheke Universitätsklinikum Würzburg
CutSmart-Puffer	NEB
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol, Dihydrochlorid)	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAN-Biotech
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate	Gibco
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	PAN-Biotech
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Dinatriumsalz	AppliChem
Ethylene-bis(oxyethylenenitrilo)tetraacetic acid (EGTA)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol (99,99 %)	Carl Roth
Ethidiumbromid	AppliChem

FastDigest-Puffer	Thermo Scientific
Fetal Bovine Serum (FCS)	Sigma-Aldrich
Gel Loading Dye (6x)	NEB
Gelatine	Sigma-Aldrich
Giemsa-Stammlösung	Carl Roth
GlutaMAX Supplement	Gibco
Glycerin	AppliChem
Glycerol	AppliChem
HDGreen Plus Safe DNA Dye	Intas
4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES)	Sigma-Aldrich
(highly deionized) HiDi Formamid	Applied Biosystems
Hoechst 33342, Trihydrochlorid, Trihydrat (10 mg/ml)	Invitrogen
(high performance liquid chromatography) HPLC-Wasser	Carl Roth
Human Fetal MTC Panel	Takara Bio Clontech
Human MTC Panel I	Takara Bio Clontech
Human MTC Panel II	Takara Bio Clontech
Immersionsöl	Carl Roth
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat	Merck Millipore
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Gibco
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth
KaryoMAX Colcemid Solution in HBSS	Gibco
LB-Agar (40 g/l)	Carl Roth
LB-Medium (Luria/Miller) (25 g/l)	Carl Roth
Methanol	AppliChem, Honeywell
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
Minimum Essential Media (MEM)	Gibco, Sigma-Aldrich
Mitomycin C (MMC) (0,5 mg/ml)	Medac
Natriumacetat (NaOAc)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Nonidet P40 (NP40)	AppliChem
NuPAGE LDS Sample Buffer (4X)	Invitrogen
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE Tris-Acetate SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen
Orange G (Gel-Ladepuffer)	Carl Roth
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Pierce IP Lysis Buffer	Thermo Scientific
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI	Invitrogen
Propidiumiodid - FluoroPure Grade (PI)	Invitrogen
Proteinase K solution	AppliChem
Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Puffer 3	NEB
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific

Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)-1640	Gibco, Sigma-Aldrich
sodium dodecyl sulfate (SDS) solution (20%)	AppliChem
Sodium Hydroxide (NaOH)	Carl Roth, AppliChem
Solution 6 – VB-48 – PI	ChemoMetec A/S
SYBR Safe DNA Gel Stain	Invitrogen
T4-Ligasepuffer	NEB, Promega
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (50x)	AppliChem
Tangopuffer	Thermo Scientific
Tet System Approved Fetal Bovine Serum (Tetracycline-Free; FBS)	PAN-Biotech, Takara Bio Clontech
Transfektionsreagenzien	siehe 3. 2. 3, Tabelle 4
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth, AppliChem
Tris-aminomethan (Tris)	Carl Roth
TrypLE Express	Gibco
Trypsin-EDTA solution	Sigma-Aldrich
Tween 20	Carl Roth, AppliChem
Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate	Takara Bio Clontech
β-Mercaptoethanol	AppliChem
β-Mercaptoethanol (Zellkultur)	Gibco

### 2. 3. 2 Selbst hergestellte Reagenzien

Puffer	Zusammensetzung
DNA-Gelladepuffer Orange G (10x)	100 mg Orange G; 15 ml Glycerin; 10 ml 0,5 M EDTA; 5 ml 10 % SDS; ad 50 ml ddH <sub>2</sub> O
DNA-Puffer (Zellzyklusanalyse)	100 mM Tris pH 7,4, 154 mM NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2 % BSA, 0,1 % NP40
Einfriermedium	RPMI-Medium, 10 % FCS, 10 % DMSO
Einfriermedium der HAP1-Zellen	A: IMDM, 20 % FCS B: IMDM, 20 % FCS, 20 % DMSO
Fixativ	Essigsäure:Methanol 1:3
LB-Medium	5 g LB-Medium, ad 200 ml ddH <sub>2</sub> O
LB-Agar-Platten	20 g LB-Agar, ad 500 ml ddH <sub>2</sub> O, 1 ml Antibiotikum
PBS-T	1x PBS, 0,1 % Tween 20
TBE-Puffer (10x)	1 M Tris, 1 M Borsäure, 10 mM EDTA
TBS (10x) (pH 7,6)	24 g Tris, 88 g NaCl, ad 1 l ddH <sub>2</sub> O
TBS-T	1x TBS, 0,1 % Tween 20

### 2. 4 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
BIO-X-ACT Short DNA Polymerase	Bioline
Antarctic Phosphatase	NEB
AccuStart Taq DNA Polymerase (PerfeCTa SYBR Green SuperMix)	Quantabio
BigDye	Applied Biosystems
DNase I	Invitrogen
DpnI	NEB
ExoSAP-IT	Affymetrix
GXL Star	Takara Bio Clontech

Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (Subcellular Protein Fractionation Kit)	Thermo Scientific
Micrococcal Nuclease (Subcellular Protein Fractionation Kit)	Thermo Scientific
PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase	Agilent Technologies
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (100x)	Roche
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
Restriktionsenzyme (Abschnitt 3. 2. 1. 1)	NEB, Thermo Scientific
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4 Ligase	NEB, Promega
T4 Polynucleotide Kinase	NEB

## 2.5 Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH
100 bp DNA Ladder	NEB
1 kb DNA Ladder	NEB

## 2.6 Gen-ID der verwendeten Transkripte

Gen	NCBI/RefSeq Gen-ID
<i>FAAP100/c17orf70</i>	NM_025161
<i>Faap100/2310003H01Rik</i>	NM_02798
<i>FANCA</i>	NM_000135
<i>FANCB</i>	NM_001018113
<i>FANCE</i>	NM_021922
<i>FANCL</i>	NM_018062
<i>FANCM</i>	NM_020937
<i>MHF1</i>	NM_199294

## 2.7 Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Analysewaage	MC1	Sartorius
Autoklav	Autoclave Systec 2540EL	Systec GmbH
Automatisiertes Zellanalysegerät	NucleoCounter NC-250	ChemoMetec A/S
Blotting-Systeme	BlueBlot Wet 100 Tank BB 100	SERVA Electrophoresis
	iBlot 2 Gel-Transfersystem	Life Technologies
Blotting-Zubehör	SNAP i.d. 2.0 Protein Detection System	Merck Millipore
CO <sub>2</sub> -Inkubator	NuAire NU-5810E	Integra Biosciences
Drehrad	Reax2	Heidolph
	Rotator SB2	Stuart
Durchflusszytometer	BD LSR II	BD Biosciences
Fluorometer	Qubit ( <i>original model</i> )	Invitrogen
Folienschweißgerät		GEHO PACK Service GmbH
		Clatronic

Gefrierbehälter	Mr. Frosty	Nalgene
Gel-Elektrophoresekammern	Bioemtra Compact M SE260 B	Analytic Jena AA Hoefler
Glasflaschen, Erlenmeyerkolben und weitere Glasbehälter		Schott Duran Group
Glasküvetten		Glaswerk Wertheim
Handschuhe CryoGloves		Tempshield
Handstückzähler		A. Hartenstein, Weckert Labortechnik
Imaging-Systeme	FluorChem HD2 MicroChem	Alpha Innotech DNR Bio-Imaging Systems Ltd
Kühl-, Gefrierschränke		Miele, Liebherr, Revco, Colora
Kühlsystem	DLK500 FRYKA	FRYKA Kältetechnik
Luminometer	Mitras LB 940	Berthold Technologies
Magnetrührer	Nuova II	Bioblock Scientific
Magnetständer	DynaMag-2 Magnet	Invitrogen
Messbecher, Messzylinder		Brand
Mikroskope	Durchlichtmikroskop Axiovert 40C Durchlichtmikroskop CX22LED Durchlichtmikroskop Axioskop 40 Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss Olympus Carl Zeiss Carl Zeiss
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick
Photometer	NanoPhotometer P-Class P300-30	Implen
Pipettierhilfen	Mehrkanalpipetten Saugball für Pasteurpipetten	Brand, Eppendorf A. Hartenstein, Weckert Labortechnik
	Mikropipetten	Gilson
	Dispenser Multipette pro	Eppendorf
	Dispenser Eppendorf Xplorer 8-Kanal	Eppendorf
	Mechanische Pipettierhilfe makro	Dragonmed, Brand
	Pipetboy	Integra Biosciences
	JANUS	Perkin Elmer
	VIBRAX-VXR	IKA
		INFORS AT
	Polymax 1040	Heidolph
	ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
	ABI PRISM 310 XL Genetic Analyzer	Applied Biosystems
	ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Serologische Pipetten	Glas, 2-20 ml	Brand
Skalpell	Aesculap rationed	B. Braun
Spannungsgerät/Power Supply	PowerPac 1000 Model 1000/500 Model 200/2.0 EPS 301	megro Bio-Rad Laboratories GmbH Bio-Rad Laboratories GmbH Bio-Rad Laboratories GmbH GE Healthcare Dharmacon
Spatel		Invitrogen
Sterilbank	LaminAir HB2448, HA2448 GS	Heraeus

Stickstofftank	BSR-L60, Chronos	Consarctic, Messer Griesheim
Thermocycler	Biometra TRIO iCycler Mastercycler ep Gradient S	Analytik Jena Bio-Rad Laboratories GmbH Eppendorf
Thermomixer	G-Storm GS00482	Alphamatrix Biotech
Überkopf-Rotationsmischer	TS1 ThermoShaker	Biometra Heidolph
Vakuumpumpe	Millivac Maxi SD1P014M04	Merck Millipore
Vakuum Rotationsverdampfer	RVC-2-18	Christ
Vakuumsystem	QIAvac 24 Plus	Qiagen
Vortexgerät	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wärmehaube	Certomat H	Braun Biotech
Wasserbad	Wasserbad Colora Wasserbad Typ B	Lorch Lauda
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Brand
Zentrifugen	Megafuge 1.0 Rotilabo-Mini-Zentrifuge MiniSpin plus Multifuge 1L-R	Hereaus Carl Roth Eppendorf Hereaus

## 2.8 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Agencourt CleanSEQ System	Beckman Coulter
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
DNA Clean & Concentrator Kit	Zymo Research
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
Dynabeads Protein G Immunoprecipitation Kits	Invitrogen
GeneJET Gel Extraction Kit	Fermentas
HighPure RNA Isolation Kit	Roche
innuPREP DOUBLEpure Kit	Analytik Jena
Lenti-X GoStix	Takara Bio Clontech
Lenti-X HTX Packaging System	Takara Bio Clontech
Lenti-X Lentiviral Expression System (EF1 $\alpha$ Version)	Takara Bio Clontech
Matchmaker Mammalian Assay Kit2	Takara Bio Clontech
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit	Thermo Scientific
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit	Machery Nagel
PerfeCTa SYBR Green SuperMix	Quantabio
Plasmid Plus Maxi Kit	Qiagen
PureLink Quick Gel Extraction Kit	Invitrogen
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen
Qubit Protein Assay Kit	Invitrogen
Quick-DNA Miniprep Kit	Zymo Research
Subcellular Protein Fractionation Kit	Thermo Scientific
Zyppy Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research
ZR DNA Sequencing Clean-up Kit	Zymo Research

## 2. 9 Kompetente Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller
One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli	Invitrogen
XL10-Gold Ultracompetent Cells	Stratagene/Agilent Technologies

## 2. 10 Oligonukleotide

### 2. 10. 1 Primer

Die Sequenzen der benötigten Primerpaare wurden anhand der entsprechenden gDNA- bzw. cDNA-Sequenz mithilfe der Programme BLAST (Altschul et al. 1990) von NCBI (National Center for Biotechnology Information), BLAT (Kent 2002) von UCSC (University of California, Santa Cruz) und dem OligoCalculator von ScienceLauncher erstellt. Synthese und Lieferung der Oligonukleotide erfolgte in lyophilisierter Form durch die Firmen Biolegio, Eurofins und/oder Sigma-Aldrich. Durch Lösen des Lyophilisats in demineralisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) wurde eine Stammlösung von 100 µM und daraus eine Arbeitslösung mit einer Konzentration von 10 µM erstellt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang, Abschnitt 7. 1, zu finden.

### 2. 10. 2 Protospacer-Elemente

Siehe Methodenteil, Abschnitt 3. 9, Tabelle 8.

### 2. 10. 3 Sonstige Oligonukleotide

Bezeichnung	Hersteller
dNTP Set (100 mM)	Bioline
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> Primer	Invitrogen
SMARTpool: ON-TARGETplus FAAP100 siRNA (5 nm)	GE Healthcare Dharmacon
ON-TARGETplus GAPD Control siRNA (5 nm)	GE Healthcare Dharmacon
ON-TARGETplus Non-targeting Pool (5 nm)	GE Healthcare Dharmacon

## 2. 11 Plasmide

Bei den hier aufgeführten Plasmiden handelt es sich um die Leervektoren bzw. um Vektoren, die als fertiges Konstrukt kommerziell erworben wurden. Die Vektorkarten sind im Anhang zu finden.

Bezeichnung	Hersteller	Bezeichnung	Hersteller
pBlueScript II SK (+)	Agilent Technologies	pGL4.74[hRluc/TK]	Promega
pCEP4-FAAP100	W. Wang	pGL4.31[luc2P/CRE/Hygro]	Promega
pCMV/Zeo	Invitrogen	pM GAL4 DNA-BD	Takara Bio Clontech
pLVX-EF1α-IRES-Puro	Takara Bio Clontech	pM-p53	Takara Bio Clontech
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)	Addgene	pVP16 AD	Takara Bio Clontech
pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462)	Addgene	pVP16-vCP	Takara Bio Clontech
pACT-Id	Promega	pVP16-SV40T	Takara Bio Clontech
pBIND-MyoD	Promega	pUC19	Invitrogen

## 2. 12 Transfektionsreagenzien

Siehe Methodenteil, Abschnitt 3. 2. 3, Tabelle 4.

## 2. 13 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
96 Well-Messplatten (schwarz)	Greiner Bio-One
96 Well-qPCR-Platten	Bio-Rad Laboratories GmbH
96 Well-Sequenzierplatten	Kisker Biotech GmbH & Co
Autoklavierbeutel	A. Hartenstein, Carl Roth
Deckgläser	Carl Roth
Einmalspritzen (1 ml, 5 ml)	Brand, Dispomed
Einschweißfolien	Clatronic, Carl Roth
FACS-Röhrchen (unsteril)	BD Biosciences
Falcons (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Sarstedt, Becton
Handschuhe (Nitril, Latex)	Carl Roth, SensiCare, Sentina Ambidextrous
iBlot 2 PVDF mini Transfer Stacks	Thermo Scientific
Immobilon-P Transfer Membrane	Merck Millipore
Kanüle (21 G)	B. Braun
Kryoröhrchen	Nunc
Kühlflüssigkeit	Conzelmann Schweißhandelsgesellschaft mbH
Multiwell-Kulturplatten (6, 12, 24, 96 Well Format)	Greiner Bio-One, Nunc
NC-Slide A2	ChemoMetec A/S
NC-Slide A8	ChemoMetec A/S
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Protein Gel; 1,0 mm; 10-well	Invitrogen
NuPAGE 7 % Tris-Acetate Protein Gel; 1,0 mm; 10-well	Invitrogen
Objektträger SuperFrost	Carl Roth
Parafilm	Pechiney
Pasteurpipetten (Glas)	Brand
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 8er-Streifen)	Eppendorf, Brandt, Sarstedt, Axygen
Petrischalen	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen(10 µl; 20 µl; 100 µl; 200 µl; 1250 µl)	Sarstedt, TipOne
PVDF-Membran, Porengröße 0,45 µm	Carl Roth
Reagenz-Reservoir	Brand
Serologische Pipetten (Kunststoff, 2-50 ml)	Greiner Bio-One
Slide Flasks (Objektträgerflaschen)	Sarstedt, Thermo Scientific
Spritzenvorsatzfilter Minisart	Sartorius AG, Merck Millipore
Stericup Vakuum-Filtrationssystem	Merck Millipore
Wägeschalen	A. Hartenstein, Weckert Laborotechnik
Whatman-Filterpapier	GE Healthcare Dharmacon
Zellkulturflaschen (T-25, T-75)	Corning, Nunc, Sarstedt
Zubehör für ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Zubehör für QIAvac 24 Plus	Qiagen

## 2. 14 Datenbanken und Softwareprogramme

Programm	Quelle
1000 Genomes Project-Browser	<a href="http://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers/">http://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers/</a>
ACESCAN2 Web Server	<a href="http://genes.mit.edu/acescan2/index.html">http://genes.mit.edu/acescan2/index.html</a>
Addgene plasmid repository	<a href="http://addgene.com/">http://addgene.com/</a>
Adobe Photoshop CS4	Adobe Systems
Alamut Visual (Version 2.7-1)	Interactive Biosoftware
AlphaEase FC Software (Stand Alone Version 6.0 und FluorChem HD2 Version 6.02)	Alpha Innotech
AutoSNPa	Ian Carr (University of Leeds)
AxioVision (Version 4.7.1.0)	Carl Zeiss
BACPAC Resources Center at Children's Hospital Oakland	<a href="https://bacpacresources.org/">https://bacpacresources.org/</a>
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
BioEdit Sequence Alignment Editor (Version 7.2.5)	Tom Hall
BLAST-like alignment tool (BLAT)	<a href="https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start">https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start</a>
Clustal Omega	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>
CorelDRAW Graphics Suite X4	Corel
CRISPR Design Tool	<a href="http://crispr.mit.edu/">http://crispr.mit.edu/</a>
CRISPR/Cas9-Tools zur Off-Target- Analyse	siehe Abschnitt 3. 9, Tabelle 10
Database of Short Genetic Variation (dbSNP)	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/</a>
EndNote X7	Thomson Reuters
Ensembl Genome Browser	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
ESEfinder	<a href="http://krainer01.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi">http://krainer01.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi</a>
Exome Aggregation Consortium (ExAC)-Browser	<a href="http://exac.broadinstitute.org/">http://exac.broadinstitute.org/</a>
Fanconi Anemia Mutation Database	<a href="http://www.rockefeller.edu/fanconi/">http://www.rockefeller.edu/fanconi/</a>
FAS-ESS web server	<a href="http://genes.mit.edu/fas-ess/">http://genes.mit.edu/fas-ess/</a>
GelCapture (Version 7.0.12)	DNR Bio-Imaging Systems Ltd
GenASIs Case Data Manager (Version 7.2.7.34276)	Applied Spectral Imaging, Inc.
GeneCards: The Human Gene Database	<a href="http://www.genecards.org/">http://www.genecards.org/</a>
GeneSplicer	<a href="http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml">http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml</a>
Genome Aggregation Database (gnomAD)-Browser	<a href="http://gnomad.broadinstitute.org/">http://gnomad.broadinstitute.org/</a>
H-Bond Score	<a href="https://www2.hhu.de/rna/html/hbond_score.php">https://www2.hhu.de/rna/html/hbond_score.php</a>
Guidelines for Human Gene Nomenclature	<a href="https://www.genenames.org/about/guidelines">https://www.genenames.org/about/guidelines</a>
HOPE	<a href="http://www.cmbi.ru.nl/hope/">http://www.cmbi.ru.nl/hope/</a>
Human Splicing Finder	<a href="http://www.umd.be/HSF3/">http://www.umd.be/HSF3/</a>
iCycler iQ (Version 3.1)	Bio-Rad Laboratories GmbH
ImageLab (Version 6.0.0)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Integrative Genomics Viewer (IGV) des Broad Instituts	<a href="http://software.broadinstitute.org/software/igv/">http://software.broadinstitute.org/software/igv/</a>

International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC)	<a href="http://www.mousephenotype.org/">http://www.mousephenotype.org/</a>
Jalview	<a href="http://www.jalview.org/">http://www.jalview.org/</a>
Knockout Mouse Project (KOMP)	<a href="https://www.komp.org/">https://www.komp.org/</a>
MaxENTScan	<a href="http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html">http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html</a>
Microsoft Office 2016	Microsoft
MikroWin 2000 (Version 4.41)	Mikrotek Laborsysteme GmbH
Mouse Genome Informatics MGI	<a href="http://www.informatics.jax.org/">http://www.informatics.jax.org/</a>
MutationTaster	<a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a>
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
NEB Ligation Calculator	<a href="https://nebiocalculator.neb.com/">https://nebiocalculator.neb.com/</a>
NEB Tm Calculator	<a href="https://tmcalculator.neb.com/">https://tmcalculator.neb.com/</a>
NextGENe (Version 2.4.2.2)	Softgenetics
NextGENe Viewer (Version 2.4.1.2)	Softgenetics
NNSPLICE	<a href="http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html">http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html</a>
NucleoView NC-250 (Version 1.0.14.8)	ChemoMetec A/S
OligoCalculator	<a href="http://www.sciencelauncher.com/oligocalc.html">http://www.sciencelauncher.com/oligocalc.html</a>
Origin 2016	OriginLab Corporation
PolyPhen-2	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>
PredictProtein	<a href="https://open.predictprotein.org/">https://open.predictprotein.org/</a>
Protein Molecular Weight	<a href="http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html">http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html</a>
PSORT II Prediction	<a href="https://psort.hgc.jp/form2.html">https://psort.hgc.jp/form2.html</a> <a href="https://www.genscript.com/psort.html">https://www.genscript.com/psort.html</a>
RaptorX Property	<a href="http://raptorx.uchicago.edu/StructurePropertyPred/predict/">http://raptorx.uchicago.edu/StructurePropertyPred/predict/</a>
Reverse Complement	<a href="https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html">https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html</a>
Sequence Variant Nomenclature	<a href="http://varnomen.hgvs.org/">http://varnomen.hgvs.org/</a>
Sequencher (Demoverion 5.0)	Genes Codes Corporation
SIFT des Bioinformatics Institute A*STARE Singapore	<a href="http://sift.bii.a-star.edu.sg/">http://sift.bii.a-star.edu.sg/</a>
SIFT des J. Craig Venter Institutes	<a href="http://sift.jcvi.org/">http://sift.jcvi.org/</a>
SnapGene Viewer	GSL Biotech LLC <a href="http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/">http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/</a>
Social Science Statistics	<a href="http://www.socscistatistics.com/Default.aspx">http://www.socscistatistics.com/Default.aspx</a>
Software MPlus AV (Version 4.10)	Phoenix Flow Systems
Splice Site Score Calculation	<a href="http://rulai.cshl.edu/new_alt_exon_db2/HTML/score.html">http://rulai.cshl.edu/new_alt_exon_db2/HTML/score.html</a>
SpliceSiteFinder-like	Alamut Visual-Programm
Timeline der Mausgenerierung	Ozgene <a href="https://www.ozgene.com/">https://www.ozgene.com/</a>
UCSC Genome Browser	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>
Universal Protein Resource (UniProt)	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>
YASPIN secondary structure prediction	<a href="http://www.ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/">http://www.ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/</a>

## 2. 15 Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Quelle
1176	humane transformierte Amnionzellen	Labor Somazellgenetik Würzburg
Bruder von 1176	humane LCL	Labor Somazellgenetik Würzburg
FA-B	humane transformierte Amnionzellen	Labor Somazellgenetik Würzburg
FA-D1	humane transformierte Fibroblasten	Labor Somazellgenetik Würzburg
FA-D2	humane transformierte Fibroblasten	Labor Somazellgenetik Würzburg
HAP1	humane CML-Zellen (KBM-7) C631	Horizon Discovery
HAP1 FAAP100 <sup>-/-</sup>	humane CML-Zellen (KBM-7) HZGHC003678c001	Horizon Discovery
HeLa	humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	Labor Somazellgenetik Würzburg
HEK293T	mit SV40 Large T-Antigen transformierte humane embryonale Nierenzellen	Labor Somazellgenetik Würzburg
HEK293T+FANCB	mit SV40 Large T-Antigen transformierte und FANCB stabil überexprimierende humane embryonale Nierenzellen	Johan de Winter, Amsterdam
Lenti-X 293T Cell Line	Subklon der humanen embryonale Nierenzellen HEK293	Takara Bio Clontech
MEF Faap100 <sup>+/+</sup>	murine embryonale Fibroblasten	Ozgene
MEF Faap100 <sup>+/-</sup>	murine embryonale Fibroblasten	Ozgene
MEF Faap100 <sup>-/-</sup>	murine embryonale Fibroblasten	Ozgene
nicht-FA Kontrolle	humane transformierte Fibroblasten	Labor Somazellgenetik Würzburg
nicht-FA Kontrolle	humane LCL	Labor Somazellgenetik Würzburg
Mutter von 1176	humane LCL	Labor Somazellgenetik Würzburg
U2OS	humane Epithelzellen eines Knochenosteosarkoms	Labor Somazellgenetik Würzburg
Vater von 1176	humane LCL	Labor Somazellgenetik Würzburg

## 3 METHODEN

### 3.1 Zellkultur

#### 3.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Lymphozyten aus Blut wurden mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert, sodass sich daraus eine lymphoblastoide Zelllinie (*lymphoblastoid cell line*, LCL) bildete. Bei Fibroblasten aus Haut, Amnionzellen aus Fruchtwasser und den murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) erfolgte die Transformation mithilfe des Simian Virus (SV40) Large T-Antigens. Bis auf LCLs handelte es sich bei allen Linien um adhärenz wachsende Zellen, sodass sie in liegenden Flaschen kultiviert wurden. LCLs wurden als Suspensionszellen in stehenden Flaschen gezogen. Die Kultivierung aller Zellen fand in einem Brutschrank statt, der auf eine Temperatur von 37 °C, einen CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % und auf eine 96-100 %ige relative Luftfeuchtigkeit eingestellt war. Folgende Kulturmedien wurden dabei verwendet:

- MEM mit 10 % FCS für transformierte Amnion- und Fibroblastenzelllinien sowie HeLa-, HEK293T-, und U2OS-Zellen
- RPMI mit 15 % FCS für lymphoblastoide Zelllinien
- DMEM (4,5 g/l Glukose) mit 10 % Tetrazyklin-freiem FBS für die Lenti-X 293T Zelllinie
- IMDM mit 10 % FCS und 1 % PenStrep für HAP1-Zellen
- DMEM mit 15 % FCS, 2 mM GlutaMax und 0,2 %  $\beta$ -Mercaptoethanol für primäre MEFs
- DMEM mit 15 % FCS für transformierte MEFs

Für das FCS erfolgte vor Verwendung eine Hitzeinaktivierung für 20 min bei 56 °C. Die Kultivierung der Zellen, die mithilfe des lentiviralen Lenti-X Expressionssystems transduziert worden waren, wurde statt mit FCS mit Tetrazyklin-freiem FBS und 1,0  $\mu$ g/ml Puromycin durchgeführt. Die Zellkulturflaschen, in die primäre MEFs eingesät werden sollten, wurden zuvor mit 0,5 % Gelatine/PBS beschichtet. Hierfür gab man 1 ml bzw. 2,5 ml die T-25 bzw. T-75 Flaschen und inkubierte diese für mindestens 30 min im Brutschrank. Anschließend konnten die primären Zellen mit Nährmedium in die Flaschen pipettiert werden.

Je nach Nährstoffbedarf wurden die Zellen zwei- bis dreimal pro Woche gefüttert bzw. bei einer Konfluenz von etwa 80-90 % geteilt. Um einer Klumpenbildung entgegenzuwirken, wurden LCLs zunächst durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Anschließend konnte ein Teil der Zellen für eine weitere Kultivierung in eine neue Flasche überführt, für Versuche benutzt oder verworfen werden. Das entnommene Volumen wurde durch frisches Nährmedium ersetzt. Für ein Splitten der adhärenz wachsenden Zellen wurde das Medium entfernt, die Zellen mit ca. 4 ml 1x PBS gewaschen und anschließend mit etwa 4 ml Trypsin oder Accutase abgelöst. Dieser Schritt erfolgte bei der Verwendung von Trypsin im Brutschrank, von Accutase bei Raumtemperatur in einer Zeit von etwa 5-10 min. Die abgelösten Zellen wurden in ein 15 ml Falcon überführt und die Flasche

anschließend mit 1x PBS gespült. Dieses wurde ebenfalls in das Röhrchen gegeben. Ein Zentrifugationsschritt (209 x g, 8-10 min) sorgte für eine Sedimentation der Zellen, sodass der Überstand verworfen werden konnte. Das Pellet wurde in Kulturmedium gelöst und ein Teil der Zellen in eine neue Kulturflasche, in die bereits Medium vorgelegt worden war, überführt oder für Versuche verwendet. Der Rest der Zellen wurde verworfen.

### **3. 1. 2 Kryokonservierung von Zellen**

Für eine nahezu unbegrenzte Lagerung wurden Zellen kryokonserviert. Hierfür wurde nach dem Zentrifugationsschritt das Pellet in 1,8 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Mit Ausnahme von HAP1-Zellen wurde ein gängiges Einfriermedium (RPMI-Medium, 10 % FCS, 10 % DMSO) verwendet. Für HAP1-Zellen wurde zunächst Einfriermedium A (IMDM + 20 % FCS) zu den Zellen gegeben und anschließend Medium B (IMDM + 20 % FCS + 20 % DMSO) in gleichem Volumen hinzugefügt. Die Kryoröhrchen wurden in eine Einfrierbox gegeben und diese bis zum nächsten Tag bei -80 °C gelagert. Die unbegrenzte Aufbewahrung erfolgte in einem Tank mit flüssigem Stickstoff.

Sollten Zellen weiterkultiviert werden, wurden sie aus dem Tank genommen und in einem Behälter mit handwarmem Wasser für wenige Minuten aufgetaut. Daraufhin überführte man die Zellen in eine Kulturflasche, die bereits vorgewärmtes Nährmedium enthielt. Am nächsten Tag wurde das Medium in dieser Flasche gewechselt, um das toxische DMSO zu entfernen.

### **3. 1. 3 Bestimmung der Zellzahl**

Für bestimmte Versuche war es nötig, die Zellzahl zu ermitteln. Dies erfolgte anhand einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, in die 20 µl einer Zellsuspension gegeben worden war. Es wurde die Anzahl der Zellen in mindestens drei Großquadraten bestimmt. Der daraus berechnete Mittelwert wurde mit dem Faktor 5 000 multipliziert und so die Zellzahl für 1 ml Zellsuspension bestimmt.

## **3. 2 Gentransfer**

Gentransfer erfolgte meist über Vektoren, die ein bestimmtes Gen beinhalteten. Für deren Herstellung mussten Plasmide und die einzubringende DNA zunächst mithilfe von Restriktionsenzymen verdaut werden, um sie anschließend an gewünschter Stelle miteinander zu ligieren. Bestimmte Enzyme bildeten hierbei Überhänge, sodass das Gen in nur einer Richtung in den Vektor integriert werden konnte. Andere hingegen erzeugten glatte Enden (*Blunt-Ends*), sodass, falls notwendig, nach der Transformation und der DNA-Isolierung die Plasmide, z. B. mittels Sanger-Sequenzierung, herausgefiltert werden mussten, die das Gen in gewünschter Orientierung aufgenommen hatten.

### 3. 2. 1 Klonierung

#### 3. 2. 1. 1 Restriktionsverdau

Für den Verdau der Vektoren wurden verschiedene Restriktionsenzyme verwendet. Sie sind in Tabelle 3 aufgelistet, in der zusätzlich jeweils der verwendete Puffer genannt wird. Mit Ausnahme von MfeI und BpiI (Thermo Scientific) wurden alle Restriktionsenzyme von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen. Es wurde gemäß Herstellerangaben vorgegangen.

**Tabelle 3: Übersicht der selbst klonierten Plasmide.**

Gen	Ziel-Vektor	cDNA-Quelle	Enzym 1	Enzym 2	Puffer	Experiment
<i>FAAP100</i> <sup>WT</sup>	pLVX	pCEP4-FAAP100	NotI	BamHI	Puffer 3 + BSA	Transduktion
<i>FAAP100</i> <sup>T542P</sup>	pLVX	pM-FAAP100 <sup>T542P</sup>	EcoRI-HF	AfeI	CutSmart	Transduktion
<i>FAAP100</i> <sup>Δ138</sup>	pLVX	pM-FAAP100 <sup>Δ138</sup>	EcoRI-HF	AfeI	CutSmart	Transduktion
<i>FAAP100</i> <sup>Δ138</sup>	pM	PCR aus cDNA (nicht-FA)*	–	SmaI	CutSmart	M2H & qPCR
<i>FAAP100</i> <sup>T542P</sup>	pVP16	pM-FAAP100 <sup>T542P</sup>	BamHI	HindIII	CutSmart	M2H & M3H, FANCD2-Degradierungsstudie
<i>FAAP100</i> <sup>Δ138</sup>	pVP16	pM-FAAP100 <sup>Δ138</sup>	EagI	MfeI	Puffer 3 Tangopuffer	M2H, FANCD2-Degradierungsstudie
<i>FAAP100</i> <sup>T542P</sup> (Ex5+Int)	pBlueScript II SK (+)	PCR aus gDNA (1176)**	–	SmaI	CutSmart	CRISPR/Cas9-System
<i>FAAP100</i> <sup>T542P</sup> (Ex5+Int)	pCMV/Zeo	pBlueScript II SK (+)-FAAP100 <sup>T542P</sup> (Ex5+Int)	NotI	XhoI	CutSmart	CRISPR/Cas9-System
Protospacer-Elemente	PX459	Oligonukleotide	–	BpiI	FastDigest	CRISPR/Cas9-System
Protospacer-Elemente	PX462	Oligonukleotide	–	BpiI	FastDigest	CRISPR/Cas9-System

\*: Primerpaar FAAP100\_5UTR\_for und FAAP100\_3UTR\_rev,

\*\* : Primerpaar CRISPR\_blunt\_e4for und CRISPR\_blunt\_i5rev

Für die Umklonierung von *FAAP100*<sup>Δ138</sup>-cDNA aus pM-FAAP100<sup>Δ138</sup> in pVP16-FAAP100<sup>T542P</sup> war es notwendig, einen sequenziellen Verdau durchzuführen, da die Enzyme unterschiedliche Puffer für ihre Aktivität benötigten. Ebenfalls wurde der Vektor pLVX für das Einbringen von *FAAP100*<sup>WT</sup>-cDNA aus pCEP4-FAAP100<sup>WT</sup> sequenziell verdaut, weil die Schnittstellen der Enzyme NotI und BamHI direkt neben einander lagen.

Das Einbringen von *FAAP100*<sup>Δ138</sup>-cDNA in pM sowie von einer Teilsequenz der *FAAP100*<sup>T542P</sup>-gDNA (Exon 5 und angrenzende Intronbereiche, Ex5+Int) in pBlueScript II SK (+) lief über *Blunt-End*-Klonierung ab. Die zu klonierenden Inserts wurden durch eine PCR mit dem Enzym

Q5 von NEB generiert, welches glatte Enden erzeugte. Da für eine erfolgreiche Ligation die T4-Ligase 5'-Phosphatreste an einem DNA-Molekül benötigt, wurde dem jeweiligen Ansatz nach durchlaufener PCR 3 µl T4 Ligasepuffer und 2 µl Proteinkinase hinzupipettiert und dieser für 30 min bei 37 °C inkubiert. Um hingegen einer selbst-Ligation der verdauten Vektoren vorzubeugen, sollten die 5'-Phosphatreste an diesen entfernt werden. Dies geschah durch Hinzufügen von 1 µl Antarctic Phosphatase und 1 µl Antarctic Phosphatase-Puffer zum Reaktionsansatz des Restriktionsverdaus und anschließender Inkubation im Cycler (37 °C für 15 min, 70 °C für 5 min, 8 °C für ∞).

Die Produkte der Restriktionsverdau wurden durch eine TAE-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, sodass das gewünschte Gen bzw. Plasmid anhand eines Größenmarkers ausfindig gemacht und aus dem Gel extrahiert werden konnte. Blieb das herausgeschnittene Stück aus einem Plasmid unter einer Länge von etwa 50 bp, wurde es nicht von der jeweilig genutzten Silica-Membran gebunden. In diesem Fall konnte auf eine Gelextraktion verzichtet und direkt ein Aufreinigungskit verwendet werden. Nach DNA-Aufreinigung (Abschnitt 3. 8. 5. 2) und anschließender Konzentrationsbestimmung (Abschnitt 3. 8. 2) erfolgte eine Ligation.

### 3. 2. 1. 2 Ligation

Das Verknüpfen von DNA-Enden wurde mit der T4-Ligase entweder von NEB oder von Promega jeweils gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die Berechnung der einzusetzenden Mengen des Inserts bzw. Vektors wurde der Ligation Calculator von NEB zurate gezogen. Diesem liegt folgende Formel zugrunde:

$$ng\ Insert = \frac{ng\ Vektor * bp\ Insert}{bp\ Vektor} * molare\ Ratio \frac{Insert}{Vektor}$$

Für die molare Ratio wurde 3:1 gewählt.

### 3. 2. 2 Transformation

Um eine Vervielfältigung der Plasmide zu erreichen, wurden chemisch kompetente Bakterien verwendet. Dabei handelte es sich entweder um One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli von Invitrogen oder um XL10-Gold Ultracompetent Cells von Agilent. Es wurde gemäß Herstellerangaben gearbeitet, wobei für die XL10-Gold Ultracompetent Cells nur die Hälfte der angegebenen Mengen verwendet wurde. 200 µl der Transformationsansätze wurden anschließend auf LB-Agar-Platten, die ein entsprechendes Antibiotikum enthielten, ausplattiert. Nachdem die Platten bei 37 °C unter der Wärmehaube inkubiert worden waren, konnten am nächsten Tag Klone gepickt werden. Hiermit wurde entweder eine Kolonie-PCR durchgeführt (Abschnitt 3. 8. 3. 2) oder eine Mini- bzw. Maxipräparation angeimpft. Mit dieser wurde meist am nächsten Tag, im Falle einer Minipräparation manchmal bereits nach etwa 6-8 h, die Plasmid-DNA isoliert (Abschnitt 3. 8. 1. 4). Die Vektoren wurden mithilfe der Sanger-Sequenzierung auf das korrekte Einfügen des jeweiligen Gens überprüft.

### 3. 2. 3 Transfektion

Für mehrere Experimente war es notwendig, Zellen mit einem oder mehreren Plasmiden zu transfizieren. Hierbei wurden unterschiedliche Transfektionsreagenzien verwendet, welche in Tabelle 4 aufgeführt werden. Bei den Protokollen wurde gemäß Herstellerangaben vorgegangen. Auf sie wird näher in der jeweiligen Versuchsbeschreibung eingegangen.

**Tabelle 4: Verwendete Transfektionsreagenzien.**

Experiment	Transfektionssystem/-reagenz	Firma
M2H & M3H	K2 Transfection System	Biontex
Co-Immunpräzipitation	Lipofectamine 3000 Transfection Reagent X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent	Invitrogen Roche
RNA-Interferenz	DharmaFECT 1 Transfection Reagents	GE Healthcare Dharmacon
Lentivirus-Produktion	Xfect Transfection Reagent	Takara Bio Clontech
CRISPR/Cas9-System	Lipofectamine 3000 Transfection Reagent	Invitrogen
FANCD2-Degradierungsstudie	X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent	Roche

### 3. 2. 4 Transduktion

Für die Komplementationsstudien von transformierten Amnion-, Fibroblasten-, FAAP100-CRISPR/Cas9- sowie MEF-Zelllinien wurde das Lenti-X Lentiviral Expression System von Takara Bio Clontech verwendet. Falls nicht anders angegeben, wurde gemäß Herstellerangaben gearbeitet. Zunächst wurde *FAAP100<sup>WT</sup>*-, *FAAP100<sup>T542P</sup>*- bzw. *FAAP100<sup>A138</sup>*-cDNA in das Plasmid pLVX-EF1 $\alpha$ -IRES-Puro (kurz pLVX) kloniert und mithilfe des Lenti-X HTX Packaging Systems lentivirale Viruspartikel in der Lenti-X 293T Zelllinie erzeugt, dessen Titer anhand von Lenti-X GoStix überprüft werden konnte. Die zu transduzierenden Zellen wurden in T-25 Flaschen eingesät und, anders als im Herstellerprotokoll angegeben, meist mit 180  $\mu$ l lentiviralen Überstand behandelt. Auf eine Zugabe von Polybren wurde verzichtet. Nach einer Inkubationszeit von etwa 48 h konnte mit der Selektion der Zellen begonnen werden. Hierfür wurde 1,0  $\mu$ g/ml Puromycin Dihydrochlorid von Gibco mit in das Nährmedium gegeben. Nachdem einzelne Zellklone zu einer klonalen Zelllinie herangewachsen waren, wurde aus diesen gDNA isoliert und der Erfolg der Transduktion per PCR und Sanger-Sequenzierung überprüft.

## 3. 3 Posttranskriptionelles Gen-Silencing mittels RNA-Interferenz

Die Herunterregulierung von *FAAP100* und der Kontrolle *GAPDH* wurde mithilfe von ON-TARGETplus siRNAs von GE Healthcare Dharmacon nach Herstellerangaben in HeLa-Zellen (100 000 Zellen/Well im 6 Well-Format) durchgeführt. Zunächst wurde eine 100  $\mu$ M siRNA-Stocklösung hergestellt, von der 5  $\mu$ M für die Transfektion von HeLa-Zellen genutzt wurden. Diese erfolgte mithilfe des Transfektionsreagenzes DharmaFECT 1 gemäß Herstellerangaben. Die Zellen wurden für insgesamt 48 h inkubiert, wobei für die letzten 16 h 40 ng/ml MMC hinzugefügt

wurde. Es folgte eine Gesamtproteinextraktion (Abschnitt 3. 11. 1. 1) und eine Analyse über einen Immunblot (Abschnitt 3. 11. 3). Neben *GAPDH* dienten als weitere Kontrollen eine siRNA ohne Target (Transfektionskontrolle) sowie unbehandelte HeLa-Zellen. In Tabelle 5 ist die Targetsequenz des SMARTpools ON-TARGETplus FAAP100 siRNA zu sehen.

**Tabelle 5: Targetsequenz der siRNA gegen FAAP100.**

SMARTpool: ON-TARGETplus FAAP100 siRNA	Targetsequenz
J-017139-12, FLJ22175	GUGCAGUACCUCCGCCAGA
J-017139-11, FLJ22175	GAGAGGUGGCCAUGACCGA
J-017139-10, FLJ22175	CCAUCAAGGUGUCGGCGGA
J-017139-09, FLJ22175	GCGGUUGACCAGCGGAACA

### 3. 4 Chromosomenbruchanalyse

Pro Ansatz wurden in jeweils drei T-75 Zellkulturflaschen Zellen so eingesät, dass am nächsten Tag eine Konfluenz von etwa 75 % erreicht war und je 0, 50 oder 100 ng/ml MMC hinzugegeben werden konnte. Nach einer Inkubation von 48 h wurden 160 µl Colcemid für 2,5-3,5 h hinzugefügt. Danach wurden die Zellen abgelöst, für etwa 8 min bei 209 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden je nach Größe in 1-4 ml auf 37 °C vorgewärmtem 1 % tri-Natriumcitrat-Dihydrat unter Verwendung eines Vortexgerätes resuspendiert und anschließend bei 37 °C im Brutschrank für etwa 15 min inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (8 min, 209 x g) und Verwerfen des Überstandes wurde zu den Zellen auf dem Vortexgerät tröpfchenweise -20 °C kaltes Fixativ (Essigsäure:Methanol 1:3) hinzugegeben und die Suspension bei -20 °C für mindestens 1 h aufbewahrt. Nach erneuter Zentrifugation (8 min, 209 x g) und Lösen des Pellets in frischem, eiskaltem Fixativ wurde die Zellsuspension auf Objektträger aufgetropft (3-4 Tropfen/Objektträger), die zuvor mit Fixativ behandelt und bei -20 °C gelagert worden waren. Nachdem die Objektträger getrocknet waren, konnten sie in einer 5%igen Giemsalösung für 4,5 min gefärbt und in einer weiteren Glasküvette mit frischem Wasser für 30 s gewaschen werden. Nach Trocknung wurde mithilfe eines Durchlichtmikroskops (10x Objektiv) der Objektträger nach 50 Zellen, die sich in der Metaphase befanden, abgesucht und bei diesen Metaphasen mit einem 100x Objektiv die Anzahl der Chromosomenbrüche nach Oostra et al. (Oostra et al. 2012) ermittelt. Bis auf die FA-B-Linie wurden für alle Amnion- und Fibroblastenlinien drei unabhängige Experimente durchgeführt. Für die FA-B-Linie, alle HEK293T- sowie HAP1-Zellen wurde jeweils ein Ansatz mit drei verschiedenen MMC-Konzentrationen erstellt. Für die primären MEFs konnte jeweils ein Ansatz mit 0 und 100 ng/ml MMC präpariert werden.

Die Auswertung erfolgte nach Zellanteilen in Prozent bezogen auf ihre Bruchereignisse pro Zelle. Zusätzlich wurde eine Auswertung nach der Gesamtbruchanzahl bezogen auf die MMC-Konzentration durchgeführt, wobei auch die ermittelten Rearrangements berücksichtigt worden

waren. Dabei zählten Lücken/Brüche als ein Bruch, Tri- und Quadriradialfiguren sowie Ringchromosomen als zwei Brüche. Komplexere Figuren wurden je nach beteiligter Zentromeranzahl bzw. der involvierten Bruchereignisse gewertet.

Neben der Chromosomenbruchanalyse wurde anhand der Präparate für einige der betrachteten Metaphasen der Mittelwert der gezählten Chromosomenzahlen berechnet.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse setzen sich aus selbst hergestellten Präparationen sowie aus Ansätzen zusammen, die bereits von Simone Pickel innerhalb ihrer Master-Thesis präpariert und ausgewertet worden waren (Pickel 2015). Diese umfassten jeweils zwei Ansätze für die Zelllinien 1176 und nicht-FA sowie jeweils ein Ansatz der Zelllinien 1176+FAAP100<sup>WT</sup>, 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> und 1176+Vektor<sup>pLVX</sup>.

### 3.5 Zellzyklusanalyse

Für die durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus wurden die Zellen sowohl ohne als auch mit 10 ng/ml MMC für 48 h inkubiert. Nach Ablösen und Sedimentation der Zellen durch 8-minütiges Zentrifugieren bei 209 x g wurde das Pellet in DNA-Puffer gelöst und 2 µg/ml DAPI hinzugegeben. Die Färbung der Zellen erfolgte im Dunkeln bei 4 °C für mindestens 30 min. Daraufhin konnte die Zellsuspension an einem BD LSR II Flow Zytometer bei einer Wellenlänge von 355 nm analysiert werden. Die Auswertung fand mithilfe der Software MPlus AV statt.

### 3.6 Anfertigung von Überlebenskurven

#### 3.6.1 HEK293T-, HAP1-, transformierte Fibroblasten- bzw. Amnionzellen

Für Erstellung der Überlebenskurven wurden 10 000-20 000 HEK293T- oder HAP1-Zellen bzw. 50 000-70 000 transformierte Fibroblasten- oder Amnionzellen in T-25 Zellkulturflaschen eingesät, am nächsten Tag mit unterschiedlichen Konzentrationen an ICL-induzierenden Agenzien versetzt und für mindestens 8 Tage inkubiert. Folgende Konzentrationen wurden dabei verwendet: 0 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 60 nM, 80 nM und 100 nM MMC bzw. 0 µM, 0,1 µM, 0,33 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM, 8 µM, 12 µM und 16 µM Cisplatin. Da die Kontrollen sowie die komplementierten Zellen der HEK293T- sowie der HAP1-Linie kaum eine Hypersensitivität gegenüber MMC aufwiesen und in einem Zeitraum von 8 Tagen meist in Folge des Übereinanderwachsens starben, wurden diese Zellen für die Konzentrationen 0-20 nM MMC in T-75 Flaschen eingesät.

Für die Analysen wurde zunächst das Nährmedium der Zellen in ein 15 ml Falcon überführt, die Zellen mit PBS gewaschen, welches auch in das Röhrchen gegeben wurde, und die Zellen anschließend 5-10 min in Trypsin inkubiert. Die abgelösten Zellen und auch das PBS, mit welchem die Flaschen ausgespült wurden, pipettierte man ebenfalls in das Röhrchen. Nach Zentrifugation

(8 min, 209 x g) wurde das Pellet je nach Größe in 50 µl-5 ml Medium gelöst. Die Messungen erfolgten für alle HEK293T- und HAP1-Zelllinien am NucleoCounter NC-250 von ChemoMetec A/S nach dem Vitality Assay Protokoll. Die Analyse der Amnion- und Fibroblastenlinien wurde am BD LSR II Flow Zytometer bei einer Wellenlänge von 488 nm durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit PI (2 µg/ml) angefärbt. Die Auswertung erfolgte mit der Software MPlus AV.

### 3. 6. 2 DT40-Zellen

Die Analyse der DT40-Hühnerzellen wurde mithilfe des Kits CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay von Promega von Yutong Xue, Baltimore, durchgeführt. In eine 96 Well-Platte wurden 0 µM, 0,025 µM, 0,05 µM, 0,1 µM, 0,2 µM, 0,4 µM, 0,8 µM bzw. 1,6 µM Cisplatin vorgelegt und anschließend in jedes Well 2 000 Zellen hinzupipettiert. Nach 48 h wurden 20 µl CellTiter Solution hinzugegeben und 1-2 h bis zum Farbumschlag im Brutschrank inkubiert. Die Absorbanz wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm mit einem 96 Well-Plattenlesegerät analysiert.

## 3. 7 Indirekte Immunfluoreszenz

Es wurden pro Ansatz 400 000 Zellen in jeweils zwei Objektträgerflaschen (Slide Flasks) eingesät. Am nächsten Abend wurde zu den Zellen in einem Slide Flask 40 ng/ml MMC hinzugegeben, die Zellen in dem jeweils zweiten Slide Flask blieben unbehandelt. Nach 16 h im Brutschrank wurde das Medium abgenommen und die Kammern mit 1 ml PBS ausgespült. Für alle folgenden Inkubationsschritte wurden die Objektträgerflaschen, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur auf einen Schwenktisch gestellt. Zunächst pipettierte man 1 ml 4 % Paraformaldehyd in die Slide Flasks, sodass die Zellen durch einen 15-minütigen Inkubationsschritt fixiert wurden. Nachdem das Paraformaldehyd verworfen worden war, wurde eine Permeabilisierung der Zellen durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem Methanol für 30 min auf Eis erreicht. Das Methanol wurde abgenommen und unspezifische Bindungen mit 1 ml 20 % FCS/PBS für 30 min blockiert. Der Primärantikörper  $\alpha$ -FANCD2 wurde 1:800 in 20 % FCS/PBS verdünnt und davon jeweils 1 ml in die Kammern gegeben. Nach 1 h wurde der Antikörper verworfen und es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit je 1 ml PBS für jeweils 10 min. Die Zellen wurden für 30 min im Dunkeln mit 1 ml des Sekundärantikörpers  $\alpha$ -Kaninchen/Alexa Fluor 594 (Verdünnung 1:2 000) behandelt, welcher anschließend verworfen wurde. Es folgte ein viermaliger Waschschrift für je 20 min mit 1 ml PBS im Dunkeln. Nun konnte der Deckel der Slide Flasks abgenommen, zwei Tropfen Eindeckelmedium ProLong Gold Antifade Mountant, welches bereits DAPI zum Anfärben der Zellkerne enthielt, auf die Objektträger gegeben und diese mit jeweils einem Deckglas verschlossen werden. Der Trocknungsschritt erfolgte über Nacht im Dunkeln.

Unter einem Fluoreszenzmikroskop wurden mit einem 63x Objektiv mindestens 500 Zellkerne betrachtet. Enthielt ein Zellkern mehr als 10 Foci wurde er als Foci-positiv gewertet.

Pro Ansatz wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

## 3. 8 Molekulargenetische Methoden

### 3. 8. 1 Isolierung von Nukleinsäuren

DNA wurde aus den in Kultur gehaltenen Zelllinien gewonnen. Adhärente Zellen wurden mithilfe von Trypsin oder Accutase abgelöst, Suspensionszellen direkt in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Sedimentation der Zellen durch einen Zentrifugationsschritt (209 x g, 5-10 min) wurde das Pellet einmal mit 500 µl PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert.

#### 3. 8. 1. 1 gDNA

Genomische DNA wurde mithilfe des Quick-DNA Miniprep Kits der Firma Zymo Research gemäß Herstellerangaben isoliert. Die an die Säulenmembran gebundene gDNA wurde je nach Größe des eingesetzten Zellpellets mit 20-50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

#### 3. 8. 1. 2 RNA

Die RNA-Isolierung erfolgte mithilfe des High Pure RNA Isolation Kits von Roche. Dabei wurde nach beigefügtem Protokoll vorgegangen und die gewonnene RNA mithilfe von 50 µl Eluierungspuffer von der Silica-Membran gelöst. Die Konzentration und der Reinheitsgrad wurden an einem Nanophotometer bestimmt (Abschnitt 3. 8. 2). Anschließend konnte eine cDNA-Synthese erfolgen.

#### 3. 8. 1. 3 cDNA-Synthese

Das Umschreiben von RNA in komplementäre DNA (*complementary* DNA, cDNA) wurde durch die SuperScript II Reverse Transkriptase von Invitrogen erreicht. Dabei wurde gemäß Herstellerangaben gearbeitet.

#### 3. 8. 1. 4 Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA zu gewinnen, welche durch Transduktion in Bakterienkulturen aufgenommen worden war (Abschnitt 3. 2. 4), wurde für eine erste Analyse des Plasmids, wofür nur kleinere Mengen an DNA nötig waren, das Zyppy Plasmid Miniprep Kit von Zymo Research verwendet. Die Arbeitsschritte erfolgten gemäß Herstellerangaben. Die DNA wurde mit 20-30 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert. Für Versuche waren größere Mengen an Plasmid-DNA nötig. Hier fand eine Isolierung der DNA mithilfe des Plasmid Plus Maxi Kits der Firma QIAGEN statt. Dabei wurde das QIAvac 24 Plus-System zur Hilfe genommen, um eine Vakuum-gesteuerte Aufbereitung nach beigefügtem Protokoll durchzuführen. Die Eluierung der DNA erfolgte mit 100-200 µl ddH<sub>2</sub>O.

### 3. 8. 2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von genomischer und komplementärer DNA wurde in den meisten Fällen über ein photometrisches Verfahren durchgeführt. Hierfür wurde der NanoPhotometer der Firma Implen verwendet. Neben der Konzentration der Probe wurde auch der Reinheitsgrad angegeben, welcher über die Ratio der Absorbierung ermittelt wurde und für

reine DNA bei etwa 1,8 (260 nm/280 nm) bzw. bei 2,0-2,2 (260 nm/230 nm) liegen sollte. Die Messung erfolgte mit 2 µl DNA gemäß Herstellerangaben. Für Versuche, die eine exakte Menge einer bestimmten Konzentration benötigten, wurde das Gerät Qubit Fluorometer von Invitrogen verwendet. Dabei lagerten sich Fluoreszenzfarbstoffe an das intakte Target an, sodass anschließend deren relative Fluoreszenz mithilfe einer Standardkurve gemessen werden konnte. Die Kurve wurde mithilfe von mitgelieferten Standardproben erzeugt. Man arbeitete mit dem Qubit dsDNA BR Assay Kit nach vorgegebenen Protokoll, wobei 2 µl DNA eingesetzt wurden.

### **3. 8. 3 Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion**

#### **3. 8. 3. 1 Standard-PCR**

Um bestimmte Gene bzw. Genabschnitte zu vervielfältigen wurde sich der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bedient. Hierbei kamen die Enzyme Bio-X-Act von Bioline, GXL-Star von Takara Bio Clontech sowie Phusion und Q5 von NEB zum Einsatz. Es wurde jeweils gemäß Herstellerangaben gearbeitet. Die Annealingtemperaturen der Primer waren zuvor mithilfe der Programme OligoCalculator (ScienceLauncher) bzw. Tm-Calculator (NEB) berechnet worden. Die ermittelten Temperaturen des OligoCalculators wurden meist um 2 °C erhöht. Lagen die Temperaturen für den *forward*- und den *reverse*-Primer mehr als 2 °C auseinander, wurde ein Touchdownprogramm verwendet. Dabei startete man den Annealingschritt mit der höheren Primertemperatur und reduzierte die Temperatur über 10 Zyklen bis zur niedrigen Temperatur des zweiten Primers. So konnte die Primerbindung und damit die Effizienz der PCR-Reaktion gesteigert werden. Die Elongationszeit wurde je nach Größe des zu amplifizierenden Bereichs auf die Leistung der Polymerase angepasst.

#### **3. 8. 3. 2 Kolonie-PCR**

Eine Kolonie-PCR wurde herangezogen, um direkt aus Bakterien DNA zu vervielfältigen und so den Erfolg einer Klonierung zu überprüfen (Abschnitt 3. 2. 2). Diese Art der PCR wurde wie eine Standard-PCR durchgeführt. Die Ausnahme bildete hierbei das DNA-Template. Statt einer gewissen Menge aufgereinigter DNA wurde ein Bakterien-Klon von einer LB-Agar-Platte gepickt und kurz in den PCR-Ansatz getaucht. Damit der Klon nach der PCR für mögliche Präparationen weiterhin zur Verfügung stand, wurde er anschließend auf eine neue LB-Agar-Platte ausgestrichen.

#### **3. 8. 3. 3 Quantitative Real-Time PCR**

Eine quantitative Real-Time PCR (qPCR) bietet die Möglichkeit, mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen in Echtzeit die Expression von Genen zu studieren. Dabei wird dem PCR-Ansatz z. B. SYBR Green I hinzugefügt, welches sich in doppelsträngige DNA einlagert. SYBR Green I weist ein Absorptionsmaximum bei 494 nm und ein Emissionsmaximum bei 521 nm auf. Während der Denaturierung löst sich der Farbstoff von der DNA, welche in Einzelstränge aufgetrennt wird, sodass kein Fluoreszenzsignal gemessen werden kann. Nach dem Primer-Annealing kommt es

durch eine Polymerase zur Synthese des neuen DNA-Strangs. In diesen kann SYBR Green I erneut interkalieren. Mit zunehmender Zyklusanzahl der PCR-Reaktion steigt auch die Zahl der doppelsträngigen DNA-Moleküle und somit das Fluoreszenzsignal an, welches durch einen CCD-Detektor (*Charge Coupled Device*) im qPCR-Cycler gemessen werden kann. Da SYBR Green I jedoch unspezifisch bindet, z. B. auch an unspezifische PCR-Produkte und/oder an Primer-Paare, ist es notwendig nach durchlaufenem PCR-Programm eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Dabei wird die Temperatur kontinuierlich erhöht, sodass die dsDNA-Fragmente bei ihrer spezifischen Temperatur getrennt werden. Die Schmelztemperatur ist dabei von der Länge und der Basenzusammensetzung des Fragments abhängig. Unspezifische doppelsträngige Fragmente trennen sich im Allgemeinen bei einer niedrigeren Temperatur wieder auf, sodass sie von den gewünschten PCR-Produkten unterschieden werden können. (Arya et al. 2005)

Um zu untersuchen, ob und in welchem Maße sich die Expression von *FAAP100<sup>WT</sup>* und *FAAP100<sup>J138</sup>* in verschiedenen Geweben unterscheiden, wurden qPCRs mit cDNAs des Human MTC Panels I und II sowie des Human Fetal MTC Panels von Takara Bio Clontech durchgeführt.

Da nur die Expression der beiden Gene untereinander verglichen werden sollte, konnte auf die Verwendung von Haushaltsgenen (*housekeeping genes*) verzichtet werden. Dabei wurden eine absolute und eine relative Quantifizierung angestrebt. Für die absolute Analyse war eine Standardkurve über ein linearisiertes Plasmid notwendig, um nach der qPCR die tatsächliche Kopienanzahl berechnen zu können. Hierfür wurden die Plasmide pM-FAAP100<sup>WT</sup> und pM-FAAP100<sup>Δ138</sup> durch EcoRI-HF geschnitten (1 µg DNA, 1 µl EcoRI-HF, 5 µl CutSmart-Puffer, ad 50 µl ddH<sub>2</sub>O; 37 °C 2 h, 65 °C 20 min, 4 °C ∞) und der Erfolg der Verdauung durch gelelektrophoretische Auftrennung überprüft. Nach Konzentrationsbestimmung wurde mit folgenden Formeln die Anzahl der Moleküle in 1 µl berechnet, wobei 325 Da dem Gewicht eines Nukleotids (nt) entsprachen:

$$(1) \text{ Gewicht in Dalton } \left[ \frac{g}{mol} \right] = (\text{Größe des Plasmids [bp]}) * (325 \text{ Da} * \frac{2nt}{[bp]})$$

$$(2) \text{ Kopienanzahl } \left[ \frac{g}{\text{Molekül}} \right] = \frac{\text{Gewicht in Dalton } \left[ \frac{g}{mol} \right]}{6,022140857 * 10^{23} \text{ mol}^{-1} \text{ (Avogadro Konstante)}}$$

$$(3) \text{ Molekülanzahl der Reaktion in } 1 \mu\text{l} = \frac{\text{Konzentration des Plasmids } \left[ \frac{g}{\mu\text{l}} \right]}{\text{Kopienanzahl } \left[ \frac{g}{\text{Molekül}} \right]}$$

Anschließend erstellte man aus den linearisierten Plasmiden eine Verdünnungsreihe und ließ aus dieser Reihe eine bestimmte Molekülanzahl durch jede qPCR als Standard mitamplifizieren.

Für die qPCR wurden Primer in hoch reinem Zustand (HPLC-Aufreinigung) von Biogio bestellt. Mit ihnen konnten Amplifikate mit einer Länge von 237 bp bzw. 135 bp erzeugt werden, nachdem die Annealingtemperaturen der Primer sowie die Elongationszeit der Polymerase mithilfe von Standard-PCR-Reaktionen angepasst worden waren. Als Polymerase diente die AccuStart Taq DNA Polymerase, welche im PerfeCTa SYBR Green SuperMix von Quantabio enthalten war. Bei jeder PCR-Reaktion wurden sechs Standards pro Gen ( $3,4 * 10^1$  bis  $3,4 * 10^6$  Moleküle/µl für

$FAAP100^{A138}$  und  $3,71 \cdot 10^1$  bis  $3,71 \cdot 10^6$  Moleküle/ $\mu$ l für  $FAAP100^{WT}$ ), die cDNA eines MTC Panels und ein Leerwert ohne DNA mitgeführt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten in eine 96 Well-Platte pipettiert, diese mit einer transparenten Klebefolie verschlossen und in den iCycler von Bio-Rad Laboratories GmbH gestellt (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Reaktionsansatz und Cycler-Programm der qPCR**

Reaktionsansatz		Cyclerprogramm			
SYBR-Mix	10 $\mu$ l	PCR: 95 °C		2 min	
je 0,20 $\mu$ M Primer	0,4 $\mu$ l	95 °C		5 s	} 40x Aufnahme
0,5 ng cDNA	0,5 $\mu$ l	60 °C		16 s	
ddH <sub>2</sub> O	8,7 $\mu$ l	Schmelzkurve: 95 °C		1 min	
$\Sigma$	20 $\mu$ l	55 °C		1 min	
		55 °C	+0,5 °C	10 s	80x Aufnahme
		4 °C		$\infty$	

Die Auswertung erfolgte über das Programm iCycler iQ (Version 3.1) von Bio-Rad Laboratories GmbH. Dabei wurde für das Fluoreszenzsignal ein benutzerdefinierter Schwellenwert (*Threshold*) von 30 festgelegt. Für die absolute Quantifizierung erstellte man durch das Programm für jede Genvariante pro qPCR-Lauf eine eigene Standardkurve, über die automatisch die Kopienanzahl (*Starting Quantity*, SQ-Wert) der unbekanntenen Proben pro Ansatz bestimmt wurden. Aus dem SQ-Wert der Triplikate bildete man einen Mittelwert. Aus den gemittelten drei Läufen wurde ebenfalls der Mittelwert sowie die Standardabweichung für jede Gewebeart erstellt. Die Ergebnisse wurden in einem Balkendiagramm dargestellt (Daten nicht gezeigt). Da alle Platten per Hand pipettiert wurden, konnten Pipettierfehler nicht ausgeschlossen werden. So war es möglich, dass Schwankungen in der Menge der eingesetzten Moleküle auftraten und folglich eine leicht verfälschte Standardkurve erstellt wurde. Um dieser unsicheren Methode vorzubeugen und da direkt die  $FAAP100^{WT}$ - mit der  $FAAP100^{A138}$ -Expression verglichen werden sollte, wurde zusätzlich eine relative Auswertung durchgeführt. Hierfür wurden die Standards ignoriert und direkt die durch das iCycler-Programm ermittelten Ct-Werte (*Threshold Cycle*) für jeden Ansatz verwendet. Die Auswertung erfolgte über die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak & Schmittgen 2001). Zunächst wurden aus den Ct-Werten die Mittelwerte der Triplikate gebildet. Aus diesen wurden die  $\Delta Ct$ - und die  $\Delta\Delta Ct$ -Werte berechnet und diese über  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  normalisiert:

$$(1) \Delta Ct(FAAP100^{A138}) = Ct(FAAP100^{A138}) - Ct(FAAP100^{WT})$$

$$\Delta Ct(FAAP100^{WT}) = Ct(FAAP100^{WT}) - Ct(FAAP100^{WT})$$

$$(2) \Delta\Delta Ct(FAAP100^{A138}) = \Delta Ct(FAAP100^{A138}) - \Delta Ct(FAAP100^{WT})$$

$$\Delta\Delta Ct(FAAP100^{WT}) = \Delta Ct(FAAP100^{WT}) - \Delta Ct(FAAP100^{WT})$$

$$(3) \text{Relative Expressionsmenge } FAAP100^{A138} = 2^{-\Delta\Delta Ct(FAAP100^{A138})}$$

$$\text{Relative Expressionsmenge } FAAP100^{WT} = 2^{-\Delta\Delta Ct(FAAP100^{WT})}$$

Dabei ergab sich, umgerechnet in Prozent, für das Referenzgen  $FAAP100^{WT}$  für jedes Gewebe eine 100%ige Expression und für  $FAAP100^{A138}$  die relative Expressionsmenge bezogen auf  $FAAP100^{WT}$ . Die Werte wurden in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Auswertung der

relativen Quantifizierung wurde schließlich bevorzugt und ist in Abbildung 56 dargestellt. Die Spezifität aller PCR-Reaktionen sowie die Leerwerte wurden zusätzlich über eine gelelektrophoretische Auftrennung überprüft.

### 3. 8. 3. 4 Mutagenese-PCR

Durch eine *Two-Stage* PCR-Reaktion nach dem Protokoll von Wang und Malcolm (Wang & Malcolm 2002) können spezifisch Mutationen in eine DNA-Sequenz eingebracht werden. Es wurde mit der DNA-Polymerase PfuUltra High-Fidelity von Agilent gearbeitet. Im ersten Schritt wurden sowohl für den *forward*- als auch den *reverse*-Primer eigene Ansätze, zunächst ohne Polymerase, vorbereitet. Nach Denaturierung der DNA wurde die Polymerase hinzugefügt und vier Zyklen der PCR durchlaufen. Schließlich wurden für den zweiten Schritt beide Ansätze vermengt und das Cyclerprogramm für 16 Zyklen wiederholt. Die genaue Abfolge ist in Tabelle 7 zu sehen.

Tabelle 7: Ansatz und Cyclerprogramm der *Two-Stage* PCR-Reaktion.

Reaktionsansatz		Cyclerprogramm		
<b>Schritt 1</b>				
<u>Ein Ansatz je Primer:</u> 10x PfuUltra HF reaction buffer 100 ng Template 10 pmol Primer ( <i>forward</i> oder <i>reverse</i> ) dNTPs ddH <sub>2</sub> O	5 µl x µl 1 µl 1 µl ad 48 µl	95 °C	3 min	
Hinzupipttieren je Ansatz: 2,5 U PfuUltra High-Fidelity DNA-Polymerase	2 µl	95 °C 55 °C 68 °C 4 °C	30 s 1 min 12:30 min* ∞	} 4x
<b>Schritt 2</b>				
Mischen beider Ansätze		95 °C 55 °C 68 °C 4 °C	30 s 1 min 12:30 min* ∞	} 16x
*: Elongationszeit wurde berechnet mit 2x Länge des Plasmids in Kilobasen (pM-FAAP100: 6,1 kb).				

Die PCR-Reaktion konnte bis zum DpnI-Verdau bei 4 °C gelagert werden. Für diesen wurden 10 U DpnI zum PCR-Reaktionsansatz hinzugefügt und dieser für 1 h bei 37 °C inkubiert. DpnI ist ein Restriktionsenzym, das methylierte DNA schneidet. Im Gegensatz zum Ausgangsplasmid, welches durch eine vorherige Transformation vervielfältigt und so methyliert wurde, liegt der neu amplifizierte Vektor unmethyliert vor. Folglich verdaut DpnI nur den ursprünglichen Vektor, sodass als Resultat allein das neue Plasmid mit eingebauter Mutation vorliegt. Anschließend erfolgte eine Transformation (Abschnitt 3. 2. 2) sowie die Überprüfung der Mutagenese durch PCR und Sanger-Sequenzierung (Abschnitte 3. 8. 3. 1 und 3. 8. 6).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels Mutagenese-PCR die *FAAP100*-Mutation c.1624A>C in das Plasmid pM-FAAP100<sup>WT</sup> eingebaut. Zudem konnte mithilfe der *Two-Stage*-Mutagenese der

Leserahmen zwischen der Sequenz der DNA-Bindedomäne und der *FAAP100*<sup>Δ138</sup>-cDNA in pM-FAAP100<sup>Δ138</sup> korrigiert werden.

### **3. 8. 4 Gelelektrophorese**

Um den Erfolg einer PCR zu überprüfen, wurden 5 µl jeder Probe, welche zu 2 µl Ladebuffer gegeben worden waren, und ein entsprechender Längenstandard für eine Größenbestimmung auf ein 1,5%iges TBE-Agarosegel aufgetragen. Für die Detektion war Ethidiumbromid, SYBR Safe DNA Gel Stain oder HDGreen in das noch flüssige Gel gemischt worden. Nach der Auftrennung (150 V, 15-30 min) konnten die DNA-Fragmente mithilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht werden. War es aufgrund mehrerer Produkte innerhalb einer PCR-Reaktion bzw. nach dem Restriktionsverdau von Vektoren nötig, einzelne Fragmente aus dem Gel zu isolieren, wurde ein 1,5%iges TAE-Gel mit größeren Taschen angefertigt. Es wurde der gesamte Ansatz der PCR-Reaktion bzw. des Restriktionsverdaus, welcher mit 5 µl Ladebuffer vermengt worden war, auf das Gel aufgetragen und für 1 h oder länger an 150 V angeschlossen. Danach konnte die gewünschte Bande auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnitten werden.

### **3. 8. 5 Aufreinigung von DNA**

#### **3. 8. 5. 1 Enzymatische Aufreinigung**

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten wurde durch einen enzymatischen Verdau mit dem ExoSAP-IT PCR-Product Cleanup-Reagenz durchgeführt. Die Exonuklease I baut einzelsträngige Oligonukleotide ab und übrige dNTPs werden durch die Shrimp Alkaline Phosphatase hydrolysiert. Für den Ansatz wurden 6,5 µl ddH<sub>2</sub>O, 1 µl PCR-Produkt und 0,5 µl ExoSAP-IT vermengt und in einem Thermocycler (37 °C 15 min) inkubiert. Zur Inaktivierung des ExoSAP-IT-Reagenzes wurde die Temperatur des Cyclers für 15 min auf 80 °C erhöht und anschließend auf 10 °C abgekühlt.

#### **3. 8. 5. 2 Aufreinigung über eine Silica-Membran**

Für die direkte Aufreinigung von Produkten eines Restriktionsverdaus bzw. von DNA-Fragmenten, die aus einem TAE-Gel ausgeschnitten worden waren, kamen das NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel, das GeneJET Gel Extraction Kit von Fermentas, das PureLink Quick Gel Extraction Kit von Invitrogen, das DNA Clean & Concentrator Kit von Zymo Research sowie das innuPREP DOUBLEpure Kit von Analytik Jena zum Einsatz. Es wurde jeweils gemäß Herstellerangaben vorgegangen.

#### **3. 8. 6 Sanger-Sequenzierung**

Die aufgereinigten PCR-Produkte konnten nun für eine Sequenzierung nach Sanger eingesetzt werden, welche nach der Kettenabbruch Methode ablief (Sanger et al. 1977). Es wurde das BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystem verwendet. Dabei wurden zu dem 7 µl-Ansatz des ExoSAP-IT-Verdaus 2 µl Sequenzierpuffer, 0,5 µl Primer (*forward* oder *reverse*) und

1 µl BigDye pipettiert. Sollte eine Plasmid-DNA oder eine über eine Silica-Membran aufgereinigte DNA sequenziert werden, wurden 1 µl DNA (300-400 ng), 5 µl ddH<sub>2</sub>O, 1 µl Sequenzierpuffer, 1 µl Primer (*forward* oder *reverse*) und 2 µl BigDye verwendet. Das Cyclothermprogramm für die PCR-Reaktion des Sequenzieransatzes lief wie folgt ab: 96 °C 3 min, (96 °C 15 s, 60 °C 1:30 min, 50 °C 1:30 min) 25x, 60 °C 3 min, 4 °C ∞.

Die Aufreinigung des Sequenzierreaktionsansatzes erfolgte über Ethanol-Fällung. Hierfür wurden 45 µl HPLC-Wasser, 3 µl 3 M NaOAc, 125 µl 100%iges Ethanol und der gesamte Probenansatz vermengt. Das Reaktionsgefäß wurde invertiert und bei ca. 14 000 x g für 15 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen worden war, wurden 250 µl 70%iges Ethanol hinzugefügt und das Invertieren sowie der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde verworfen und die Probe für 5 min bei 60 °C in einem Vakuumrotationsverdampfer oder für etwa 15 min bei Raumtemperatur mit geöffnetem Gefäßdeckel getrocknet. Es wurden 20 µl Formamid hinzugefügt und das Pellet auf einem Schüttler gelöst.

Eine alternative Methode für die Aufreinigung der Sequenzierreaktion erfolgte mit dem ZR DNA Sequencing Clean-up Kit von Zymo Research gemäß Herstellerangaben. Statt ddH<sub>2</sub>O wurde die DNA allerdings mit 20 µl Formamid eluiert.

Eine dritte Möglichkeit war, die Proben automatisiert über einen Pipettierroboter JANUS der Firma PerkinElmer aufzureinigen zu lassen. Hier wurde das Agencourt CleanSEQ System von Beckman Coulter mit magnetischen Beads verwendet, an die die DNA während des Aufreinigungsprozesses reversibel gebunden wurde.

Für die Analyse am Kapillarsequenzierer wurden die Proben in eine Sequenzierplatte überführt. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte anhand der Demo-Software Sequencher 5.0.

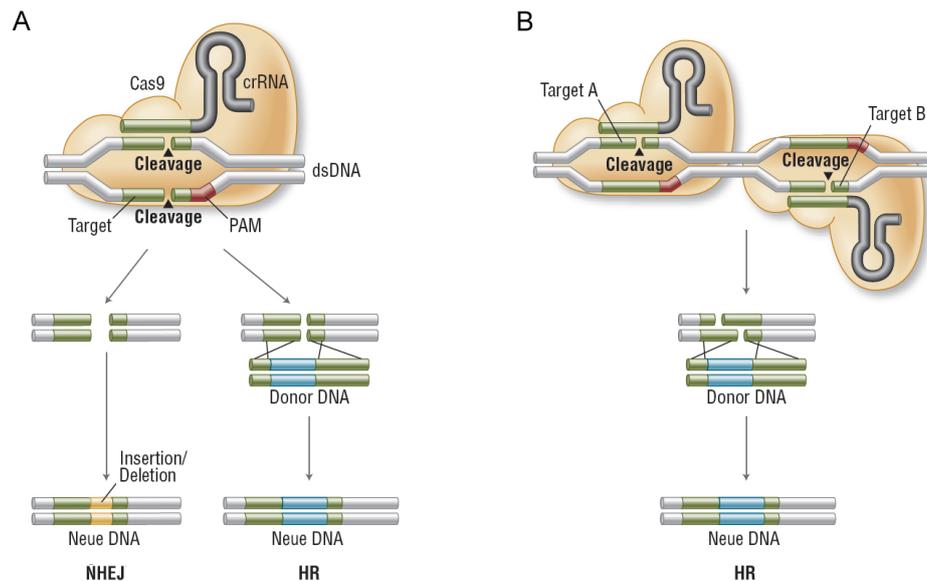
### 3. 8. 7 Exom-Sequenzierung durch *Next-Generation Sequencing*

Für die kommerzielle Anfertigung einer Exom-Sequenzierung (*Whole Exome Sequencing*, WES) wurde gDNA von 1176 zu der Firma BGI geschickt. Die Anreicherung fand mit dem Kit SureSelect Human All Exon 50Mb Kit statt und als Sequenzierplattform diente das Gerät HighSeq2000 von Illumina. Die Auswertung wurde mithilfe der NextGENe-Software von SoftGenetics selbst durchgeführt. Die Filterungsstrategie ist in Tabelle 14 des Ergebnisteils, Abschnitt 4. 1. 3, zusammengefasst, wobei man sich aufgrund der vorliegenden Konsanguinität in der Familie auf homozygote Varianten konzentrierte. Die ermittelten Gene, welche homozygote Varianten ohne dbSNP-Eintrag (dbSNP137) in Exons und/oder an essentiellen Spleißstellen trugen und folglich durch die Vorhersageprogramme *MutationTaster* (Schwarz et al. 2014) und *PolyPhen-2* (Adzhubei et al. 2010) als pathogen eingestuft worden waren, wurden bezüglich ihrer Funktion durch die NCBI- und/oder GeneCards-Datenbank analysiert.

### 3.9 *FAAP100*-Editierung durch das CRISPR/Cas9-System

Die Funktionsweise von CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) und CRISPR-assoziierten (Cas) Genen geht auf das adaptive Immunsystem verschiedener Bakterien und Archaea zurück. Das CRISPR/Cas-System dieser Prokaryoten bietet durch einen RNAi-ähnlichen Mechanismus Schutz vor eindringender DNA, z. B. vor Viren. Der Locus besteht dabei aus kurzen, palindromischen Sequenzwiederholungen (Repeats), zwischen denen variable Sequenzen liegen. Bei diesen sogenannten Spacern handelt es sich um Fremd-DNA, die bei Erstkontakt mit einem Virus in das Genom des Prokaryoten integriert. In der Nachbarschaft sind meist Cas-Gene zu finden. (Makarova et al. 2006, Barrangou et al. 2007) Nach Transkription entsteht eine prä-crRNA, welche mithilfe eines Cas-Proteins in crRNA (CRISPR RNA) prozessiert wird. Diese weist hauptsächlich Sequenzen eines Spacers auf und ist so bei Neuinfektion komplementär gegen die Virus-DNA gerichtet. Zusammen mit einem Proteinkomplex, welcher abhängig vom CRISPR/Cas-Typ ist, kommt es nun zum Abbau der Target-DNA (Brouns et al. 2008, Makarova et al. 2011).

Basierend auf diesem Mechanismus wurde ein Verfahren zur Genom-Editierung durch das CRISPR/Cas9-System entwickelt. Die Endonuklease Cas9 stammt meist aus *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) oder *Staphylococcus aureus* (SaCas9). Sie wird durch die Leit-RNA (*guide* RNA, gRNA) spezifisch an den Target-Locus gesteuert, um dort mithilfe der Nukleasedomänen HNH und RuvC Doppelstrangbrüche in der DNA zu erzeugen (Gasiunas et al. 2012, Jinek et al. 2012). Die gRNA setzt sich dabei aus einem zweiteiligen System zusammen, der crRNA und der tracrRNA (*trans-activating* CRISPR RNA). Über einen Linker verknüpft können beide Teile eine einzelne RNA ergeben, welche als sgRNA (*single-guide* RNA, sgRNA) bezeichnet wird. Die crRNA beinhaltet das sogenannte Protospacer-Element, dessen Sequenz auch in der DNA als Target zu finden ist. In der Ziel-DNA muss angrenzend an dieses Element eine PAM-Sequenz (*Protospacer Adjacent Motif*) vorliegen, denn nur dann kann die Nuklease schneiden. Die PAM-Sequenz ist hingegen nicht in der sgRNA und folglich auch nicht in den Spacern des Bakteriums vorhanden. Dies gilt als Schutzmechanismus vor der Zerstörung des eigenen Genoms durch die Nuklease. Die Sequenz des PAMs ist abhängig von der Art des Bakteriums. Bei *S. pyogenes* setzt sie sich aus 5'-NGG zusammen. Die erzeugten Doppelstrangbrüche werden nun über die HR oder das NHEJ repariert (Abbildung 11A). Ist kein Reparatur-Template vorhanden, läuft die Reparatur über das NHEJ ab. Dieser Mechanismus ist allerdings fehlerbehaftet. Meist kommt es zu Insertionen oder Deletionen, welche zur Verschiebung des Leserasters und so zu vorzeitigen Stopcodons führen können. Bietet man einer Zelle, z. B. durch einen weiteren Vektor, ein Reparatur-Template an, kann eine fehlerfreie Reparatur über die HR ablaufen. Dieses Template kann auch modifiziert werden, um zielgerichtet bestimmte Varianten in ein Gen einzufügen. (Ran et al. 2013b, Ran et al. 2015)



**Abbildung 11: Mechanismus des CRISPR/Cas9- und des CRISPR/Cas9n-Systems. A: Gen-Editierung durch die Cas9-Nuklease.** Die Nuklease Cas9 (orange) wird durch die gRNA (*guide* RNA), die sich aus der tracrRNA (*trans-activating* CRISPR RNA) und der crRNA (CRISPR RNA, grau) zusammensetzt, zum Target-Locus gesteuert. Die tracrRNA beinhaltet das Protospacer-Element (grün), dessen Sequenz ebenfalls am Target-Locus vorhanden ist und dort an die PAM-Sequenz (*Protospacer Adjacent Motif*, rot) angrenzt. Durch die Cas9-Nuklease werden DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt. Ist kein Reparatur-Template vorhanden, erfolgt die Reparatur über das *Non-homologous end joining* (NHEJ). Durch diesen Mechanismus können Insertionen oder Deletionen (gelb) entstehen, wodurch das Target-Gen ausgeknockt werden kann (links). Liegt dagegen eine Donor-DNA vor, wird der DNA-Schaden über die Homologe Rekombination (HR) repariert (rechts). Durch das Reparatur-Template können während der HR zudem definierte Mutationen bzw. Knock-ins in das Target-Gen inseriert werden (blau). **B: Gen-Editierung durch zwei Cas9n-Nickasen.** Durch eine Mutation in Cas9 können Cas9n-Nickasen entstehen, die spezifisch DNA-Einzelstrangbrüche erzeugen. Verwendet man zwei Cas9n-Nickasen mit unterschiedlich komplementären Protospacer-Elementen für Target A sowie Target B, können DNA-Doppelstrangbrüche mit überstehenden Enden generiert werden, wodurch eine Reparatur über die HR gefördert wird. Durch ein Reparatur-Template (Donor DNA) können definierte Mutationen bzw. Knock-ins in das Target-Gen inseriert werden (blau). *Cleavage*: Einschnitt. dsDNA: Doppelstrang-DNA. *Veränderter Nachdruck von www.neb.com (2017) mit Genehmigung von New England Biolabs, Inc.*

Durch eine Substitution in der RuvC I Domäne konnte die Nuklease SpCas9 zur Nickase SpCas9n modifiziert werden, welche Einzelstrangbrüche in der DNA erzeugt. Werden zwei SpCas9n-Nickasen eingesetzt, die leicht versetzt an jeweils den anderen DNA-Strang binden, können Doppelstrangbrüche mit überhängenden Enden generiert werden (Abbildung 11B). Dadurch wird die HR eingeleitet, die bei Vorliegen eines modifizierten Templates spezifisch Mutationen in ein Gen einbauen kann. (Cong et al. 2013, Ran et al. 2013a)

Es wurde angestrebt, FAAP100-defiziente Zelllinien zu generieren, die ähnlich wie 1176 Mutationen in Exon 5 aufweisen sollten. Dabei orientierte man sich an dem Protokoll von Ran et al. (Ran et al. 2013b). Mithilfe des CRISPR Design Tools wurden Protospacer-Elemente ausgewählt, um sie in die Vektoren pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) und pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) zu klonieren. Diese wurden jeweils mit dem Enzym BpiI/BbsI geschnitten (Tabelle 9, Mitte), wodurch Überhänge entstanden. Diese (5'-CACC für den *forward*-Strang bzw. 5'-AAAC für den *reverse*-Strang) wurden den Protospacer-Elementen während des Designs hinzugefügt. Um

diese Oligonukleotide aneinanderzubinden, wurden sie sowohl in *forward*- als auch in *reverse*-Richtung bestellt. Sie wurden mit cr1-cr4 benannt und sind in Tabelle 8 aufgelistet.

**Tabelle 8: Protospacer-Elemente.**

Label	Protospacer-Elemente 5'→3'	DNA-Strang	FAAP100 Exon	Anwendung	generierte Zelllinien
cr1	GGCGGTTGACCAGCGGAACA	<i>forward</i>	5	SpCas9	–
cr2	GCTGCTGTTCTCTAGCACGC	<i>reverse</i>	5	SpCas9 & SpCas9n	Cr21
cr3	GGGGTGGACCCTGTGCATCC	<i>forward</i>	5	SpCas9 & SpCas9n	Cr10, Cr12, Cr21
cr4	CGAGTCCAGGTCGAGAGCAC	<i>reverse</i>	5	SpCas9	–
crA2	GCTGTTCTCTAGCACGCAGG	<i>reverse</i>	5	SpCas9n	–
HAP1	GCTGCATCTTCCATCGGGCA	<i>reverse</i>	3	SpCas9	HAP1 FAAP100 <sup>-/-</sup>

HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>: kommerziell erworbene Zelllinie, Cas9-Nuklease: SpCas9 (PX459)-Vektor, Cas9n-Nickase: SpCas9n (PX462)-Vektor, Cr21 wurde durch zwei PX462-Vektoren, die cr2 bzw. cr3 enthielten, generiert.

Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden so in ddH<sub>2</sub>O gelöst, dass sie eine Konzentration von 100 µM aufwiesen. Anschließend wurden sie aneinandergebunden und dabei gleichzeitig phosphoryliert (Tabelle 9, links). Während des Verdau von PX459 bzw. PX462 durch BpiI/BbsI wurden jeweils nur 18 bp aus den Vektoren herausgeschnitten (Tabelle 9, Mitte). Diese kurzen DNA-Fragmente konnten während der Plasmid-Aufreinigung über eine Säule mit dem innuPREP DOUBLEpure Kit von Analytik Jena entfernt werden, da sie wegen ihrer kleinen Größe nicht von der Silica-Membran gebunden wurden. Nach Konzentrationsbestimmung der Vektoren und der Protospacer-Elemente, welche mit ddH<sub>2</sub>O 1:100 verdünnt worden waren, wurden mit dem Ligation Calculator von NEB (molare Ratio 3:1) die einzusetzenden Mengen für die Ligation berechnet (Tabelle 9, rechts).

**Tabelle 9: Ansätze und Cyclerprogramme für die Klonierung der Protospacer-Elemente (PE) in die Cas9-Nuklease- (PX459) bzw. Cas9n-Nickasevektoren (PX462).**

<u>Annealing der Protospacer-Elemente (PE)</u>		<u>Verdau der Vektoren PX459 bzw. PX462</u>		<u>Ligation der PE in PX459 bzw. PX462</u>	
Komponente	Menge	Komponente	Menge	Komponente	Menge
PE forward 100 µM	1 µl	PX459 bzw. PX462	1 µg	PX459 bzw. PX462	76 ng
PE reverse 100 µM	1 µl	FastDigest Puffer 10x	2 µl	PE	0,5 ng
T4 Ligasepuffer 10x	1 µl	Enzym BpiI	1 µl	T4 Ligase	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 µl	ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl	T4 Ligasepuffer 10x	2 µl
				ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl
<u>Cyclerprogramm</u>		<u>Cyclerprogramm</u>		<u>Cyclerprogramm</u>	
Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
37 °C	30 min				
95 °C	5 min	37 °C	5 min	16 °C	über Nacht
15x td 95-25 °C	pro min -5 °C	65 °C	10 min	65 °C	10 min
10 °C	∞				

Die nachfolgende Transformation erfolgte mit den chemisch kompetenten Bakterien One Shot TOP10 von Invitrogen (Abschnitt 3. 2. 2). Von jeder LB-Agar-Platte wurden 2-3 Klone gepickt,

woraus mithilfe des Zyppy Plasmid Miniprep Kits von Zymo Research DNA gewonnen werden konnte. Der Erfolg der Ligation wurde durch PCR und Sanger-Sequenzierung überprüft. Anschließend wurden positive Plasmide durch eine Maxipräparation angereichert, sodass sie für eine Transfektion der Zellen verwendet werden konnten.

Als Reparatur-Template-Vektor wurde das Plasmid pBlueScript II SK (+) ausgewählt, in das Exon 5 mit c.1624A>C und angrenzenden Intronbereichen der *FAAP100*-gDNA kloniert wurde. Dafür wurde mithilfe der Primer CRISPR\_blunt\_e4for und CRISPR \_blunt\_i5rev gDNA von 1176 amplifiziert und über *Blunt-End*-Klonierung in den Vektor pBlueScript II SK (+) eingebracht. Alternativ wurde als Reparatur-Template-Vektor das Plasmid pCMV/Zeo genutzt, in das *FAAP100* Exon 5 mit c.1624A>C und angrenzenden Intronbereiche aus pBlueScript II SK (+) umkloniert wurde.

Für die Transfektion wurden 130 000 U2OS oder 50 000 HEK293T-Zellen in ein 24 Well-Format eingesät. Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamin 3 000 von Invitrogen gemäß Herstellerangaben. Dabei wurden entweder der Vektor PX456 alleine, der Vektor PX456 und der Template-Vektor oder jeweils zwei Vektoren PX462 mit dem Template-Vektor transfiziert. PX456 bzw. PX462 enthielten jeweils ein Protospacer-Element. Drei Tage nach der Transfektion wurde mit der Puromycin-Selektion (1,0 µg/ml) begonnen. Die Zellen sollten so lange mit dem Antibiotikum behandelt werden, bis alle unbehandelten Kontrollzellen gestorben waren. Da die Addgene-Datenbank, von der die Vektoren bezogen worden waren, allerdings während des Versuchsablaufes auf ihrer Homepage bekannt gab (<http://www.addgene.org/48139/> und <http://www.addgene.org/48141/>), dass die Puromycin-Kassette in beiden Plasmiden eine Punktmutation trägt, welche die Wirksamkeit der Resistenz herabsetzt, wurde in weiteren Ansätzen auf eine Selektion verzichtet. So wurde direkt nach der Transfektion mit einer Einzelzell-Isolierung begonnen. Mithilfe einer Verdünnungsreihe wurden 0,3 Zellen/Well in ein 96 Well-Format eingesät. Waren Einzelzell-Klone zu erkennen, wurden sie weiter beobachtet und bei Bedarf in ein größeres Platten- bzw. Flaschenformat umgesetzt. Waren genug Zellen vorhanden, wurde aus einem Teil der Zellen gDNA isoliert und das 5. Exon von *FAAP100* per PCR und Sanger-Sequenzierung auf Mutationen überprüft.

Für eine Off-Target-Analyse wurden verschiedene CRISPR/Cas9-Tools sowie BLAST und BLAT (Altschul et al. 1990, Kent 2002) verwendet, welche in Tabelle 10 aufgelistet werden.

**Tabelle 10: Genutzte Vorhersageprogramme zur Off-Target-Analyse der eingesetzten sgRNAs.**

CRISPR/Cas9-Tool	Quelle
CRISPR Design Tool <sup>1</sup>	Zhang Lab, MIT ( <a href="http://crispr.mit.edu/">http://crispr.mit.edu/</a> )
CRISPR Finder <sup>2</sup>	Sanger Institute ( <a href="http://www.sanger.ac.uk/htgt/wge/search_by_seq?s_eq_block=&amp;bulk_species=Grch38">http://www.sanger.ac.uk/htgt/wge/search_by_seq?s_eq_block=&amp;bulk_species=Grch38</a> )
CHOPCHOP <sup>3</sup>	Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University ( <a href="https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/index.php">https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/index.php</a> )
E-CRISP <sup>4</sup>	German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg ( <a href="http://www.e-crisp.org/E-CRISP/">http://www.e-crisp.org/E-CRISP/</a> )
CCTOP <sup>5</sup>	Centre for Organismal Studies (COS), Heidelberg University ( <a href="http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/index.html">http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/index.html</a> )
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) <sup>6</sup>	National Center for Biotechnology Information (NCBI) ( <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&amp;PAGE_TYPE=BlastSearch&amp;LINK_LOC=blasthome">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&amp;PAGE_TYPE=BlastSearch&amp;LINK_LOC=blasthome</a> )
BLAST-like alignment tool (BLAT) <sup>7</sup>	UCSC Genome Informatics Group (UCSC) ( <a href="https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start">https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start</a> )

1 (Ran et al. 2013b), 2 (Hodgkins et al. 2015), 3 (Montague et al. 2014), 4 (Heigwer et al. 2014), 5 (Stemmer et al. 2015), 6 (Altschul et al. 1990), 7 (Kent 2002)

### 3. 10 Autozygotie-Kartierung

Mithilfe des BeadChips SNP-Array HumanHap300v2\_A von Illumina, auf dem 300 000 in der dbSNP-Datenbank eingetragene SNPs verzeichnet waren, konnten genomweite SNP-Genotypen für die Eltern und den Bruder von 1176 generiert werden. Die Genotypisierung wurde von Thomas Bettecken, München, durchgeführt. Die Ergebnisse wertete ich mit dem Programm AutoSNPa von Ian Carr, University of Leeds, aus (Carr et al. 2006). Dabei wurde 1176 als Patient definiert und die Genotypen der einzelnen Familienmitglieder untereinander verglichen. Homozygote Bereiche, die sich zwischen dem Patienten und den Allelen der Familienmitglieder unterschieden, wurden hervorgehoben. Da innerhalb der Familie eine Konsanguinität vorlag, war davon auszugehen, dass das unbekannte Krankheitsgen in einem solchem homozygoten Genombereich liegen würde. Mögliche Gene in diesen Bereichen, die in die DNA-Reparatur im Allgemeinen und in den FA-Signalweg im Besonderen involviert waren, wurden mithilfe der UniProt- und/oder GeneCards-Datenbank herausgefiltert. Anschließend konnten diese Gene durch Sanger-Sequenzierung oder durch Analyse der WES-Daten auf mögliche Varianten hin überprüft werden.

### 3. 11 Proteinanalytische Methoden

#### 3. 11. 1 Isolierung von Proteinen

##### 3. 11. 1. 1 Isolierung von Gesamtprotein

16 h vor der Proteingewinnung wurden 40 ng/ml MMC zu den Zellen gegeben und diese bis zur Zellernte im Brutschrank inkubiert. In einigen Fällen blieben Zellen auch unbehandelt. Nachdem

sie abgelöst worden waren, wurde gemäß dem Protokoll *Procedure for Lysing Cell Suspension Cultures* des Pierce IP Lysepuffers der Firma Thermo Scientific vorgegangen. Dabei wurden, anders als angegeben, für die Zellyse nur 50-60 µl des Puffers, welcher zuvor mit Protease Inhibitor Cocktail (1:100) versetzt worden war, auf 50 mg Zellpellet verwendet. Für die FANCD2-Degradierungsstudie wurden Proteine der U2OS-Zellen wie folgt extrahiert: 15-minütige Inkubation des Zellpellets auf Eis mit 400 µl hypotonischem Puffer (0,5 M HEPES pH 7,9, 1 M KCl, 0,5 M EDTA pH 8,0, 0,1 M EGTA pH 8,0, 2 M DTT, 0,1 M PMSF, ad 400 µl ddH<sub>2</sub>O, Protease Inhibitor Cocktail 1:100), Zugabe von 25 µl NP-40, Zugabe von 400 µl Lysispuffer (0,5 M HEPES pH 7,9, 1 M NaCl, 0,1 M EDTA pH 8,0, 0,1 M EGTA pH 8,0, 20 % Glycerol, 2 M DTT, 0,1 M PMSF, ad 400 µl ddH<sub>2</sub>O, Protease Inhibitor Cocktail 1:100) und Inkubation auf dem Drehrad bei 4 °C für 1 h. Zentrifugation des Lysats bei ca. 13 000 x g für 10 min bei 4 °C.

### 3. 11. 1. 2 Fraktionierung

Um Proteine aus bestimmten Kompartimenten der Zelle zu isolieren wurden zwei unterschiedliche Kits verwendet. Für Gewinnung der zytoplasmatischen Extrakte fand das Kit NE-Per Nuclear and Cytoplasmatic Extraction von Thermo Scientific Verwendung. Kern- sowie Chromatin-gebundene Extrakte wurden mithilfe des Subcellular Protein Fractionation Kits von Thermo Scientific isoliert. Dabei wurde weitestgehend gemäß Herstellerangaben vorgegangen. In der Menge (Verwendung von nur 50 % der angegebenen Volumina) und der Inkubationszeiten (Verdopplung der Zeitangaben) wurde vom Protokoll des Subcellular Protein Fractionation Kits abgewichen. Zudem wurde nach Isolierung des Membranextraktes, welcher verworfen wurde und daher als Waschschrift anzusehen war, ein zweiter Waschschrift mit PBS durchgeführt. Bevor die Lyse Chromatin-gebundener Proteine im Wasserbad bei 37 °C stattfand, wurde das Pellet dreimal mit PBS gewaschen.

### 3. 11. 2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteinlysate und -extrakte wurde anhand des Geräts Qubit Fluorometer von Invitrogen bestimmt. Dabei kam das *Qubit Protein Assay Kit* zum Einsatz, welches gemäß Herstellerprotokoll angewandt wurde. Da allerdings die mögliche Maximalkonzentration dieses Kits bei 5 µg/µl liegt, wurde für die Messung eine kleine Menge der Proteine 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und anschließend der ermittelte Wert mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

### 3. 11. 3 Immunblot

#### 3. 11. 3. 1 SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese

Für eine Größenauftrennung der Proteine über eine SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden kommerzielle Polyakrylamidgele des NuPAGE Gelsystems (Invitrogen) verwendet. Für einen FAAP100- und FANCD2-Immunblot wurden die Proteine mithilfe eines NuPAGE 7 % Tris-Acetat (TA) Protein Gels aufgetrennt. Proteine, die aus verschiedenen

Zellkompartimenten gewonnen worden waren, sowie Proben des RNA-Interferenz-Experimentes wurden auf ein NuPAGE 4-12 % Bis-Tris (BT) Protein Gel aufgetragen. Die Auswahl war abhängig von der Größe der zu untersuchenden Proteine bzw. den Proteinen, die als Ladungskontrolle dienen sollten. Es wurde nach dem Protokoll für denaturierende Proben vorgegangen und hierfür 5 µl NuPAGE LDS Sample Buffer (4X), 2 µl NuPAGE Reducing Agent (10X), 20-30 µg Protein für einen FAAP100-Immunblot bzw. 40-50 µg Protein für einen FANCD2-Immunblot gemischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Der Denaturierungsschritt fand für 10 min bei 70 °C in einem Thermocycler statt. Zusätzlich zu den Proben wurde auf jedes Gel ein angefärbter Größenstandard (Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standard von Bio-Rad Laboratories GmbH) mit aufgetragen. Die Gelkassette war zuvor in eine Elektrophoresekammer eingespannt worden, welche an ein Kühlsystem angeschlossen und mit NuPAGE Tris-Acetat oder MES SDS Running Buffer (1x) gefüllt worden war. Die Laufzeit betrug etwa 2 h bei 150 V (TA-Gele) bzw. 200 V (BT-Gele). Die Auftrennung für FANCD2-Immunblots dauerte hingegen ca. 6,5 h bei 150 V bzw. wurde über Nacht bei 70 V durchgeführt.

### **3. 11. 3. 2 Proteintransfer**

Mit einem Spatel wurde die Plastikkassette aufgebrochen und die Taschen sowie die untere Kante des Gels abgetrennt. Die Proteine wurden entweder durch Dry- oder Wet-Blotting-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen.

Für das Dry-Blotting wurde das iBlot 2 Gel-Transfergerät der Firma Life Technologies verwendet und gemäß Herstellerangaben vorgegangen. Für den Transfer verwendete man das Programm P0.

Wet-Blotting kam für die FAAP100-Immunblots in Abbildung 23B sowie in Abbildung 58A zum Einsatz. Hierfür wurde die PVDF-Membran durch kurzes Schwenken in 100 % Methanol aktiviert und das Gel in 1x NuPAGE Transferpuffer, zu welchem 5 % Methanol hinzugegeben worden war, äquilibriert. Das Blotsandwich (1 Schwamm, 1 dickes Filterpapier, 2 dünne Filterpapiere, Gel, PVDF-Membran, 2 dünne Filterpapiere, 1 dickes Filterpapier, 1 Schwamm) setzte man in ein Blotmodul von Serva, welches mit Transferpuffer gefüllt und an ein Kühlsystem angeschlossen wurde. Der Protein-Transfer fand bei 70 V für 2 h statt.

### **3. 11. 3. 3 Immunblotanalyse**

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die PVDF-Membran für mindestens 1 h (Raumtemperatur) oder über Nacht (4 °C) in 5 % Milch/PBS-T gegeben. Für die Verwendung einzelner  $\alpha$ -FANCB-Antikörper wurde TBS-T statt PBS-T und/oder BSA statt Milchpulver verwendet. Je nach Protein betrug die Inkubationszeit mit dem Primärantikörper, welcher in 5 % Milch/PBS-T verdünnt wurde, 1-3 h bei Raumtemperatur oder sie fand über Nacht bei 4 °C statt. Alle weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurde drei Mal mit PBS-T für 15 min gewaschen, bevor der Sekundärantikörper für 1-1,5 h auf die Membran gegeben wurde.

Nach einem viermaligen Waschschrift mit PBS-T für je 15 min konnten die gebundenen Antikörper detektiert werden. Hierfür wurde das Immobilon Western HRP Substrat der Firma Merck Millipore bzw. das Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate von Takara Bio Clontech verwendet. Es wurden das Luminol-Reagenz und die Peroxide-Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Da der Sekundäantikörper mit HRP gekoppelt war, kam es in Anwesenheit der Peroxide-Lösung zu einer Oxidation des Luminols und folglich zu einer Chemolumineszenz. Diese konnte mit einer CCD-Kamera im Gerät MicroChemi der Firma DNR Bio-Imaging Systems Ltd aufgenommen werden. Gegen Austrocknung wurde die Membran während der Aufnahme mit einer Folie geschützt.

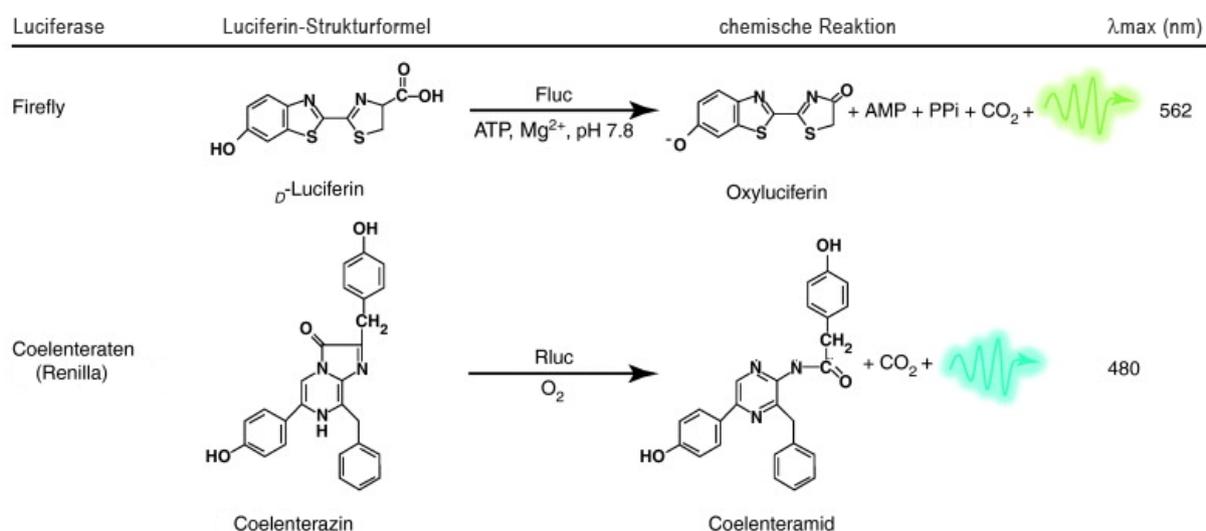
### 3. 11. 3. 4 Entfernung von Antikörpern

Für weitere Analysen war es nötig, die gebundenen Antikörper von der PVDF-Membran zu entfernen. Dies wurde mithilfe des Restore Western Blot Stripping-Puffers von Thermo Scientific erreicht, welches bei etwa 42 °C für 20-30 min auf die Membran gegeben wurde. Reste des Puffers wurden durch einen Waschschrift mit PBS-T entfernt.

## 3. 11. 4 Untersuchungen zu Proteininteraktionen

### 3. 11. 4. 1 Mammalian Two/Three-Hybrid System

Die Methode des *Mammalian Two/Three-Hybrid* (M2/3H) Systems basiert auf einem Dual-Luciferase Assay. Luciferasen sind Enzyme, die in Anwesenheit von O<sub>2</sub> eine Oxidation von Luciferinen katalysieren. Bei dieser Reaktion kommt es zu einer Biolumineszenz, die mithilfe eines Luminometers gemessen werden kann. Für einen Dual-Luciferase Assay werden zwei Luciferasen eingesetzt. Die Firefly Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* und die Renilla Luciferase aus der Oktokorallenart *Renilla reniformis*. Die Reaktionen der beiden Luciferasen sind in Abbildung 12 zu sehen. (Badr & Tannous 2011)



**Abbildung 12: Biolumineszenz-Reaktion der Renilla- (Rluc) und Firefly-Luciferasen (Fluc).** Für jede Luciferase ist die chemische Reaktion sowie die Wellenlänge der Lichtemission ( $\lambda_{\max}$ ) gezeigt. *Veränderer Nachdruck von (Badr & Tannous 2011) mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.*

Befinden sich die Luciferase-Gene in Reporterplasmiden, können sie für Expressionsstudien herangezogen werden. Das *Renilla*-Reporterplasmid pGL4.74[hRluc/TK] ist immer aktiv und kann dadurch als Transfektionskontrolle eingesetzt werden. Im Gegensatz dazu befindet sich im *Firefly*-Reporterplasmid pGL4.31[luc2P/CRE/Hygro] vor dem Luciferase-Gen eine GAL4 UAS (*upstream activating sequence*). So kann das Gen nur abgelesen werden, wenn sich an diesen GAL4 abhängigen Promotor eine GAL4 DNA-Bindedomäne (BD) anlagert. Diese befindet sich in dem Vektor pM GAL4 DNA-BD (kurz pM) und muss durch eine Aktivierungsdomäne (AD) angeschaltet werden. Die AD liegt im Vektor pVP16 AD Vektor (kurz pVP16). Sind in den jeweiligen Vektoren Gene vorhanden, bilden diese zusammen mit der DNA-BD bzw. der AD Fusionsproteine. Durch Fusionsproteine, die miteinander interagieren, kommen die DNA-BD und die AD in räumliche Nähe zueinander, sodass die BD aktiviert werden kann und an die GAL4 UAS bindet. So kann die Firefly-Luciferase exprimiert werden und ein Lumineszenz-Signal entstehen.

Die Vektoren pM und pVP16 sowie die Positiv- und Negativkontrollen (pM-p53, pVP16-vCP, pVP16-SV40T) entstammten aus dem Matchmaker Mammalian Assay Kit2 von Takara Bio Clontech. In beide Plasmide waren bereits im Vorfeld von Mitarbeitern des Kooperationspartners Johan de Winter, Amsterdam, jeweils die Gene *FANCB*, *FANCL* und *FAAP100* kloniert und uns zur Verfügung gestellt worden. Die Mutanten von *FAAP100* (*FAAP100<sup>T542P</sup>*, *FAAP100<sup>A138</sup>*) wurden selbst in die Vektoren eingebracht (Abschnitt 3. 2. 1), wobei darauf geachtet wurde, dass sich die Gene im Leserahmen mit der AD bzw. DNA-BD befanden. Aus diesem Grund wurde für den Vektor pM-FAAP100<sup>A138</sup> durch eine Mutagenese-PCR (Abschnitt 3. 8. 3. 4) ein fehlendes Nukleotid eingefügt. Die Luciferase-Reporterplasmide sowie die Positivkontrollen pBIND-MyoD und pACT-Id wurden von Promega bezogen und ein pUC19-Vektor, welcher zum Ausgleichen der Gesamtkonzentration auf insgesamt 1,5 µg DNA/Well verwendet wurde, stammte aus dem Kit der One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli von Invitrogen. Die Plasmide wurden mithilfe des Qubit Fluorometers auf folgende Konzentrationen eingestellt: alle pM- und pVP16-Vektoren auf 25 ng/µl, pGL4.31 und pGL4.74 auf 50 ng/µl und pUC19 auf 245 ng/µl. So war garantiert, dass man für alle Transfektionsansätze gleiche Volumina verwendete. Es wurden 200 000 HEK293T bzw. HEK293T-Zellen, in denen *FANCB* stabil überexprimiert wurde, in eine 12 Well-Platte eingesät. Am nächsten Tag konnten die Zellen mit dem K2 Transfection System von Biontex gemäß Herstellerangaben mit folgenden Mengen transfiziert werden: 0,1 µg pM, 0,1 µg pVP16, 0,16 µg pGL4.31, 0,16 µg pGL4.74 und 0,98 µg pUC19. Pro Vektorkombination wurden Triplikate verwendet. Ein Co-Transfektionsschema des M2H-Systems ist in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11: Co-Transfektionsschema für das M2H-System.**

Zellen ohne Transfektion	pM-FAAP100 <sup>WT</sup> + pVP16-FANCB	pM-FANCL + pVP16-FAAP100 <sup>T542P</sup>	pM-FAAP100 <sup>Δ138</sup> + pVP16-FANCB
pM + pVP16	pM-FANCL + pVP16	pM-FAAP100 <sup>T542P</sup> + pVP16-FANCL	pM-FANCL + pVP16-FAAP100 <sup>Δ138</sup>
pM-FAAP100 <sup>WT</sup> + pVP16	pM + pVP16-FANCL	pM-FANCB + pVP16-FAAP100 <sup>T542P</sup>	pM-FAAP100 <sup>Δ138</sup> + pVP16-FANCL
pM + pVP16-FAAP100 <sup>WT</sup>	pM-FANCL + pVP16-FAAP100 <sup>WT</sup>	pM-FAAP100 <sup>T542P</sup> + pVP16-FANCB	pM-p53 + pvp16-SV40T
pM-FANCB + pVP16	pM-FAAP100 <sup>WT</sup> + pVP16-FANCL	pM-FAAP100 <sup>Δ138</sup> + pVP16	pM-p53 + pVP16-vCP
pM + pVP16-FANCB	pM-FAAP100 <sup>T542P</sup> + pVP16	pM + pVP16-FAAP100 <sup>Δ138</sup>	pM-FAAP100 <sup>WT</sup> + pVP16-FAAP100 <sup>WT</sup>
pM-FANCB + pVP16-FAAP100 <sup>WT</sup>	pM + pVP16-FAAP100 <sup>T542P</sup>	pM-FANCB + pVP16-FAAP100 <sup>Δ138</sup>	pBIND-MyoD + pACT-Id

Neben den dargestellten Kombinationen von pM und pVP16 wurden die Zellen mit den Vektoren pGL4.31, pGL4.74 und pUC19 transfiziert. Alle Kombinationen wurden pro Experiment in Triplikaten angesetzt.

Für das M3H-System konnten die Kombinationsansätze mit FANCB weggelassen werden, da das Protein bereits überexprimiert in den Zellen vorlag. Da für die Isoform FAAP100<sup>Δ138</sup> durch das M2H-System keine Interaktion mit FANCB ermittelt werden konnte und bereits durch FAAP100<sup>WT</sup> gezeigt worden war, dass nur bei einer vorhandenen Wechselwirkung zwischen FAAP00 und FANCB eine Interaktion mit FANCL eingegangen werden kann, wurde für FAAP100<sup>Δ138</sup> auf das M3H-System verzichtet.

Die Kombinationen, die entweder zwei Leervektoren oder jeweils einen Vektor mit Gen und einen Leervektor enthielten, dienten dazu, ungewollte Interaktionen zwischen den Vektoren oder zwischen einem Protein und einem Vektor zu identifizieren. Die Kombination pM-FAAP100<sup>WT</sup> + pVP16-FAAP100<sup>WT</sup> wurde mitgeführt, da bei Ling et al. (Ling et al. 2007) eine Induktion der Luciferase-Expression gegenüber FAAP100 allein gezeigt wird. In dieser Veröffentlichung wird ebenfalls erwähnt, dass nur bei einer Co-Expression von pM-BD-FAAP100<sup>WT</sup> und pVP16-AD-FANCB ein positives Interaktionssignal gemessen werden konnte. Um diese Richtungsabhängigkeit zu prüfen und gleichzeitig falsch-negative Ergebnisse aufgrund von Blockierungen der Domänen auszuschließen, wurden beide Richtungen beachtet (Gen sowohl in pM als auch in pVP16).

Etwa 48 h nach der Transfektion wurden mithilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems von Promega gemäß Herstellerangaben die Lyse der Zellen und die Lumineszenzmessungen durchgeführt. Diese fanden mit je 20 µl Zellysat in schwarzen 96 Well-Messplatten am Mitras LB 940 Luminometer von Berthold Technologies statt. Durch den Injektor wurden zunächst 80 µl des LARII-Reagenzes in die Wells mit Zellysat hinzugefügt. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 s unter Schütteln und anschließend eine 5-sekündige Messung der Firefly-Luciferase-Aktivität. Danach fand die gleiche Abfolge mit dem Stop&Glo-Reagenz über einen weiteren Injektor statt, um die Renilla-Luciferase-Aktivität aufzuzeichnen.

Für die Auswertung der Messergebnisse wurden für die jeweiligen Firefly- bzw. Renilla-Triplikate der Mittelwert gebildet und davon jeweils der Hintergrund (Zellen ohne Transfektion) abgezogen. Anschließend wurde die Ratio Firefly/Renilla berechnet und die ermittelten Werte schließlich auf die Negativkontrollen (Kombination pM-p53 + pVP16-vCP) normalisiert. Da für die Kombinationen aus den Leervektoren untereinander sowie aus Vektor mit einem Gen und Leervektor keine Aktivität nachweisbar war, konnten sie für die Ergebnisdarstellung weggelassen werden. Ebenso wurde wegen einer besseren Übersichtlichkeit auf eine Darstellung der Kombination pM-FAAP100<sup>WT</sup> + pVP16-FAAP100<sup>WT</sup>, für die ebenfalls keine Aktivität messbar war, und die Kombination der Positivkontrollen pBIND-MyoD und pACT-Id von Promega verzichtet.

#### **3. 11. 4. 2 Co-Immunpräzipitation**

Um Proteininteraktionen mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP) nachzuweisen, wurde zunächst eine Überexpression des zu präzipitierenden Proteins erreicht. Da für FAAP100 kein geeigneter Antikörper für eine IP zur Verfügung stand, fiel die Wahl auf einen  $\alpha$ -FANCB-Antikörper. Für die Überexpression wurden die zu untersuchenden Zelllinien mit dem bereits vorhandenem Plasmid pVP16, welches das Fusionsprotein FANCB-AD enthielt, mithilfe der Transfektionsreagenzien Lipofectamine 3000 (Invitrogen) bzw. X-tremeGENE 9 (Roche) transfiziert. Dabei wurden 180 000 Amnion- oder Fibroblastenzellen bzw. 3000 000 HEK293T-Zellen in 6 Well-Platten eingesät und die Transfektion gemäß Herstellerangaben ausgeführt. 16 h vor der Proteinisolierung mit 125-200  $\mu$ l Pierce IP Lysepuffer (Abschnitt 3. 11. 1. 1) wurde 40 ng/ml MMC zu den Zellen gegeben. Diesmal wurde zum Lysepuffer neben dem Protease Inhibitor Cocktail auch DNase I (1:100) hinzugefügt, um möglichen, über DNA vermittelten Interaktionen entgegenzuwirken. Als Input wurden 20  $\mu$ l des Gesamtproteinlysates aufbewahrt und mit der übrigen Menge die IP durchgeführt. Die Kopplung des Antikörpers und das anschließende Herausziehen von FANCB und seinen Interaktionspartnern fand mithilfe des Dynabeads Protein G Immunoprecipitation Kits von Invitrogen statt. Auf den Crosslinking-Schritt wurde verzichtet. Der  $\alpha$ -FANCB-Antikörper wurde in einer Verdünnung 1:30 eingesetzt und für 20 min inkubiert. Die Inkubationszeit nach Proteinzugabe wurde auf 30 min verlängert und anschließend vier Waschschrte durchgeführt. Die Zugabe von NuPAGE LDS Sample Buffer (5  $\mu$ l) und NuPAGE Reducing Agent (2  $\mu$ l) wurde an das Standardprotokoll der SDS-PAGE angeglichen. Gemäß diesem ging man für die weitere Analyse vor.

#### **3. 11. 5 Biochemische Analyse der FANCD2-Monoubiquitinierung**

##### **3. 11. 5. 1 Expression und Aufreinigung der Proteine**

Dieser Versuch wurde von Yanbin Zhang, Miami, nach den im Folgenden aufgeführten Angaben durchgeführt. Die Aufreinigung des ID2-Komplexes war bereits zuvor beschrieben worden (Yuan et al. 2009). Unter Verwendung des Bac-to-Bac Expressionssystems von Invitrogen wurde in High

Five Insektenzellen eine Überexpression von Hexahistidin-getaggten FAAP100<sup>WT</sup>, FAAP100<sup>T542P</sup> und FANCB erreicht, welche durch eine Immunblotanalyse mit einem monoklonalen THE  $\alpha$ -Hexahistidin-Tag-Antikörper von GenScript und dem Pierce ECL-Kit von Pierce bestätigt werden konnte. Die SDS-PAGE wurde zuvor mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt. Daraufhin wurden die Zellen in 25 ml eines hypotonen Puffers (20 mM Hepes, KOH, pH 7,5, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und einem Cocktail mit Protease Inhibitoren (Yuan et al. 2012)) resuspendiert und die Nuklei durch Homogenisierung (Dounce-Homogenisator, 10 Stöße, auf Eis) und anschließende Zentrifugation (4 200 rpm, 4 °C, 6 min) vom Zytoplasma getrennt. Das Pellet mit den Zellkernen wurde in kaltem Extraktionspuffer (20 mM Hepes, KOH pH 7,5, 10 % Saccharose, 420 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und einem Cocktail mit Protease Inhibitoren) gelöst, für 5 min auf Eis inkubiert und bei 4 °C für 1 h abzentrifugiert (16 000 rpm). Der Überstand mit FAAP100<sup>WT</sup> oder FAAP100<sup>T542P</sup> wurde in 1,5x Nickelpuffer A (50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 8,0, 15 % Glycerol, 300 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und einem Cocktail mit Protease Inhibitoren) verdünnt und mit einer Nickel-Säule über einen Imidazol-Gradienten gelöst. Das konzentrierte FAAP100 (Peak bei 150 mM Imidazol) wurde in 100 mM KCl in Puffer Q (50 mM KPO<sub>4</sub> pH 7,4, 0,5 mM EDTA, 0,01 % NP-40, 10 % Glycerol, 2 mM DTT und Protease Inhibitoren) ausgesalzen und auf eine Mono Q-Säule gegeben. Die Mono Q-Fraktion, welche FAAP100 enthielt (Peak bei 280 mM KCl), wurde in 100 mM KCl ausgesalzen und damit eine Mono S-Säule beladen. Die entstandenen Fraktionen mit FAAP100 (Peak bei etwa 250 mM KCl) wurden gepoolt und mit einer Superdex 200 Gelfiltrationssäule (180 mM KCl in Puffer Q) aufgereinigt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte über das Coomassie (Bradford) Protein Assay Reagenz von Pierce. Die Lagerung dieser Proteine erfolgte bei -80 °C in Aliquots. Aufgereinigtes HA-Ubiquitin und UBE1 wurden von Boston BioChem, aufgereinigtes UBE2T von Novoprotein und aufgereinigtes FANCL von SignalChem bezogen.

FANCB, FANCL und FAAP100<sup>WT</sup> wurden zusammen als Komplex aufgereinigt. Hierfür wurde Hexahistidin-getaggtes FANCB, FANCL und FAAP100<sup>WT</sup> eingesetzt und die Aufreinigung analog zum Protokoll der oben genannten FAAP100-Aufreinigung durchgeführt. Eine Aufreinigung des LBP100<sup>T542P</sup>-Komplexes war nicht erfolgreich, was durch eine SDS-PAGE (Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250) und einen Immunblot nachgewiesen wurde.

### 3. 11. 5. 2 Nachstellung der FANCD2-Monoubiquitinierung

10 nM des ID2-Komplexes wurde mit 2,4 nM PBR322 DNA und dem Reaktionspuffer (10 mM Hepes pH 7,5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 % Glycerol, 0,5 mM DTT und 100 mM KCl) gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auf Eis wurde 10 nM UBE1, 1 nM UBE2T, 50 nM HA-getaggtes Ubiquitin, 2 mM ATP und je nach Ansatz 40 nM FANCL, 40 nM FANCB und/oder FAAP100<sup>WT</sup> bzw. FAAP100<sup>T542P</sup> (suboptimale Konzentration von 16 nM für Abbildung 44A bzw. in angegebenen Konzentrationen für Abbildung 44B) hinzugegeben und für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert (Longerich et al. 2014, Rajendra et al. 2014). Anschließend fügte man

10 U der rekombinanten DNase I von Roche hinzu, um DNA zu entfernen, und inkubierte das Gemisch bei 37 °C für 30 min. Mithilfe einer 8%igen SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt und die FANCD2-Monoubiquitinierung durch einen Immunblot nachgewiesen, wofür ein  $\alpha$ -FANCD2-Antikörper von Weidong Wang, Baltimore, benutzt wurde. Es wurde die Ratio monoubiquitiniertes FANCD2/gesamt-FANCD2 (ubiquitiniertes und nicht-ubiquitiniertes FANCD2) bestimmt, um die gemessene Ubiquitinierungseffizienz angeben zu können. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des doppelten t-Tests berechnet.

### 3. 12 Generierung von Tiermodellen

#### 3. 12. 1 $\Delta$ FAAP100-DT40-Zellen

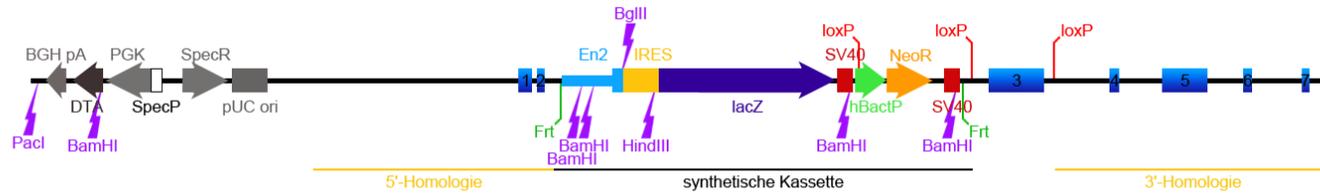
Die  $\Delta$ FAAP100-DT40-Hühnerzellen wurden durch Minoru Takata, Kyoto, generiert. Das Protokoll ist in der Veröffentlichung von Ling et al. beschrieben (Ling et al. 2007). Die anschließenden Versuche wurden von Yutong Xue, Baltimore, durchgeführt. Für die Komplementationsstudie wurden die  $\Delta$ FAAP100-DT40-Zellen mit Expressionsvektoren, in denen *FAAP100<sup>WT</sup>*- bzw. *FAAP100<sup>T547P</sup>*-cDNA der Spezies Huhn inkloniert worden war, mit dem Cell Line Nucleofector Kit T (VCA-1002) transfiziert. In den verwendeten Vektoren (Flag-chFA100 p.c.DNA3.1 puro, chFAAP100-GFP p.c.DNA3.1 Zeo) war zudem entweder die *enhanced*-Variante des grün fluoreszierenden Proteins (*enhanced green fluorescent protein, EGFP*) oder ein FLAG-Tag als Marker enthalten. Durch Selektion mit 0,2  $\mu$ g/ml Puromycin bzw. 500  $\mu$ g/ml Zeocin wurden Zelllinien erzeugt, die stabil die Fusionsproteine EGFP-FAAP100<sup>WT</sup>, EGFP-FAAP100<sup>T547P</sup>, FLAG-FAAP100<sup>WT</sup> oder FLAG-FAAP100<sup>T547P</sup> exprimierten.

Mit diesen Zellen wurden Überlebenskurven angefertigt, deren Protokoll in Abschnitt 3. 6. 2 beschrieben wird. Zudem wurde die FANCD2-Monoubiquitinierung in diesen Zellen mithilfe von Immunblots analysiert. Für die Detektion wurde ein  $\alpha$ -FANCD2-Antikörper von Minoru Takata, Kyoto, sowie ein  $\alpha$ -GFP- und  $\alpha$ -FLAG-Antikörper verwendet.

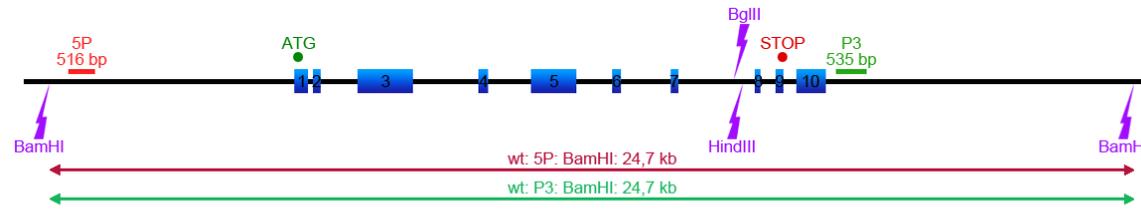
#### 3. 12. 2 *Faap100*<sup>-/-</sup>-Mäuse

Die Herstellung einer 2310003H01Rik<sup>-/-</sup>/*Faap100*<sup>-/-</sup>-Maus (NM\_027980) wurde kommerziell bei der Firma Ozgene, Australien, in Auftrag gegeben. Zunächst sollte die Generierung dieser Tiere mit embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), die in der KOMP-Datenbank (*Knockout Mouse Project*) hinterlegt sind, durchgeführt werden. Dieser Versuch sowie die verwendeten ES-Zellklone (Tabelle 18) werden im Ergebnisteil, Abschnitt 4. 2. 2, näher beschrieben. Da diese Methode nicht erfolgreich war, wurde für einen weiteren Projektansatz der ebenfalls bei KOMP verzeichnete Target-Vektor PRPGS00048\_B\_H06 (Children's Hospital Oakland, BACPAC Resources) genutzt (Abbildung 13A).

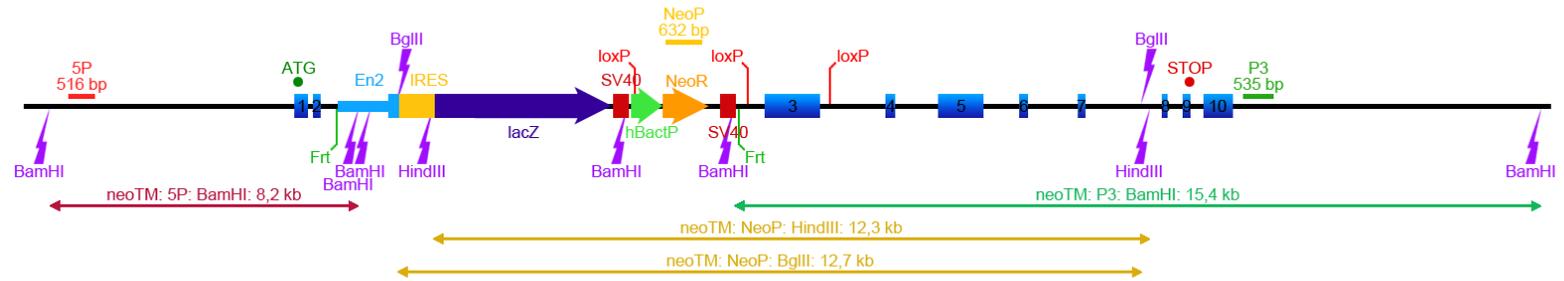
A Target-Vektor PRPGS00048\_B\_H06



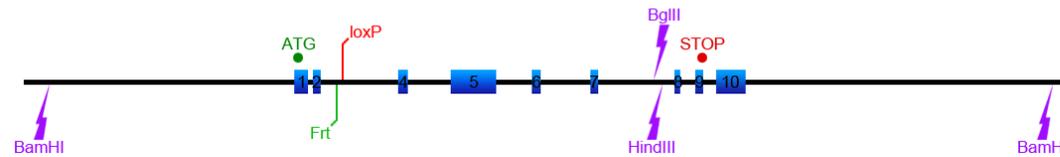
B WT Lokus



C durch den Target-Vektor veränderter Lokus



D KO Lokus



**Abbildung 13: Targeting-Strategie der Faap100<sup>-/-</sup>-Mausgenerierung.** Es sind der verwendete Target-Vektor PRPGS00048\_B\_H06 (Children's Hospital Oakland, BACPAC Resources) (A), der Faap100 Wildtyp (WT)-Locus (B), der Locus, der durch den Targetvektor verändert wurde, (C) sowie der Knockout (KO)-Locus (D) dargestellt. Der Target-Vektor enthält eine synthetische Kasette mit Neomycin-Resistenz (NeoR, orange), die durch Frt-Stellen (grün) flankiert wird. Exon 3 ist von loxP-Stellen (rot) umgeben. Durch die 3'- und 5'-Homologie konnten Vektorbereiche in das Genom der ES-Zellen integrieren. ES-Zellklone wurden mit G418 selektiert und durch Southern Hybridisierung gescreent. Die verwendeten Sonden sind über dem jeweiligen Locus angegeben (5P rot, P3 grün, NeoP orange). Unter den Loci werden mit bidirektionalen Pfeilen die Restriktionsfragmente dargestellt, die unter Verwendung der jeweiligen Sonde entstanden waren. Durch Kreuzung der Maus-Chimären mit Flp-Mäusen wurde die synthetische Kasette, durch Kreuzung mit Cre-Mäusen Exon 3 entfernt. Blaue Quadrate: Exons, violette Blitze: Restriktionsschnittstellen.

Dieser wurde von der Firma Ozgene nochmals überprüft und anschließend durch einen PacI-Verdau linearisiert. So konnte er mittels Elektroporation in C57BL/6 Bruce4 ES-Zellen eingebracht (Kontgen et al. 1993) und durch Homologe Rekombination in das Maus-Genom integriert werden. Die ES-Zellklone wurden mit G418 selektiert und durch Southern Hybridisierung gescreent, indem eine Sonde (5P) genutzt wurde, die an einen Bereich in der 5'-flankierenden Sequenz von Faap100 band. Die gDNA wurde mit BamHI verdaut, sodass das wildtypische Allel eine Größe von 24,7 kb (Abbildung 13B) und das Allel, in das Teile des Vektors integriert waren, eine Größe von 8,2 kb ergab (Abbildung 13C). Die durch diesen Verdau als positiv eingestuften ES-Zellklone wurden einer weiteren Überprüfung durch Southern Hybridisierung unterzogen. Hierfür wurde die Sonde P3, die in der 3'-flankierenden Sequenz von Faap100 lag, genutzt. Der Verdau mit BamHI (Abbildung 13B und C) ergab die Größen 24,7 kb (Wildtyp-Allel) und 15,4 kb (Allel mit integriertem Target-Konstrukt). Eine zufällige Integration des Vektor-konstrukts wurde durch zwei weitere Testverdaue mit HindIII bzw. BglII ausgeschlossen, welche mit einer Sonde gegen die Neomycin-Kasette (NeoP) markiert wurden. Für positive Allele mit integriertem Target-Konstrukt (Abbildung 13C) ergaben sich je Größen von 12,3 kb (HindIII) bzw. 12,7 kb (BglII).

Nach dieser Bestätigung wurden die ES-Zellen in goGermline Blastozysten injiziert und diese in goGermline Mäuse eingepflanzt (Koentgen et al. 2016). Aus diesen gingen Chimären hervor, die mit Flp-Mäusen gekreuzt wurden. Durch deren Flp-Rekombinaseaktivität konnte die synthetische Kasette zwischen den Frt-Stellen herausgeschnitten werden. Um Faap100 Exon 3 zwischen den loxP-Stellen zu entfernen, wurden die erzeugten Tiere mit Cre-Mäusen gekreuzt. Konditionale sowie Knockout-Allele (Abbildung 13D) wurden nach Schwanz- bzw. Ohrbiopsie durch qPCR identifiziert. Die benötigten Primer wurden mithilfe der Programme MacVector und IDT PrimerQuest Tool erstellt. Die 20 µl-qPCR-Reaktion wurde nach dem IDT Standardassay-Protokoll durchgeführt, wobei die Konzentration (1x) für jede Sonde 250 nM und für jedes Primerpaar 500 nM betrug. Für die Amplifikation wurde folgendes Cyclerprogramm (CFX Connect Real-Time PCR Detection System von Bio-Rad Laboratories GmbH) verwendet: 95 °C 3 min, 95 °C 15 s (40 Zyklen), 62 °C 1 min. Alle Reaktionsansätze wurden in Duplikaten in zwei unabhängigen Läufen mit einem Leerwert ohne DNA, einer Wildtyp-Kontrolle und einer STOP-Kontrolle durchgeführt. Die Daten wurden nach der  $\Delta\Delta CT$ -Methode mit der CFX Manager

Software (Version 3.1) von Bio-Rad Laboratories GmbH analysiert, wobei gegen die endogene Kontrolle *Tert* (MGI:1202709) normalisiert wurde.

Um *Faap100<sup>-/-</sup>*-Mäuse zu erhalten, wurden die als *Faap100<sup>+/-</sup>* identifizierten Mäuse für zwei Generationen mit C57BL/6-Mäusen rückgekreuzt und anschließend die daraus hervorgegangenen *Faap100<sup>+/-</sup>*-Mäuse für zwei Generationen untereinander gekreuzt. Der Genotyp dieser Mäuse wurde ebenfalls anhand der bereits beschriebenen qPCR bestimmt.

Für eine mRNA-Expressionsanalyse mittels Reverser Transkriptase-qPCR (RT-qPCR) wurden den Tieren Lymphknoten entnommen, diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Aus dem gefrorenen Gewebe wurde mithilfe des PureLink RNA Mini Kits von ThermoFisher Scientific und eines gleichzeitigen DNase-Verdau mRNA extrahiert. Durch das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von ThermoFisher Scientific wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben, wobei als Kontrolle ein Transkriptions-Ansatz ohne Enzym durchgeführt wurde. Die qPCR-Reaktion wurde so gewählt, um die mRNA-Expression von *Faap100* Exon 3 bis Exon 4 sowie Exon 6 bis Exon 8 nachweisen zu können. Durch die Amplifikation von Exon 3-4 sollte der Knockout von Exon 3, durch die Amplifikation von Exon 6-8 eine stabile Expression des *Faap100*-Transkripts bestätigt werden, obwohl Exon 3 deletiert worden war. Bei jedem Ansatz wurden jeweils ein Leerwert ohne DNA und die nicht-umgeschriebene Kontrolle mitgeführt. Die Amplifikation von *beta-actin* (*Actb*, MGI:87904) diente als endogene Kontrolle. Die qPCR-Reaktionen wurden nach den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die qPCR, die bereits zur Genotypisierung der Mäuse diente. Sie wurden jeweils in Duplikaten pipettiert und in drei unabhängigen Experimente durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode mit der CFX Manager Software (Version 3.1) von Bio-Rad Laboratories GmbH.

Die phänotypischen Analysen wurden von Ozgene und die Histologie-Untersuchungen von einem beauftragten Veterinär nach australischen Ethik-Richtlinien durchgeführt.

Da beide Geschlechter der *Faap100<sup>-/-</sup>*-Mäuse infertil waren, wurden männliche und weibliche *Faap100<sup>+/-</sup>*-Tiere gekreuzt und aus den daraus hervorgegangenen Embryonen murine embryonale Fibroblasten (MEFs) gewonnen. Nachdem die MEFs in Würzburg in Kultur genommen worden waren (Abschnitt 3. 1), konnte der Genotyp durch PCR und Sanger-Sequenzierung bestätigt werden. Eine Chromosomenbruchanalyse (Abschnitt 3. 4) wurde an primären MEFs durchgeführt. Für die Untersuchung des Zellzyklus (Abschnitt 3. 5) und das Anfertigen von Überlebenskurven (Abschnitt 3. 6) wurden immortalisierte MEF-Zellen verwendet.

## 4 ERGEBNISSE

Die Charakterisierung des Fanconi-Anämie (FA)-assoziierten Proteins FAAP100 gliedert sich in drei Teilbereiche. Zunächst wird ein Fetus mit typischem klinischen FA-Phänotyp vorgestellt und Versuchsergebnisse dargelegt, die *FAAP100* als neues kausales FA-Gen einstufen. Daraufhin erfolgte eine nähere Charakterisierung des Proteins. In diesem Rahmen wurden Tiermodelle – im Besonderen ein Mausmodell – generiert, welche im zweiten Abschnitt behandelt werden. Anschließend werden Nachweise über die Existenz verschiedener FAAP100-Isoformen sowie deren funktionelle Bedeutung erbracht.

### 4.1 *FAAP100* als kausales Gen für FA

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden bisher nicht zugeordnete FA-Patientenzelllinien auf mögliche kausale FA-Mutationen hin untersucht (Kuehl 2011). Während des Screenings konnte bei einer FA-Zelllinie im Gen *FAAP100* die homozygote Missense-Mutation c.1624A>C ermittelt werden. Dieser Teil der Arbeit widmet sich den sich daran anschließenden Untersuchungen. Um die Vollständigkeit zu wahren, wird der Fall hier in seiner Gesamtheit dargestellt.

#### 4.1.1 Falldarstellung, Stammbaumanalyse und Einordnung im FA-Signalweg

Bei der im Folgenden vorgestellten FA-Zelllinie handelt es sich um Amnionzellen, die während einer Fruchtwasseruntersuchung in der 22. Schwangerschaftswoche gewonnen, anschließend kultiviert und immortalisiert worden waren. Die primären Amnionzellen stammten von dem weiblichen Fetus 1176 ab, bei dem zuvor im Rahmen einer Schwangerschaftsvorsorge mehrere Fehlbildungen bei einer Ultraschalluntersuchung aufgedeckt worden waren. Diese sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

**Tabelle 12: Während einer Ultraschalluntersuchung ermittelte Auffälligkeiten bei Fetus 1176.**

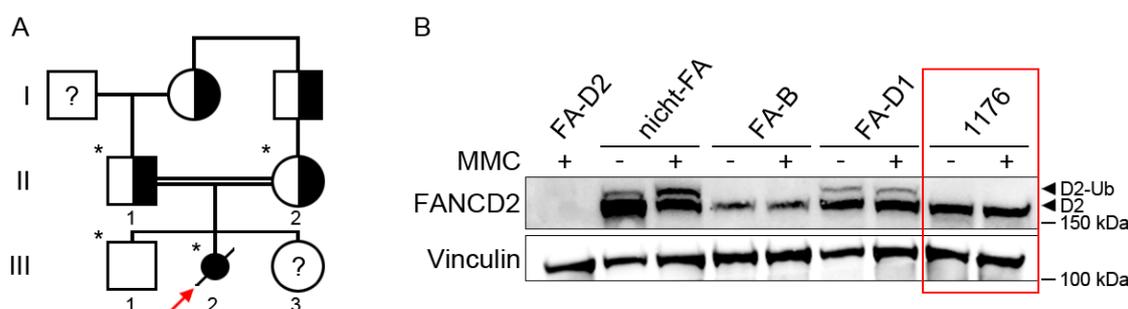
Hydrozephalus internus	kleiner Ausflusstrakt mit Ventrikelseptumdefekt
Duodenalstenose mit Double-Bubble-Phänomen	singuläre Nabelarterie rechts
Radiusedaplasie rechts	pathologischer maternaler Doppler

Hieraus wurde die Indikation für die bereits erwähnte Fruchtwasserentnahme gestellt, um aus den gewonnenen Amnionzellen eine Chromosomenpräparation anfertigen und andere Untersuchungen durchführen zu lassen. Der aufgrund des Fehlbildungsmusters naheliegende Anfangsverdacht auf das Vorliegen von FA stand in Übereinstimmung mit einer deutlich erhöhten Rate an Chromosomenbruchereignissen. Diese Annahme konnte mithilfe einer Zellzyklusmessung bestätigt werden. Hierbei zeigten die Amnionzellen bereits spontan einen erhöhten G2-Phase-Arrest (20,8 %) im Vergleich zu nicht-FA-Zellen (10,6 %), welcher nach MMC-Behandlung auf 59,1 % (bei nicht-FA-Zellen auf 11,2 %) anstieg (Daten nicht gezeigt). Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit transformierten Amnionzellen die Chromosomenbruchanalyse sowie die Zellzyklusmessung wiederholt, welche den zellulären FA-Phänotyp der Diagnostikuntersuchung

bestätigen konnten. Diese selbst generierten Daten sind in den Abschnitten 4.1.7.2 (Zellzyklusanalyse) sowie 4.1.7.3 (Chromosomenbruchanalyse) dargestellt. Auch durch Überlebenskurven konnte der zelluläre FA-Phänotyp der Zelllinie 1176 bestätigt werden. Diese Daten sind in Abschnitt 4.1.7.4 zu finden.

Die gravierenden Fehlbildungen veranlassten die Eltern des Fetus 1176 dazu, sich gegen eine Fortsetzung der Schwangerschaft zu entscheiden.

Wie der in Abbildung 14A dargestellte Stammbaum der Familie zeigt, lag innerhalb der Familie eine Konsanguinität vor, da es sich bei den Eltern (II.1 und II.2) um Cousin und Cousine ersten Grades handelte. Aus der Ehe gingen neben dem Fetus 1176 (III.2) zwei gesunde Geschwisterkinder hervor, ein älterer Bruder (III.1) und eine jüngere Schwester (III.3). DNA der jüngeren Schwester sowie der Großeltern des Indexpatienten stand für molekulargenetische Untersuchungen nicht zur Verfügung.

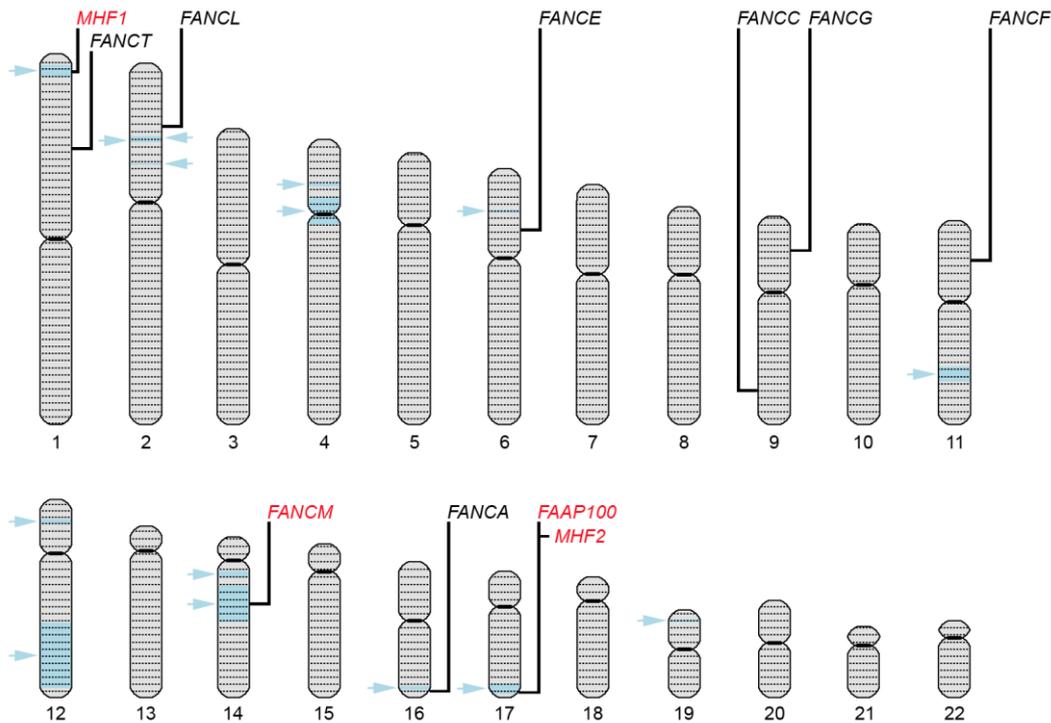


**Abbildung 14: Stammbaumanalyse und *upstream*-Klassifikation des Fetus 1176 im FA-Signalweg. A: Stammbaum der Familie des Fetus 1176.** Vater (II.1) und Mutter (II.2) sind Cousin und Cousine ersten Grades. Aus dieser Verwandtenehe gingen neben dem Indexpatienten 1176 (III.2, roter Pfeil) zwei weitere gesunde Kinder hervor (III.1 und III.3). Quadrat: männlich, Kreis: weiblich, ausgefüllte Symbole: gesunde (weiß) bzw. kranke (schwarz) Individuen, halb ausgefüllte Symbole: Konduktoren, \*: genetisch gesicherter Genotyp, ?: unbekannter Genotyp. **B: FANCD2-Immunblot.** Zur *upstream*- bzw. *downstream*-Eingruppierung der FA-Zelllinie 1176 wurden Proteinlysate der transformierten Amnionzellen zusammen mit Lysaten bekannter FA-Komplementationsgruppen sowie einer nicht-FA-Kontrolle durch einen FANCD2-Immunblot analysiert. Für den Fetus 1176 (roter Rahmen) konnte nur nicht-monoubiquitiniertes FANCD2 (D2) nachgewiesen werden. Vinculin diente als Ladungskontrolle. D2-Ub: monoubiquitiniertes FANCD2, kDa: Kilodalton.

Um eine Komplementationsgruppenzuordnung vorzunehmen, wurde mithilfe von Proteinlysaten der Zelllinie 1176 ein FANCD2-Immunblot angefertigt. Im Gegensatz zu einem mitgeführten nicht-FA-Kontrollprotein konnte für 1176 nur die nicht-monoubiquitinierte Isoform von FANCD2, analog zu Proteinlysate einer FA-B-Zelllinie, nachgewiesen werden (Abbildung 14B). Somit wurde die Zelllinie 1176 als *upstream* eingestuft. Orientierende retrovirale Komplementationsanalysen, die im Vorfeld der eigenen Studie durchgeführt und mithilfe von FANCD2-Immunblots ausgewertet worden waren (Daten nicht gezeigt), ergaben, dass *FANCA*, *-C*, *-E*, *-F*, *-G* und *-L* als ursächliche FA-Gene ausgeschlossen werden konnten. Da der Fetus ein weibliches Geschlecht aufwies, hielt man eine pathogene Mutation in *FANCB* für unwahrscheinlich. Somit blieb die Zelllinie 1176 zunächst unklassifiziert.

### 4. 1. 2 Autozygotie-Kartierung

Aufgrund der Konsanguinität innerhalb der Familie wurde anhand eines SNP-Arrays eine Autozygotie-Kartierung mit gDNA der Eltern, des gesunden Bruders und des Fetus angefertigt. Diese sollte singulär homozygote Bereiche aufdecken, welche sich zwischen 1176 und den Eltern sowie dem gesunden Geschwisterkind unterschieden, und eine Eingrenzung potentieller krankheitsverursachender Gene ermöglichen. Insgesamt konnten 15 solcher Abschnitte auf den Autosomen ausgemacht werden, welche in Abbildung 15 dargestellt sind.



**Abbildung 15: Nachweis singulär homozygoter Bereiche bei 1176 gegenüber gesunden Familienmitgliedern durch Autozygotie-Kartierung.** Auf den Autosomen (11-22) konnten 15 Chromosomenbereiche lokalisiert werden, die nicht in gleicher Weise homozygot bei 1176 und den Eltern bzw. dem gesunden Geschwisterkind waren (Pfeile, blau). Zudem wurden die auf den Autosomen liegenden *upstream*-FA-Gene eingezeichnet. Die Genorte von *FANCM* und der FA-Kandidatengene *FAAP100* sowie *MHF1* und *MHF2* (rot) waren innerhalb solcher singulär homozygoter Bereiche lokalisiert.

Bis auf *FANCM* auf Chromosom 14 lag kein weiteres bekanntes *upstream*-FA-Gen in einem solchen Bereich. Für *FANCM* jedoch war vor kurzem gezeigt worden, dass Mutationen in diesem Gen kein typisches FA-Krankheitsbild verursachen, sondern eher eine frühe Manifestation von heterogenen Krebserkrankungen zur Folge haben (Bogliolo et al. 2017, Catucci et al. 2017). Somit sollte *FANCM* nicht mehr als *bona fide* FA-Gen angesehen werden. *FANCV* auf Chromosom 1 kam wegen seiner *downstream*-Lokalisation im FA/BRCA-Signalweg nicht als pathogenes FA-Gen für 1176 in Frage. Mögliche Kandidaten, die durch Datenbankrecherchen (UniProt, GeneCards) mit DNA-Reparatur in Zusammenhang gebracht werden konnten, sind in Tabelle 13 aufgeführt. Dabei konzentrierte ich mich zunächst auf *FAAP100/c17orf70* sowie *MHF1/FAAP16* und *MHF2/FAAP10*, da diese Gene bereits als Mitglied des FA-Signalwegs beschrieben worden

waren. Andernfalls hätte es sich um ein im Zusammenhang mit FA bisher noch unbekanntes Gen handeln können.

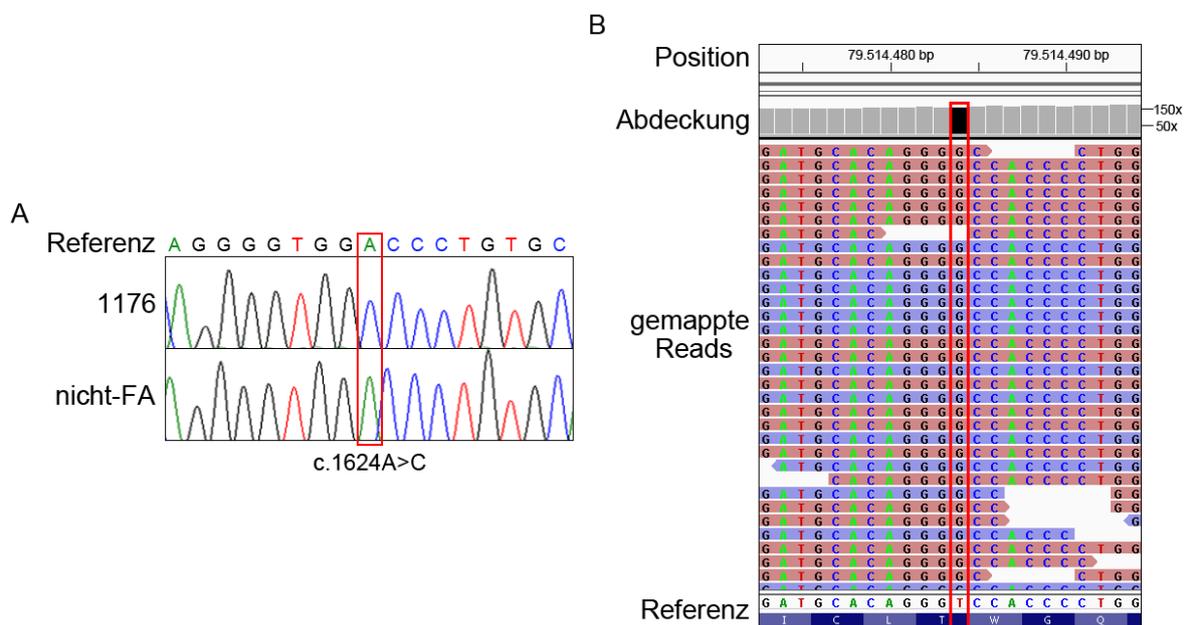
**Tabelle 13: Durch Autozygotie-Kartierung ermittelte FA-Kandidatengene für Fetus 1176**

Chromosom	homozygoter Bereich (hg18)	rs-Nummer	Kandidatengen	Genregion (hg18)
1	7 590 933-15 479 891	rs10864308-rs493970	<i>APITD1/CENPS/MHF1/FAAP16</i>	10 412 746-10 434 797
			<i>MAD2L2/FANCV/REV7</i>	11 657 125-11 674 294
2	49 007 179-50 100 653	rs6545082-rs6753833	–	–
2	51 521 646-52 366 820	rs1528800-rs6709386	–	–
2	66 384 227-66 598 107	rs4075737-rs3890755	–	–
4	30 922 137-32 531 943	rs4361348-rs6812308	–	–
4	40 346 389-55 649 989	rs1552138-rs1531289	–	–
6	29 696 125-30 317 781	rs29246-rs1362089	–	–
11	96 523 420-106 145 165	rs1789196-rs11211904	<i>DDI1</i>	103 412 518-103 415 132
12	13 377 930-16 280 892	rs4540917-rs1671518	–	–
12	81 662 003-125 496 520	rs11115376-rs7296549	<i>DRAM1/AC084398.25-3</i>	100 795 236-100 841 530
			<i>PARPBP/c12orf48</i>	101 038 086-101 119 401
			<i>NUAK1</i>	104 981 255-105 057 941
			<i>ALKBH2</i>	108 010 379-108 015 660
			<i>RAD9B</i>	109 424 388-109 454 274
			<i>BRAP</i>	110 566 272-110 608 122
			<i>ALDH2</i>	110 688 729-110 732 165
			<i>SIRT4</i>	119 224 546-119 235 430
14	22 299 814-26 510 055	rs873921-rs12886431	<i>DCAF11/WDR23</i>	23 653 861-23 664 288
			<i>BRMS1L</i>	35 365 348-35 410 919
14	32 064 483-56 201 918	rs1951179-rs2094694	<b><i>FANCM</i></b>	44 674 900-44 739 835
			<i>POLE2</i>	49 180 028-49 224 685
16	81 228 910-83 502 680	rs8045889-rs903194	<i>USP10</i>	83 291 050-83 371 026
17	72 423 727-78 634 366	rs8081232-rs6502043	<b><i>c17orf70/FAAP100</i></b>	77 117 388-77 129 848
			<i>SIRT7</i>	77 463 107-77 469 332
			<b><i>STRA13/CENPX/MHF2/FAAP10</i></b>	77 569 868-77 574 083
19	6 693 864-8 601 520	rs339408-rs7254400	–	–

Die aufgelisteten Gene wurden anhand von Literatur- und Datenbankrecherchen mit der DNA-Schadensreparatur bzw. mit FA in Zusammenhang gebracht. Bereits bekannte FA- und FA-assoziierte Gene sind hervorgehoben.

### 4. 1. 3 Sequenzanalysen, Segregation und proteinanalytische Untersuchungen

Durch Sanger-Sequenzierung der gDNA von 1176 war es möglich, den homozygoten Basenaustausch c.1624A>C in Exon 5 von *FAAP100* (Transkript NM\_025161) zu identifizieren (Abbildung 16A). Als Folge kann auf Proteinebene eine Missense-Mutation vorhergesagt werden, da an Position 542 statt Threonin die Aminosäure Prolin codiert wird (p.(T542P)). Beide Aminosäuren unterscheiden sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften. Threonin weist eine ungeladene, polare Seitenkette mit einer Hydroxygruppe auf, die für einen hydrophilen Charakter sorgt. Das ungeladene, unpolare Prolin besitzt als einzige Aminosäure keine freie, sondern eine sekundäre, zyklische Aminogruppe, wodurch die Sekundärstruktur von Proteinen beeinflusst werden kann. So stört Prolin vor allem die Konformation von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern (Li et al. 1996). Mithilfe von Vorhersageprogrammen konnte ermittelt werden, dass sich Position 542 von FAAP100 in einem  $\beta$ -Faltblatt befindet, welches vermutlich durch die Aminosäure Prolin zerstört wird. So stuften *in silico*-Analysen mithilfe der Mutationsvorhersageprogramme *MutationTaster* (p-Wert 0,993) (Schwarz et al. 2014), *PolyPhen-2* (Score 0,839 HumVar, *possibly damaging*) (Adzhubei et al. 2010) sowie auch *SIFT* (Score 0,04 des J. Craig Venter Institutes bzw. Score 0,02 des Bioinformatics Institute A\*STARE Singapore) (Ng & Henikoff 2001, Kumar et al. 2009) den Basenaustausch c.1624A>C übereinstimmend als krankheitsverursachend ein.



**Abbildung 16: Identifizierung von c.1624A>C in *FAAP100* bei 1176. A: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung von *FAAP100* Exon 5. Die Position c.1624, an der bei 1176 ein Cytosin statt eines Adenins (nicht-FA-Kontrolle, Referenz) homozygot nachgewiesen wurde, ist mit einem roten Rahmen hervorgehoben. B: Ergebnisse der Exom-Sequenzierung von 1176 durch NGS. Ein Ausschnitt der *FAAP100*-Sequenzierungsdaten ist im *Integrative Genomics Viewer* (IGV) des Broad Instituts dargestellt (Robinson et al. 2011). Neben den Reads (*forward* rot, *reverse* blau) sind die Chromosomenpositionen des Gens, die Abdeckungsfrequenz und die Referenzsequenz angegeben. Da *FAAP100* auf dem Minusstrang liegt, wurde die Sequenz der NGS-Daten in revers-komplementärer Ansicht dargestellt. Auf Chromosom 17 Position 79 514 484 bp (hg19) konnte so durch alle dort gemappten Reads statt des Thymins der**

Referenzsequenz ein Guanin nachgewiesen werden (roter Rahmen). Dies entsprach dem Basenaustausch c.1624A>C der Sanger-Sequenzierung.

Parallel zur klassischen Mutationsanalyse mittels Sanger-Sequenzierung wurde eine exomweite Sequenzierung (*Whole Exome Sequencing*, WES) via NGS von gDNA des Fetus 1176 bei dem kommerziellen Dienstleister BGI in Auftrag gegeben. Die durch BGI generierten Daten wurden anschließend mit der Software *NextGENe* von Softgenetics analysiert. Eine statistische Analyse der WES-Daten ist in Tabelle 14 zu sehen.

**Tabelle 14: Statistikanalyse und Filterungsstrategie der Exom-Sequenzierung von 1176.**

Gesamtzahl der Reads	104 114 566
Von der <i>NextGENe</i> Software in ein FASTA-Standardformat konvertierte Reads	103 369 482
Gemappte Reads an hg19	101 858 328 98,5 %
Durchschnittliche Exom-Abdeckung	196x
Gemappte Reads an ROI (SureSelect Human All Exon 50Mb Kit) mit einer $\leq 100x$ Abdeckung	40,94 %
Gesamtzahl der detektierten Varianten in Exons und/oder an essentiellen Spleißstellen	20 145
Varianten mit hinterlegtem dbSNP-Eintrag in Exons und/oder an essentiellen Spleißstellen	18 934
Varianten ohne dbSNP-Eintrag in Exons und/oder an essentiellen Spleißstellen	1 218
Varianten ohne dbSNP-Eintrag in Exons	1 202
Varianten ohne dbSNP-Eintrag an essentiellen Spleißstellen	40
Heterozygote Varianten ohne dbSNP-Eintrag in Exons und/oder an essentiellen Spleißstellen	1 080
Homozygote Varianten ohne dbSNP-Eintrag in Exons und/oder an essentiellen Spleißstellen	138
Homozygote Insertionen/Deletionen	5
Homozygote Missense-Mutationen	79
Homozygote Nonsense-Mutationen	2
Homozygote synonyme Mutationen	49
Homozygote Mutationen nicht-codierenden Bereichen	3
Gene mit homozygoten Varianten ohne dbSNP-Eintrag in Exons und/oder an essentiellen Spleißstellen	94
Als krankheitsverursachend vorhergesagte Gene mit homozygoten Varianten ohne dbSNP-Eintrag in Exons und/oder an essentiellen Spleißstellen	20
In die DNA-Reparatur involvierte, als krankheitsverursachend vorhergesagte* Gene mit homozygoten Varianten ohne dbSNP-Eintrag in Exons und/oder an essentiellen Spleißstellen	2

Essentielle Spleißstellen: 2 bp vor bzw. nach der Intron-Exon-Grenze, dbSNP-Datenbank: dbSNP137, \*: Vorhersage durch die Software *NextGENe* oder manuell durch die Programme *MutationTaster* und *PolyPhen-2* (Adzhubei et al. 2010, Schwarz et al. 2014).

Es konnte eine 100-fache Abdeckung in 40,94 % in der ROI (*Region Of Interest*), welche den Zielregionen des Anreicherungskits SureSelect Human All Exon 50Mb Kit entsprach, erreicht werden. Dennoch waren unter den bekannten *upstream*-FA-Genen *FANCA* und *FANCE* jeweils Exon 1 sowie bei *FANCM* die Exons 14 und 18 stellenweise gar nicht abgedeckt. Des Weiteren traten bei Exon 1 des Kandidatengens *MHF1* sowie bei Exon 1 und Exon 9 von *FAAP100* Lücken auf. Die Stellen wurden per Sanger-Sequenzierung überprüft, wobei keine Varianten in diesen Bereichen identifiziert werden konnten. Aufgrund der Konsanguinität der Eltern von 1176

konzentrierte man sich bei der Filterungsstrategie der NGS-Daten (Tabelle 14) zunächst auf homozygote Varianten innerhalb codierender Bereiche und/oder an essentiellen Spleißstellen. So konnten insgesamt 138 Varianten in 94 Genen ausgemacht werden, die keinen Eintrag in der dbSNP-Datenbank (dbSNP137) aufwiesen. Diese wurden mithilfe der beiden Vorhersageprogramme *MutationTaster* (Schwarz et al. 2014) und *PolyPhen-2* (Adzhubei et al. 2010) auf ihre Pathogenität hin untersucht.

So verblieben noch 20 Gene, die von den beiden Programmen als krankheitsverursachend eingestuft worden waren (Tabelle 15). Literatur- und Datenbankrecherchen ergaben schließlich, dass zwei Gene im Zusammenhang mit der DNA-Schadensreparatur gelistet worden waren, *FAAP100* und *RRM2B*. Das Gen *RRM2B* codiert für eine Untereinheit der Ribonukleotidreduktase, welche an der DNA-Synthese sowie an der p53-abhängigen DNA-Schadensreparatur bei den in der G1- und G2-Phase arretierten Zellen beteiligt ist (Tanaka et al. 2000).

**Tabelle 15: Durch die Exom-Sequenzierungsdaten von 1176 ermittelten Gene mit homozygoten Varianten.**

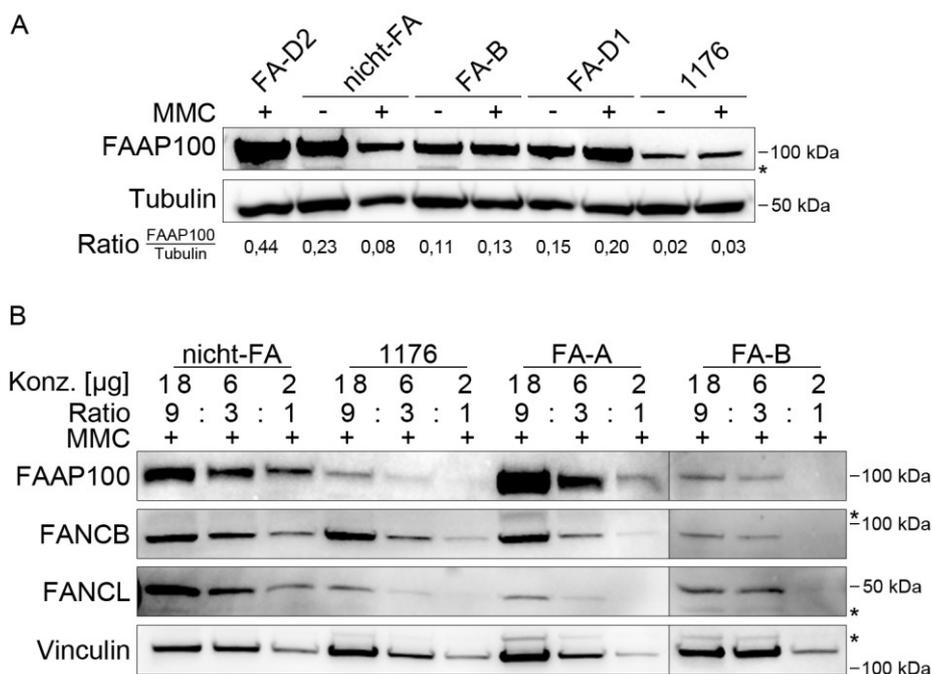
<b><i>C17orf70/FAAP100</i></b>	<i>C18orf54</i>	<i>CBS</i>	<i>EGFLAM</i>	<i>HAP1</i>
<i>HPGDS</i>	<i>HSD17B4</i>	<i>KIRREL3</i>	<i>KRTAP10-10</i>	<i>KRTAP5-5</i>
<i>MAMDC4</i>	<i>MRPS11</i>	<i>PPP4R1</i>	<i>PRAMEF3</i>	<i>PRSS16</i>
<b><i>RRM2B/P53R2</i></b>	<i>SBF1</i>	<i>SBF2</i>	<i>TMEM183B</i>	<i>TMEM87B</i>

Die hervorgehobenen Gene wurden anhand von Literatur- und Datenbankrecherchen mit der DNA-Schadensreparatur in Zusammenhang gebracht und galten somit als Kandidatengene für FA bei 1176.

Durch WES konnte im Gen *FAAP100* ebenfalls die Variante c.1624A>C identifiziert werden, welche den Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung entsprach (Abbildung 16B). Zusätzlich konnten für 1176 durch die NGS-Daten alle bekannten FA-Gene als krankheitsverursachend ausgeschlossen werden, da die DNA-Sequenzen dieser Gene keine biallelischen, als pathogen eingestuften Mutationen aufwiesen. Insbesondere galt das auch für *FANCM* sowie *MHF1* und *MHF2*, welche durch das Ergebnis der Autozygotie-Kartierung als ursächliche Gene für FA bei 1176 in den Fokus gerückt waren.

Da zum Zeitpunkt der Mutationsanalyse die Genomdatenbanken weder sehr umfassend waren noch in allen Vorhersageprogrammen *FAAP100/c17orf70* gelistet war, wurde zusätzlich gDNA-Material von 100 europäischen nicht-FA-Personen per Sanger-Sequenzierung auf die *FAAP100*-Mutation c.1624A>C hin untersucht (Daten nicht gezeigt). Sie konnte in keiner dieser Proben nachgewiesen werden. Da NGS sich immer mehr zu einer Routinemethode entwickelt hat, sind heute die Genomdatenbanken sehr umfangreich geworden. Data-Mining (Browser des 1000 Genomes Projects, des Exome Aggregation Consortiums, der Genome Aggregation Database) ergab ebenfalls, dass c.1624A>C in *FAAP100* in keiner der hinterlegten Sequenzen aufgetreten war.

Um eine mögliche Auswirkung der Mutation bei 1176 auf Proteinebene zu untersuchen, wurde aus Proteinlysaten, welche aus der Amnionzelllinie 1176 gewonnen worden waren, ein FAAP100-Immunblot angefertigt. Im Vergleich zu den ebenfalls mit aufgetragenen Proteinlysaten der FA-D2-, FA-B- und FA-D1-Zelllinien konnte für 1176 eine reduzierte Proteinmenge von FAAP100 detektiert werden (Abbildung 17A). Eine Ratioberechnung FAAP100/Tubulin bestätigte das visuell ermittelte Ergebnis.



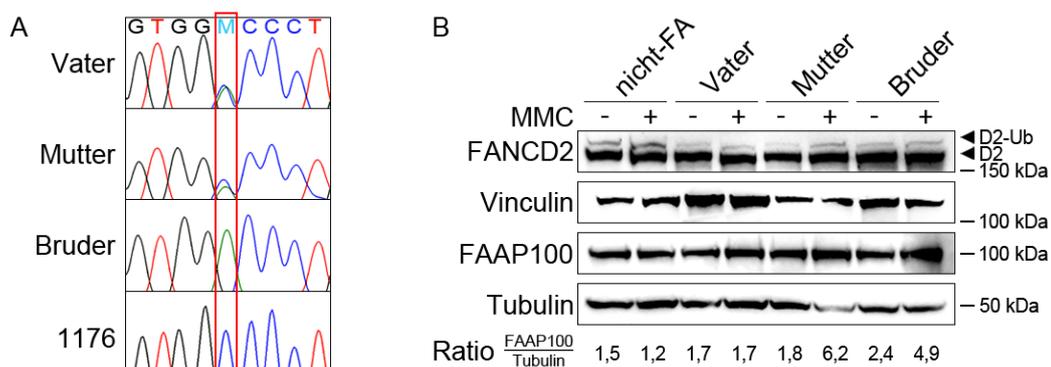
**Abbildung 17: Verminderte FAAP100-Proteinexpression bei 1176. A: FAAP100-Immunblot.** Die aufgetragenen Proteinlysate wurden aus transformierten Zelllinien isoliert. Der rote Rahmen markiert die reduzierte FAAP100-Proteinmenge bei 1176. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Über die Ratioberechnung FAAP100/Tubulin wurden ungleichmäßig geladene Proteinkonzentrationen normalisiert und so ein direkter Vergleich der FAAP100-Expression ermöglicht. \*: unspezifische Banden, kDa: Kilodalton. **B: Verdünnungsblots.** Auf zwei Immunblots wurden Proteinlysate transformierter Zelllinien in unterschiedlichen Konzentrationen (Konz.) im Verhältnis 9:3:1 aufgetragen, um eine Mengenabschätzung der reduzierten Proteine durchzuführen. Neben FAAP100 wurden auch die Proteinexpressionen von FANCB sowie FANCL analysiert. Vinculin diente jeweils als Ladungskontrolle. \*: unspezifische Banden, kDa: Kilodalton.

Um die Verringerung der Menge quantitativ abschätzen zu können, wurde ein Verdünnungsblot erstellt (Abbildung 17B). Für einen direkten Vergleich wurden Proteinlysate einer nicht-FA-Kontrollzelllinie, einer FA-A- sowie einer FA-B-Zelllinie isoliert und diese in unterschiedlichen Konzentrationen im Verhältnis 9:3:1 auf das SDS-Polyakrylamid-Gel aufgetragen. Mithilfe eines Antikörpers konnte nachgewiesen werden, dass gegenüber einer nicht-FA-Kontrolle die FAAP100-Menge sowohl bei 1176 als auch bei FA-B um mehr als das Neunfache bzw. im Vergleich zu einer FA-A-Kontrolle etwa um das Neunfache reduziert war. Ebenso wurde die Proteinmenge von FANCB und FANCL analysiert. FANCL war bei allen aufgetragenen FA-Zelllinien etwa um ein Neunfaches vermindert. Wohingegen bei 1176 sowie bei FA-A kaum eine FANCB-Reduzierung, bei FA-B jedoch eine etwa neunfach geringere FANCB-Menge detektiert

wurde. Bei der pathogenen FANCB-Mutation handelt es sich allerdings um c.829dup, eine Duplikation eines Thymins, die auf Proteinebene zu der Frameshift-Mutation p.(C277Lfs\*31) führt. Das Protein, falls es translatiert werden würde, würde nur ein Gewicht von 35,2 kDa aufweisen. Somit ist eine Detektion eines FANCB-Proteins mit einem Gewicht von etwa 98 kDa formal gesehen nicht möglich. Folglich ist der verwendete Antikörper nicht spezifisch für FANCB. In den Datenbanken Ensembl, NCBI/RefSeq und UniProt sind drei FANCB-Proteinisoformen hinterlegt, die jedoch alle von der Mutation betroffen wären. Somit ist auch die Detektion einer alternativen FANCB-Proteinbande ausgeschlossen. Eine Aussage über das exprimierte FANCB-Level ist demnach nicht möglich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt acht verschiedene Antikörper analysiert, von denen keiner spezifisch für FANCB war.

Für die FAAP100-Mutation p.(T542P) kann bestätigt werden, dass sie sowohl zu einer verminderten FAAP100- als auch zu einer verminderten FANCL-Proteinexpression führt. Umgekehrt wird durch die FANCB-Mutation p.(C277Lfs\*31) die exprimierte FAAP100-Menge reduziert.

Für eine Segregationsanalyse von c.1624A>C innerhalb der Familie des Fetus wurde gDNA der Eltern und des gesunden Bruders auf diese *FAAP100*-Mutation hin sequenziert. Aus den Elektropherogrammen in Abbildung 18A geht hervor, dass sowohl der Vater als auch die Mutter von 1176 heterozygote Überträger der Mutation sind. Der gesunde Bruder zeigte hingegen an Position c.1624 die *FAAP100*-Wildtyp-Sequenz. Somit war eine große Deletion ausgeschlossen, formalgenetisch die parentale Segregation der Mutation bestätigt und damit ein Hinweis gegeben, dass die identifizierte Missense-Mutation bei 1176 ursächlich für FA gewesen war.

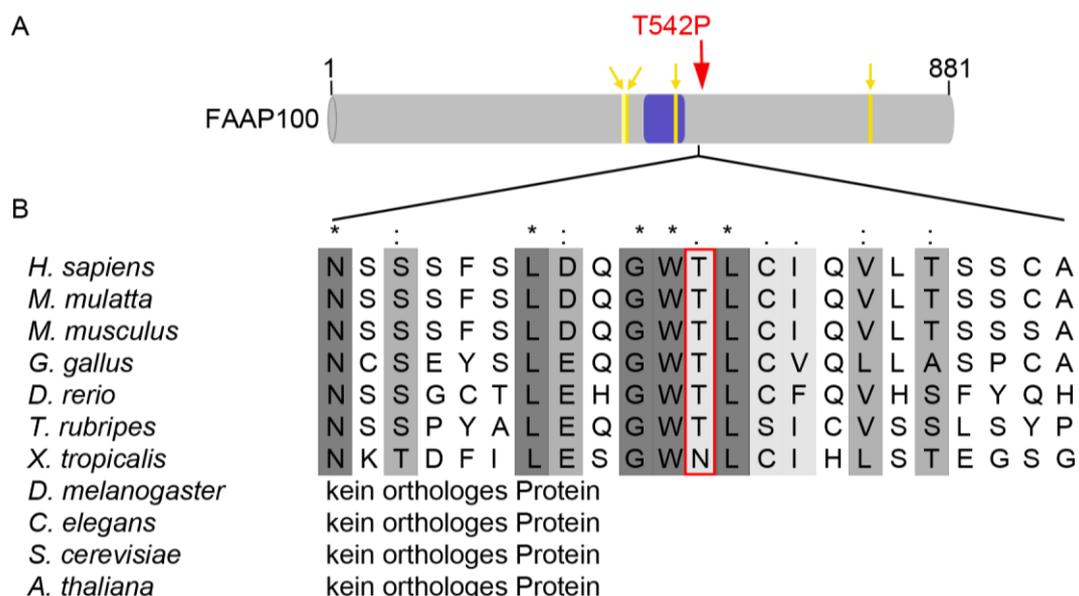


**Abbildung 18: Segregations- und Proteinanalyse der Familienmitglieder von 1176. A: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung zur Segregation von c.1624A>C in der Familie von 1176.** In den Elektropherogrammen ist jeweils ein Sequenzausschnitt von *FAAP100* Exon 5 dargestellt. Die Substitution c.1624A>C segregiert innerhalb der Familie von 1176 (roter Rahmen). Vater und Mutter sind jeweils heterozygote Träger von c.1624A>C. Der gesunde Bruder weist an Position c.1624 homozygot das Nukleotid Adenin auf, wohingegen man beim Fetus 1176 homozygot einen Basenaustausch nach Cytosin findet. M steht nach dem IUPAC Nukleotid-Code für die Basen Adenin oder Cytosin. **B: FANCD2- und FAAP100-Immunblots.** Es sind zwei Immunblots dargestellt, auf die aus LCLs isolierte Proteinlysate aufgetragen wurden. Vinculin und Tubulin dienten für die jeweiligen Immunblots als Ladungskontrollen. Über die Ratioberechnung FAAP100/Tubulin wurden ungleichmäßig geladene Proteinkonzentrationen normalisiert und so ein direkter Vergleich der FAAP100-Expression ermöglicht. D2-Ub: monoubiquitiniertes FANCD2, D2: nicht-ubiquitiniertes FANCD2, kDa: Kilodalton.

Aus den lymphoplastoiden Zelllinien der Familienmitglieder wurden Proteinlysate isoliert und ein FANCD2- sowie ein FAAP100-Immunblot angefertigt. Die Proteinlysate aller Familienmitglieder wiesen sowohl die ubiquitinierte als auch die nicht-ubiquitinierte Form von FANCD2 auf. Folglich ist trotz der heterozygoten *FAAP100*-Mutation c.1624A>C bei Mutter und Vater von 1176 eine funktionelle Beeinträchtigung des FAAP100-Proteins auszuschließen, da FANCD2 in diesen Zelllinien monoubiquitiniert kann. Des Weiteren wurde durch die Ratioberechnung FAAP100/Tubulin gezeigt, dass bei allen aufgetragenen Proteinlysaten nach dieser semi-quantitativen Methode eine ähnliche Menge an FAAP100 vorhanden war (Abbildung 18B). Ausnahmen waren das mit MMC behandelte Proteinlysate der Zelllinie der Mutter (Ratio 6,2) sowie das des Bruders (Ratio 4,9) von 1176. Da die FAAP100-Menge der Familienmitglieder von 1176 mit dem FAAP100-Level der nicht FA-Kontrolle entweder vergleichbar oder erhöht, jedoch keinesfalls reduziert war, war bestätigt, dass die Mutation c.1624A>C in monoallelischer Form bei Mutter und Vater von 1176 zu keiner Verringerung der FAAP100-Proteinexpression führt.

#### 4. 1. 4 Konservierung von Threonin an Position 542 in FAAP100

Die Missense-Mutation p.(T542P) von 1176 ist etwa in der Mitte des FAAP100-Proteins lokalisiert. Dabei liegt sie weder in der beschriebenen Coiled-Coil-Domäne noch in einem der Inter-Links (Ling et al. 2007, Swuec et al. 2017), welche für eine Interaktion mit FANCB notwendig sind (Abbildung 19A).



**Abbildung 19: Konservierung von FAAP100 in Vertebraten. A: FAAP100-Proteindarstellung mit Lokalisation von p.(T542P).** In grau wurde schematisch das FAAP100-Protein dargestellt und dessen Länge durch die Anzahl der Aminosäuren (1-881) gekennzeichnet. In Gelbtönen wurde die Lokalisation der vier Inter-Links für die Interaktion mit FANCB (Swuec et al. 2017) bzw. in Lila die der potentiellen Coiled-Coil-Domäne (Ling et al. 2007) hervorgehoben. Die Lage der Mutation des Fetus p.(T542P) wurde mit einem roten Pfeil markiert. **B: FAAP100-Sequenzalignments.** Im Bereich der humanen Substitution p.(T542P) (roter Rahmen) wurden Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies miteinander verglichen. \* und dunkelgraue Farbe: gleiche Aminosäure bei allen Spezies vorhanden (voll konserviert), „ und mittleres Grau: Konservierung zwischen Aminosäuregruppen mit sehr ähnlichen Eigenschaften, „ und hellgraue Farbe: Konservierung zwischen Aminosäuren mit leicht ähnlichen Eigenschaften, weiße Farbe: Aminosäuren mit unterschiedlichen Eigenschaften. Referenz: Clustal Omega und UniProt (Sievers et al. 2011, The UniProt 2017).

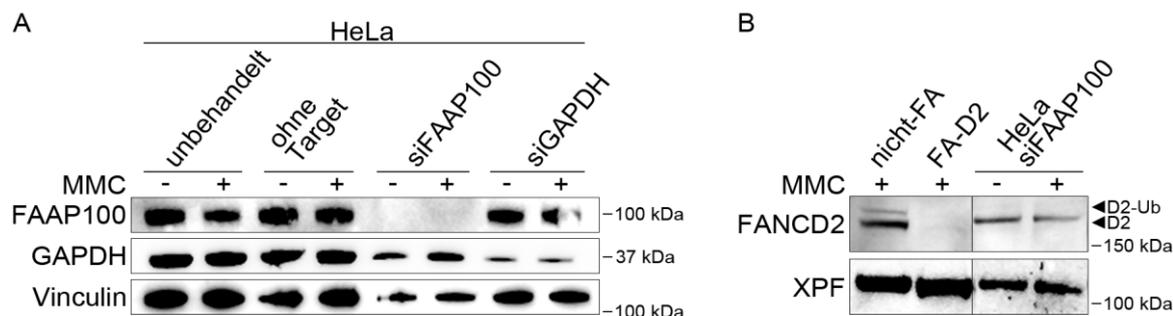
Wie die meisten FA-Kernkomplexproteine ist auch FAAP100 nur in Vertebraten konserviert, sodass diese Proteine etwa zur gleichen Zeit während der Evolution entstanden sein müssen (Ling et al. 2007). Mithilfe von Sequenzalignments wurde ersichtlich, dass der Bereich, in dem die Mutation p.(T542P) auftrat, in Vertebraten stark konserviert ist (Abbildung 19B). Mit nur einer Ausnahme mit Asparagin (N) für den tropischen Krallenfrosch (*X. tropicalis*) befindet sich bei den anderen Spezies an der zur humanen Aminosäureposition 542 analogen Stelle ebenfalls ein Threonin (T). Die starke Konservierung deutet daraufhin, dass dieser Bereich des Proteins eine wichtige Bedeutung aufweist und Sequenzveränderungen maßgebliche Auswirkungen auf die Proteinfunktion haben könnten. *In silico*-Analysen ergaben, dass insbesondere das Fehlen von Prolin an dieser Position konserviert ist. Somit ist anzunehmen, dass die Substitution p.(T542P) nicht mit einer intakten FAAP100-Proteinfunktion vereinbar ist.

Außerhalb der Vertebraten, beispielsweise bei der Fruchtfliege (*D. melanogaster*), dem Fadenwurm (*C. elegans*), der Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) oder der Acker-Schmalwand (*A. thaliana*), sind keine Orthologe von FAAP100 zu finden.

#### 4. 1. 5 Posttranskriptionelles Gen-Silencing mittels RNA-Interferenz

Ob der in den Amnionzellen 1176 nachgewiesene Phänotyp auch für andere Zelltypen bestätigt werden kann, wurde in HeLa-Zellen durch eine Herunterregulierung der *FAAP100*-Expression mittels siRNA (siFAAP100) untersucht. Da es sich hierbei um eine Änderung der Genexpression handelt, waren zur weiteren Analyse lediglich Proteinlysate aus den mit siRNA transfizierten Zellen relevant. Als Transfektionskontrollen dienten bei diesem Versuch HeLa-Zellen, die mit siRNAs transfiziert worden waren, welche sich gegen kein Target (Negativkontrolle, Bezeichnung „ohne Target“) bzw. gegen *GAPDH* (Positivkontrolle, siGAPDH) richteten. Zudem wurden unbehandelte HeLa-Zellen mit in den Versuch eingeschlossen. Ein FAAP100-Immunblot zeigt, dass bei Proteinlysaten aus siFAAP100-Zellen sowohl mit als auch ohne MMC-Behandlung kein FAAP100-Protein detektiert werden konnte (Abbildung 20A) und demnach die Abschaltung von FAAP100 erfolgreich gewesen war. Im Gegensatz dazu wiesen alle Lysate der Kontrollzellen FAAP100 mit einem Gewicht von etwa 100 kDa auf. Mithilfe eines  $\alpha$ -GAPDH-Antikörpers wurde die Herunterregulierung von GAPDH überprüft. So konnte für alle aufgetragenen Proteinlysate GAPDH mit einem Gewicht von ca. 37 kDa detektiert werden, wobei die GAPDH-Mengen bei siFAAP100- sowie bei siGAPDH-Zellen im Vergleich zu der Menge der Negativkontrollen vermindert waren. Durch die Ladungskontrolle Vinculin konnte gezeigt werden, dass eine geringere Konzentration der siFAAP100-Proteinlysate aufgetragen worden war verglichen mit der Konzentration der Kontrolllysate. Diese geringere Proteinmenge der siFAAP100-Zellen spiegelt sich dementsprechend auch in der reduzierten GAPDH-Menge wider. Da das detektierte Vinculin der siGAPDH-Zellen eine ähnliche Konzentration wie die Lysate der Negativkontrollzellen aufwies, konnte eine unvollständige Herunterregulierung von GAPDH in siGAPDH-Zellen bestätigt werden.

Als Folge der Inhibition der *FAAP100*-Genexpression konnte in den siFAAP100-behandelten Zellen keine Monoubiquitinierung von FANCD2 stattfinden, sodass nur die nicht-monoubiquitinierte Isoform von FANCD2 auf einem Immunblot detektiert werden konnte (Abbildung 20B). Dies unterstützt die Interpretation, dass die fehlende FANCD2-Monoubiquitinierung in Patientenzellen auf den Verlust von FAAP100 zurückzuführen ist und folglich den FA-Phänotyp verursacht.



**Abbildung 20: FAAP100-Silencing durch RNA-Interferenz. A: FAAP100-Immunblot.** Es wurden Proteinlysate von HeLa-Zellen aufgetragen, die mit siRNAs gegen *FAAP100* (siFAAP00), *GAPDH* (siGAPDH) oder kein spezifisches Gen (ohne Target) transfiziert worden waren. Letzteres diente als negative, siGAPDH als positive Transfektionskontrolle. Mit einem  $\alpha$ -FAAP100-Antikörper wurde die Herunterregulierung der FAAP100-Expression überprüft. Vinculin diente als Ladungskontrolle. kDa: Kilodalton. **B: FANCD2-Immunblot.** Die HeLa-Proteinlysate, in denen FAAP100 durch siRNA herunterreguliert worden war, wurden zusammen mit Kontrollproteinen aufgetragen, um die FANCD2-Monoubiquitinierung nachzuweisen. Die dargestellten Proteine befanden sich auf der gleichen Membran. XPF diente als Ladungskontrolle. D2-Ub: monoubiquitiniertes FANCD2, D2: nicht-ubiquitiniertes FANCD2, kDa: Kilodalton.

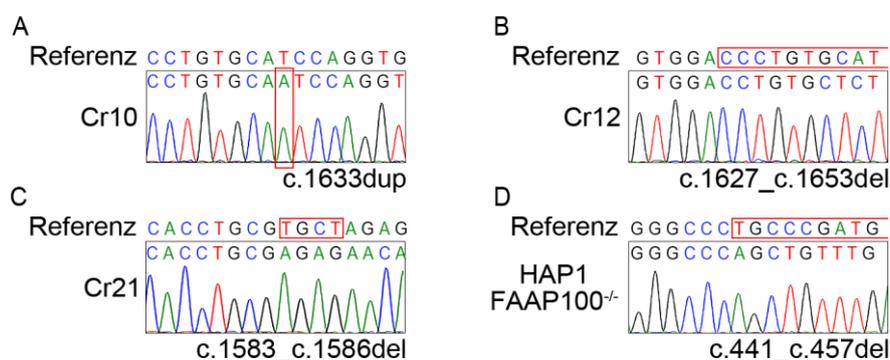
#### 4. 1. 6 Generierung von FAAP100-defizienten Zelllinien

Um für eine nähere Charakterisierung von FAAP100 neben 1176 weitere Zelllinien nutzen zu können, sollten mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems FAAP100-defiziente-Zelllinien generiert werden. Für die Herstellung der FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien wurden vier verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen Protospacer-Elementen (Methodenteil, Tabelle 8), die jeweils in die Vektoren pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) sowie pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) kloniert worden waren, durchgeführt. Durch je zwei Nickase-Plasmide PX462 und einem FAAP100-Template-Vektor pro Transfektionsansatz sollten Zelllinien mit der Variante c.1624A>C von 1176 generiert werden. Dagegen sollten mithilfe eines Nuklease-Plasmids PX459 pro Ansatz Doppelstrangbrüche generiert und durch die anschließende fehlerhafte Reparatur des NHEJs der Einbau von unspezifischen Mutationen ermöglicht werden.

Aus den durchgeführten Ansätzen mit U2OS- sowie HEK293T-Zelllinien wurden insgesamt 274 klonale Zelllinien per Sanger-Sequenzierung analysiert. Es konnte keine Zelllinie ausgemacht werden, die die patientenspezifische Mutation c.1624A>C homozygot trug. Für zwei Zelllinien gelang es, diese Mutation auf jeweils nur einem Allel einzubauen. Da es sich bei FA mit Ausnahme der Komplementationsgruppe FA-R jedoch um eine rezessive Erbkrankheit handelt, wurden die heterozygot mutierten Zellklone in weitere Analysen nicht miteingeschlossen. Bei fast allen isolierten Einzelzellkolonien wurde die Wildtyp-Sequenz von *FAAP100* nachgewiesen.

Andernfalls lag im Elektropherogramm eine Überlagerung mehrerer Sequenzen vor. Hier war davon auszugehen, dass es sich nicht um reine Einzelzellklone handelte, sondern eine Mischung von zwei oder mehreren Ursprungszellen vorlag. Darüber hinaus wurden drei unterschiedliche HEK293T-Zelllinien mit homozygoten Mutationen in *FAAP100* Exon 5 identifiziert, die im weiteren Text als Cr10, Cr12 und Cr21 aufgeführt werden. Somit lag die Erfolgsrate der FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien-Generierung bei 1,1 %.

In der FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinie Cr10 kam es an der cDNA-Position 1633 zu einer Duplikation eines Adenins (Abbildung 21A), welche auf Proteinebene zu einem Frameshift sowie zu einer vorzeitigen Termination der Translation führt (c.1633dup, p.(I545Nfs\*44)). *In silico*-Analysen ergaben, dass folglich ein trunkiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 62 kDa exprimiert werden würde. In der Zelllinie Cr12 trat c.1627\_c.1653del, eine Deletion von 27 Basenpaaren, auf (Abbildung 21B). Als Folge kommt es auf Proteinebene zu einer In-frame-Deletion von neun Aminosäuren (p.(L543\_S551del)). Somit hätte dieses Protein mit 92,5 kDa nur eine unwesentlich geringere Größe im Vergleich zum wildtypischen FAAP100 (93,45 kDa). In der dritten FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinie Cr21 ist eine Deletion von vier Nukleotiden (c.1583\_c.1586del, p.(V528Efs\*52)) aufgetreten (Abbildung 21C), welche zu einer Verschiebung des Leserahmens und auf Proteinebene zu einem verfrühten Stopcodon nach 52 Aminosäuren führt. Das Proteingewicht von Cr21 wurde mit 60,8 kDa vorhergesagt.



**Abbildung 21: Nachweise der durch das CRISPR/Cas9-System generierten *FAAP100*-Mutationen. Ergebnisse der Sanger-Sequenzierungen von Cr10 (A), Cr12 (B), Cr21 (C) und HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> (D).** In den Elektropherogrammen wurde die Veränderung in der Sequenz gegenüber der Referenz jeweils mit einem roten Rahmen hervorgehoben. Ist der Rahmen nicht geschlossen, ist nur ein Teilbereich der Deletion abgebildet. Die identifizierte Mutation wurde jeweils angegeben. Cr10, Cr12 und Cr21: HEK293T-Zelllinien.

Bereits im Vorfeld waren fünf unterschiedliche CRISPR/Cas9-Tools und auch BLAT sowie BLAST zur Off-Target-Analyse herangezogen worden (Methodenteil, Tabelle 10). Alle Vorhersageprogramme stimmten in ihrem Ergebnis überein, dass für das verwendete Cas9-Nuklease-Plasmid mit dem Protospacer-Element cr3, mit denen die Linien Cr10 und Cr12 generiert worden waren, keine Off-Targets (<3 Basenfehlpaarungen) vorhanden waren. Bei der Transfektion für Cr21 waren zwei Nickase-Plasmide mit den Protospacer-Elementen cr2 bzw. cr3 verwendet worden, die jeweils Einzelstrangbrüche auf den gegenläufigen DNA-Strängen hervorrufen. Für cr2 wurden von den Programmen E-CRISP und CCTOP (Heigwer et al. 2014,

Stemmer et al. 2015) als potentielle Off-Targets zwei Gene (*CALML6*, *KANK1*) vorhergesagt, deren Sequenz sich in jeweils zwei Nukleotiden von der cr2-Sequenz unterschied. Datenbankrecherchen ergaben jedoch, dass beide Gene nicht in die DNA-Schadensreparatur involviert sind. Zudem wird bei der Verwendung von zwei Nickase-Plasmiden die Gefahr für Off-Targets methodisch bedingt als gering angesehen, da eine extrem hohe Spezifität zweier unterschiedlicher benachbarter Sequenzbereiche gegeben ist (Ran et al. 2013a). Aus diesen Gründen wurde auf eine Nachsequenzierung potentieller Off-Targets verzichtet.

Zusätzlich zu den selbstgenerierten FAAP100-HEK293T-CRISPR/Cas9-Zelllinien wurde die kommerziell erworbene FAAP100-defiziente HAP1-Zelllinie mit in die Untersuchungen eingeschlossen. In dieser war, ebenfalls durch das CRISPR/Cas9-System, in *FAAP100* Exon 3 eine Frameshift-Deletion von 17 Basenpaaren (c.441\_c.457del, p.(R149Vfs\*2)) eingefügt worden (Abbildung 21D). Das Molekulargewicht von FAAP100 dieser Linie wurde mit 16,0 kDa vorhergesagt. Eine Zusammenfassung aller verwendeten CRISPR/Cas9-Zelllinien ist in Tabelle 16 aufgeführt.

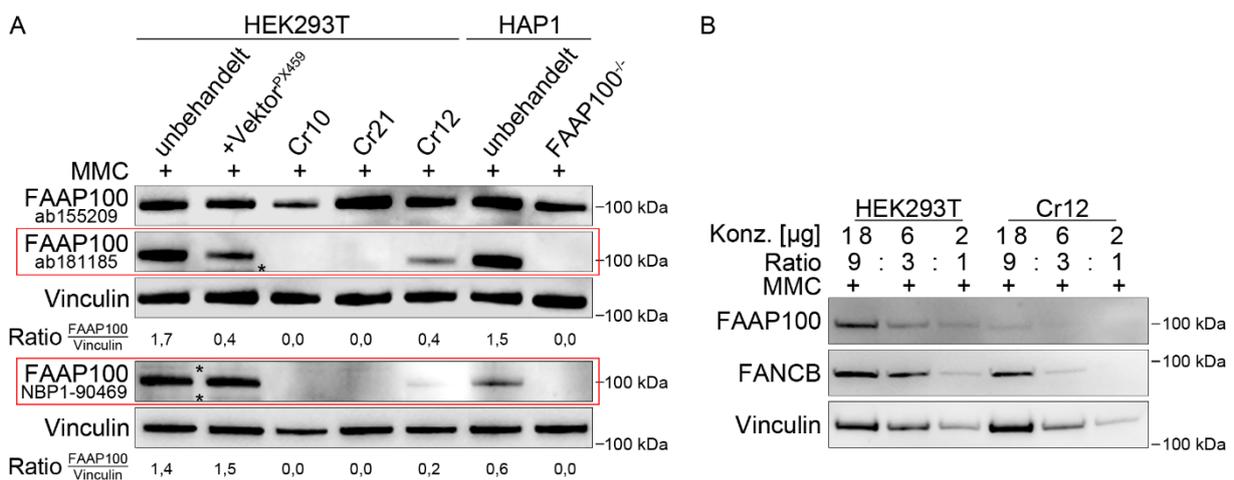
**Tabelle 16: Zusammenfassung der durch das CRISPR/Cas9-System generierten FAAP100-Mutationen.**

Zelllinie	Mutation homozygot		vorhergesagtes Molekulargewicht*
	cDNA	Protein	
HEK293T Cr10	c.1633dup	p.(I545Nfs*44)	62 kDa
HEK293T Cr21	c.1583_c.1586del	p.(V528Efs*52)	60,8 kDa
HEK293T Cr12	c.1627_c.1653del	p.(L543_S551del)	92,5 kDa
HAP1 FAAP100 <sup>-/-</sup>	c.441_c.457del	p.(R149Vfs*2)	16,0 kDa

\*: durch das Programm *Protein Molecular Weight* ermitteltes mögliches Molekulargewicht der FAAP100-Proteine, falls diese stabil wären und kein NMD stattfinden würde.

Neben der Verifizierung per Sanger-Sequenzierung wurde FAAP100 der CRISPR/Cas9-Zelllinien mithilfe von Immunblots analysiert. Für die Detektion von FAAP100 wurde zunächst der polyklonale Antikörper ab155209 verwendet, mit dem sich in allen Proteinlysaten der unterschiedlichen FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien eine vergleichbare FAAP100-Menge mit einem wildtypischen Gewicht von etwa 100 kDa nachweisen ließ (Abbildung 22A, FAAP100 ab155209). Da zu erwarten war, dass die FAAP100-defizienten Zelllinien mit Ausnahme von Cr12 nur C-terminal trunkiertes FAAP100 aufweisen würden, wurden weitere  $\alpha$ -FAAP100-Antikörper getestet. Mithilfe des monoklonalen Antikörpers ab181185 sowie des polyklonalen Antikörpers NBP1-90469 war es möglich, den Knockout von FAAP100 bei Cr10, Cr21 und HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> nachzuweisen, da in den Proteinlysaten dieser Zelllinien kein FAAP100-Protein mit einem Gewicht von etwa 100 kDa detektiert werden konnte (Abbildung 22A, FAAP100 ab181185 und FAAP100 NBP1-90469). Mit diesen Antikörpern war es nicht möglich, verkürztes FAAP100 für diese drei Zelllinien nachzuweisen. Bei ab181185 handelt es sich um einen C-terminalen Antikörper, der gegen ein Epitop im Bereich der Aminosäuren 750-881 gerichtet ist. Da die FAAP100-Translation in den Cr10-, Cr21- und HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>-Zelllinien vor

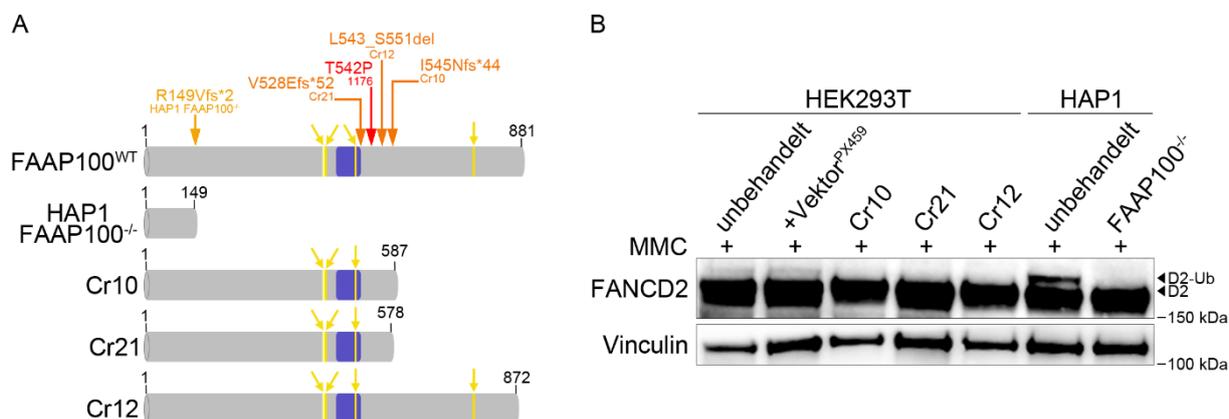
Aminosäure 750 abbricht, konnte folglich auch keine Bindung dieses Antikörpers erfolgen. Der Antikörper NBP1-90469 bindet an ein Epitop im Bereich der Aminosäuren 196-311. FAAP100 der Zelllinie HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> würde nur 149 Aminosäuren und somit nicht die Erkennungssequenz des Antikörpers aufweisen. Allerdings hätte mit NBP1-90469 trunkiertes FAAP100 für Cr10 und Cr21 nachweisbar sein sollen. Dies war nicht der Fall. Somit ist davon auszugehen, dass FAAP100 in diesen Zelllinien entweder instabil ist oder durch *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD) abgebaut wird. NMD ist die spezifische Degradierung von mRNAs mit verfrühten Stopcodons. Sie wird als Kontrollmechanismus in Zellen gesehen, der verhindert, dass verkürzte Proteine exprimiert werden, die eventuell schädlich bzw. ohne Funktion für die Zellen sind (Karousis et al. 2016). Im Gegensatz dazu war für die Proteinlysate der Kontrollzellen HEK293T, HEK293T+Vektor<sup>PX459</sup> und HAP1 sowie das Lysat der Cr12-Zellen eine Detektion von FAAP100 mit einem Gewicht von ca. 100 kDa möglich. FAAP100 von Cr12 war im Vergleich zu der FAAP100-Menge der Kontrollzellen reduziert. Durch die jeweilige Berechnung der Ratio FAAP100/Vinculin wurde das visuell ermittelte Ergebnis bestätigt.



**Abbildung 22: Proteinanalytische Untersuchungen von FAAP100 der CRISPR/Cas9-Zelllinien. A: FAAP100-Immunblots.** Aus CRISPR/Cas9- sowie aus Kontrollzelllinien isolierte Proteinlysate wurden auf zwei Immunblots aufgetragen, um die Folgen der *FAAP100*-Mutationen auf Proteinebene nachzuweisen. Durch drei unterschiedliche Antikörper wurde die FAAP100-Expression analysiert. ab155209 detektierte bei allen aufgetragenen Proteinlysaten FAAP100 mit einem Gewicht von etwa 100 kDa. Im Gegensatz dazu wurde durch ab181185 sowie durch NBP1-90469 (roter Rahmen) FAAP100 mit einem Gewicht von etwa 100 kDa nur bei den Kontrollzelllinien sowie in verminderter Menge auch bei Cr12 nachgewiesen. Für beide Immunblots diente Vinculin als Ladungskontrolle. Über die Ratioberechnung FAAP100/Vinculin wurden ungleichmäßig geladene Proteinkonzentrationen normalisiert und so ein direkter Vergleich der FAAP100-Expression ermöglicht. \*: unspezifische Bande, kDa: Kilodalton. **B: Verminderte FAAP100-Proteinexpression bei Cr12.** Es wurden je drei unterschiedliche Konzentrationen (Konz.) an HEK293T-Kontroll- sowie HEK293T-Cr12-Proteinextrakten im Verhältnis 9:3:1 aufgetragen, um die verminderte FAAP100-Expression von Cr12 zu bestätigen. Neben FAAP100 wurde auch die Proteinexpression von FANCB analysiert. Vinculin diente als Ladungskontrolle. kDa: Kilodalton.

Zusätzlich wurde über einen Verdünnungsblot die Proteinmenge quantifiziert. So wurde bestätigt, dass FAAP100 bei Cr12 um mehr als ein Neunfaches im Vergleich zu der Proteinmenge von HEK293T reduziert war (Abbildung 22B). FANCB hingegen war bei Cr12 nur geringfügig vermindert. Allerdings war für den  $\alpha$ -FANCB-Antikörper bereits nachgewiesen worden, dass er

nicht spezifisch an FANCB bindet. Bei Proteinlysaten einer FA-B-Zelllinie hatte er nicht trunkiertes FANCB detektiert wie es erwartet worden war, sondern ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 98 kDa, welches auch Wildtyp-FANCB aufweist. Da dies formal gesehen nicht möglich ist, war das Ergebnis der detektierten FANCB-Menge nicht aussagekräftig. Da FAAP100 der Zelllinie HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> aus nur 149 Aminosäuren bestehen und somit weder die beschriebene Coiled-Coil-Domäne noch einen der Inter-Links, über welche die Interaktion mit FANCB vermittelt wird (Ling et al. 2007, Swuec et al. 2017), aufweisen würde (Abbildung 23A), ist es wahrscheinlich, dass FAAP100<sup>R149Vfs\*2</sup> durch NMD abgebaut wird. Eine Übersicht der FAAP100-Mutationen sowie der trunkierten FAAP100-Proteine der CRISPR/Cas9-Zelllinien ist in Abbildung 23A dargestellt. Weder p.(T542P) von 1176 noch eine der FAAP100-CRISPR/Cas9-Mutationen sind in der Coiled-Coil-Domäne oder einem der Inter-Links lokalisiert. Als Folge der Frameshift-Mutationen kommt es bei Cr10 und Cr21 zum Verlust des jeweils C-terminal gelegenen Inter-Links (aa 698-716) in den trunkierten FAAP100-Proteinen.



**Abbildung 23: FAAP100-Proteine der CRISPR/Cas9-Zelllinien sowie Auswirkung ihrer Mutationen auf die FANCD2-Monoubiquitinierung.** **A: FAAP100-Proteindarstellungen mit Lokalisationen der CRISPR/Cas9-Mutationen und p.(T542P).** Falls es nicht zum *Nonsense-mediated mRNA Decay* kommen sollte, würden durch die verschiedenen FAAP100-CRISPR/Cas9-Mutationen verkürzte FAAP100-Proteine translatiert werden. Diese unterschiedlichen FAAP100-Längen wurden mit ihrer jeweiligen Aminosäureanzahl schematisch in grau dargestellt. In Gelbtönen wurde je die Lokalisation der vier Inter-Links für die Interaktion mit FANCB (Swuec et al. 2017) bzw. in Lila die der potentiellen Coiled-Coil-Domäne (Ling et al. 2007) hervorgehoben. Die Lage der FAAP100-Mutation p.(T542P) des Fetus 1176 wurde mit einem roten Pfeil, die der CRISPR/Cas9-Zelllinien mit orangefarbenen Pfeilen (hellorange HAP1-Zellen, dunkelorange HEK293T-Zellen) bei FAAP100<sup>WT</sup> markiert. **B: FANCD2-Immunoblot.** Auf einen Immunblot wurden Proteinlysate der CRISPR/Cas9- sowie von Kontrollzelllinien aufgetragen. Durch einen  $\alpha$ -FANCD2-Antikörper konnte bei allen FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien nur nicht-ubiquitiniertes FANCD2 (D2) nachgewiesen werden. Vinculin diente als Ladungskontrolle. D2-Ub: monoubiquitiniertes FANCD2, kDa: Kilodalton.

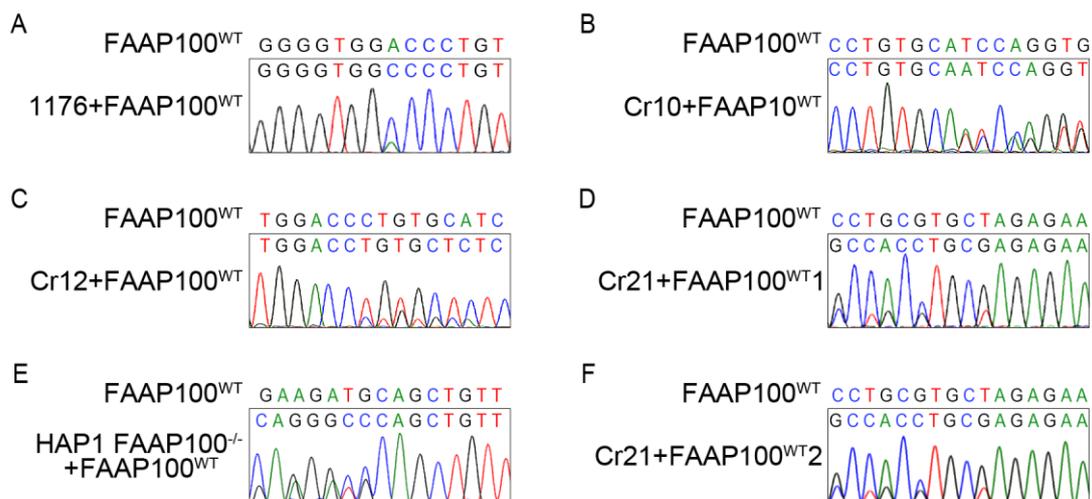
Funktionell wurde FAAP100 der CRISPR/Cas9-Zelllinien anhand der FANCD2-Monoubiquitinierung analysiert. Durch einen Immunblot konnte für alle vier FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien eine *upstream*-Eingruppierung bestätigt werden, da nur die unmodifizierte Form von FANCD2 detektiert war (Abbildung 23B). Somit führen alle durch das CRISPR/Cas9-System generierten FAAP100-Mutationen zu einem Funktionsverlust des Proteins.

#### 4. 1. 7 Komplementation und Charakterisierung FAAP100-defizienter Zelllinien

Für einen sicheren Nachweis, dass es sich bei der identifizierten Mutation in 1176 um die Ursache für FA handelt, musste die Zelllinie durch FAAP100<sup>WT</sup> komplementiert und anschließend im Vergleich mit der parentalen Linie analysiert werden. In diese Komplementationsstudien wurden zudem die FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien miteinbezogen. Damit ausgeschlossen werden konnte, dass der Leervektor pLVX bereits einen funktionellen Effekt aufweisen würde, bzw. bestätigt werden konnte, dass einzig c.1624A>C in *FAAP100* für den zellulären FA-Phänotyp in 1176 verantwortlich gewesen war, wurden die Amnionzellen 1176 neben FAAP100<sup>WT</sup>-cDNA auch mit dem Leervektor pLVX (Vektor<sup>pLVX</sup>) bzw. mit FAAP100-cDNA transduziert, die c.1624A>C trug (FAAP100<sup>T542F</sup>). Als Kontrollen dienten transduzierte nicht-FA- sowie transduzierte FA-B-Zelllinien.

##### 4. 1. 7. 1 Überprüfung der Komplementation per Sanger-Sequenzierung

Um zu prüfen, ob die FAAP100<sup>WT</sup>-cDNA erfolgreich in das Genom der FAAP100-defizienten Zelllinien integriert worden war, wurde gDNA dieser Linien per Sanger-Sequenzierung analysiert. In allen Elektropherogrammen konnte neben der vorhandenen Mutation die wildtypische Sequenz von *FAAP100* identifiziert werden (Abbildung 24).



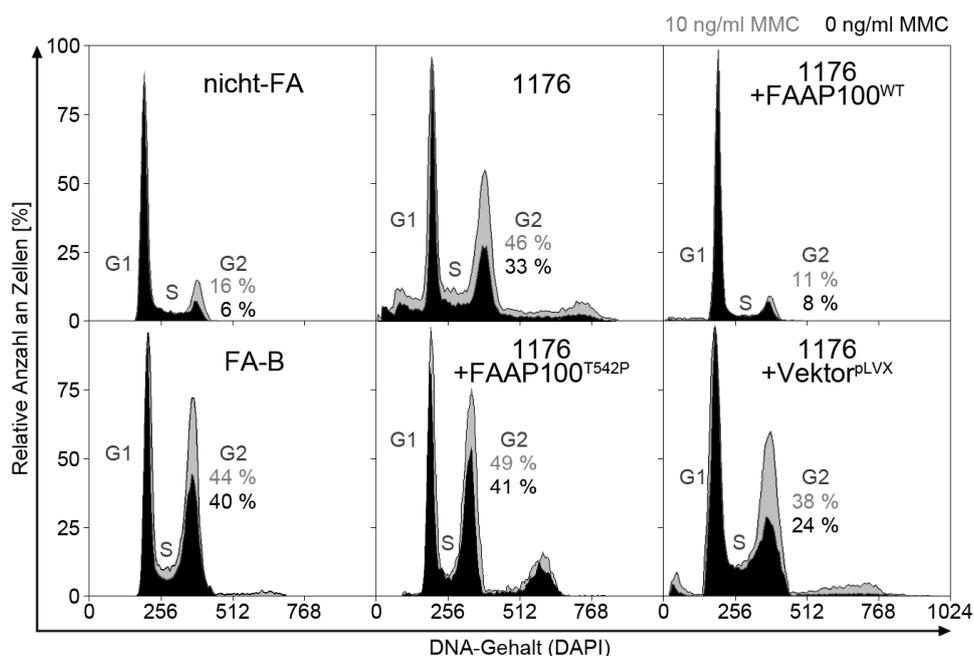
**Abbildung 24:** Nachweis der Transduktion FAAP100-defizienter Zelllinien durch FAAP100<sup>WT</sup>. Ergebnisse der Sanger-Sequenzierungen von 1176+FAAP100<sup>WT</sup> (A), Cr10+FAAP100<sup>WT</sup> (B), Cr12+FAAP100<sup>WT</sup> (C), Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> Ansatz 1 (D), HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>+FAAP100<sup>WT</sup> (E) und Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> Ansatz 2 (D). In den Elektropherogrammen konnte jeweils die mutierte sowie die Wildtyp-Sequenz der *FAAP100*-cDNA nachgewiesen werden. Für Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> wurden zwei unterschiedliche Transduktionsansätze (Cr21+FAAP100<sup>WT</sup>1 und Cr21+FAAP100<sup>WT</sup>2) analysiert. 1176+FAAP100<sup>WT</sup>: transformierte Amnionzelllinie, Cr10+FAAP100<sup>WT</sup>, Cr12+FAAP100<sup>WT</sup>, Cr21+FAAP100<sup>WT</sup>1 und Cr21+FAAP100<sup>WT</sup>2: HEK293T-Zelllinien, HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>+FAAP100<sup>WT</sup>: HAP1-Zelllinie.

Da Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> in den sich an die Komplementation anschließenden Analysen (Abschnitte 4. 1. 7. 2 bis 4. 1. 7. 4) weiterhin einen zellulären FA-Phänotyp aufwies, wurden für diese Zelllinie

jeweils drei Komplementationsansätze überprüft. Die Elektropherogramme, von denen zwei (Cr21+FAAP100<sup>WT</sup>1, Cr21+FAAP100<sup>WT</sup>2) der drei Zelllinien in Abbildung 24D und F dargestellt sind, zeigten jedoch neben der vier Basenpaar-Deletion nur die Sequenz von *FAAP100*<sup>WT</sup> und keine weiteren Mutationen. Somit war die Integration der wildtypischen *FAAP100*-cDNA in das Genom der Zelllinie Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> bestätigt. Auch die Zelllinie 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> wurde mithilfe der Sanger-Sequenzierung überprüft. Hier konnte weiterhin nur die homozygote Substitution c.1624A>C nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

#### 4. 1. 7. 2 Zellzyklusanalyse

Eine Standardtechnik in der FA-Diagnostik stellt die Analyse des Zellzyklus dar. Da der Reparaturmechanismus in FA-Zellen gestört ist, kommt es in diesen Zellen zu einem Arrest der G2-Phase. Dieser lässt sich mithilfe der Durchflusszytometrie darstellen, sodass FA-Zellen von nicht-FA-Zellen unterschieden werden können. Zunächst wurden die G2-Phase-Anteile der Amnionzelllinien analysiert (Abbildung 25).



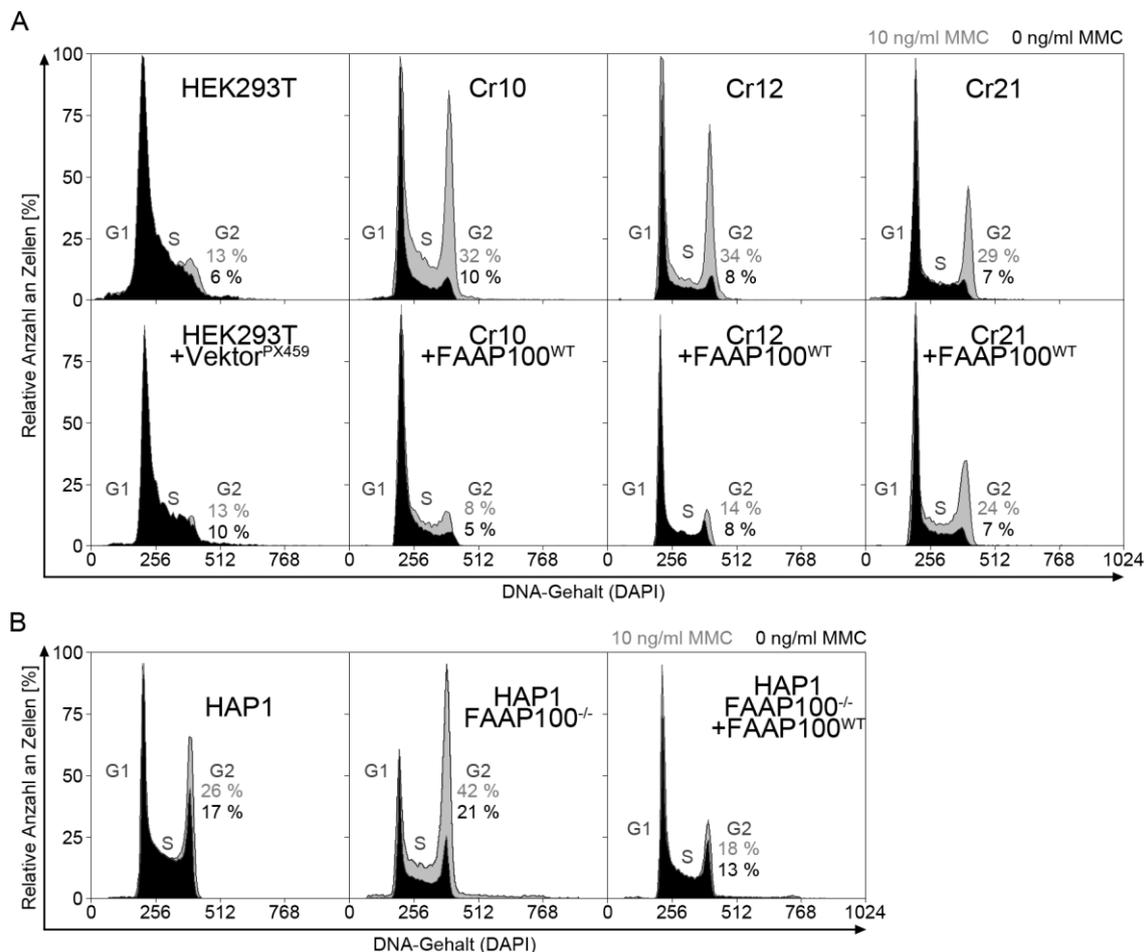
**Abbildung 25: Untersuchung zur Komplementation anhand des G2-Phase-Anteils bei 1176.** Es sind die Zellzyklushistogramme transformierter Zelllinien dargestellt, deren DNA mit DAPI angefärbt worden war. Die Zellzyklusprofile zeigen die Proportionen der Phasen mit (grau) und ohne (schwarz) MMC-Behandlung. Die Anteile der sich jeweils in der G2-Phase befindlichen 1176-, 1176+FAAP100<sup>WT</sup>-, 1176+FAAP100<sup>T542P</sup>- sowie 1176+Vektor<sup>PLVX</sup>-Zellen wurden mit denen zweier Kontrollzelllinien (nicht-FA, FA-B) verglichen.

Es ließ sich nachweisen, dass die Zellen 1176 im Gegensatz zu denen einer nicht-FA-Kontrolllinie einen erhöhten spontanen G2-Phase-Anteil aufwiesen (33 % bei 1176, 6 % bei nicht-FA). Dieser erhöhte sich nach MMC-Behandlung (10 ng/ml, 48 h) auf 46 %, wohingegen sich nur 16 % der nicht-FA-Zellen in der G2-Phase befanden. Der G2-Phase-Anteil der Zellen 1176 war vergleichbar mit dem einer FA-B-Kontrolllinie, von der 40 % der Zellen im unbehandelten Zustand und 44 % der Zellen nach MMC-Inkubation in der G2-Phase arretiert waren. Die transduzierten Zelllinien

1176+FAAP100<sup>WT</sup>, 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> und 1176+Vektor<sup>pLVX</sup> wurden ebenfalls in die Messungen eingeschlossen. Sowohl für die Linie 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> als auch 1176+Vektor<sup>pLVX</sup> konnte im Vergleich zu 1176 keine starke Veränderung des Anteils der in der G2-Phase arretierten Zellen festgestellt werden. Demnach waren sie weiterhin sensitiv gegenüber MMC und folglich nicht durch *FAAP100*<sup>T542P</sup>-cDNA bzw. den Leervektor pLVX komplementiert worden. Im Gegensatz dazu wies die Zelllinie 1176+FAAP100<sup>WT</sup> einen deutlich geringeren Anteil der in der G2-Phase arretierten Zellen als die Linie 1176 auf, sodass sie mit einer nicht-FA-Kontrolllinie vergleichbar war. So befanden sich nur 8 % (ohne MMC-Behandlung) bzw. 11 % (mit MMC-Behandlung) der Zellen von 1176+FAAP100<sup>WT</sup> in der G2-Phase. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Zellen 1176 durch *FAAP100*<sup>WT</sup>-cDNA komplementiert wurden und es sich demnach bei *FAAP100* um das ursächliche Gen für FA handelt. Darüber hinaus war es durch *FAAP100*<sup>T542P</sup>-cDNA nicht möglich, den zellulären FA-Phänotyp aufzuheben, was darauf schließen lässt, dass nur die Missense-Mutation p.(T542P) die Ursache für FA bei 1176 sein konnte.

Weiterhin wurden die Zellzyklusprofile der FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien, der jeweiligen Komplementationsansätze sowie der unbehandelten Kontrollzelllinien untersucht. Für Zellen mit einem HAP1-Hintergrund war es vor der Messung nötig, Einzelzellklone zu isolieren und diese zu einer klonalen Linie heranwachsen zu lassen. Bei HAP1-Zellen handelt es sich um eine fast haploide Zelllinie, die aus der männlichen Krebs-Linie KBM-7 (chronische myeloische Leukämie, CML) gewonnen wurde (Kotecki et al. 1999, Carette et al. 2011). Eine Ausnahme davon bildet ein Fragment von Chromosom 15, von dem in dieser Zelllinie zwei Kopien vorliegen (Essletzichler et al. 2014). Die Linie besitzt des Weiteren die Eigenschaft, im Laufe der Zeit einen diploiden Chromosomensatz zu entwickeln (Essletzichler et al. 2014). Dabei verhalten sich die Zellen nicht synchron, sodass eine Mischung in Bezug auf ihre Chromosomenanzahl vorliegt. Der durch eine Durchflusszytometriemessung ermittelte Zellzyklus wäre folglich nicht eindeutig einem bestimmten Chromosomensatz zuzuordnen. Durch die Messung einer klonalen HAP1-Zelllinie wurde eine einheitliche Anzahl an Chromosomen sichergestellt. Für eine exakte Zuordnung des Chromosomensatzes (haploid vs. diploid bzw. Übergänge) wurden bei jeder Messung Huhn-Zellen mitgeführt (Daten nicht gezeigt). Diese besitzen wie der Mensch einen diploiden Chromosomensatz, der allerdings aus 78 Chromosomen besteht. Da demnach 32 Chromosomen mehr als in humanen Zellen (in der Regel 46 Chromosomen) vorliegen, konnte man Rückschlüsse auf die Chromosomenanzahl der gemessenen HAP1-Zellen und damit auf die Ploidie ziehen. So konnte ermittelt werden, dass es sich bei allen vorliegenden HAP1-Zelllinien um Zellen mit einem weitgehend diploiden Chromosomensatz handelte. Die Diploidie ist vermutlich durch Endoreduplikation entstanden (Essletzichler et al. 2014). Abbildung 26 ist zu entnehmen, dass die FAAP100-defizienten Zelllinien Cr10, Cr12, Cr21 (Abbildung 26A) und HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> (Abbildung 26B) ohne MMC-Behandlung einen ähnlichen Zellanteil in der G2-Phase aufwiesen wie die Kontrollzelllinien (HEK239T, HEK239T+Vektor<sup>pX459</sup>, HAP1). Allerdings kam es nach

Inkubation mit MMC nur in den FAAP100-defizienten Zelllinien zu einem starken Anstieg des G2-Phase-Anteils.



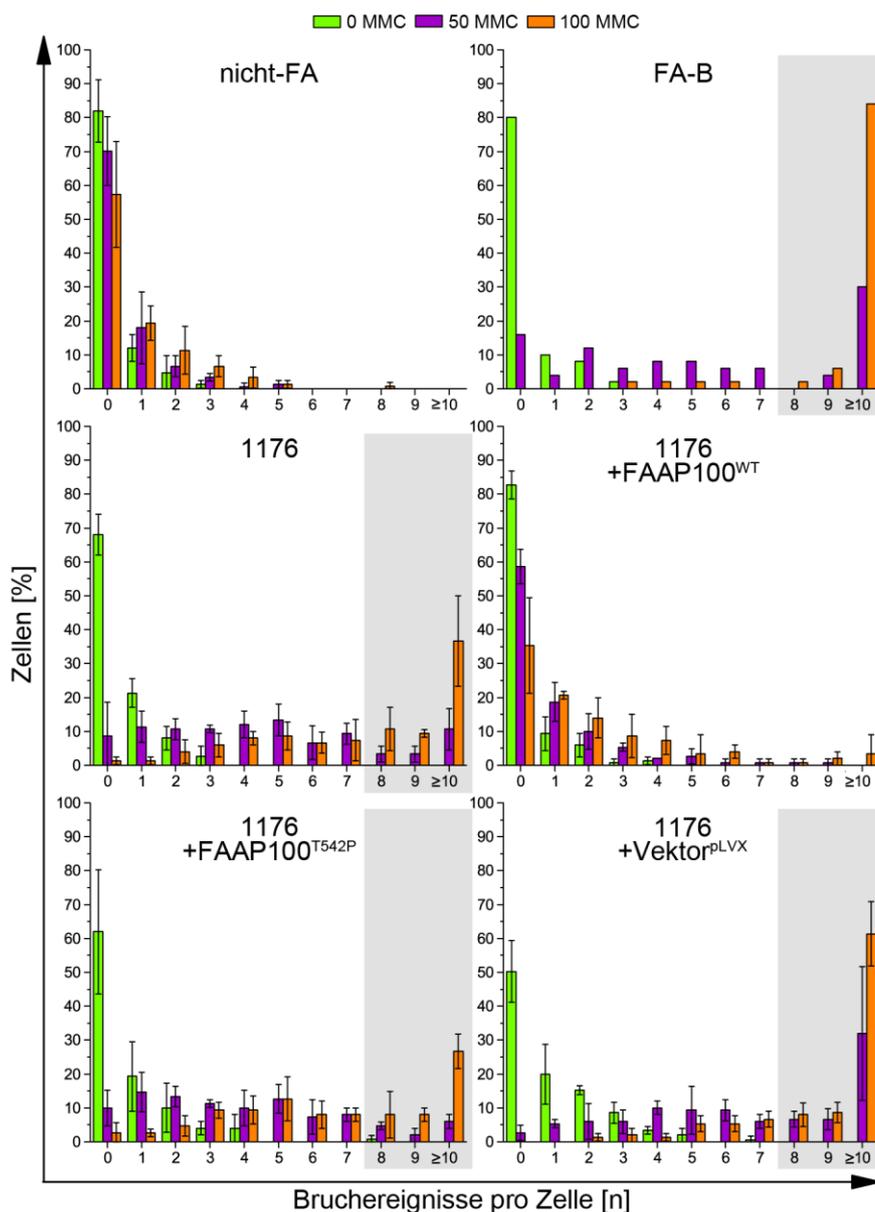
**Abbildung 26: Untersuchungen zur Komplementation anhand des G2-Phase-Anteils bei den FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien.** Zellzyklushistogramme nach DAPI-Färbung der HEK293T-Zelllinien (A) sowie der HAP1-Zelllinien (B). Die Zellzyklusprofile zeigen die Proportionen der Phasen mit (grau) und ohne (schwarz) MMC-Behandlung. Die Anteile der sich jeweils in der G2-Phase befindlichen FAAP100-CRISPR/Cas9-Zellen bzw. der Zellen, die mit FAAP100<sup>WT</sup> transduziert worden waren, wurden mit denen der Kontrollzelllinien (HEK293T, HEK293T+Vektor<sup>PX459</sup>, HAP1) verglichen.

So konnte gezeigt werden, dass sich die mit dem CRISPR/Cas9-System generierten Zelllinien sensitiv gegenüber ICL-induzierenden Agenzien verhalten, was den zellulären FA-Phänotyp widerspiegelt. Nach Einbringen von *FAAP100*<sup>WT</sup>-cDNA konnte der G2-Phase-Arrest für Cr12, Cr10 und HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> aufgehoben werden, sodass sie einen ähnlichen Zellzyklus wie ihre jeweils parentale Zelllinie aufweisen. Bei Cr21 hingegen reduzierte sich der G2-Phase-Anteil der mit MMC behandelten Zellen nur von 29 % auf 24 % und wies damit im Vergleich zu den Kontrollen HEK293T und HEK293T+Vektor<sup>PX459</sup> weiterhin eine erhöhte G2-Phase auf. Hier scheint die Komplementation mit *FAAP100*<sup>WT</sup>-cDNA nicht erfolgreich gewesen zu sein. Dieses Ergebnis wurde bei drei unabhängigen Komplementationsansätzen für die Zelllinie Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> beobachtet.

### 4. 1. 7. 3 Chromosomenbruchanalyse

Da FA zu den Chromosomeninstabilitätssyndromen gehört, wurde neben der Zellzyklusanalyse ein zytogenetischer Test mit den Zelllinien durchgeführt. Dabei wurden die Art und Anzahl der Chromosomenbrüche in je 50 Metaphasen ausgewertet.

Zunächst konnte anhand der Linie 1176 die bereits diagnostizierte Chromosomenbrüchigkeit bestätigt werden (Abbildung 27).

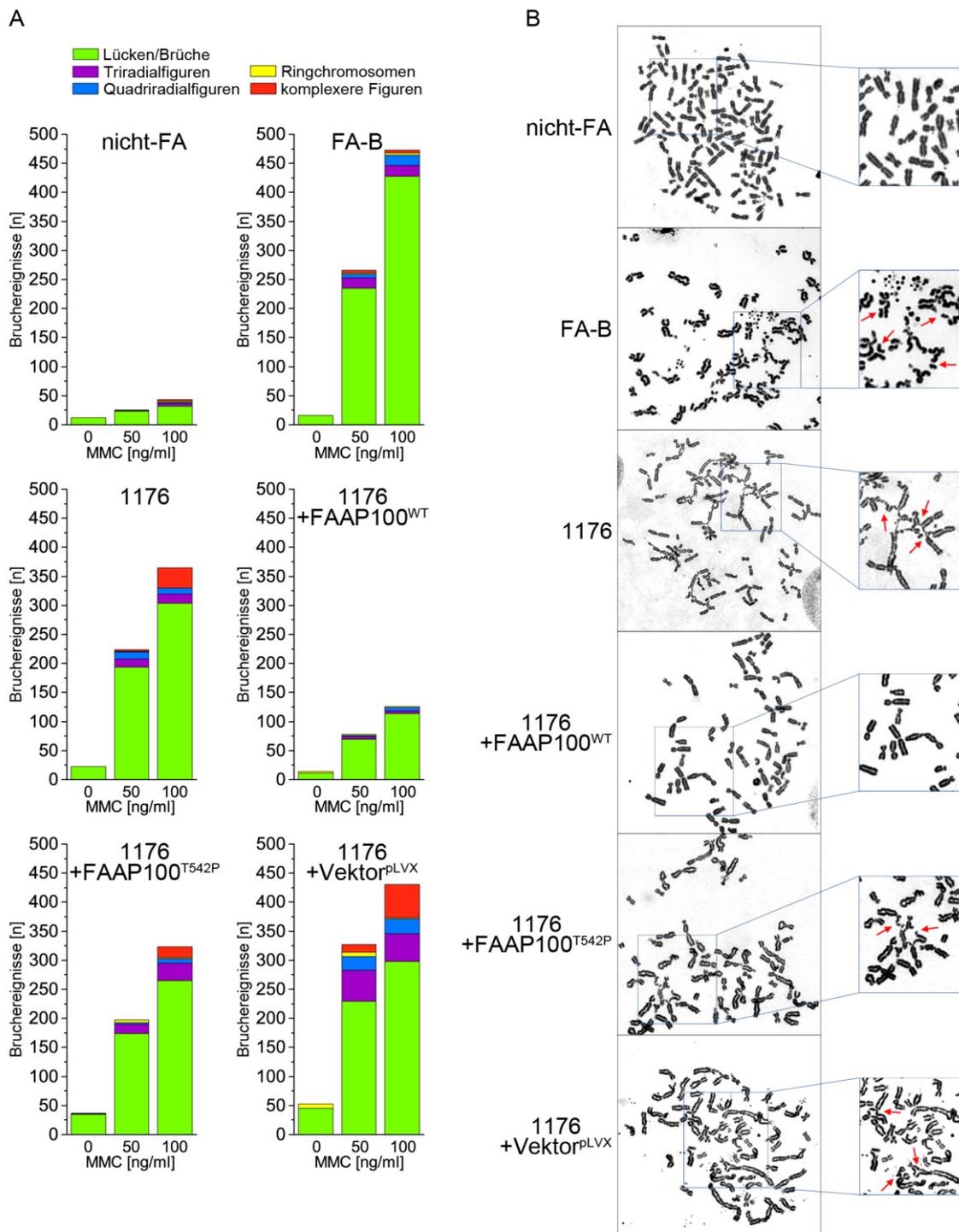


**Abbildung 27: Untersuchungen zur Komplementation mittels Chromosomenbruchanalysen bei 1176.** Anhand von Balkendiagrammen wurden die Anteile der Zellen in Prozent in Abhängigkeit der Bruchereignisse pro Zelle verschiedener Zelllinien verglichen. Zellen, die unbehandelt geblieben waren, sind grün, Zellen, die für 48 h 50 ng/ml MMC bzw. 100 ng/ml MMC exponiert wurden, sind lila bzw. orange markiert. Eine graue Hintergrundfläche hebt die veränderten Bruchverteilungen hervor, die typisch für einen zellulären FA-Phänotyp sind. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit ihren Standardabweichungen angegeben. Für FA-B wurde nur ein Ansatz ausgewertet.

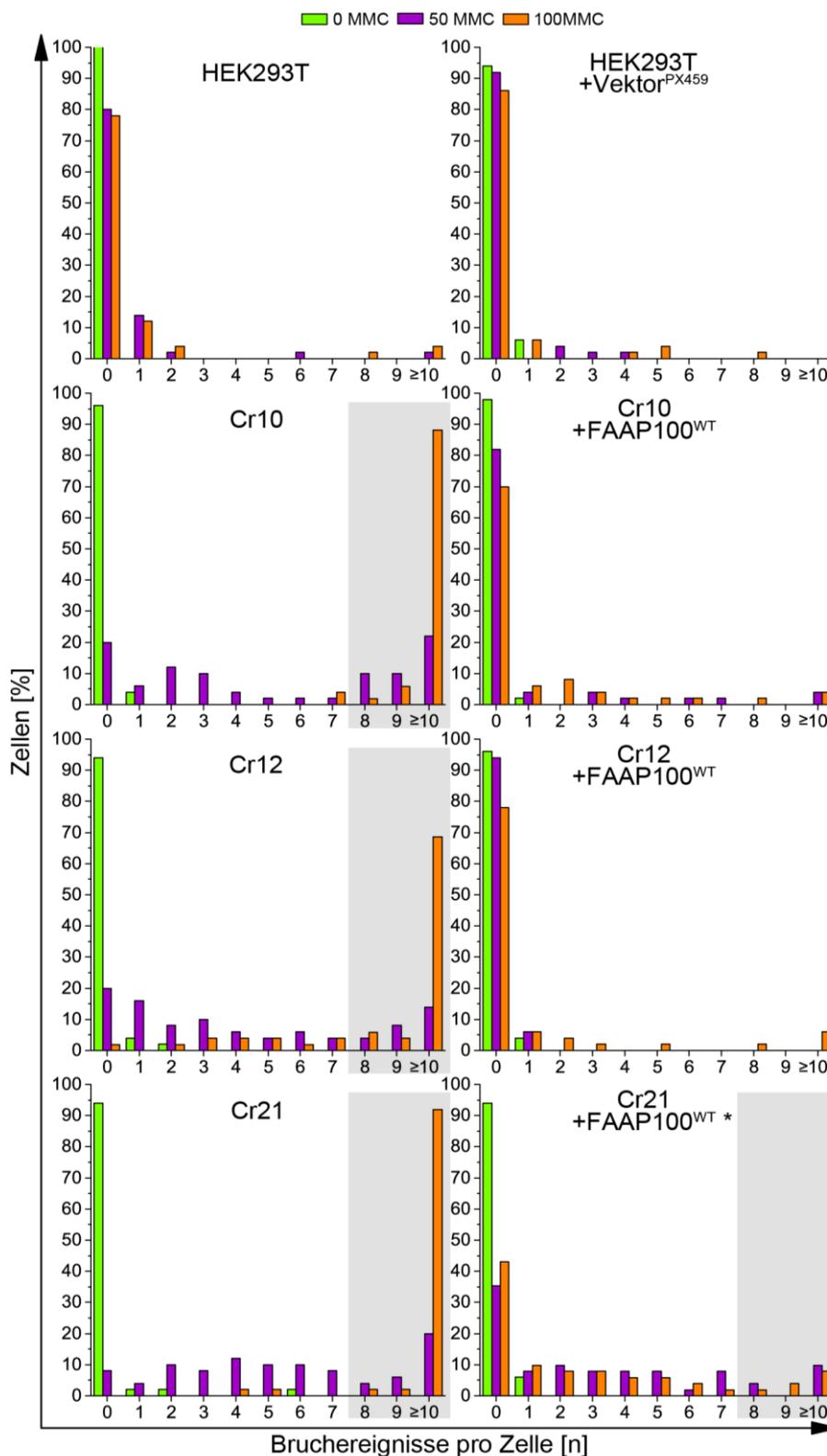
Diese nahm im Gegensatz zu einer nicht-FA-Kontrolle abhängig von der MMC-Konzentration stark zu. Ohne MMC konnte bei allen Linien ein ähnliches Verhalten beobachtet werden. Die meisten Zellen wiesen keine Brüche auf. Dabei lag jedoch nur bei den Zelllinien nicht-FA und 1176+FAAP100<sup>WT</sup> dieser Wert über 80 %. Nach MMC-Zugabe konnten größere Unterschiede hinsichtlich des Anteils der Zellen mit Bruchereignissen beobachtet werden. Nicht-FA und 1176+FAAP100<sup>WT</sup> wiesen sowohl mit 50 ng/ml als auch mit 100 ng/ml MMC in den meisten Zellen weiterhin keine Bruchereignisse auf, wohingegen die Bruchrate bei FA-B, 1176, 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> sowie 1176+Vektor<sup>pLVX</sup> nach MMC-Behandlung mit 50 ng/ml über das ganze Spektrum verteilt war. Nach Inkubation mit 100 ng/ml kamen bei diesen Zelllinien in den meisten Metaphasen zehn oder mehr Brüche vor.

Ein vergleichbares Ergebnis erhielt man, wenn man die Anzahl der Bruchereignisse auf die jeweilige MMC-Konzentration bezog (Abbildung 28A). Nach MMC-Zugabe stieg die Gesamtanzahl der Brüche bei den Zelllinien FA-B, 1176, 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> sowie 1176+Vektor<sup>pLVX</sup> stark an. Bei 50 ng/ml MMC lag die Anzahl im Bereich von 197 (1176+FAAP100<sup>T542P</sup>) bis 326 Brüchen (1176+Vektor<sup>pLVX</sup>) und nach Zugabe von 100 ng/ml bereits in einer Spanne von 323 (1176+FAAP100<sup>T542P</sup>) bis 473 Brüchen (FA-B). Auch das Vorhandensein von Rearrangements ist Abbildung 28A zu entnehmen. So traten in den Zellen dieser Linien neben einfachen Brüchen auch Radialfiguren, Ringchromosomen sowie komplexere Figuren auf, was ein typisches Merkmal von FA-Zellen ist (Schroeder et al. 1964, Oostra et al. 2012). Gegensätzlich verhielten sich die nicht-FA-Kontrolle sowie die komplementierte Zelllinie 1176+FAAP100<sup>WT</sup>. Beide Linien blieben unter einer Gesamtbruchanzahl von 130 nach 100 ng/ml MMC-Behandlung. Dabei wies die nicht-FA-Kontrolle mit nur 43 Brüchen insgesamt die geringste Anzahl an Bruchereignissen auf. So kamen in der nicht-FA-Kontrolle und in 1176+FAAP100<sup>WT</sup> auch kaum Radial- oder komplexere Bruchfiguren vor. In Abbildung 28B sind beispielhaft Metaphasen dieser Zelllinien mit (FA-B, 1176, 1176+FAAP100<sup>T542P</sup>, 1176+Vektor<sup>pLVX</sup>) und ohne Rearrangements (nicht-FA, 1176+FAAP100<sup>WT</sup>) dargestellt.

Durch die Chromosomenbruchanalyse kann gezeigt werden, dass die Linie 1176 sensitiv gegenüber MMC ist und sich ähnlich wie eine FA-Kontrolle (FA-B) verhält. Dies bestätigt die Verdachtsdiagnose FA für den Fetus 1176 ein weiteres Mal. Die Sensitivität kann nach Einbringen von *FAAP100*<sup>WT</sup>-cDNA aufgehoben werden, sodass sich die Zelllinie 1176+FAAP100<sup>WT</sup> bezüglich ihrer Chromosomenbrüchigkeit wie eine nicht-FA-Kontrolle verhält. Die Zelllinie 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> hingegen weist weiterhin eine Hypersensitivität gegenüber MMC auf. Somit kann anhand dieser Ergebnisse abermals nachgewiesen werden, dass es sich bei *FAAP100* um das ursächliche FA-Gen und bei p.(T542P) um die ursächliche Mutation bei dem Fetus 1176 gehandelt hatte.



**Abbildung 28: Untersuchungen zur Komplementation hinsichtlich der Anzahl und des Typs von Chromosomenaberrationen bei 1176. A: Anzahl der Chromosomenbruchereignisse sowie der Chromosomenbrucharten in Abhängigkeit von der MMC-Konzentration.** Es sind mit Ausnahme von FA-B (nur ein Ansatz) die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Werte wurden je nach Art des entsprechenden Bruchereignisses bzw. Rearrangements (Lücken/Brüche in Grün, Triradial- und Quadriradialfiguren in Lila bzw. Blau, Ringchromosomen in Gelb und komplexere Figuren in Rot) aufgedgliedert. **B: Mikrofotografien je einer Metaphase.** Pro Zelllinie ist eine Metaphase dargestellt, deren entsprechende Kulturen mit 100 ng/ml MMC für 48 h inkubiert worden waren. Brüche, Radial- sowie komplexere Figuren sind durch rote Pfeile markiert. Die Originalmikrofotografien wurden mit einem 100x Objektiv aufgenommen.

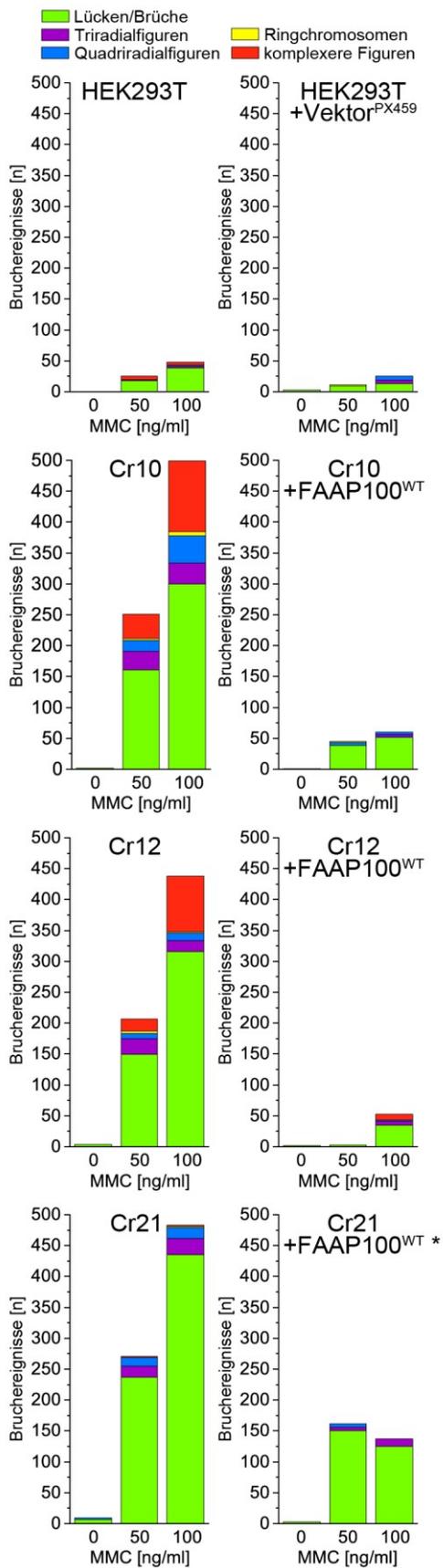


**Abbildung 29: Untersuchungen zur Komplementation mittels Chromosomenbruchanalysen bei den CRISPR/Cas9-HEK293T-Zelllinien.** Anhand von Balkendiagrammen wurden die Anteile der Zellen in Prozent in Abhängigkeit der Bruchereignisse pro Zelle verschiedener Zelllinien verglichen. Zellen, die unbehandelt geblieben waren, sind grün, Zellen, die für 48 h 50 ng/ml MMC bzw. 100 ng/ml MMC exponiert wurden, sind lila bzw. orange markiert. Eine graue Hintergrundfläche hebt die veränderten Bruchverteilungen hervor, die typisch für einen zellulären FA-Phänotyp sind. Der \* gibt an, dass bei Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> bei einer Behandlung mit 100 ng/ml MMC nur auszählbare Metaphasen berücksichtigt worden waren. Die meisten Chromosomen dieser Zellen waren vollständig zerstört.

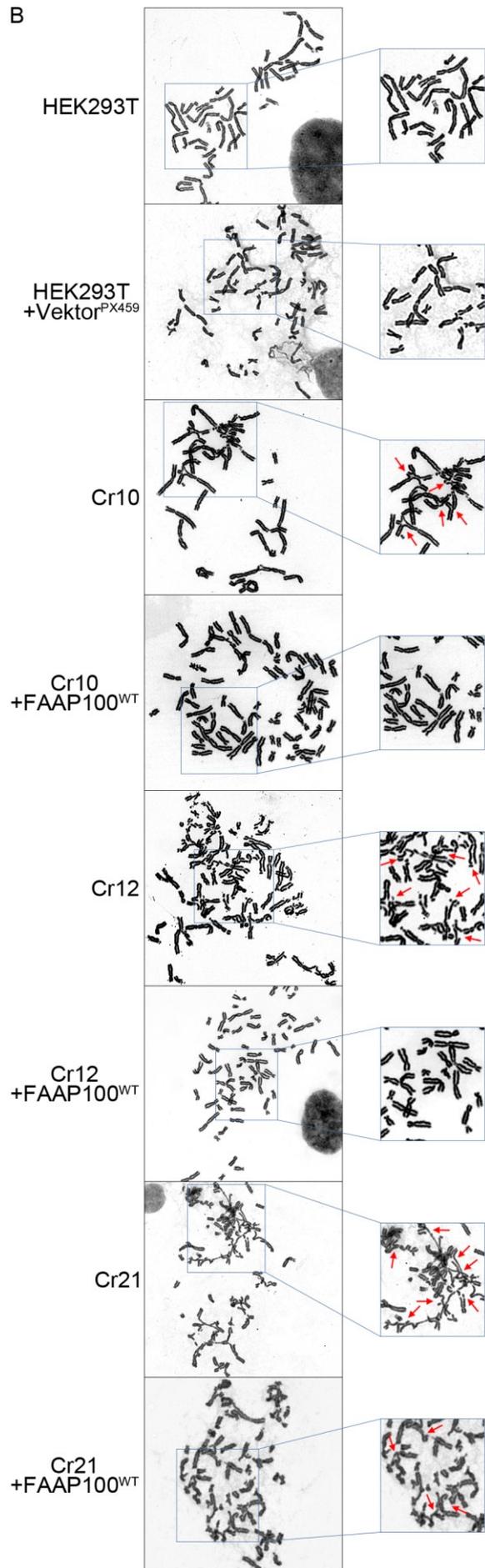
Ebenso wiesen alle selbst generierten FAAP100-CRISPR/Cas9-Linien (Cr10, Cr21, Cr12) eine hohe Bruchrate verglichen mit den Kontrollen HEK293T und HEK293T+Vektor<sup>PX459</sup> auf. Aus Abbildung 29 und Abbildung 30A wird deutlich, dass die Bruchereignisse pro Zelle sowie die Bruchanzahl in Abhängigkeit der zugegebenen MMC-Konzentration sogar höher als bei der Zelllinie 1176 ausfielen. Bei einer Behandlung mit 100 ng/ml MMC wiesen fast alle Zellen zehn oder mehr Brüche auf (Abbildung 29).

Auch die Gesamtanzahl der Brüche bei 100 ng/ml MMC lag mit 499 (Cr10), 486 (Cr21) und 438 (Cr12) Brüchen in einem Bereich, der sich stark an das auswertungsbedingte Maximum von 500 Brüchen annäherte (Abbildung 30A). Vor allem bei den Linien Cr10 und Cr12 fiel auf, dass sehr viele komplexere Figuren mit fünf oder mehr Brüchen auftraten. Nachdem *FAAP100*<sup>WT</sup>-cDNA in diese beiden Zelllinien eingebracht worden war, war die Chromosomenbrüchigkeit mit der von normalen Kontrollzelllinien vergleichbar. Anders verhielt es sich bei Cr21+FAAP100<sup>WT</sup>. In Abbildung 29 zeigt diese Zelllinie vor allem nach Behandlung mit 100 ng/ml MMC ein ähnliches Muster an Bruchereignissen pro Zelle wie die nicht-sensitiven Zelllinien HEK293T, HEK293T+Vektor<sup>PX459</sup>, Cr10+FAAP100<sup>WT</sup> bzw. Cr12+FAAP100<sup>WT</sup>. Allerdings wurden bei den Zellen Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> nach einer Behandlung mit 100 ng/ml MMC nur die Metaphasen berücksichtigt, die auszählbar waren. Die meisten Chromosomen der in der Metaphase befindlichen Zellen waren vollständig zerstört, sodass keine eindeutigen Chromosomenstrukturen mehr ausgemacht werden konnten. Wertet man zerstörte Metaphasen als hochgradig geschädigte Zellen, so müsste korrekterweise der orange Balken, welcher die Konzentration von 100 ng/ml MMC darstellt, bei  $\geq 10$  Brüchen pro Zelle auf fast 100 % gesetzt werden. Aus Abbildung 30 wird ersichtlich, dass die Bruchanzahl von Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> mit 137 Brüchen bei 100 ng/ml MMC nicht so weit zurückging wie es bei Cr10+FAAP100<sup>WT</sup> (60 Brüchen) und Cr12+FAAP100<sup>WT</sup> (53 Brüchen) zu beobachten gewesen war. Jedoch waren für Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> hier ebenfalls nur die analysierbaren Zellen ausgezählt und so die extrem zerstörten Metaphasen nicht mitberücksichtigt worden. In Abbildung 30B ist jeweils eine Metaphase der selbst generierten FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien nach 100 ng/ml-MMC Behandlung für 48 h dargestellt. In den Metaphasen der Kontrolllinien HEK293T und HEK293T+Vektor<sup>PX459</sup> sowie in denen der komplementierten Zelllinien Cr10+FAAP100<sup>WT</sup> und Cr12+FAAP100<sup>WT</sup> waren nur Chromosomen ohne Bruchereignisse zu finden. Dagegen wiesen die Chromosomen der Zelllinien Cr10, Cr12, Cr21 und Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> Brüche sowie komplexere Rearrangements auf. Da die Zelllinien Cr10, Cr12 und Cr21 eine vergleichbare Chromosomeninstabilität zur Zelllinie 1176 und somit ein typisches Merkmal des zellulären FA-Phänotyps zeigten, kann der Phänotyp der FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien als FA-typisch bestätigt werden. Die anschließende Komplementation dieser Zelllinien ist nur bei Cr10 und Cr12 erfolgreich gewesen, da Cr21 nach Einbringen der *FAAP100*<sup>WT</sup>-cDNA weiterhin einen zellulären FA-Phänotyp aufweist. Dies traf für alle drei Komplementationsansätze der Zelllinie Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> zu.

A

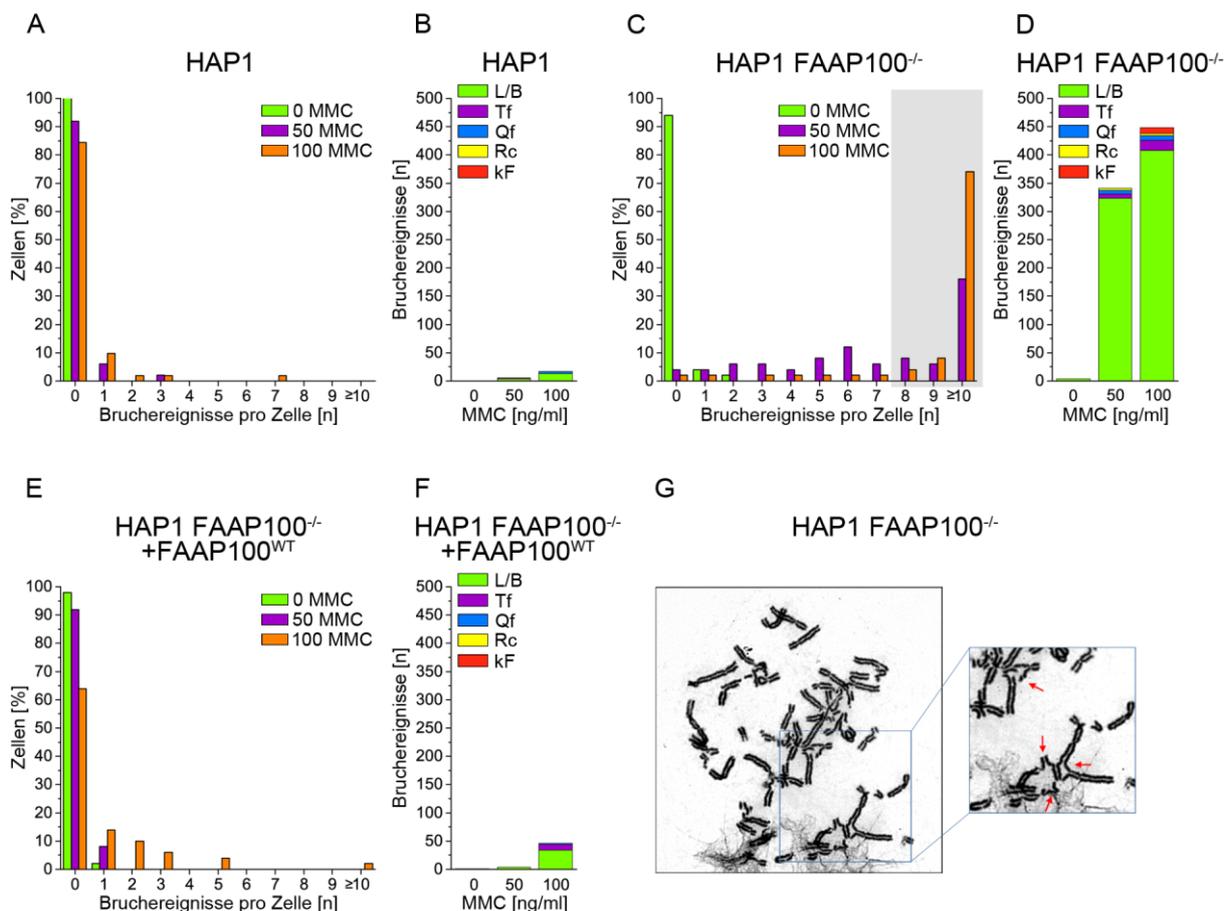


B



**Abbildung 30: Untersuchungen zur Komplementation hinsichtlich der Anzahl und des Typs von Chromosomenaberrationen bei den CRISPR/Cas9-HEK293T-Zelllinien. A: Anzahl der Chromosomenbruchereignisse sowie der Chromosomenbrucharten in Abhängigkeit von der MMC-Konzentration.** Die Werte wurden je nach Art des entsprechenden Bruchereignisses bzw. Rearrangements (Lücken/Brüche in Grün, Triradial- und Quadriradialfiguren in Lila bzw. Blau, Ringchromosomen in Gelb und komplexere Figuren in Rot) aufgedgliedert. Der \* bei Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> gibt an, dass in diesen Zellen nach einer MMC-Behandlung mit 100 ng/ml nur auszählbare Metaphasen berücksichtigt worden waren. Die meisten Chromosomen dieser Zellen waren vollständig zerstört, sodass auch die Arten der Chromosomenrearrangements nicht genau erfasst werden konnten. **B: Mikrofotografien je einer Metaphase.** Pro Zelllinie ist eine Metaphase dargestellt, deren entsprechende Kulturen mit 100 ng/ml MMC für 48 h inkubiert worden waren. Brüche, Radial- sowie komplexere Figuren sind durch rote Pfeile markiert. Die Originalmikrofotografien wurden mit einem 100x Objektiv aufgenommen.

Der Knockout der kommerziell erworbenen Zelllinie HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> konnte durch eine Chromosomenbruchanalyse ebenfalls bestätigt werden. So zeigt Abbildung 31B, dass die Anteile der Bruchereignisse pro HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>-Zelle sowie auch die Gesamtanzahl der ermittelten Brüche nach MMC-Zugabe (341 Brüche mit 50 ng/ml MMC bzw. 448 Brüche mit 100 ng/ml MMC) stark anstiegen. Im Gegensatz dazu wiesen die Kontrollzelllinie HAP1 (Abbildung 31A) sowie die komplementierte Zelllinie HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>+FAAP00<sup>WT</sup> (Abbildung 31C) kaum Bruchereignisse auf. In Abbildung 31D ist beispielhaft eine Metaphase der Zelllinie HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> abgebildet, welche zuvor mit 100 ng/ml MMC inkubiert worden war. In der Vergrößerung kann man deutlich die Bruchereignisse sowie eine Triradialfigur erkennen.



**Abbildung 31: Untersuchungen zur Komplementation mittels Chromosomenbruchanalysen bei HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>.** Anteil der Zellen in Prozent klassifiziert nach Bruchereignissen pro Zelle der Zelllinien HAP1 (A), HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> (C) und HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>+FAAP100<sup>WT</sup> (E). Zellen, die unbehandelt geblieben

waren, sind grün, Zellen, die für 48 h 50 ng/ml MMC bzw. 100 ng/ml MMC exponiert wurden, sind lila bzw. orange markiert. Eine graue Hintergrundfläche hebt die veränderten Bruchverteilungen hervor, die typisch für einen zellulären FA-Phänotyp sind. **Anzahl der Chromosomenbruchereignisse sowie der Chromosomenbrucharten in Abhängigkeit von der MMC-Konzentration der Zelllinien HAP1 (B), HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> (D) und HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>+FAAP100<sup>WT</sup> (F).** Die Werte wurden nach Art des entsprechenden Bruchereignisses bzw. Rearrangements aufgegliedert. L/B: Lücken/Brüche (grün), Tf: Triradialfiguren (lila), Qf: Quadriradialfiguren (blau), Rc: Ringchromosomen (gelb), kF: komplexere Figuren (rot). **G: Mikrofotografie einer Metaphase der Zelllinie HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>.** Die entsprechende Kultur der dargestellten Metaphase war mit 100 ng/ml MMC für 48 h inkubiert worden. Brüche, Radial- sowie komplexere Figuren sind durch rote Pfeile markiert. Die Originalmikrofotografie wurde mit einem 100x Objektiv aufgenommen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch die zytogenetischen Experimente FA-typische Chromosomenbrüchigkeiten für die Amnionzelllinie 1176 sowie für die CRISPR/Cas9-Linien Cr10, Cr21, Cr12 und HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> bestätigt werden können. Dieser ermittelte zelluläre FA-Phänotyp lässt sich, mit Ausnahme von Cr21+FAAP100<sup>WT</sup>, nach der Transduktion mit FAAP100<sup>WT</sup>-cDNA aufheben. So war die Komplementation bei allen Zelllinien außer bei Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> erfolgreich.

Im Rahmen der Chromosomenbruchanalyse wurden stichprobenartig die vorliegenden Chromosomenanzahlen der einzelnen Zelllinien ermittelt. Sie sind in Tabelle 17 aufgeführt.

**Tabelle 17: Gemittelte Chromosomenzahlen.**

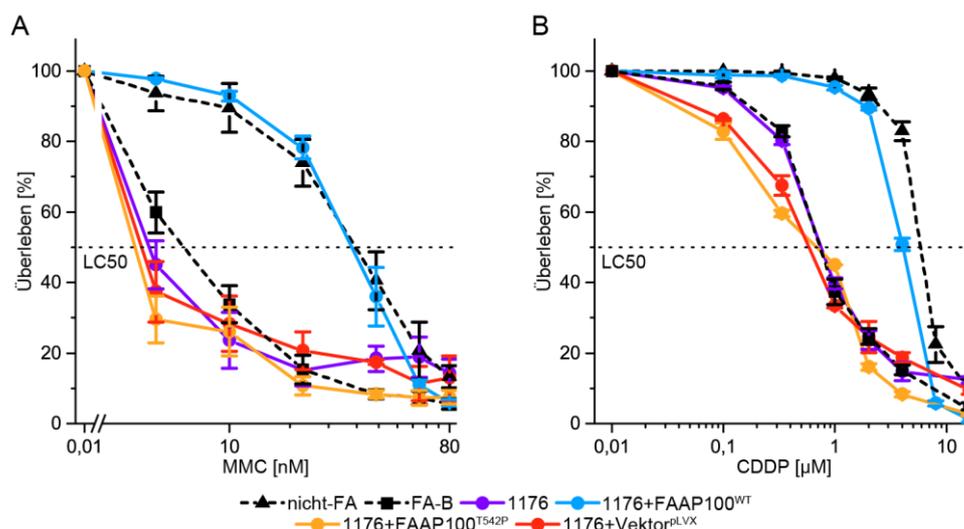
Zelllinie	Chromosomenanzahl/Zelle	Anzahl der untersuchten Zellen	Zelllinie	Chromosomenanzahl/Zelle	Anzahl der untersuchten Zellen
nicht-FA	73,64	85	HEK293T	63,38	32
FA-B	47,82	17	HEK293T +Vektor <sup>PX459</sup>	62,17	30
1176	69,22	67	Cr10	63,83	30
1176 +FAAP100 <sup>WT</sup>	60,23	118	Cr10 +FAAP100 <sup>WT</sup>	62,93	30
1176 +FAAP100 <sup>T542P</sup>	61,71	55	Cr12	64,91	23
1176+Vektor <sup>PLVX</sup>	66,53	90	Cr12 +FAAP100 <sup>WT</sup>	57,23	31
HAP1	31,28	36	Cr21	60,94	17
HAP1 FAAP100 <sup>-/-</sup>	33,08	38	Cr21 +FAAP100 <sup>WT</sup>	61,25	16
HAP1 FAAP100 <sup>-/-</sup> +FAAP100 <sup>WT</sup>	39,91	34			

Demnach kamen sowohl in den diploiden Zelllinien über 46 Chromosomen als auch in den haploiden Zelllinien mit einem HAP1-Hintergrund mehr als 23 Chromosomen vor. Da es sich bei den diploiden Linien entweder um transformierte Fibroblasten- bzw. Amnionkulturen oder um eine etablierte Laborzelllinie (transformierte menschliche embryonale Nierenzellen, *Human Embryonic Kidney*, HEK293T) handelte, weisen diese Linien die Eigenschaft chromosomaler Instabilität auf (Ray et al. 1990). Durch das SV40 Large T-Antigen kommt es zur Immortalisierung der Zellen, die mit strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen einhergeht. Der

genaue Mechanismus ist nicht bekannt, jedoch scheint das SV40 Large T-Antigen eine Dysregulation der mitotischen Zellzyklus-Kontrollpunkte hervorzurufen, die normalerweise eine Endoreduplikation verhindern und Zellen mit anomal replizierter DNA oder falsch-segregierten Chromosomen arretieren (Chang et al. 1997, Velicescu et al. 2003). So kommt es zu Poly- und/oder Aneuploidie, was sich in den hier analysierten Zelllinien in einer Hypotri- bzw. Hypotetraploidie äußert. Die Amnionlinien weisen über 60 Chromosomen, die nicht-FA-Kontrollzelllinie bereits über 73 Chromosomen auf. Bei der FA-B-Linie wurden durchschnittlich etwas mehr als 47 Chromosomen ermittelt. Allerdings waren hier nur 17 Metaphasen in Bezug auf ihre Chromosomenanzahl aus nur einem Ansatz betrachtet worden. Die Chromosomenanzahl der Zellen mit einem HEK293T-Hintergrund schwankt ebenfalls um etwa 60 Chromosomen pro Zelle. Des Weiteren besitzt die fast haploide Zelllinie HAP1 die Tendenz, sich zu einer diploiden Linie zu entwickeln (Essletzbichler et al. 2014). Dies kann mit einer ermittelten Anzahl von 31 oder mehr Chromosomen pro Metaphase bestätigt werden. Sie weisen somit eine Hypodiploidie auf.

#### 4. 1. 7. 4 Überlebenskurven

Ein weiteres Charakteristikum von FA-Zellen ist ihre geringere Überlebensfähigkeit in Abhängigkeit von einer ansteigenden Konzentration an ICL-induzierenden Agenzien. Es wurde die Überlebensfähigkeit von allen Zellen in Abhängigkeit von MMC und die der Zelllinie 1176 sowie deren transduzierter Tochterlinien zusätzlich in Abhängigkeit von Cisplatin (CDDP) gemessen. Sowohl nach Behandlung mit MMC (Abbildung 32A) als auch mit CDDP (Abbildung 32B) verhielt sich die Linie 1176 ähnlich wie eine FA-B-Linie. So nahm mit ansteigenden MMC- oder CDDP-Konzentrationen der Anteil der vitalen Zellen kontinuierlich ab. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die LC50 (*lethal concentration*, letale Konzentration für 50 % der Zellen) für 1176 bei etwa 4 nM MMC bzw. bei etwa 0,6 µM CDDP lag. Weder eine Transduktion der Zellen 1176 mit dem Leervektor pLVX noch mit *FAAP100<sup>T542P</sup>*-cDNA konnte die Überlebensfähigkeit der Zellen steigern. Im Gegensatz dazu verhielt sich die Zelllinie 1176+FAAP10<sup>WT</sup> ähnlich wie eine nicht-FA-Kontrolle und wies keinen typischen zellulären FA-Phänotyp auf. Somit kann durch die Überlebenskurven ebenfalls bestätigt werden, dass die Missense-Mutation p.(T542P) in FAAP100 die FA-Ursache bei dem Fetus 1176 gewesen war.

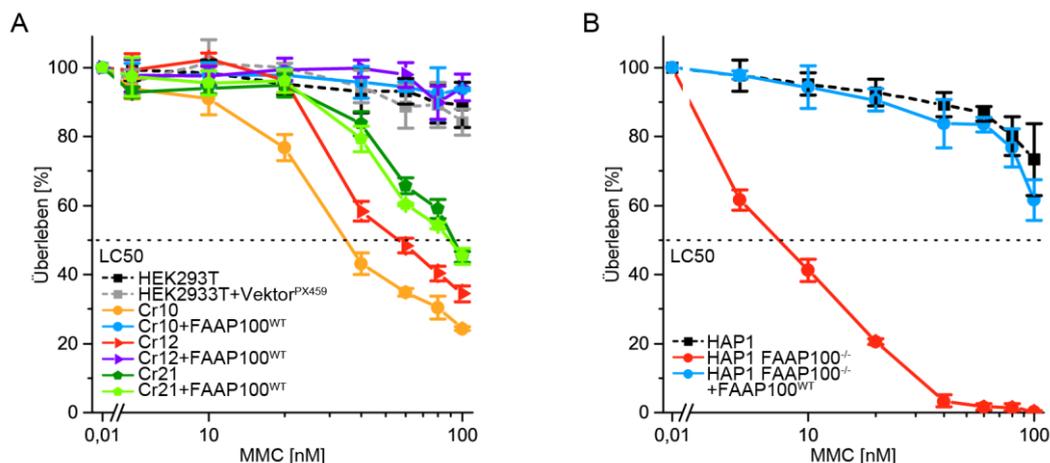


**Abbildung 32: Untersuchungen zur Komplementation mittels Überlebenskurven von 1176. Überleben transformierter Zellen in Abhängigkeit der Konzentration von MMC (A) sowie Cisplatin (B).** In einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve wurden die Anteile der vitalen Zellen in Prozent aufgetragen, nachdem sie gegen die Anzahl der jeweils unbehandelten Kultur normalisiert worden waren (arbiträr 100 %). Die Mittelwerte sowie Standardabweichungen wurden aus Triplikaten berechnet. Bei den Analysen wurden jeweils Kontrollzelllinien (gestrichelte Kurven) mitgeführt. Die gestrichelte horizontale Linie markiert die LC50 (letale Konzentration für 50 % der Zellen). MMC: Mitomycin C, CDDP: Cisplatin.

Auch bei den FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien war eine geringere Überlebensfähigkeit im Vergleich zu den Kontrollzelllinien nachweisbar (Abbildung 33). Die Zelllinien zeigten bei steigender MMC-Konzentration eine Abnahme ihrer Vitalität. Allerdings verhielten sich die Zellen mit einem HEK293T-Hintergrund (Abbildung 33A) weniger sensitiv als die Amnionzellen. Bei einer Konzentration von 100 nM MMC waren noch 34-45 % lebende Zellen zu verzeichnen und die LC50 betrug 35 nM für Cr10. Mit ca. 56 nM für Cr12 und über 90 nM für Cr21 waren sogar noch höhere Konzentrationen nötig, um die LC50 zu erreichen. Für die HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>-Zellen gab es bereits bei einer Konzentration von 40 nM nur noch 3 % lebende Zellen und bei 100 nM war gar kein Überleben mehr zu beobachten (Abbildung 33B). Die LC50 für diese Zellen lag bei etwa 7 nM MMC. Durch die Komplementation der FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien mit FAAP100<sup>WT</sup>-Protein konnte mit Ausnahme von Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> die Sensitivität gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen aufgehoben werden, sodass sich die Zellen ähnlich wie die der jeweiligen Kontrollzelllinie verhielten. Da sowohl die HEK293T- als auch die HAP1-Kontroll- bzw. komplementierten Zelllinien sich im Vergleich zu den Fibroblasten- bzw. Amnionzelllinien weniger sensitiv gegenüber MMC verhielten, konnte im verwendeten Konzentrationsbereich für sie keine LC50 ermittelt werden. Für Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> war kaum ein Unterschied in der Überlebensfähigkeit zu Cr21 festzustellen.

Die herabgesetzte Vitalität der CRISPR/Cas9-Zelllinien bei zunehmender MMC-Konzentration bestätigt das Einbringen pathogener FAAP100-Mutationen in diesen Zellen. Die Sensitivität konnte bei Cr10+FAAP100<sup>WT</sup> sowie bei Cr12+FAAP100<sup>WT</sup> durch FAAP100<sup>WT</sup>-cDNA aufgehoben und die Zellen konnten somit komplementiert werden. Demgegenüber verhielt sich Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> weiterhin sensitiv gegenüber MMC, sodass demnach die Komplementation in

dieser Zelllinie nicht erfolgreich gewesen ist. Dies traf auf alle drei Komplementationsansätzen der Zelllinie Cr21+FAAP10<sup>WT</sup> zu. Der Übersicht halber ist in Abbildung 33A jedoch nur ein Ansatz dargestellt.



**Abbildung 33: Untersuchungen zur Komplementation mittels Überlebenskurven der FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien. Überleben der CRISPR/Cas9-HEK293T-Zellen (A) sowie der CRISPR/Cas9-HAP1-Zellen (B) in Abhängigkeit von der MMC-Konzentration.** In einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve wurden die Anteile der vitalen Zellen in Prozent aufgetragen, nachdem sie gegen die Anzahl der jeweils unbehandelten Kultur normalisiert worden waren (arbiträr 100 %). Die Mittelwerte sowie Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet. Bei den Analysen wurden jeweils Kontrollzelllinien (gestrichelte Kurven) mitgeführt. Die gestrichelte horizontale Linie markiert die LC50 (letale Konzentration für 50 % der Zellen). MMC: Mitomycin C.

Zusammenfassend zeigen die Analysen der Hypersensitivität gegenüber ICL-induzierenden Agenzien, die sowohl durch Zellzyklus- und Chromosomenbruchanalysen als auch durch Überlebenskurven untersucht wurde, dass die Zelllinien 1176, Cr10, Cr12, Cr21 und HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> eine FA-typische Sensitivität gegenüber ICL-induzierenden Agenzien aufweisen. Durch Transduktion mit FAAP100<sup>WT</sup> werden diese Zelllinien, mit Ausnahme von Cr21, komplementiert und somit wird die FA-typische Hypersensitivität gegenüber MMC und Cisplatin aufgehoben. Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> hingegen weist weiterhin einen zellulären FA-Phänotyp auf.

So wird durch diese Versuche bestätigt, dass *FAAP100* zukünftig als ein neues FA-Gen eingestuft werden sollte. Nach Annahme einer Publikation könnte ein FA-Aliasname des Gens, z. B. *FANCY*, mit der HUGO (*Human Genome Organisation*) Gen-Nomenklatur-Kommission (HGNC) abgeklärt werden.

Um mögliche Auswirkungen der FAAP100-Mutation p.(T542P) des Fetus 1176 auf den FA-Signalweg bzw. auf die DNA-Schadensreparatur zu untersuchen, wurden funktionelle Analysen durchgeführt.

#### 4. 1. 8 Funktionelle Analysen von p.T542P und p.L543\_S551del in FAAP100

FAAP100 geht als essentielles Mitglied des FA-Kernkomplexes mit FANCL und FANCB einen Subkomplex ein, der das katalytische Modul für die Monoubiquitinierung von FANCD2 im FA-Signalweg darstellt (Huang et al. 2014, Rajendra et al. 2014). Infolgedessen wurde der Frage

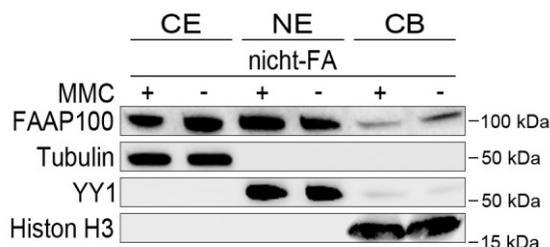
nachgegangen, ob die Missense-Mutation p.(T542P) der Zelllinie 1176 bzw. die In-frame-Deletion p.(L543\_S551del) der Zelllinie Cr12 die Interaktion von FAAP100 mit FANCB bzw. FANCL beeinflusst und was der Grund für das Fehlen der Monoubiquitinierung von FANCD2 bei den Zelllinien 1176 und Cr12 sein könnte.

#### 4. 1. 8. 1 Kern- und Chromatinlokalisierung von FAAP100

Da die FANCD2-Monoubiquitinierung an der DNA stattfindet, müssen die FA-Kernkomplexproteine zuvor in den Nukleus und ans Chromatin rekrutiert werden. Für FAAP100 wird der Transport in den Zellkern durch FANCA und FANCM vermittelt, allerdings nur, wenn es mit FANCB und FANCL im Komplex vorliegt (Ling et al. 2007).

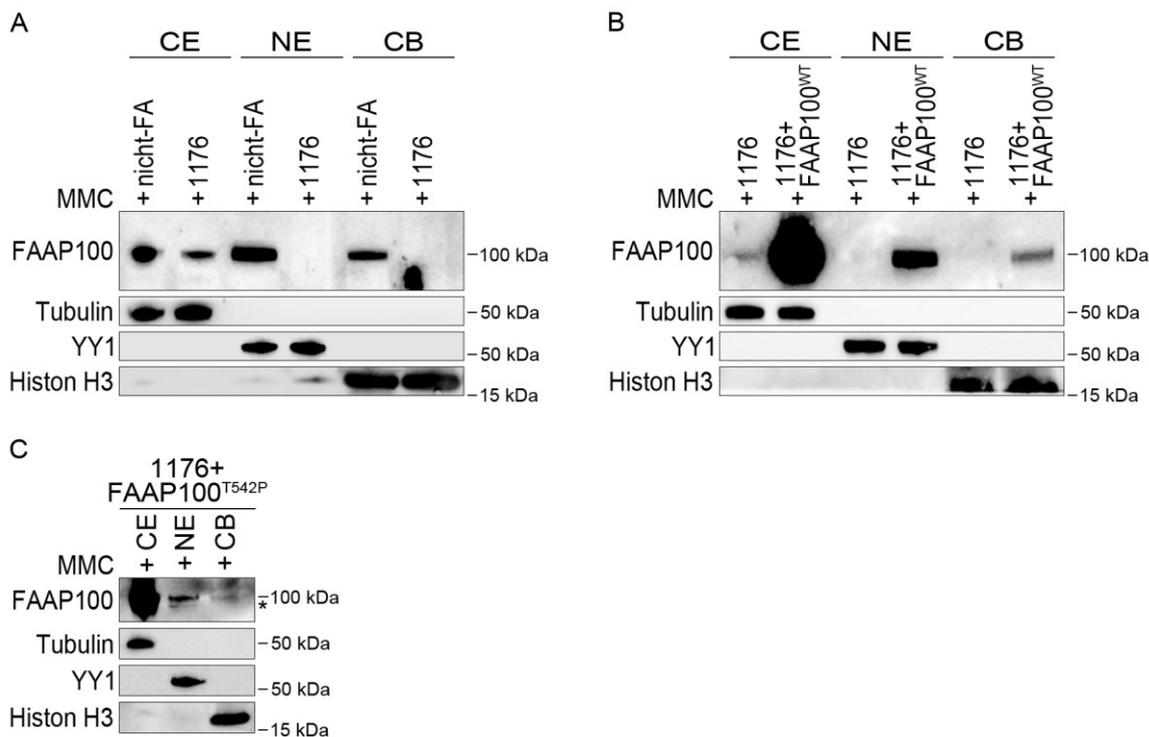
Zunächst wurde das Vorhandensein von Kernlokalisierungssignalen (*nuclear localization signals*, NLS) in FAAP100, FANCB und FANCL durch das Vorhersageprogramm PSORT II analysiert (Nakai & Horton 1999). Demzufolge weist nur FANCB NLS-Sequenzen mit einem Score von 0,95 auf. FAAP100 sowie FANCL scheinen keine NLS-Sequenzen zu besitzen (Score jeweils -0,47). Dies bestätigt, dass LBP100 nur als Komplex in den Zellkern transportiert werden kann.

Ob der Transport von LBP100 nur im Falle eines DNA-Schadens, der beispielsweise durch MMC induziert wurde, oder auch ohne induzierter DNA-Quervernetzung erfolgen kann, wurde durch eine Proteinfraktionierung einer nicht-FA-Kontrollzelllinie überprüft. Während der Fraktionierung wurde aus dem Gesamtprotein der Zellen, die mit MMC inkubiert worden waren oder unbehandelt geblieben waren, der zytoplasmatische Extrakt (*cytoplasmatic extract*, CE), der nukleäre Extrakt (NE) und die Chromatin-gebundene Fraktion (*chromatin bound*, CB) isoliert und anschließend auf einen Immunblot aufgetragen. Die Ladungskontrollen wurden je nach dem zu untersuchenden Zellkompartiment gewählt. Sie sollten dazu dienen, Kontaminationen in den einzelnen Proteinfraktionen auszuschließen, um so den Erfolg des Versuches zu bestätigen. Tubulin kommt vor allem im zytoplasmatischen Extrakt vor, wohingegen YY1 im Zellkern lokalisiert ist. Histon H3 stellt ein typisches Protein des Chromatins dar. FAAP100 der nicht-FA-Kontrolle wurde in allen drei untersuchten Zellkompartimenten detektiert (Abbildung 34). Dabei war es unerheblich, ob in den nicht-FA Zellen vorher ein DNA-Schaden durch MMC induziert worden war oder nicht. Demnach findet der Transport von FAAP100 in den Nukleus auch bei Zellen statt, in denen kein induzierter DNA-Schaden vorliegt. Die FAAP100-Menge der Chromatin-gebundenen Fraktion war im Vergleich zu der Proteinmenge des zytoplasmatischen sowie des nukleären Extrakts deutlich reduziert, jedoch immer nachweisbar. So wurde FAAP100 mit aber auch ohne MMC-Behandlung in nicht-FA-Zellen ans Chromatin rekrutiert. Für die Ladungskontrollen Tubulin bzw. Histon H3 war das jeweilige Protein nur im CE bzw. in der CB Fraktion nachweisbar. Dagegen konnte YY1 nicht nur im NE, sondern in sehr geringen Mengen auch in der CB Fraktion detektiert werden. Folglich wurden bei der Proteinisolierung kleine Mengen des NE in die CB Fraktion verschleppt.



**Abbildung 34: Nachweis der Proteinlokalisierung von FAAP100 bei nicht-FA-Kontrollzelllinien durch Proteinfractionierungen.** In transformierten nicht-FA-Zellen war entweder ein DNA-Schaden durch MMC induziert worden oder sie waren unbehandelt geblieben. Auf den Immunblot wurden Proteinextrakte aus drei unterschiedlichen Zellkompartimenten aufgetragen. CE: zytoplasmatischer Extrakt, NE: nukleärer Extrakt, CB: Chromatin-gebundene Fraktion. Mithilfe eines Antikörpers konnte die Lokalisation von FAAP100 nachgewiesen werden. Als Ladungskontrolle sowie Kontaminationsnachweis dienten je nach Zellkompartiment Tubulin, YY1 oder Histone H3. kDa: Kilodalton.

Ebenso wurde mithilfe einer Proteinfractionierung untersucht, ob FAAP100 mit p.(T542P) in den Zellkern und ans Chromatin gelangen kann. Hierfür wurden aus den Zelllinien 1176, 1176+FAAP100<sup>WT</sup>, 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> sowie aus einer nicht-FA-Kontrolle Proteine der einzelnen Zellkompartimente isoliert. Die Immunblots sind in Abbildung 35 dargestellt.

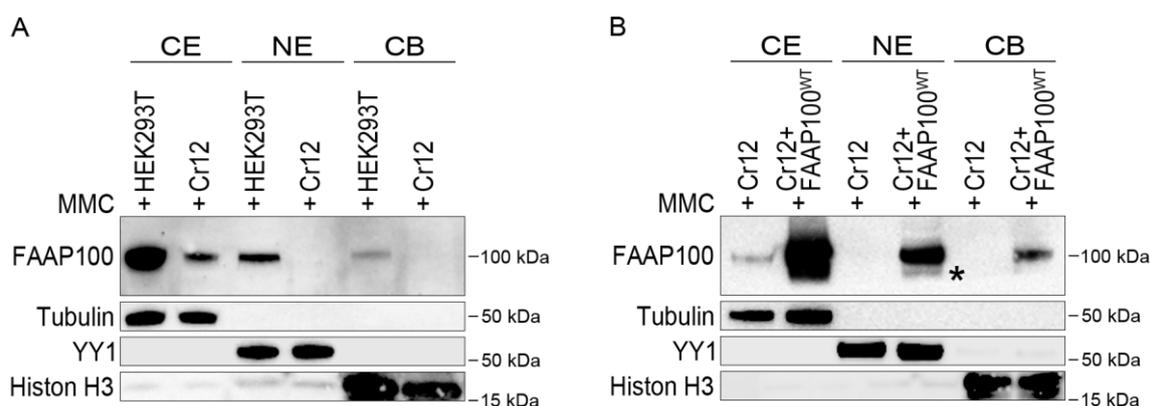


**Abbildung 35: Nachweis der Proteinlokalisierung von FAAP100 bei 1176. Proteinfractionierungen der Zelllinien 1176 (A), 1176+FAAP100<sup>WT</sup> (B) sowie 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> (C).** Auf den Immunblots wurden jeweils Proteinextrakte aus drei unterschiedlichen Zellkompartimenten aufgetragen. CE: zytoplasmatischer Extrakt, NE: nukleärer Extrakt, CB: Chromatin-gebundene Fraktion. Mithilfe eines Antikörpers konnte die Lokalisation von FAAP100<sup>WT</sup> bzw. FAAP100<sup>T542P</sup> jeweils mit einem Gewicht von etwa 100 kDa nachgewiesen werden. Als Ladungskontrolle sowie Kontaminationsnachweis dienten je nach Zellkompartiment Tubulin, YY1 oder Histone H3. \*: unspezifische Bande, kDa: Kilodalton.

FAAP100 konnte bei der Zelllinie 1176 nur im Zytoplasma detektiert werden (Abbildung 35A). Demnach findet kein Transport des Proteins in den Zellkern und folglich nicht ans Chromatin

statt. Im Gegensatz dazu war FAAP100-Protein sowohl bei der Kontrollzelllinie (Abbildung 35A), bei der komplementierten Zelllinie 1176+FAAP100<sup>WT</sup> (Abbildung 35B) als auch bei der Zelllinie 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> (Abbildung 35C) in allen drei untersuchten Fraktionen nachweisbar. Abbildung 35B zeigt aufgrund der FAAP100<sup>WT</sup>-Transduktion zudem eine deutliche Überexpression von FAAP100 bei 1176+FAAP100<sup>WT</sup>. Die Detektion von FAAP100<sup>T542P</sup> in allen drei Zellkompartimenten bei der Zelllinie 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> (Abbildung 35C) widerspricht dem Ergebnis der parentalen Zelllinie 1176, für die natives FAAP100<sup>T542P</sup> mit einem Gewicht von etwa 100 kDa nur im Proteinextrakt des Zytoplasmas nachgewiesen worden war (Abbildung 35A und B). So können aufgrund der starken Überexpression von FAAP100<sup>T542P</sup> geringe Mengen von FAAP100<sup>T542P</sup> in den Kern und ans Chromatin der Zelllinie 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> gelangen, was im nativen Zustand von FAAP100<sup>T542P</sup> nicht möglich ist. Antikörper gegen Tubulin bzw. YY1 detektierten ihre jeweiligen Proteine nur in der Fraktion, für die sie spezifisch waren. Demnach lagen im CE sowie im NE keine Verunreinigungen vor. Dies traf auch auf Histon H3 für die Chromatin-gebundene Fraktion in Abbildung 35B zu. In Abbildung 35A und C hingegen waren sowohl der CE als auch der NE mit sehr geringen Mengen an Chromatin-spezifischen Proteinen kontaminiert.

Die Zelllinien Cr12, Cr12+FAAP100<sup>WT</sup> und HEK293T wurden ebenfalls für Proteinfractionierungen herangezogen, um den Nukleustransport und die Rekrutierung ans Chromatin von FAAP100 mit p.(L543\_S551del) in Cr12 zu untersuchen. Durch Immunblots konnte ähnlich wie bei 1176 gezeigt werden, dass FAAP100<sup>L543\_S551del</sup> der Zelllinie Cr12 nur im zytoplasmatischen Extrakt detektierbar war (Abbildung 36A und B).



**Abbildung 36: Nachweis der Proteinlokalisierung von FAAP100 bei Cr12. Proteinfractionierungen der Zelllinien Cr12 (A) sowie Cr12+FAAP100<sup>WT</sup> (B).** Auf den Immunblots wurden jeweils Proteinextrakte aus drei unterschiedlichen Zellkompartimenten aufgetragen. CE: zytoplasmatischer Extrakt, NE: nukleärer Extrakt, CB: Chromatin-gebundene Fraktion. Mithilfe eines Antikörpers konnte die Lokalisation von FAAP100<sup>WT</sup> bzw. FAAP100<sup>L543\_S551del</sup> jeweils mit einem Gewicht von etwa 100 kDa nachgewiesen werden. Als Ladungskontrolle sowie Kontaminationsnachweis dienten je nach Zellkompartiment Tubulin, YY1 oder Histon H3. \*: unspezifische Bande, kDa: Kilodalton.

Somit ist der Nukleustransport von FAAP100<sup>L543\_S551del</sup> in den Cr12-Zellen ebenfalls gestört, sodass das Protein folglich auch nicht ans Chromatin gelangen kann. Die komplementierte

Cr12+FAAP100<sup>WT</sup>-Zelllinie (Abbildung 36B) hingegen wies, wie auch die parentale HEK293T-Linie (Abbildung 36A), in allen drei Kompartimenten FAAP100 auf. Somit ist in diesen beiden Zelllinien ein FAAP100<sup>WT</sup>-Transport in den Zellkern und an die DNA möglich. Aufgrund der Komplementation durch FAAP100<sup>WT</sup> war bei Cr12+FAAP100<sup>WT</sup> eine vermehrte Menge an FAAP100, vor allem im CE, nachweisbar (Abbildung 36B). Der Erfolg der Proteinfractionierungen wurde wiederum durch Antikörper gegen Tubulin, YY1 bzw. Histon H3 bestätigt. Für Tubulin bzw. YY1 war nur Protein im CE bzw. im NE nachweisbar, wohingegen der  $\alpha$ -Histon H3-Antikörper auch sehr geringe Mengen an Chromatin-spezifischen Proteinen im CE und im NE detektieren konnte.

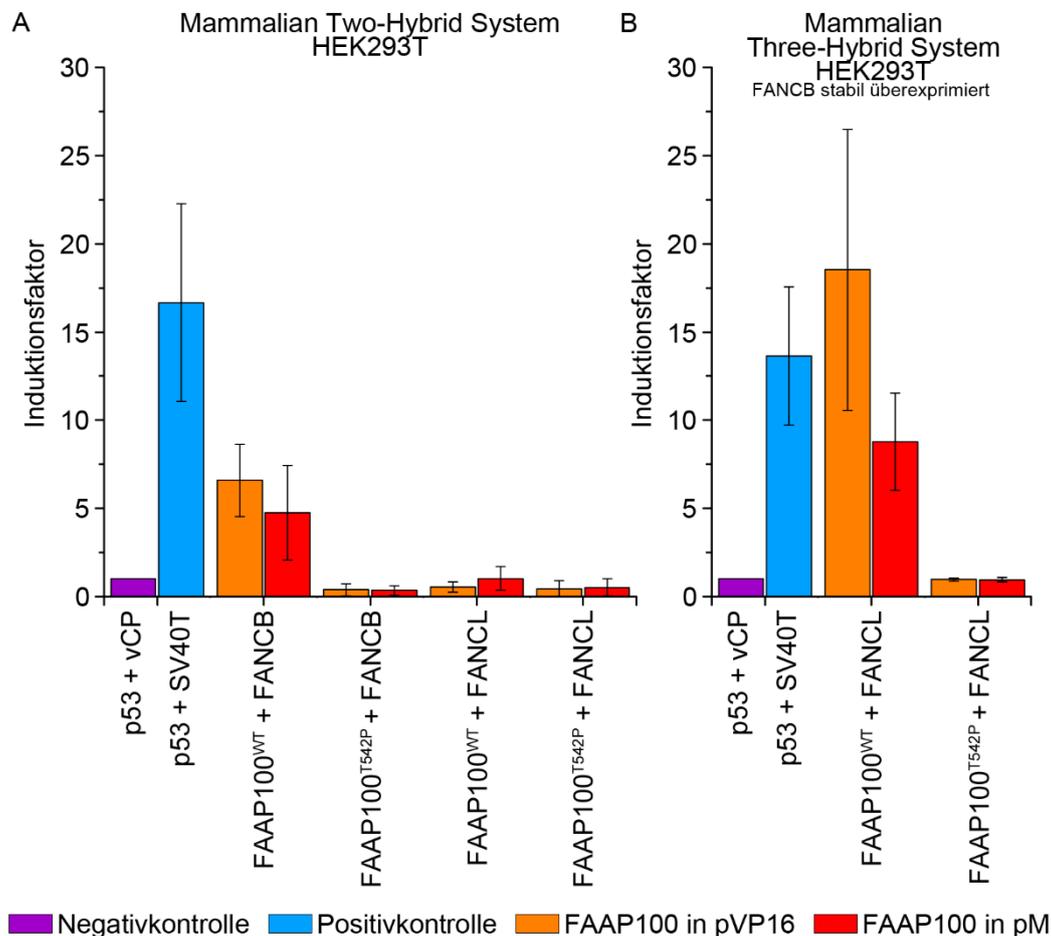
#### 4. 1. 8. 2 Interaktionsstudien zur Komplexbildung von LBP100

Da der Nukleustransport von FAAP100 sowohl in den Zellen 1176 als auch Cr12 gestört ist, wurde der Frage nachgegangen, ob die Mutationen p.(T542P) sowie p.(L543\_S551del) einen Einfluss auf die Komplexbildung von LBP100 haben. Für die Interaktionsstudien zwischen FAAP100 und FANCB bzw. FANCL wurden die Methoden des *Mammalian Two-* bzw. *Three-Hybrid* Systems (M2H, M3H) sowie der Co-Immunpräzipitation herangezogen.

Für Untersuchungen im M2/3H-System wurden alle zu untersuchenden Gene sowohl in den pM GAL4 DNA-BD (kurz pM) und in den pVP16 AD Vektor (kurz pVP16) kloniert. DNA-BD beschreibt eine DNA-Bindedomäne, wohingegen AD für eine DNA-Aktivierungsdomäne steht. Beide Domänen codieren mit der jeweils inklonierten cDNA für ein Fusionsprotein. Eine Überprüfung der Richtungsabhängigkeit der Fusionsproteine (cDNA des jeweiligen Gens sowohl im pM- als auch im pVP16-Plasmid), also ob ein Protein die DNA-BD oder die AD enthielt, war notwendig, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen. Diese können beispielsweise durch Blockierungen der Domänen auftreten. Als Positivkontrolle diente jeweils die Kombination der Plasmide pM-p53 (murines p53-Protein) und pVP16-SV40T (SV40 large T-Antigen), wohingegen pM-p53 und pVP16-vCP (virales Coat-Protein) stets die Negativkontrolle darstellte. Es wurden je drei unabhängige Biolumineszenz-Messungen mithilfe eines Dual-Luciferase Assays durchgeführt. Die Induktion der Luciferase-Aktivitäten (Induktionsfaktor) wurde anhand der Negativkontrollen pM-p53 und pVP16-vCP normalisiert, sodass bei deren Messergebnissen folglich keine Standardabweichungen zu sehen sind.

Zunächst wurden M2H-Versuche durchgeführt, um die beschriebene Interaktion zwischen Wildtyp-FAAP100 und FANCB zu bestätigen bzw. um den Einfluss von p.(T542P) in FAAP100 zu untersuchen. Auch sollte nachgewiesen werden, dass FAAP100<sup>WT</sup> und FANCL nicht direkt interagieren, wie es bereits Ling et al. gezeigt hatten (Ling et al. 2007). Die Ergebnisse sind in Abbildung 37A dargestellt. So konnte neben den Positivkontrollen nur für die Kombination aus FAAP100<sup>WT</sup>+FANCB für beide Richtungen Luciferase-Aktivitäten gemessen werden, die über dem Induktionsfaktor der Negativkontrolle lagen. Somit findet zwischen FAAP100<sup>T542P</sup> und

FANCB keine Interaktion statt. Des Weiteren war für FAAP100, sowohl in wildtypischer als auch in mutierter Form, keine direkte Interaktion mit FANCL messbar.

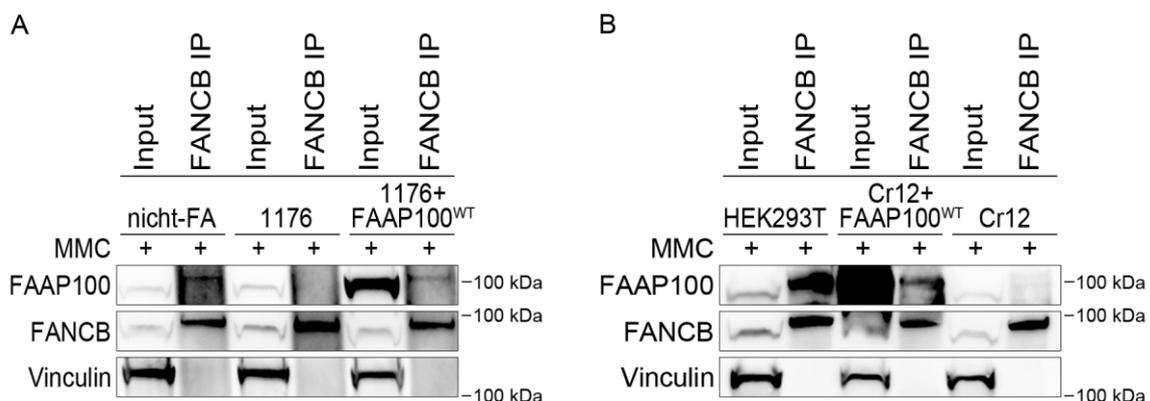


**Abbildung 37: Nachweis der Interaktion zwischen LBP100. Ermittelte Induktion der Luciferase-Aktivitäten (Induktionsfaktor) in einem *Mammalian Two-Hybrid* (A) bzw. *Three-Hybrid* System (B).** Beim *Mammalian Two-Hybrid* System wurden parentale HEK293T-Zellen, beim *Mammalian Three-Hybrid* System HEK293T-Zellen transfiziert, in denen FANCB bereits stabil überexprimiert vorlag. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt und die daraus resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen in einem Balkendiagramm aufgetragen. Die Normalisierung erfolgte jeweils über die Negativkontrollen, sodass hierfür keine Standardabweichungen angegeben sind (Induktionsfaktor=1). Orange: *FAAP100*-cDNA im pVP16-Vektor, Bildung eines FAAP100-AD (Aktivierungsdomäne) Fusionsproteins. Rot: *FAAP100*-cDNA im pM-Vektor, Bildung eines FAAP100-BD (Bindedomäne) Fusionsproteins. Die cDNA des Partnerproteins befand sich im jeweils anderen Vektor. SV40T: SV40 large T Antigen, vCP: virales Coat-Protein.

Um einen Nachweis des Subkomplexes LBP100 zu erbringen, also eine indirekte Wechselwirkung zwischen Wildtyp-FAAP100 und FANCL zu erkennen, wurde das M2H-System um eine zusätzliche Komponente erweitert. Hierbei kam eine HEK293T-Zelllinie zum Einsatz, in der FANCB stabil überexprimiert wird. So lagen nach Transfektion der *FAAP100*- sowie der *FANCL*-cDNA, die jeweils in ein Fusionsprotein translatiert wurden, in diesen Zellen insgesamt drei Proteine überexprimiert vor. Die Ergebnisse dieses M3H-Systems sind in Abbildung 37B zusammengefasst. So war bei überexprimiert vorliegendem FANCB eine Interaktion zwischen FAAP100<sup>WT</sup> und FANCL messbar, welche hingegen für FAAP100<sup>T542P</sup> nicht beobachtet werden konnte.

Sowohl den Versuchen im M2H- als auch im M3H-System ist zu entnehmen, dass eine stärkere Wechselwirkung vorliegt, wenn sich FAAP100<sup>WT</sup> im pVP16-Vektor mit der DNA-Aktivierungsdomäne befindet. Der Induktionsfaktor von FAAP100<sup>WT</sup>-AD+FANCB-BD lag hierbei allerdings nur in geringem Maße über dem ermittelten Wert von FAAP100<sup>WT</sup>-BD+FANCB-AD. Im Gegensatz dazu war bei der Interaktion zwischen FAAP100<sup>WT</sup>-AD und FANCL-BD im Rahmen des M3H-Systems eine viel größere Induktion ersichtlich als zwischen FAAP100<sup>WT</sup>-BD und FANCL-AD. Dieser Wert überstieg sogar den der mitgeführten Positivkontrolle.

Eine weitere Möglichkeit, Interaktionen zwischen zwei oder mehr Proteinen zu analysieren, ist die Methode der Immunpräzipitation (IP). Da die vorhandenen  $\alpha$ -FAAP100-Antikörper hierfür nicht geeignet waren, wurde ein  $\alpha$ -FANCB-Antikörper zur Präzipitation der Proteine verwendet (Co-Immunpräzipitation, Co-IP). Auf den in Abbildung 38A dargestellten Immunblot wurden Gesamtproteinlysate der transformierten Zelllinien nicht-FA-Kontrolle, 1176 und 1176+FAAP100<sup>WT</sup> (Input) sowie deren FANCB-Präzipitate (FANCB-IP) aufgetragen. Die FAAP100-Detektion wurde mit dem Antikörper ab155209 durchgeführt, welcher keine Überexpression von FAAP100 bei der Zelllinie 1176+FAAP100<sup>WT</sup> nachweisen konnte. Es zeigte sich dennoch, dass bei 1176 im Gegensatz zur nicht-FA-Kontrolle sowie zu 1176+FAAP100<sup>WT</sup> kein FAAP100-Protein zusammen mit FANCB aufgereinigt werden kann. Demnach findet bei 1176 keine Interaktion zwischen FAAP100 und FANCB statt. Da für die Präzipitation ein  $\alpha$ -FANCB-Antikörper verwendet worden war, wurde FANCB für alle aufgetragenen Zelllinien detektiert. Dies gilt als Bestätigung, dass tatsächlich FANCB aus dem Gesamtproteinlysate aufgereinigt wurde und die Co-IP somit erfolgreich war. Für Vinculin, welches als Ladungskontrolle diente, konnte keine Interaktion mit FANCB ausgemacht werden.



**Abbildung 38: Nachweis der Interaktion zwischen FAAP100 und FANCB. Ergebnisse der Co-Immunpräzipitationen von 1176 (A) sowie Cr12 (B).** Mithilfe eines  $\alpha$ -FANCB-Antikörpers wurden aus Gesamtproteinlysaten (Input) jeweils FANCB und dessen Interaktionspartner präzipitiert (FANCB IP). Für die Zelllinien 1176 und Cr12 konnte keine gemeinsame Präzipitation von FAAP100 mit FANCB detektiert werden. Durch die Detektion von FANCB wurde der Erfolg der jeweiligen Co-Immunpräzipitation bestätigt. Vinculin diente als Ladungskontrolle. A:  $\alpha$ -FAAP100-Antikörper ab155209, keine Überexpression von FAAP100 bei Input 1176+FAAP100<sup>WT</sup>. B:  $\alpha$ -FAAP100-Antikörper ab181185, starke Überexpression von FAAP100 bei Input Cr12+FAAP100<sup>WT</sup>. kDa: Kilodalton.

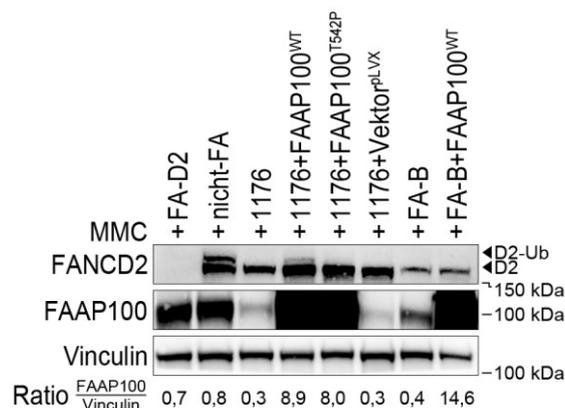
Da für die durch das CRISPR/Cas9-System generierte Zelllinie Cr12 auf einem Immunblot ein FAAP100-Protein mit einem Gewicht von etwa 92,5 kDa detektiert werden konnte (Abschnitt 4.1.6, Abbildung 22A), wurde mit dieser sowie mit der parentalen HEK293T- und der Cr12+FAAP100<sup>WT</sup>-Zelllinie ebenfalls eine Co-IP durchgeführt (Abbildung 38B). Für diesen Immunblot wurde der Antikörper ab181185 verwendet, der mithilfe der FAAP100-defizienten Zelllinien validiert worden war. Er detektierte für die beiden Zelllinien, die wildtypisches FAAP100 enthielten (HEK293T, Cr12+FAAP100<sup>WT</sup>), jeweils eine präzipitierte FAAP100-Bande, was auf eine Interaktion zwischen FAAP100 und FANCB hinweist. Für Cr12 hingegen blieb diese Beobachtung aus. Hier findet demnach keine Interaktion zwischen FAAP100 und FANCB statt. Durch Verwendung dieses Antikörpers konnte zusätzlich die FAAP100-Überexpression bei Cr12+FAAP100<sup>WT</sup> sichtbar gemacht werden. Des Weiteren wurde bei allen aufgetragenen Zelllinien FANCB sowohl für den Input als auch für die IP detektiert, wohingegen Vinculin nur bei den Gesamtproteinlysaten nachweisbar war. So konnte der Erfolg der Co-Immunpräzipitation bestätigt werden.

#### 4.1.8.3 Funktionelle Komplementation von FAAP100-defizienten Zellen

Die Hauptaufgabe des FA-Kernkomplex besteht darin, durch seine E3-Ligaseaktivität FANCD2 zu monoubiquitinieren. Diese posttranslationale Modifikation von FANCD2 kann allerdings nur durch einen intakten FA-Kernkomplex erfolgen (van Twest et al. 2017). Sie lässt sich mithilfe eines FANCD2-Immunblots nachweisen. So war bereits die *upstream*-Eingruppierung der Zelllinie 1176 erfolgt (Abschnitt 4.1.1, Abbildung 14B). Auf diesem sowie auf dem Immunblot in Abbildung 39 war, wie bei einem Patienten der Gruppe FA-B, nur nicht-ubiquitiniertes FANCD2 für 1176 nachweisbar. Infolgedessen führt die Mutation p.(T542P) in FAAP100 dazu, dass der FA-Kernkomplex seine E3-Ligasefunktion nicht mehr erfüllen und somit FANCD2 nicht ubiquitiniert werden kann. Nach Komplementation der Zelllinie 1176 mit FAAP100<sup>WT</sup> konnten bei dem Proteinlysat der Zelllinie 1176+FAAP100<sup>WT</sup> für FANCD2 zwei Protein-Banden mit einem Gewicht von etwa 155 und 162 kDa detektiert werden (Abbildung 39). So kann die Monoubiquitinierung von FANCD2 in dieser Zelllinie wieder stattfinden. Im Gegensatz dazu war sowohl für 1176+FAAP100<sup>T542P</sup>- als auch für FA-B+FAAP100<sup>WT</sup>-Zellen nur die unmodifizierte Form von FANCD2 nachweisbar. Dies bestätigt zum einen, dass FAAP100 im Allgemeinen und die Mutation p.(T542P) in FAAP100 im Besonderen ursächlich für FA bei dem Fetus 1176 gewesen war, da keine FANCD2-Monoubiquitinierung für 1176-, für 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> sowie für FA-B+FAAP100<sup>WT</sup>-Zellen nachgewiesen werden konnte. Zum anderen zeigt der Immunblot in Abbildung 39, dass das Vorhandensein eines intakten FA-Kernkomplexes, welcher bei der nicht-FA- sowie bei der 1176+FAAP100<sup>WT</sup>-Zelllinie vorliegt, für die FANCD2-Monoubiquitinierung und damit für den gesamten FA-Signalweg essentiell ist.

Durch den gleichen Immunblot konnte mithilfe eines  $\alpha$ -FAAP100-Antikörpers zudem die Proteinmenge von FAAP100 semi-quantitativ nachgewiesen werden. So war im Vergleich zu nicht-

FA- und zu FA-D2-Proteinextrakten für die Zelllinien 1176- und 1176+Vektor<sup>pLVX</sup> stark, für die Zelllinie FA-B mäßig reduziertes FAAP100-Protein detektierbar, wohingegen die Linien 1176+FAAP100<sup>WT</sup>, 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> und FA-B+FAAP100<sup>WT</sup> eine sehr deutliche FAAP100-Überexpression zeigten. Durch die Ratioberechnung FAAP100/Vinculin wurde das visuelle Ergebnis bestätigt.

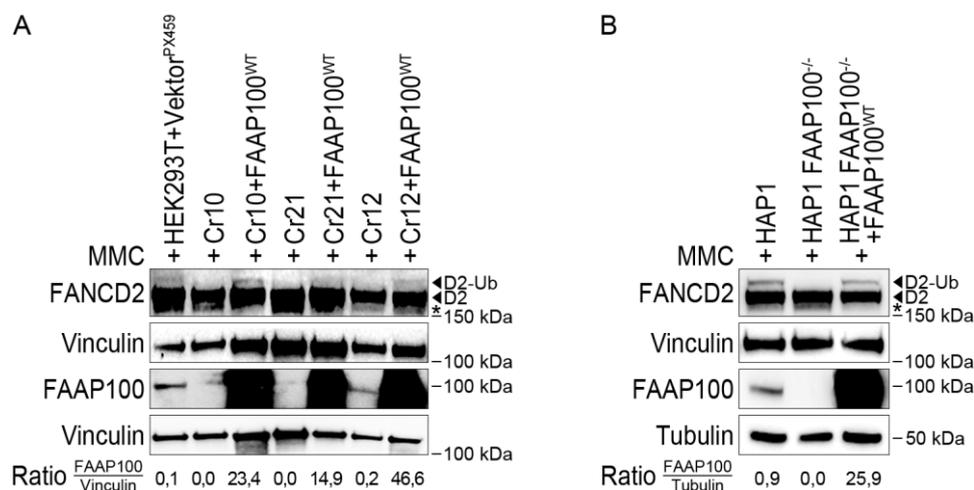


**Abbildung 39: Nachweis der FANCD2-Monoubiquitinierung sowie der FAAP100-Expressionsmenge bei Zelllinie 1176 und Tochterzelllinien.** Auf einen Immunblot wurden Proteinlysate transformierter FA- und Kontrollzellen aufgetragen. Durch einen  $\alpha$ -FANCD2-Antikörper konnte bei 1176+FAAP100<sup>WT</sup> die Monoubiquitinierung von FANCD2 und somit die Komplementation durch FAAP100<sup>WT</sup> bestätigt werden. Reduziertes bzw. überexprimiertes FAAP100 wurde durch einen  $\alpha$ -FAAP100-Antikörper nachgewiesen. Vinculin diente als Ladungskontrolle. Über die Ratioberechnung FAAP100/Vinculin wurden ungleichmäßig geladene Proteinkonzentrationen normalisiert und so ein direkter Vergleich der FAAP100-Expression ermöglicht. D2-Ub: monoubiquitiniertes FANCD2, D2: nicht-ubiquitiniertes FANCD2, kDa: Kilodalton.

Die FANCD2-Monoubiquitinierung wurde darüber hinaus an FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien untersucht. Ein Immunblot, auf dem die Proteinlysate der Kontrollzellen HEK293T+Vektor<sup>PX459</sup>, der Zellen Cr10 Cr12, Cr21 und der jeweiligen Komplementationsansätze aufgetragen wurden, zeigt für Cr10, Cr12 sowie Cr21 nur die nicht-monoubiquitinierte Isoform von FANCD2 (Abbildung 40A). Für Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> war durch die Zellzyklus- und die Chromosomenbruchanalyse wie auch anhand der Überlebenskurven bereits bestätigt worden, dass diese Zelllinie durch FAAP100<sup>WT</sup> nicht komplementiert wird. So wurde für diese Zelllinie auf dem Immunblot ebenfalls kein monoubiquitiniertes FANCD2, sondern nur ein Schatten der nicht-monoubiquitinierten FANCD2-Bande nachgewiesen. Für alle anderen Zelllinien (HEK293T+Vektor<sup>PX459</sup>, Cr10+FAAP100<sup>WT</sup>, Cr12+FAAP100<sup>WT</sup>) wurde jeweils, wenn auch nur schwach, sowohl ubiquitiniertes als auch nicht-ubiquitiniertes FANCD2 detektiert.

Durch einen weiteren Immunblot, der ebenfalls in Abbildung 40A dargestellt ist, wurde die Proteinmenge an FAAP100 für diese Zelllinien semi-quantitativ analysiert. So konnte bei Cr10 und bei Cr12 nur reduziertes FAAP100 im Vergleich zu der Kontrollzelllinie HEK293T+Vektor<sup>PX459</sup> detektiert werden. Ob es sich bei der für Cr21 schwach detektierten Proteinbande um FAAP100 handelt, ist fraglich. Denn durch den Immunblot in Abbildung 22A (Abschnitt 4. 1. 6) wurde bereits bestätigt, dass in Cr21 kein FAAP100-Protein mit einem Gewicht von etwa 100 kDa exprimiert wird. Demnach stellt die für Cr21 in Abbildung 40A detektierte

FAAP100-Bande eine Verunreinigung aus einer der benachbarten Spuren dar. Für die aufgetragenen Zelllinien, die mit FAAP100<sup>WT</sup> transduziert worden waren, war eine starke Überexpression von FAAP100 nachweisbar. Durch die Ratioberechnungen FAAP100/Vinculin wird das visuell ermittelte Ergebnis bestätigt.



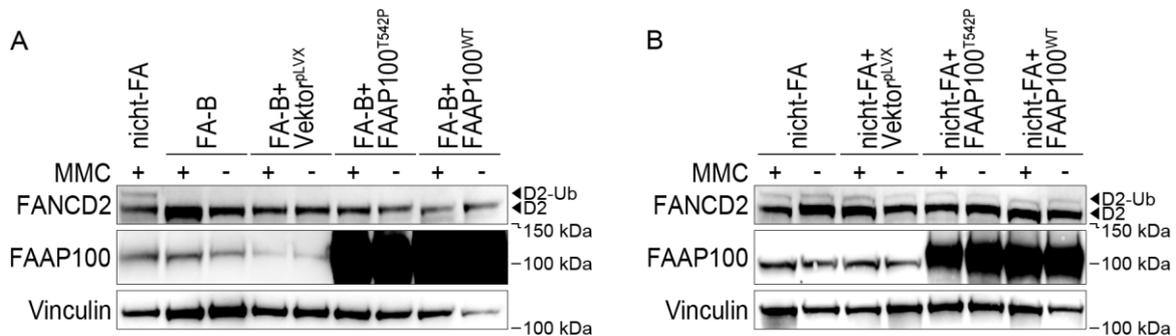
**Abbildung 40: Nachweis der FANCD2-Monoubiquitinierung sowie der FAAP100-Expressionsmenge der CRISPR/Cas9-Zelllinien.** FANCD2- sowie FAAP100-Immunblots der CRISPR/Cas9-HEK293T- (A) bzw. der CRISPR/Cas9-HAP1-Zellen (B). Auf jeweils zwei Immunblots wurden die aus den CRISPR/Cas9-Zelllinien isolierten Proteinlysate aufgetragen. Durch einen  $\alpha$ -FANCD2-Antikörper konnte die Monoubiquitinierung von FANCD2 bei den mit FAAP100<sup>WT</sup> komplementierten Zelllinien bestätigt werden. Reduziertes bzw. überexprimiertes FAAP100 wurde durch einen  $\alpha$ -FAAP100-Antikörper nachgewiesen. Vinculin bzw. Tubulin dienten als Ladungskontrollen. Über die Ratioberechnung FAAP100/Vinculin bzw. FAAP100/Tubulin wurden ungleichmäßig geladene Proteinkonzentrationen normalisiert und so ein direkter Vergleich der FAAP100-Expression ermöglicht. D2-Ub: monoubiquitiniertes FANCD2, D2: nicht-ubiquitiniertes FANCD2, \*: unspezifische Banden, kDa: Kilodalton.

Ein Immunblot, auf den Proteinlysate der Zellen mit einem HAP1-Hintergrund aufgetragen wurden, zeigt für die HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>-Zelllinie nur nicht-ubiquitiniertes FANCD2 (Abbildung 40B). Im Gegensatz dazu findet in der Kontrollzelllinie HAP1 sowie in der komplementierten Zelllinie HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>+FAAP100<sup>WT</sup> die Monoubiquitinierung von FANCD2 statt, sodass auf dem Immunblot zwei FANCD2-Banden zu sehen sind. Mithilfe eines  $\alpha$ -FAAP100-Antikörpers und der anschließenden Ratioberechnung FAAP100/Tubulin wurde durch einen weiteren Immunblot in Abbildung 40B sowohl die FAAP100-Defizienz für HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> als auch die FAAP100-Überexpression für HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>+FAAP100<sup>WT</sup> nachgewiesen.

Die Ergebnisse der Immunblots in Abbildung 40A und B bestätigen, dass die FANCD2-Monoubiquitinierung nicht nur in 1176, sondern auch in Zelllinien gestört ist, in denen FAAP100 durch das CRISPR/Cas9-System *in vitro* mutiert worden war. Somit ist bewiesen, dass FAAP100 bei dem Monoubiquitinierungsprozess von FANCD2 eine essentielle Rolle einnimmt.

Um zu zeigen, dass FAAP100<sup>WT</sup> nur FAAP100-defiziente Zelllinien komplementieren und damit FAAP100 nur in diesen Zelllinien ursächlich für FA sein kann, und um einen dominant-negativen Effekt der Mutation p.(T542P) auszuschließen, wurden transformierte FA-B- sowie nicht-FA-

Zelllinien mit FAAP100<sup>WT</sup>, FAAP100<sup>T542P</sup> sowie dem Leervektor pLVX transduziert. Immunblotanalysen aus Proteinlysaten dieser Zelllinien ergaben, dass eine FA-B-Amnionzelllinie weder durch FAAP100<sup>WT</sup> noch durch FAAP100<sup>T542P</sup> bzw. den Leervektor pLVX komplementiert werden kann, da bei Proteinlysaten dieser Zelllinien weiterhin nur nicht-ubiquitiniertes FANCD2 nachweisbar war (Abbildung 41A). Demnach kann bestätigt werden, dass eine Komplementation mit FAAP100<sup>WT</sup> nur bei FAAP100-defizienten Zelllinien möglich ist.



**Abbildung 41: Nachweis der FANCD2-Monoubiquitinierung sowie der FAAP100-Expressionsmenge bei Kontrollzelllinien.** FANCD2- sowie FAAP100-Immunblots der transformierten FA-B- (A) bzw. der transformierten nicht-FA-Kontrollzellen (B). Auf jeweils einen Immunblot wurden Proteinlysate von Zelllinien aufgetragen, die zuvor mit oder ohne MMC behandelt worden waren. Durch einen  $\alpha$ -FANCD2-Antikörper wurde jeweils die Monoubiquitinierung von FANCD2 untersucht. Reduziertes bzw. überexprimiertes FAAP100 konnte durch  $\alpha$ -FAAP100-Antikörper nachgewiesen werden. Vinculin diente jeweils als Ladungskontrolle. D2-Ub: monoubiquitiniertes FANCD2, D2: nicht-ubiquitiniertes FANCD2, kDa: Kilodalton.

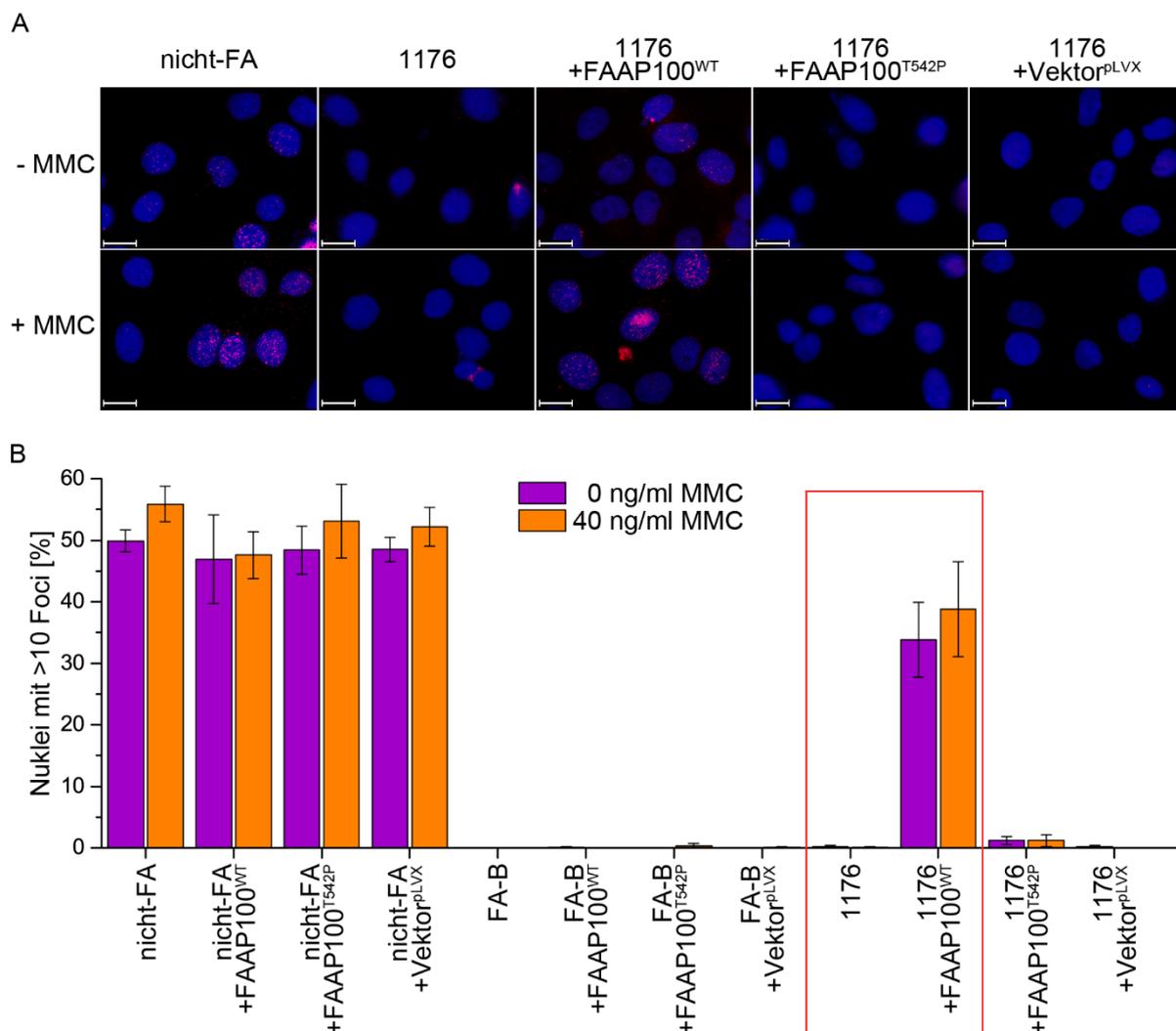
Des Weiteren zeigt ein Immunblot, der in Abbildung 41B dargestellt ist, dass für alle aufgetragenen nicht-FA-Zelllinien vergleichbare Mengen an ubiquitiniertem sowie nicht-ubiquitiniertem FANCD2 detektiert werden kann. Dies war unabhängig davon, ob die Zellen mit FAAP100<sup>WT</sup>, FAAP100<sup>T542P</sup> oder dem Leervektor pLVX transduziert wurden. Da bei der Zelllinie nicht-FA+FAAP100<sup>T542P</sup> weiterhin monoubiquitiniertes FANCD2 nachweisbar und dies in keiner Weise reduziert ist, kann ein dominant-negativer Effekt der FAAP100-Mutation p.(T542P) ausgeschlossen werden. Anhand der Immunblots in Abbildung 41A und B wurde zudem die Überexpression von FAAP100 bei den Zelllinien sichtbar, die mit FAAP100<sup>WT</sup> bzw. FAAP100<sup>T542P</sup> transduziert worden waren.

#### 4. 1. 8. 4 Bildung von FANCD2-Foci

Durch die Monoubiquitinierung wird FANCD2 aktiviert, woraufhin es mit anderen DNA-Reparaturproteinen wie beispielsweise BRCA1 akkumuliert (Garcia-Higuera et al. 2001). Diese Bildung sogenannter FANCD2-Foci kann mithilfe indirekter Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden und wird als Nachweis für die Aktivierung der DNA-Schadensreparatur angesehen.

Abbildung 42A zeigt Mikrofotografien der Immunfluoreszenzpräparate der Zelllinien nicht-FA-Kontrolle, 1176 sowie der transduzierten 1176-Zelllinien. Zu sehen sind die Nuklei der Zellen, die entweder mit 40 ng/ml MMC inkubiert wurden oder unbehandelt geblieben waren. Sowohl mit als auch ohne MMC konnte bei nicht-FA sowie bei 1176+FAAP100<sup>WT</sup> eine Bildung der FANCD2-

Foci erfolgen, wohingegen die Zelllinien 1176, 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> und 1176+Vektor<sup>pLVX</sup> negativ für die Foci-Formation waren.



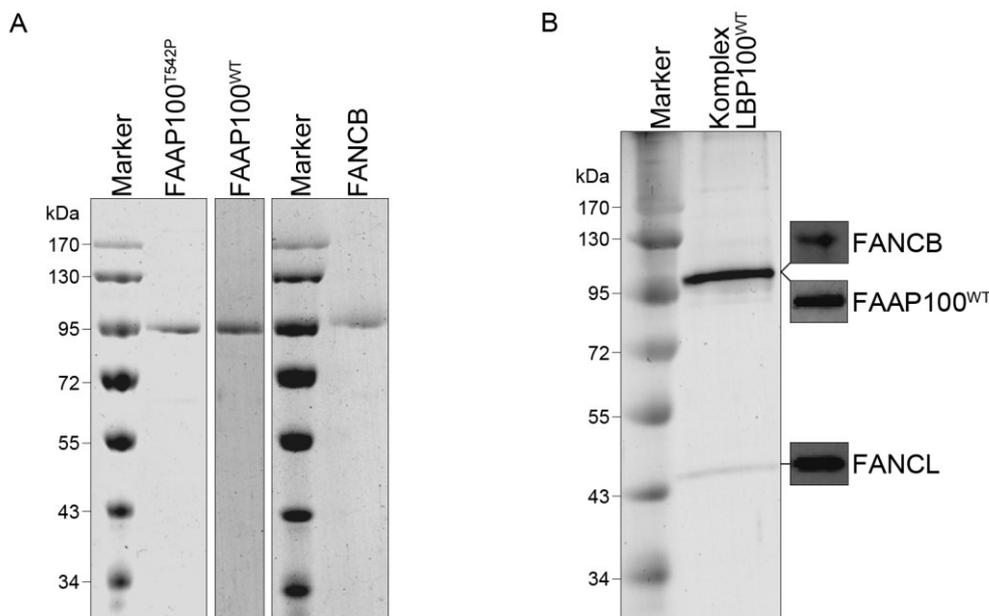
**Abbildung 42: FANCD2-Foci-Bildung nach Transduktion mit FAAP100<sup>WT</sup>, FAAP100<sup>T542P</sup> oder dem Vektor pLVX. A: Mikrofotografien der indirekten Immunfluoreszenzpräparate.** Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. Durch einen fluoreszenzgekoppelten  $\alpha$ -FANCD2-Antikörper konnten FANCD2-Foci detektiert werden (rot). Die Zellen waren zuvor mit 0 ng/ml MMC (- MMC) bzw. 40 ng/ml MMC (+ MMC) für 16 h inkubiert worden. Die Maßstabsbalken (weiße Balken jeweils unten links in den Fotografien) kennzeichnen eine Länge von 20  $\mu$ m. **B: Statistische Auswertung der Zellen mit über zehn FANCD2-Foci pro Zellkern.** Es sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Es wurden jeweils  $\geq 500$  Zellkerne pro Zelllinie ohne bzw. mit MMC-Behandlung ausgewertet. Mit einem roten Rahmen sind die Zelllinie des Indexpatienten 1176 sowie dessen Zelllinie hervorgehoben, die mit FAAP100<sup>WT</sup> komplementiert wurde.

In Abbildung 42B ist die prozentuale Verteilung der FANCD2-Foci-Bildung dargestellt. Dabei wurden Zellkerne, die über zehn FANCD2-Foci aufwiesen, als Foci-positiv gewertet. Etwa 50 % der nicht-FA-Zellen, egal ob transduziert oder nicht, waren ohne MMC-Behandlung Foci-positiv. Mit MMC-Behandlung bildeten etwa 55 % der Zellen dieser Zelllinien FANCD2-Foci. Eine Ausnahme war hierbei die Zelllinie nicht-FA+FAAP100<sup>WT</sup>, welche sowohl mit als auch ohne MMC-Behandlung etwa 47 % Foci-positiv Zellkerne aufwies. Im Gegensatz dazu zeigten sowohl die parentale als auch die transduzierten FA-B-Zelllinien fast keine FANCD2-Foci-Bildung

( $\leq 0,33\%$ ). In den Zellkernen der Zelllinie 1176 sowie in den Nuklei der Linien 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> und 1176+Vektor<sup>pLVX</sup> wurden ebenfalls kaum FANCD2-Foci ( $\leq 1,18\%$ ) gebildet. Nach Komplementation der Zelllinie 1176 mit FAAP100<sup>WT</sup> konnten dagegen FANCD2-Foci-positive Zellkerne beobachtet werden. Deren Anteil war mit 33,8 % (ohne MMC) bzw. 38,8 % (mit MMC) jedoch etwas geringer als bei den Foci-positiven Nuklei der nicht-FA-Kontrollzelllinie. Dennoch wird dadurch bestätigt, dass in diesen Zellen eine DNA-Schadensreparatur eingeleitet und folglich die Zelllinie 1176 durch Wildtyp-FAAP100 komplementiert werden kann. Im Gegensatz dazu kann FAAP100<sup>WT</sup> die Zelllinie FA-B bzw. FAAP100<sup>T542P</sup> die Zelllinie 1176 nicht komplementieren. Somit ist nachgewiesen, dass nur die Missense-Mutation p.(T542P) in FAAP100 ursächlich für FA bei dem Fetus 1176 gewesen war.

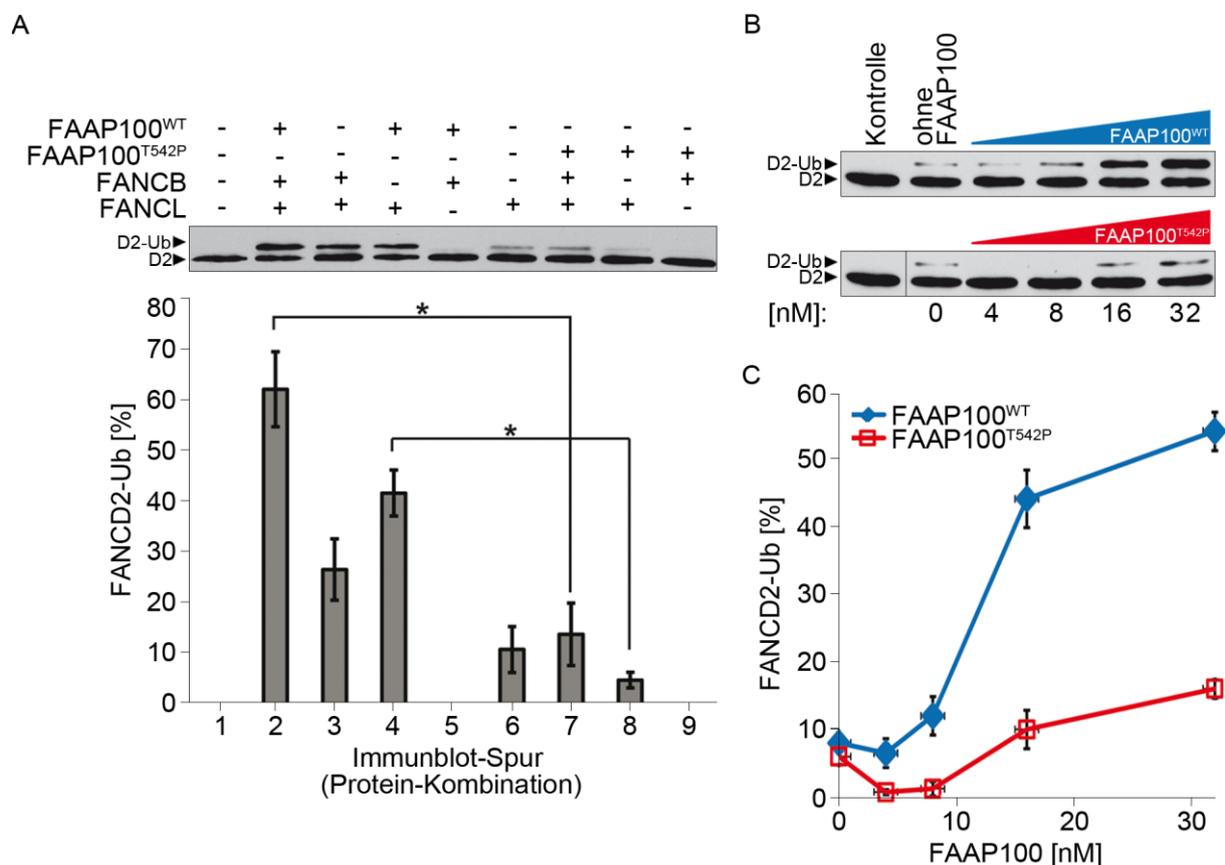
#### 4. 1. 8. 5 Biochemische Analyse der FANCD2-Monoubiquitinierung

Ein Nachweis über die Beteiligung von FAAP100 an der Monoubiquitinierung von FANCD2 war bereits durch einen FANCD2-Immunblot erbracht worden (Abbildung 39, Abschnitt 4. 1. 8. 3). Die Stärke der Monoubiquitinierung dagegen wurde durch unseren Kooperationspartner Yanbin Zhang, Miami, mit einem biochemisch definierten System analysiert. Hierfür wurden zunächst humanes FAAP100<sup>WT</sup>, FAAP100<sup>T542P</sup> und FANCB biochemisch aufgereinigt (Abbildung 43A). Aufgereinigtes UBE1, UBE2T, FANCD2-FANCI und FANCL standen bereits zur Verfügung, worauf im Methodenteil, Abschnitt 3. 11. 5. 1, näher eingegangen wird. Zudem konnten im Komplex FANCL, FANCB und FAAP100<sup>WT</sup> aufgereinigt werden, was für FANCL, FANCB und FAAP100<sup>T542P</sup> biochemisch nicht möglich war (Abbildung 43B).



**Abbildung 43: Nachweis von Proteinaufreinigungen. A: SDS-PAGEs der Proteine FAAP100<sup>T542P</sup>, FAAP100<sup>WT</sup> und FANCB (A) sowie des Komplexes LBP100<sup>WT</sup> (B).** Die SDS-PAGE wurde mit Coomassie-Brillant-Blau R-250 angefärbt. In B ist rechts die Detektion der Proteine FANCB, FAAP100<sup>WT</sup> sowie FANCL auf einem Immunblot dargestellt. Es war nicht möglich, LBP100<sup>T542P</sup> als Komplex aufzureinigen. kDa: Kilodalton.

Um eine FANCD2-Monoubiquitinierungsreaktion nachzustellen wurden verschiedene Ansätze erstellt, in denen die Proteine HA-Ubiquitin, UBE1, UBE2T und FAND2-FANCI vorhanden waren. Hierzu wurden in unterschiedlichen Kombinationen FANCL, FANCB, FAAP100<sup>WT</sup> und/oder FAAP100<sup>T542P</sup> hinzugefügt. Die genaue Kombinationsanordnung ist Abbildung 44A zu entnehmen.



**Abbildung 44: Biochemische Analyse der FANCD2-Monoubiquitinierung. A: FANCD2-Immunblot und FANCD2-Ubiquitinierungseffizienz verschiedener Protein-Kombinationen.** Die FANCD2-Monoubiquitinierung wurde biochemisch nachgestellt, indem zu UBE1, UBE2T und FANCD2-FANCI die aufgereinigten Proteine FAAP100<sup>WT</sup>, FAAP100<sup>T542P</sup>, FANCB und/oder FANCL hinzugefügt wurden. Aus der Ratio ubiquitiniertes FANCD2/gesamt-FANCD2 (ubiquitiniertes und nicht-ubiquitiniertes FANCD2) wurde die prozentuale Ubiquitinierungseffizienz berechnet. Die Mittelwerte sowie Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten wurden in einem Balkendiagramm aufgetragen. Die Signifikanzen wurden mit dem doppelten t-Test ermittelt: \* p<0,05. **B: FANCD2-Immunblot eines Titrationsexperimentes.** Zu HA-Ubiquitin, UBE1, UBE2T, FAND2-FANCI, FANCB und FANCL wurde in unterschiedlichen Konzentrationen entweder FAAP100<sup>WT</sup> (blau) oder FAAP100<sup>T542P</sup> (rot) hinzugefügt. **C: FANCD2-Ubiquitinierungseffizienz des Titrationsexperimentes.** Aus zwei unabhängig angefertigten FANCD2-Immunblots wurde die Ratio ubiquitiniertes FANCD2/gesamt-FANCD2 bestimmt. Die daraus gebildeten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in einem Kurvendiagramm aufgetragen. D2-Ub: monoubiquitiniertes FANCD2, D2: nicht-monoubiquitiniertes FANCD2.

Anhand der Ratio monoubiquitiniertes FANCD2/gesamt-FANCD2 (ubiquitiniertes und nicht-ubiquitiniertes FANCD2) konnte die prozentuale Ubiquitinierungseffizienz je Protein-Kombination ermittelt werden. So fand ohne FANCL keine FANCD2-Monoubiquitinierung bzw. durch FANCL alleine nur eine FANCD2-Monoubiquitinierung von etwa 10 % statt (Abbildung 44A, Spur 1 und 6). Wurde zu FANCL entweder FANCB oder FAAP100<sup>WT</sup> gegeben, erhöhte sich

die Monoubiquitinierungseffizienz auf etwa 27 % bzw. 42 % (Abbildung 44A, Spur 3 und 4). Im Gegensatz dazu kann man bei der Kombination aus FANCL und FAAP100<sup>T542P</sup> nur eine etwa 5%ige Monoubiquitinierung von FANCD2 ausmachen (Abbildung 44A, Spur 8). Waren alle Mitglieder des Komplexes LBP100 in der wildtypischen Form vorhanden, wurde für dieses definierte System eine maximale Stärke von über 60 % erreicht (Abbildung 44A, Spur 2). Ersetzte man in dieser Konstellation FAAP100<sup>WT</sup> durch FAAP100<sup>T542P</sup>, trat die FANCD2-Monoubiquitinierung nur noch in einer Stärke von ca. 15 % auf (Abbildung 44A, Spur 7).

Zusätzlich wurde ein Titrationsexperiment durchgeführt (Abbildung 44B). Zu HA-Ubiquitin, UBE1, UBE2T, FANCD2-FANCI, FANCB und FANCL wurden entweder FAAP100<sup>WT</sup> oder FAAP100<sup>T542P</sup> in den Konzentrationen 0, 4, 8, 16 und 32 nM hinzugegeben und die Ratio von monoubiquitiniertem FANCD2/gesamt-FANCD2 ermittelt. Hier zeigt sich, dass bei Hinzutritieren von FAAP100<sup>WT</sup> die FANCD2-Ubiquitinierungsstärke kontinuierlich bis auf ca. 55 % für 32 nM zunahm. Wurde dagegen FAAP100<sup>T542P</sup> dem System zugeführt, kann zunächst eine Abnahme der Monoubiquitinierung, ausgehend von einem Anfangswert von etwa 10 %, beobachtet werden. Ab einer Konzentration von 16 nM FAAP100<sup>T542P</sup> steigt die Ubiquitinierungseffizienz wieder an, bis sie bei der Konzentration von 32 nM ihr Maximum von etwa 15 % erreicht.

Somit wird durch diese beiden Versuche nachgewiesen, dass im Gegensatz zu FAAP100<sup>WT</sup> das Protein FAAP100<sup>T542P</sup> nur eine sehr geringe FANCD2-Ubiquitinierungseffizienz besitzt. Zudem war es biochemisch nicht möglich, FANCL, FANCB und FAAP100<sup>T542P</sup> als Komplex aufzureinigen, was hingegen mit FAAP100<sup>WT</sup> gelang. Dies bestätigt, ähnlich wie die in Abschnitt 4.1.8.2 beschriebenen Interaktionsstudien, dass bei Vorliegen von p.(T542P) in FAAP100 keine Komplexbildung von LBP100 erfolgen kann.

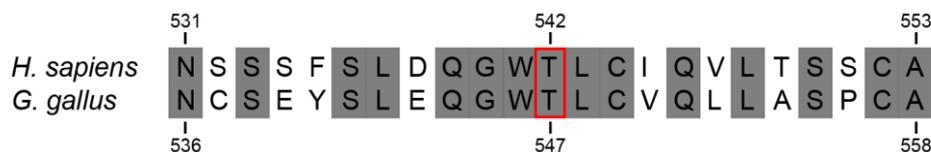
## 4.2 Tiermodelle

Die unter Abschnitt 4.1 beschriebenen Ergebnisse bestätigen, dass die Missense-Mutation p.(T542P) in FAAP100 bei 1176 ursächlich für die Erkrankung FA war. Da bisher kein weiterer FAAP100-Patient identifiziert werden konnte, wurden für eine nähere *in vitro* sowie *in vivo* Charakterisierung von FAAP100 Tiermodelle herangezogen.

### 4.2.1 ΔFAAP100-DT40-Zellen

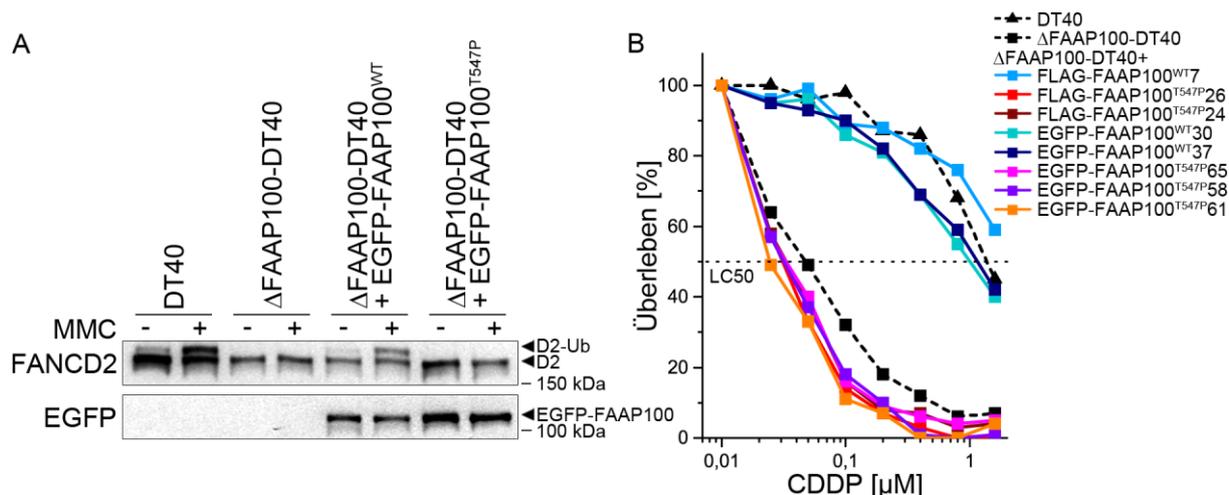
Im Labor unseres Kooperationspartners Weidong Wang führte Yutong Xue, Baltimore, Versuche mit ΔFAAP100-DT40-Hühnerzellen durch, die bei Ling et al. beschrieben worden waren (Ling et al. 2007). Diese Zellen wurden mit Vektoren transient transfiziert und anschließend mit Puromycin selektiert, sodass sie stabil die Fusionsproteine EGFP-FAAP100<sup>WT</sup>, EGFP-FAAP100<sup>T547P</sup>, FLAG-FAAP100<sup>WT</sup> oder FLAG-FAAP100<sup>T547P</sup> exprimierten. Die *FAAP100*-cDNA-Sequenzen stammten

dabei aus der Spezies Huhn, wobei die FAAP100-Mutation p.(T547P) der humanen Variante p.(T542P) entsprach (Abbildung 45).



**Abbildung 45: FAAP100-Sequenzalignments der Spezies Mensch (*H. sapiens*) und Huhn (*G. gallus*).** Die Sequenzausschnitte von FAAP100 zeigen die unterschiedlichen Aminosäurepositionen bei Mensch und Huhn. So entspricht die humane Substitution p.(T542P) der Mutation p.(T547P) im Huhn (roter Rahmen). Mit einer dunkelgrauen Farbe wurden gleiche Aminosäuren hervorgehoben.

Durch einen FANCD2-Immunblot wurde nachgewiesen, dass in  $\Delta$ FAAP100-DT40- sowie in  $\Delta$ FAAP100-DT40+FAAP100<sup>T547P</sup>-Zellen keine FANCD2-Monoubiquitinierung stattfinden kann (Abbildung 46A). Wurden die  $\Delta$ FAAP100-DT40-Zellen jedoch stabil mit FAAP100<sup>WT</sup> transfiziert, ist in diesen Zellen eine FANCD2-Monoubiquitinierung möglich. Folglich komplementiert FAAP100<sup>WT</sup> die  $\Delta$ FAAP100-DT40-Huhn-Zellen.



**Abbildung 46: Nachweis der FANCD2-Monoubiquitinierung und Sensitivität gegenüber Cisplatin von nativen und transfizierten DT40-Zellen.** **A: FANCD2-Immunblot.** Auf einen Immunblot wurden Proteinlysate von parentalen und  $\Delta$ FAAP100-DT40-Zellen sowie von  $\Delta$ FAAP100-DT40-Zellen aufgetragen, die mit EGFP-FAAP100<sup>WT</sup> bzw. EGFP-FAAP100<sup>T547P</sup> transfiziert worden waren. EGFP-FAAP100 wurde mithilfe eines  $\alpha$ -GFP-Antikörpers nachgewiesen, was als Transfektionskontrolle diente. D2-Ub: monoubiquitiniertes FANCD2, D2: nicht-ubiquitiniertes FANCD2, kDa: Kilodalton. **B: Überlebenskurven der DT40-Zelllinien.** In einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve wurden die Anteile der vitalen Zellen in Prozent aufgetragen, nachdem sie gegen die Anzahl der jeweils unbehandelten Kultur normalisiert worden waren (arbiträr 100 %). Die gestrichelte Linie markiert die LC50 (letale Konzentration für 50 % der Zellen). CDDP: Cisplatin. EGFP-FAAP100: Fusionsprotein aus EGFP und FAAP100, FLAG-FAAP100: Fusionsprotein aus FLAG-Epitop und FAAP100. Die Zahlen geben die Identifikationsnummer der unterschiedlichen klonalen Zelllinien an.

Die  $\Delta$ FAAP100-DT40-Zellen sowie die Zellen, die mit FAAP100<sup>WT</sup> bzw. FAAP100<sup>T547P</sup> transfiziert worden waren, wurden auf ihre Überlebensfähigkeit in Abhängigkeit unterschiedlicher Cisplatin-Konzentrationen untersucht (Abbildung 46B). Es wurden je eine Messung der DT40-

Kontrollzellen, der  $\Delta$ FAAP100-DT40-Zellen sowie verschiedener klonaler  $\Delta$ FAAP100-DT40+FAAP100<sup>T547P</sup>- bzw.  $\Delta$ FAAP100-DT40+FAAP100<sup>WT</sup>-Zelllinien durchgeführt. Sowohl die parentalen DT40-Zellen als auch die  $\Delta$ FAAP100-DT40+FAAP100<sup>WT</sup>-Zellen zeigten nur eine geringe Sensitivität gegenüber Cisplatin, sodass die LC50 bei etwa 1,3  $\mu$ M Cisplatin lag. Im Gegensatz dazu wiesen die  $\Delta$ FAAP100-DT40- sowie die  $\Delta$ FAAP100-DT40+FAAP100<sup>T547P</sup>-Zellen eine Hypersensitivität gegenüber Cisplatin und somit eine LC50 zwischen 0,025  $\mu$ M und 0,05  $\mu$ M Cisplatin auf.

Die ermittelte Hypersensitivität in den  $\Delta$ FAAP100-DT40- und den  $\Delta$ FAAP100-DT40+FAAP100<sup>T547P</sup>-Zellen gegenüber ICL-induzierenden Agenzien spiegelt einen typischen zellulären FA-Phänotyp wider, der durch die Komplementation dieser Zellen mit FAAP100<sup>WT</sup>, aber nicht durch die Transfektion mit FAAP100<sup>T547P</sup>, aufgehoben werden kann.

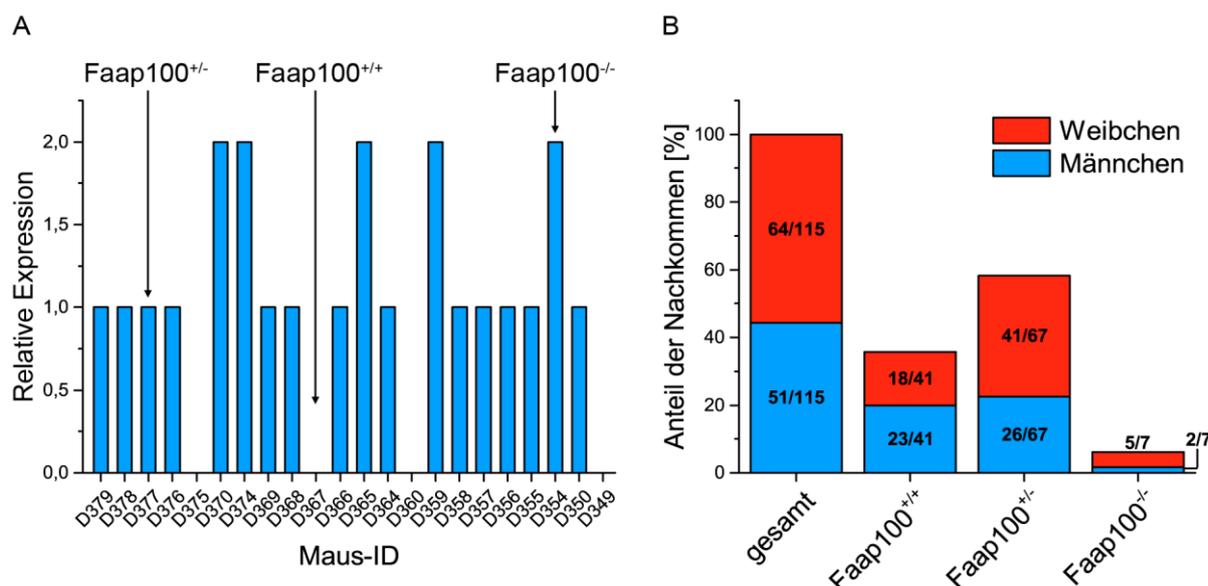
#### 4. 2. 2 Faap100<sup>-/-</sup>-Mausmodell

Um die Folgen eines FAAP100-Knockouts in einem lebenden Organismus zu untersuchen, wurde die Generierung einer Faap100<sup>-/-</sup>-Maus bei der Firma Ozgene in Auftrag gegeben. Die Herstellung sollte anhand bereits vorhandener embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) des Repositoriums *The Knockout Mouse Project* (KOMP, University of California Davis) erfolgen. Nach Auftragserteilung wurden die ES-Zellen aufgetaut, um sie Qualitätskontrollen zu unterziehen, die von KOMP selbst durchgeführt wurden. Sie ergaben, dass alle zwölf vorhandenen ES-Zellen nur in geringem Maße euploid waren bzw. das Vektorkonstrukt bei ES-Zellklon H07 fehlerhaft in das Genom integriert war (Tabelle 18). KOMP gab an, wenn weniger als 50 % der ausgezählten Metaphasen die erwarteten 40 Chromosomen aufweisen sollten, war davon auszugehen, dass eine Generierung somatischer Chimären und folglich heterozygoter Knockout-Tiere mit diesen ES-Zellen nicht erfolgreich sein würde. Auch der Zellklon F08 wies nur 35 % Euploidie auf und lag damit unter den gewünschten 50 % für eine erfolgreich durchlaufene Qualitätskontrolle. Laut der Firma Ozgene bestand für diesen Zellklon dennoch eine reelle Chance, dass durch ihn Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse generiert werden könnten. Folglich wurde er von Ozgene für eine Injektion in Blastozysten genutzt. Die daraus hervorgegangenen Maus-Chimären waren jedoch alle infertil, sodass mit diesen Tieren keine Faap100<sup>+/-</sup>-Mäuse hergestellt werden konnten.

**Tabelle 18: Ergebnisse der Qualitätskontrollen muriner embryonaler Stammzellen bei KOMP (Repositorium *The Knockout Mouse Project*, University of California Davis).**

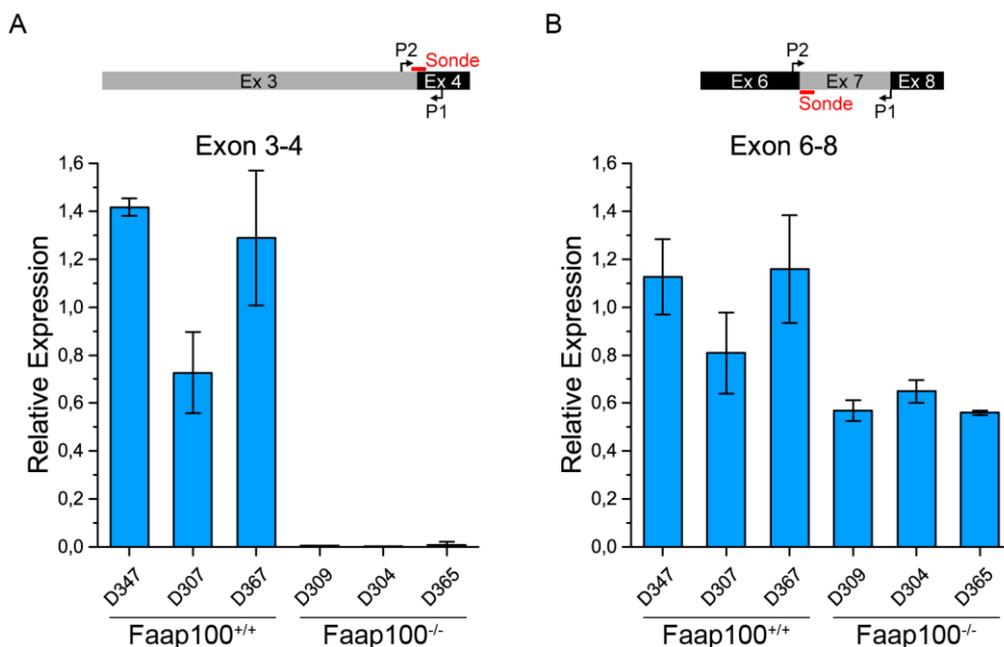
ES-Zellklon-ID	ermittelte Euploidie	ES-Zellklon-ID	ermittelte Euploidie
EPD0223_1_G08	15 %	EPD0223_1_A07	0 %
EPD0223_1_B07	0 %	EPD0223_1_H07	fehlerhafte Integration des Vektorkonstruktes
EPD0223_1_E08	30 %	EPD0223_1_F07	0-10 %
EPD0223_1_D05	15 %	EPD0223_1_A06	0-10 %
EPD0223_1_H06	15 %	EPD0223_1_F08	35 %
EPD0223_1_H05	0-10 %	EPD0223_1_F06	0-10 %

Infolgedessen wurde Ozgene beauftragt, selbst ES-Zellen herzustellen. Hierfür verwendete die Firma den Target-Vektor PRPGS00048\_B\_H06 (Methodenteil 3. 12. 2, Abbildung 13) vom *Children's Hospital Oakland (BACPAC Resources)*. Die Generierung der Faap100<sup>+/-</sup>-Mäuse wird in Abschnitt 3. 12. 2 näher beschrieben. Um Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse zu erhalten, wurden die heterozygoten Tiere untereinander gekreuzt. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte durch Schwanz- bzw. Ohrbiopsie mittels qPCR (Abbildung 47A). Wurde ein relativer, gegen die endogene Kontrolle *Tert* normalisierter Expressionswert von  $2^{-\Delta\Delta Ct}=2$  erreicht, wiesen die Mäuse einen homozygoten Faap100-Knockout auf. Bei einem  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert von 1 war ihr Genotyp Faap100<sup>+/-</sup>, bei einem  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert von 0 Faap100<sup>+/+</sup>. Die Verteilung der Genotypen aus 14 Kreuzungen ist in Abbildung 47B dargestellt. Das Geschlechterverhältnis der Mäuse war mit 56 % Weibchen und 44 % Männchen statistisch nicht signifikant verschieden (Chi<sup>2</sup>-Test, p>0,05). Die Genotypenverteilung der Faap100-Mäuse erfolgte mit 36 % (Faap100<sup>+/+</sup>), 58 % (Faap100<sup>+/-</sup>) und 6 % (Faap100<sup>-/-</sup>) hoch signifikant nicht nach den Mendelschen Vererbungsregeln (Chi<sup>2</sup>-Test, p<0,001), nach denen 25 %, 50 % und 25 % erwartet worden wären. Da 6 % stark unter dem erwarteten 25 %-Anteil lagen, ging man von embryonaler Letalität bei den homozygoten Knockout-Mäusen aus.



**Abbildung 47: Genotypisierung sowie Genotypenverteilung der Nachkommen nach Kreuzung der Faap100<sup>+/-</sup>-Mäuse. A: Genotypisierung mittels qPCR.** Die Normalisierung erfolgte über die endogene Kontrolle *Tert*. Ein Faap100<sup>-/-</sup>-Genotyp wies eine relative Expression von  $2^{-\Delta\Delta Ct}=2$ , ein Faap100<sup>+/-</sup>-Genotyp eine relative Expression von  $2^{-\Delta\Delta Ct}=1$  und ein Faap100<sup>+/+</sup>-Genotyp eine relative Expression von  $2^{-\Delta\Delta Ct}=0$  auf. Die x-Achsenbeschriftung gibt die Identifikationsnummer der analysierten Faap100-Mäuse an. **B: Anteil der Nachkommen aus Kreuzungen der Faap100<sup>+/-</sup>-Mäuse.** Es sind die Anteile der weiblichen (rot) sowie der männlichen (blau) Nachkommen in Prozent dargestellt, die nach dem jeweiligen Genotyp aufgegliedert wurden. Die absolute Anzahl der Mäuse bzw. ihrer Genotypen ist in Zahlen angegeben.

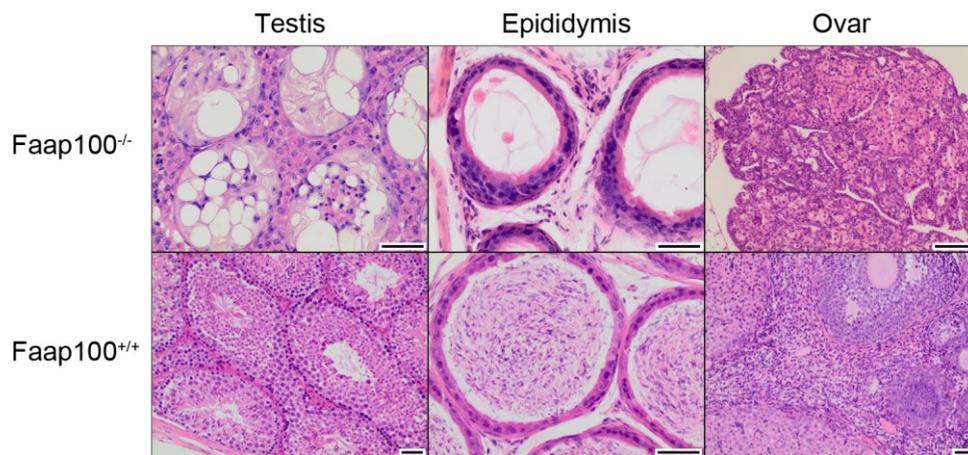
Eine mRNA-Expressionsanalyse wurde anhand von Lymphknoten-Gewebe durchgeführt. Die Ergebnisse der Reverse Transkriptase-qPCR (RT-qPCR) sind in Abbildung 48 dargestellt.



**Abbildung 48: mRNA-Expressionanalyse von *Faap100* Exon 3-4 (A) sowie von Exon 6-8 (B).** Die Reverse Transkriptase-qPCR wurde mit mRNA verschiedener *Faap100*<sup>+/+</sup>- bzw. *Faap100*<sup>-/-</sup>-Lymphknotenzellen durchgeführt. Im oberen Bereich der Abbildungen ist jeweils der relevante *Faap100*-cDNA-Bereich mit den Bindestellen der Primer P1 und P2 sowie der Sonden dargestellt. Darunter werden die Ergebnisse der RT-qPCR gezeigt. Die Normalisierung der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte erfolgte über die endogene Kontrolle *beta-actin*. Die x-Achsenbeschriftung gibt die Identifikationsnummer der verwendeten *Faap100*-Mäuse an. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten berechnet.

Für die *Faap100*<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte keine mRNA-Expression von *Faap100* Exon 3-4 nachgewiesen werden (Abbildung 48A). Exon 6-8 hingegen wurde weiterhin, allerdings in reduzierter Menge exprimiert (Abbildung 48B). Somit war der Knockout von Exon 3 in den *Faap100*<sup>-/-</sup>-Tieren bestätigt. Für *Faap100*<sup>+/+</sup>-Mäuse war sowohl die Expression von *Faap100* Exon 3-4 als auch die von Exon 6-8 nachweisbar.

Um *Faap100*<sup>-/-</sup>-MEFs (murine embryonalen Fibroblasten) herzustellen, wurden *Faap100*<sup>-/-</sup>-Mäuse untereinander gekreuzt. Allerdings konnte keine Gestation erreicht werden. Histologieuntersuchungen ergaben, dass bei *Faap100*<sup>-/-</sup>-Mäusen sowohl testikuläre als auch ovariale Hypoplasie vorlagen (Abbildung 49). Mikroskopieaufnahmen der Testis zeigten eine große Menge an gut differenzierten interstitiellen Zellen und somit stark ausgeprägtes interstitielles Gewebe, sehr kleine Samenkanälchen sowie keine Anzeichen einer Spermatogenese. Auch die Nebenhoden (Epididymis) der *Faap100*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen im Gegensatz zu den *Faap100*<sup>+/+</sup>-Tieren keine Spermien auf. Die Ovarien der *Faap100*<sup>-/-</sup>-Weibchen waren atrophisch und wiesen keine klare, sondern eine unregelmäßige Form auf. Das interstitielle Gewebe war ebenfalls stark ausgeprägt. Es war keine Follikeldifferenzierung zu beobachten. Das Fehlen der Spermatogenese sowie der Follikelbildung bestätigte die Infertilität für beide Geschlechter der *Faap100*<sup>-/-</sup>-Mäuse.



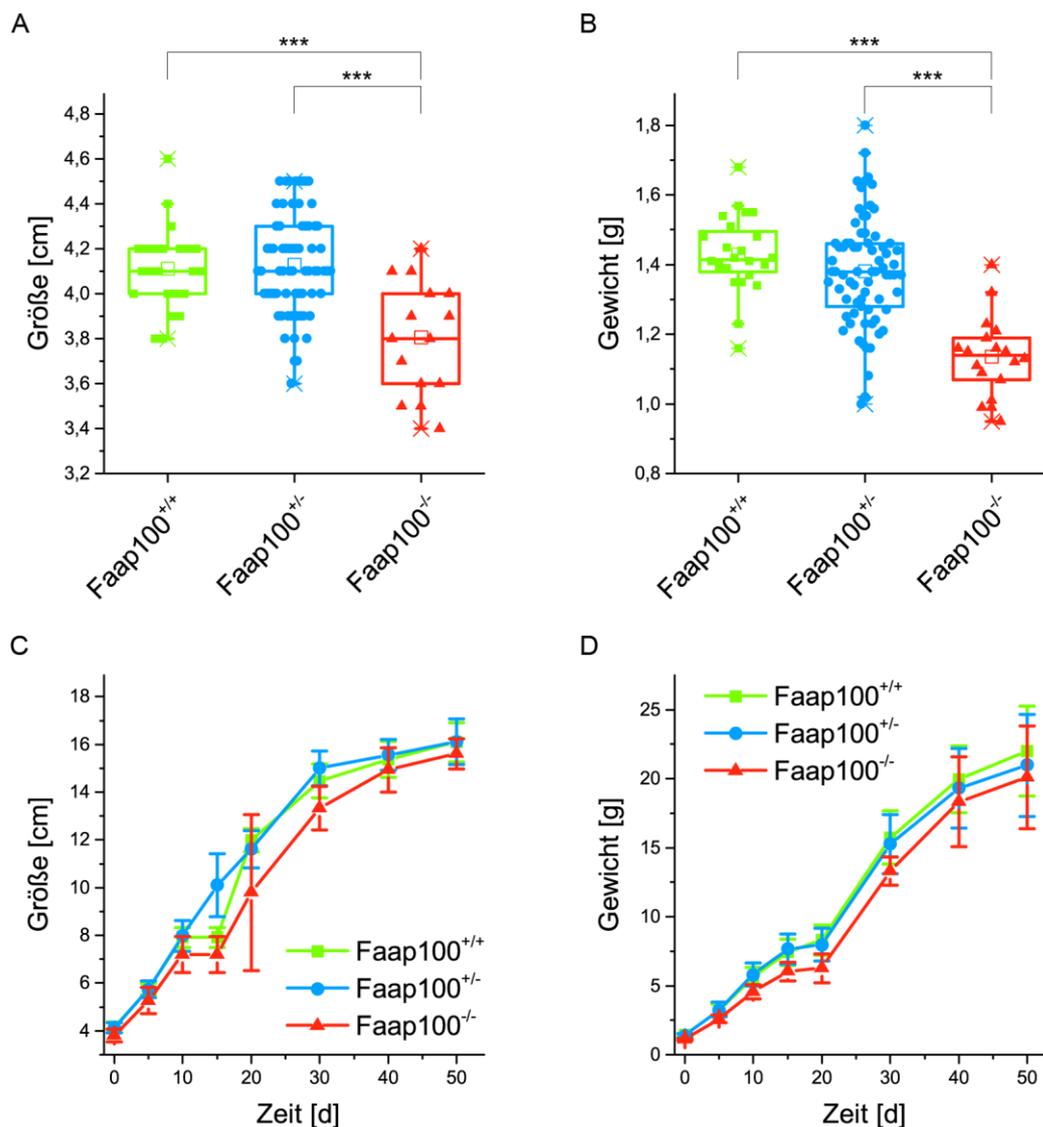
**Abbildung 49: Histologie der Faap100-Mausgonaden.** Die Mikrofotografien zeigen Testis-, Epididymis- sowie Ovargewebe der Faap100<sup>-/-</sup> (oben) sowie der Faap100<sup>+/+</sup>-Mäuse (unten). Die Faap100<sup>-/-</sup>-Testis wiesen im Gegensatz zu den Faap100<sup>+/+</sup>-Testis atrophe Samenkanälchen, die vereinzelte Sertoli-Zellen enthielten, sowie eine Hyperplasie des interstitiellen Gewebes auf. Es konnte keine Spermatogenese nachgewiesen werden. In den Nebenhodengängen der Faap100<sup>-/-</sup> Epididymis waren keine reifen Spermien vorhanden. Das Lumen wurde durch eine vermehrte Anzahl an Epithelzellen begrenzt. Die Nebenhodengänge der Faap100<sup>+/+</sup>-Mäuse enthielten viele funktionsfähige Spermien. Die Faap100<sup>-/-</sup>-Ovarien waren atrophisch und wiesen unregelmäßige Konturen auf. Im Gegensatz zu den Faap100<sup>+/+</sup>-Mäusen war in den Ovarien der Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse keine Follikelbildung zu beobachten. Die Maßstabsbalken kennzeichnen eine Länge von 50 µm.

Darüber hinaus wurden bei 3,5 % der Faap100<sup>+/-</sup>- und bei 3,5 % der Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse weitere phänotypische Anomalien beobachtet, die in Tabelle 19 aufgeführt werden. Sowohl heterozygote als auch homozygote Faap100-Knockout-Mäuse zeigten einen Hydrozephalus sowie einseitige oder beidseitige Anophthalmien. Eine Faap100<sup>+/-</sup>-Maus, die totgeboren wurde, wies zudem Anomalien in allen Extremitäten auf. Da bei C57BL/6-Inzuchtstämmen jedoch etwa 10 % basale Fehlbildungen beobachtet werden (Kalter 1968), könnten sowohl die Anomalien der Faap100<sup>+/-</sup>- als auch die der Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse bereits auf diese basale Rate, und nicht auf den heterozygoten bzw. homozygoten Knockout von *Faap100*, zurückzuführen sein. Hydrozephalus wird in der Literatur für den Inzuchtstamm C57BL/6 mit einer Häufigkeit von 1-3 %, Mikrophthalmie und Anophthalmie mit 8-20 % angegeben (Dagg 1966). Somit unterschieden sich die Anteile der in dieser Arbeit charakterisierten Faap100-Tiere nicht signifikant (Chi<sup>2</sup>-Test, p>0,05) von den publizierten Werten.

**Tabelle 19: Von der Firma Ozgene beschriebene Anomalien der Faap100-Mäuse.**

Genotyp	Anomalien
Faap100 <sup>+/-</sup>	Hydrozephalus
Faap100 <sup>+/-</sup>	Anophthalmie rechts
Faap100 <sup>+/-</sup>	Anophthalmie links, alle Extremitäten abnormal, Totgeburt
Faap100 <sup>-/-</sup>	Anophthalmie rechts, Hydrozephalus
Faap100 <sup>-/-</sup>	Anophthalmie beidseitig, Hydrozephalus
Faap100 <sup>-/-</sup>	Anophthalmie rechts

Ozgene dokumentierte von den Mäusen für jeden Genotyp Größe und Gewicht am Tag ihrer Geburt sowie über einen Zeitraum von 50 Tagen. Sowohl Faap100<sup>+/+</sup>- als auch Faap100<sup>+/-</sup>-Mäuse waren am Tag ihrer Geburt mit einer durchschnittlichen Länge von 4,1 cm größer als Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse, deren Durchschnittsgröße 3,8 cm betrug (Abbildung 50A). Aus den Boxplots ist ersichtlich, dass die Messungen aus unterschiedlichen Anzahlen an Tieren bestanden. So wurde von 15 Faap100<sup>-/-</sup>-Mäusen die Größe am Tag ihrer Geburt bestimmt, wobei die kleinste Faap100<sup>-/-</sup>-Maus 3,4 cm und die größte Faap100<sup>-/-</sup>-Maus 4,2 cm maß. So wies diese Maus eine Länge auf, die sowohl mit Faap100<sup>+/+</sup>- als auch mit Faap100<sup>+/-</sup>-Mäusen vergleichbar war. Ein doppelter t-Test ergab jedoch, dass der Größenunterschied zwischen den Faap100<sup>-/-</sup>- und den Faap100<sup>+/+</sup>-Mäusen sowie auch zwischen den Faap100<sup>-/-</sup>- und den Faap100<sup>+/-</sup>-Mäusen hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ) war. Über einen Zeitraum von 50 Tagen wurden je neun Faap100<sup>+/+</sup>- bzw. Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse sowie 11-42 Faap100<sup>+/-</sup>-Mäuse analysiert. Es war zu beobachten, dass die Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse stets kleiner als die Faap100<sup>+/+</sup>- sowie die Faap100<sup>+/-</sup>-Mäuse waren (Abbildung 50C). Am 50. Tag wiesen sowohl die Faap100<sup>+/+</sup>- als auch die Faap100<sup>+/-</sup>-Mäuse eine durchschnittliche Größe von 16,1 cm auf, wohingegen die Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse 15,6 cm groß waren. Die Gewichtsmessungen am Tag der Geburt (Abbildung 50B) ergaben, dass die Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse mit durchschnittlich 1,13 g leichter waren als die Faap100<sup>+/+</sup>- (1,43 g) sowie die Faap100<sup>+/-</sup>-Mäuse (1,38 g). Die Messergebnisse waren nach dem doppelten t-Test mit  $p \leq 0,001$  hoch signifikant. Allerdings war die Streuung der Messwerte hier ebenfalls sehr groß. Im Verlauf über 50 Tage nahm der Gewichtsunterschied zwischen den verschiedenen Genotypen zu (Abbildung 50D). So betrug das mittlere Gewicht am 50. Lebenstag für Faap100<sup>+/+</sup>-Mäuse 22,00 g und für Faap100<sup>+/-</sup>-Mäuse 20,96 g, wohingegen Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse etwa 20,10 g wogen. Pro Tag und Genotyp waren hier ebenfalls eine unterschiedliche Anzahl an Tieren analysiert worden: mindestens sechs Faap100<sup>-/-</sup>-, mindestens elf Faap100<sup>+/-</sup>- und mindestens neun Faap100<sup>+/+</sup>-Mäuse.



**Abbildung 50: GröÙe und Gewicht der Faap100-Mäuse. GröÙen- (A) sowie Gewichtsmessungen (B) der Mäuse am Tag ihrer Geburt.** In die Boxplots wurden sowohl der Median als auch die Anzahl der analysierten Tiere eingezeichnet. Die Whisker geben das 1,5-Fache des Interquartilsabstands an. Signifikanzen wurden mit dem doppelten t-Test ermittelt: \*\*\*  $p \leq 0,001$ . **GröÙen- (C) sowie Gewichtsmessungen (D) der Mäuse der Tage 0-50.** Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus unterschiedlichen Anzahlen an Mäusen ermittelt. Pro Tag und Genotyp wurden für die GröÙenmessungen mindestens neun (Faap100<sup>-/-</sup>, Faap100<sup>+/+</sup>) bzw. elf (Faap100<sup>+/-</sup>) Mäuse, für die Gewichtsmessungen mindestens sechs (Faap100<sup>-/-</sup>), neun (Faap100<sup>+/+</sup>) bzw. elf (Faap100<sup>+/-</sup>) Mäuse analysiert.

Die Störung des hämatologischen Systems stellt ein typisches FA-Kennzeichen dar. Dies kann auch bei einigen FA-Mäusen beobachtet werden, beispielsweise bei *Fancd1*<sup>-/-</sup> und *Fancp*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Navarro et al. 2006, Crossan et al. 2011). Daher ließ Ozgene nach sechs Monaten von den Faap100-Mäusen das erste große Blutbild anfertigen (Tabelle 20). Sowohl die Blutwerte der Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse als auch der Faap100<sup>+/+</sup>-Mäuse lagen innerhalb des jeweiligen Referenzintervalls. Somit wiesen Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse in einem Alter von sechs Monaten keine Anämie auf.

**Tabelle 20: Hämatologischer Bericht des großen Blutbildes von sechs Monate alten Faap100-Mäusen.**

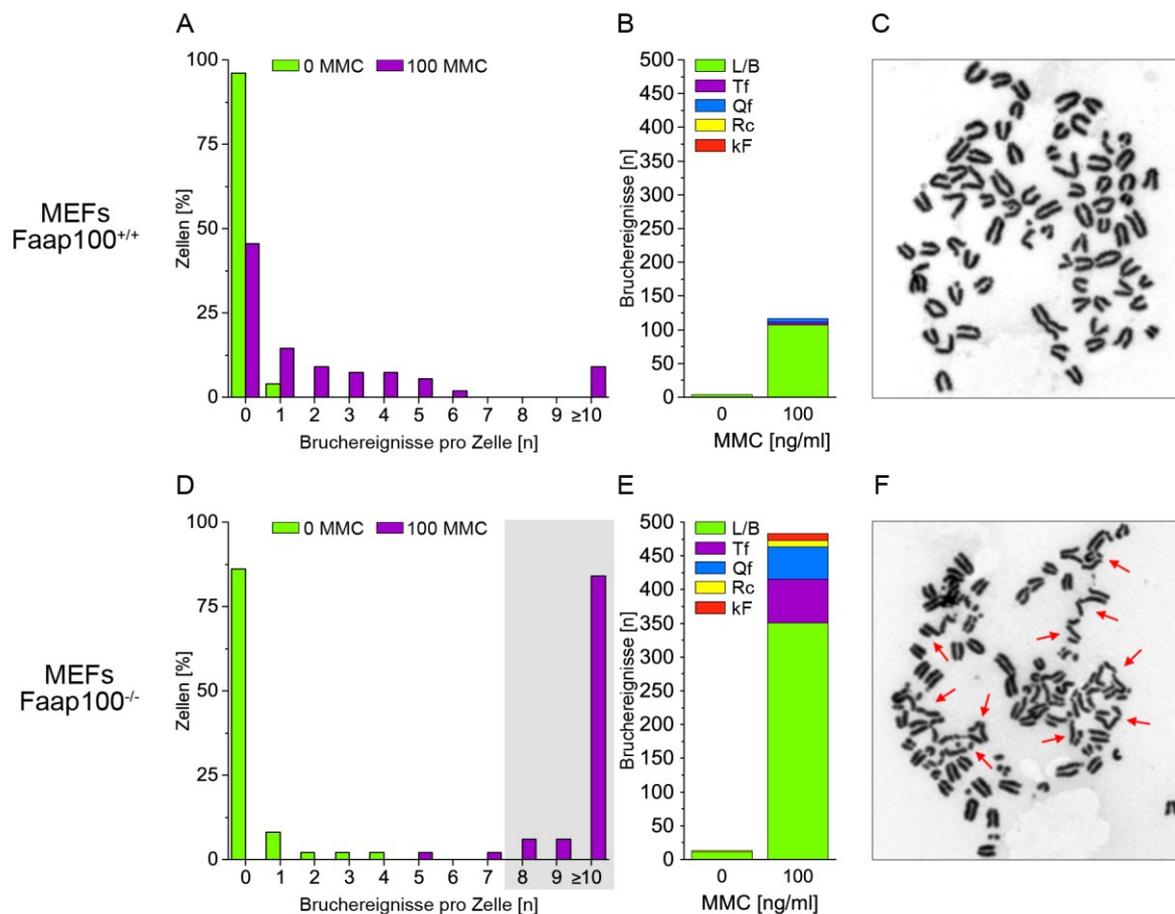
Blutwert	Faap100 <sup>+/+</sup> -Mäuse*	Faap100 <sup>-/-</sup> -Mäuse*	Referenzintervall
Hämoglobin [g/l]	142,00	135,50	126-205
Hämatokrit [l/l]	0,43	0,42	0,42-0,68
Erythrozyten x10 <sup>12</sup> /l	9,35	8,85	6,9-12,2
durchschnittliche Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten [g/l]	328,00	324,00	233-331
durchschnittliche Hämoglobinemenge pro Erythrozyt [pg]	15,00	15,50	13-18
durchschnittliches Volumen eines Erythrozyten [fl]	46,50	47,50	50,7-64,4
Leukozyten x10 <sup>9</sup> /l	7,25	8,50	3,5-14,8
Neutrophile Granulozyten x10 <sup>9</sup> /l	1,14	1,41	0,6-3,8
Lymphozyten x10 <sup>9</sup> /l	6,07	6,97	2,2-11,5
Eosinophile Granulozyten x10 <sup>9</sup> /l	0,05	0,12	0,00-0,80
Thrombozyten x10 <sup>9</sup> /l	978,50	852,50	420-1690

\* Mittelwert aus je zwei unabhängigen Blutanalysen, zusammengesetzt aus Blut von jeweils vier Faap100<sup>+/+</sup>- bzw. Faap100<sup>-/-</sup>-Mäusen. Quelle der Referenzintervalle: Ozgene.

Aufgrund der Infertilität der Faap100<sup>-/-</sup>-Tiere mussten für die MEF-Generierung heterozygote Mäuse gekreuzt werden. Die primären MEFs wurden nach Würzburg versandt, wo alle weiteren Versuche durchgeführt wurden. Die Genotypen der primären MEFs konnten durch PCR und anschließende Gelelektrophorese sowie durch Sanger-Sequenzierung bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Ein möglicher zellulärer FA-Phänotyp der primären MEFs wurde durch eine spontane sowie induzierte Chromosomenbrüchigkeit analysiert (Abbildung 51). Dabei wiesen ohne MMC-Behandlung 96 % der analysierten Faap100<sup>+/+</sup>-Metaphasen keine Bruchereignisse auf. Waren die Zellen zuvor mit 100 ng/ml MMC inkubiert worden, konnte man bei 45 % der Metaphasen keine Bruchereignisse und bei 9 % der Metaphasen zehn oder mehr Brüche beobachten (Abbildung 51A). Die ermittelte Gesamtbruchanzahl der 50 bzw. 55 ausgezählten Metaphasen betrug bei unbehandelten Zellen vier Brüche bzw. bei mit 100 ng/ml MMC behandelten Zellen 107 Brüche zusätzlich zweier Triradialfiguren sowie dreier Quadriradialfiguren (Abbildung 51B). Abbildung 51C zeigt beispielhaft die für eine Maus typischen akrozentrischen Chromosomen ohne Bruchereignisse, nachdem die Zellen mit 100 ng/ml MMC behandelt worden waren. Faap100<sup>-/-</sup>-MEFs wiesen ohne MMC-Behandlung in den meisten Metaphasen (86 %) ebenfalls keine Bruchereignisse auf (Abbildung 51D), sodass insgesamt nur elf Brüche sowie zwei Ringchromosomen beobachtet werden konnten (Abbildung 51E). Anders verhielt es sich, nachdem die Zellen mit 100 ng/ml MMC behandelt worden waren. 84 % dieser Metaphasen enthielten Chromosomen mit zehn oder mehr Bruchereignissen (Abbildung 51D), sodass insgesamt 483 Bruchereignisse bei 50 analysierten Zellen ermittelt werden konnten. Diese setzten

sich aus Brüchen, Tri- und Quadriradialfiguren, komplexeren Figuren sowie Ringchromosomen zusammen (Abbildung 51E).



**Abbildung 51: Chromosomenbruchanalyse primärer Faap100-MEFs. Anteil der Zellen in Prozent klassifiziert nach Bruchereignissen pro Zelle von Faap100<sup>+/+</sup>- (A) sowie von Faap100<sup>-/-</sup>-MEFs (D). Zellen, die unbehandelt geblieben waren, sind grün, Zellen, die für 48 h 100 ng/ml MMC exponiert wurden, sind lila markiert. Eine graue Hintergrundfläche hebt die veränderten Bruchverteilungen hervor, die typisch für einen zellulären FA-Phänotyp sind. Anzahl der Chromosomenbruchereignisse sowie der Chromosomenbrucharten in Abhängigkeit von der MMC-Konzentration von Faap100<sup>+/+</sup>- (B) sowie von Faap100<sup>-/-</sup>-MEFs (E). Die Werte wurden je nach Art des entsprechenden Bruchereignisses bzw. Rearrangements aufgegliedert. L/B: Lücken/Brüche (grün), Tf: Triradialfiguren (lila), Qf: Quadriradialfiguren (blau), Rc: Ringchromosomen (gelb), kF: komplexere Figuren (rot). Mikrofotografie je einer Metaphase von Faap100<sup>+/+</sup>- (C) sowie von Faap100<sup>-/-</sup>-MEFs (F). Die entsprechenden Kulturen der dargestellten Metaphasen waren mit 100 ng/ml MMC für 48 h inkubiert worden. Brüche und Radialfiguren sind durch rote Pfeile markiert. Die Originalmikrofotografien wurden mit einem 100x Objektiv aufgenommen.**

Damit konnte nach Behandlung mit 100 ng/ml MMC ein größerer Anteil an Metaphasen mit zehn oder mehr Bruchereignissen beobachtet werden, als es beispielsweise mit etwa 50 % für primäre Fancw<sup>-/-</sup>-MEFs beschrieben worden war (Knies et al. 2017). In dieser Veröffentlichung waren neben Brüchen ebenfalls Radialfiguren in Fancw<sup>-/-</sup>-Metaphasen nachgewiesen worden. Die spontane Chromosomenbrüchigkeit der Faap100<sup>-/-</sup>-MEFs war etwa mit der von Fancf<sup>-/-</sup>, von Fancg<sup>-/-</sup> bzw. von Fancw<sup>-/-</sup>-MEFs vergleichbar (Koomen et al. 2002, Bakker et al. 2012, Knies et al. 2017). Eine induzierte Chromosomenbrüchigkeit der Fancf<sup>-/-</sup> sowie der Fancg<sup>-/-</sup>-MEFs war nur mit 50 ng/ml MMC analysiert worden, sodass diese Ergebnisse für einen direkten Vergleich nicht herangezogen werden konnten. Eine Faap100<sup>-/-</sup>-Metaphase, die eine deutlich erhöhte

Chromosomenbrüchigkeit sowie auch Radialfiguren zeigt, ist in Abbildung 51F dargestellt. Somit ist durch die Chromosomenbruchanalyse ein typischer zellulärer FA-Phänotyp für primäre Faap100<sup>-/-</sup>-MEFs bestätigt, der sich in einer Hypersensitivität gegenüber MMC widerspiegelt.

Während der Chromosomenbruchanalyse fiel auf, dass die gemittelten Chromosomenzahlen von 40 erwarteten murinen Chromosomen abwichen (Tabelle 21). Obwohl es sich um primäre MEFs handelte, wiesen Faap100<sup>+/+</sup>-Metaphasen im Durchschnitt 48,75 und Faap100<sup>-/-</sup>-Metaphasen 55,00 Chromosomen pro Zelle auf.

**Tabelle 21: Gemittelte Chromosomenzahlen.**

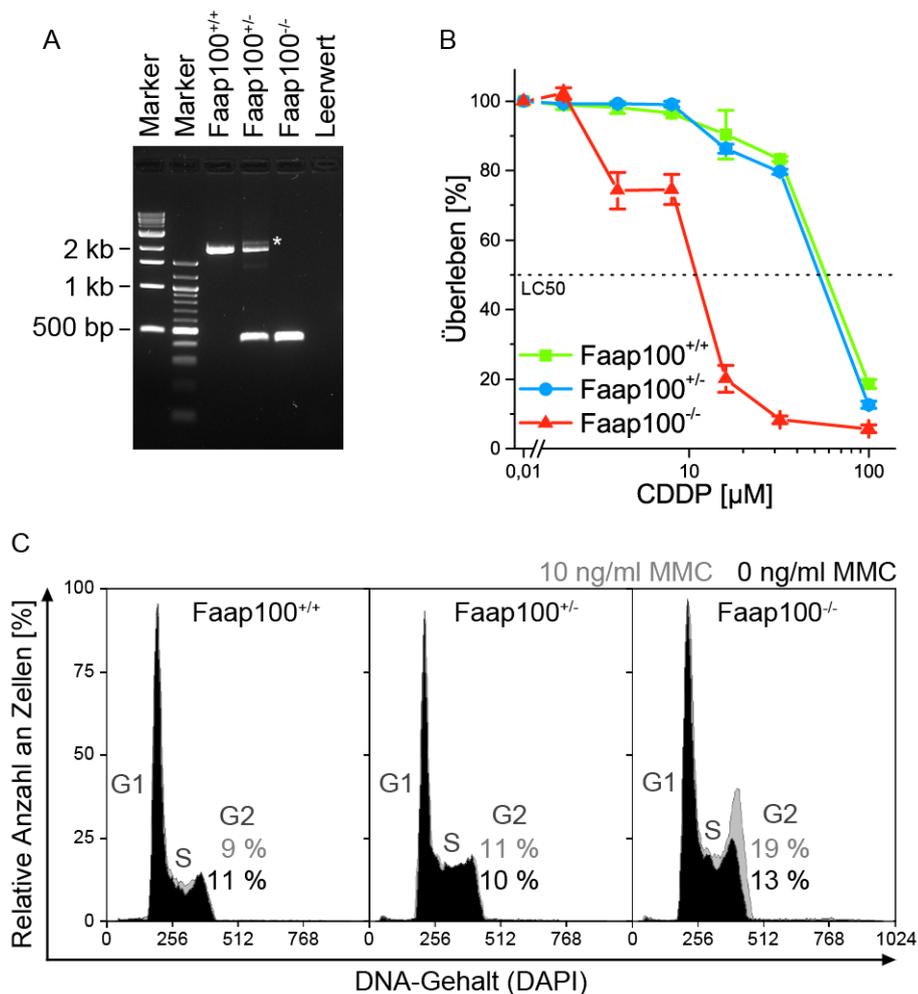
Zelllinie	Chromosomenanzahl/Zelle	Anzahl der untersuchten Zellen
MEF Faap100 <sup>+/+</sup>	48,75	16
MEF Faap100 <sup>-/-</sup>	55,00	8

Allerdings ist bekannt, dass Zellen, die *in vitro* kultiviert werden, in Korrelation mit der Kulturdauer spontan aneuploid werden können. Dieses Phänomen scheint auf eine erhöhte Rate reaktiver Sauerstoffverbindungen in der Kultur zurückzuführen zu sein, welche in Zusammenhang mit dem Kulturmedium gebracht wird (Wang et al. 2013a). So sind oxidative DNA-Schäden mit replikativer Seneszenz assoziiert, sodass Zellen in Kultur nur eine limitierte Anzahl an Zellteilungen aufweisen (Chen et al. 1995). Diesen Alterungsprozess konnte man auch bei den vorliegenden MEF-Kulturen beobachten, der sich vor allem in einer langsamen Proliferation und einem vermehrten Absterben der Zellen zeigte. Um weitere Versuche mit diesen MEFs durchführen zu können, wurde ein Teil dieser Zellen immortalisiert.

Die Genotypen der immortalisierten MEFs wurden erneut durch PCR und anschließende Gelelektrophorese (Abbildung 52A) sowie durch Sanger-Sequenzierung bestätigt.

Der zelluläre Phänotyp der immortalisierten MEFs wurde anhand von Überlebenskurven und Zellzyklusmessungen analysiert. Abbildung 52B zeigt, dass sich die Faap100<sup>-/-</sup>-MEFs hypersensitiv gegenüber Cisplatin verhielten und deren Vitalität in Abhängigkeit der Cisplatin-Konzentration stark abnahm. Die letale Konzentration von 50 % der Zellen betrug etwa 12 µM Cisplatin. Dagegen waren für die Faap100<sup>+/+</sup>- sowie für die Faap100<sup>+/-</sup>-MEFs etwa 55 µM Cisplatin notwendig, um eine LC50 zu erreichen. Folglich wiesen die MEFs dieser Genotypen keine Hypersensitivität gegenüber Cisplatin auf. Die Zellzyklusanalyse der immortalisierten MEFs ist in Abbildung 52C dargestellt. Es konnte sowohl für die Faap100<sup>+/+</sup>- als auch für die Faap100<sup>+/-</sup>-MEFs nachgewiesen werden, dass sich 11 % bzw. 10 % der Zellen in der G2-Phase befanden. Nach Zugabe von MMC war für beide Genotypen kein bzw. kaum ein Anstieg des G2-Phase-Anteils zu erkennen. Im Gegensatz dazu befanden sich bei unbehandelten Faap100<sup>-/-</sup>-MEFs etwa 13 % der Zellen in der G2-Phase. Nach Inkubation mit MMC erhöhte sich der G2-Phase-Anteil um 6 %. Somit wiesen die Faap100<sup>-/-</sup>-Zellen bereits im unbehandelten Zustand einen höheren G2-Phase-Anteil als die

Faap100<sup>+/-</sup>- bzw. die Faap100<sup>+/-</sup>-MEFs auf und reagierten zudem sensitiv auf MMC, was sowohl bei den Faap100<sup>+/-</sup>- als auch bei den Faap100<sup>+/-</sup>-Zellen nicht beobachtet werden konnte.



**Abbildung 52: Genotypennachweis und zellulärer FA-Phänotyp immortalisierter Faap100-MEFs** **A: Ergebnisse einer Standard-PCR.** Durch die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate konnten drei unterschiedlichen Genotypen (Faap100<sup>+/+</sup>, Faap100<sup>+/-</sup>, Faap100<sup>-/-</sup>) der transformierten MEFs nachgewiesen werden: Wildtyp-Bande ca. 2 kb, Knockout-Bande ca. 500 bp. Für die Größenbestimmungen wurden ein 1 kb- sowie ein 100 bp-Marker aufgetragen. Eine PCR-Reaktion ohne DNA (Leerwert) diente als Kontaminationskontrolle. \*: Wildtyp-Bande mit integriertem Vektorkonstrukt. **B: Überlebenskurven.** In einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve wurden die Anteile der vitalen Zellen in Prozent aufgetragen, nachdem sie gegen die Anzahl der jeweils unbehandelten Kultur normalisiert worden waren (arbiträr 100 %). Die Mittelwerte sowie Standardabweichungen wurden aus Triplikaten berechnet. Die gestrichelte horizontale Linie markiert die LC50 (letale Konzentration für 50 % der Zellen). CDDP: Cisplatin. **C: Zellzyklushistogramme nach DAPI-Färbung.** Die Zellzyklusprofile zeigen die Proportionen der Phasen mit (grau) und ohne (schwarz) MMC-Behandlung. Die Anteile der sich jeweils in der G2-Phase befindlichen Zellen wurden miteinander verglichen.

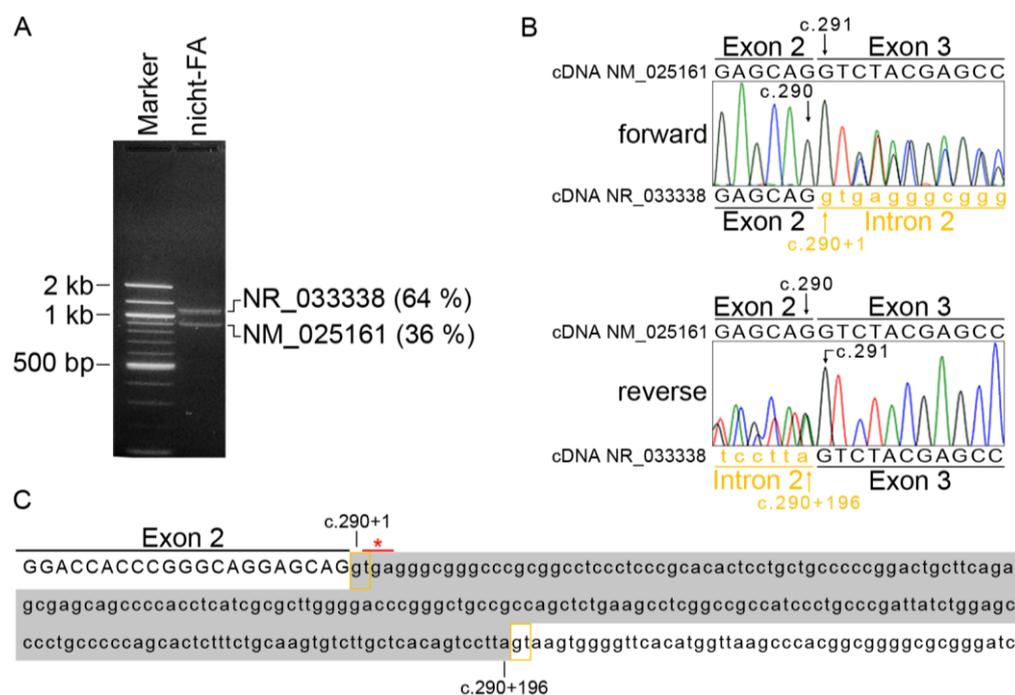
Durch die nachgewiesene Hypersensitivität gegenüber ICL-induzierenden Substanzen kann der zelluläre FA-Phänotyp auch für immortalisierte Faap100<sup>-/-</sup>-MEFs bestätigt werden. Somit sind die murinen Faap100<sup>-/-</sup>-Zellen mit MEFs anderer beschriebener FA-Mäuse sowie mit humanen FA-Zelllinien vergleichbar.

### 4.3 Alternative Spleißvarianten von *FAAP100*

#### 4.3.1 Identifizierung zweier *FAAP100*-Isoformen

Während der Mutationsanalyse der 1176- sowie der generierten *FAAP100*-CRISPR/Cas9-Zelllinien, wurde *FAAP100* auch auf cDNA-Ebene analysiert. Bei allen Untersuchungen wurden nicht-FA-Kontrollzellen mitgeführt. Nachdem *FAAP100*-cDNA-Fragmente amplifiziert worden waren, wurden sie zur Überprüfung ihrer Größe gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für das Fragment entsprechend Exon 1-3 konnten zwei Banden nachgewiesen werden (Abbildung 53A). Zudem waren bereits im Vorfeld der vorliegenden Arbeit (Kuehl 2011) für das Amplifikat entsprechend Exon 4-7 drei Banden detektiert worden (Abbildung 54A). Die Amplifikate wurden einzeln aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt, aber auch direkt analysiert.

Die Sequenzierung der cDNA-PCR-Produkte entsprechend Exon 1-3 ergab, dass es sich bei der kleineren Bande um die Wildtyp-Form des Transkriptes NM\_025161 handelte. Für die größere Bande konnte ausgehend von Transkript NM\_025161 eine Exonisierung von 196 bp des 3'-angrenzenden Intronbereiches (c.290+1\_c.290+196) ermittelt werden (Abbildung 53B und C). Da auf gDNA-Ebene keine Mutation zu finden war, ist der zugrunde liegende Prozess alternatives Spleißen. Datenbankrecherchen (Ensembl, NCBI/RefSeq, UniProt) ergaben, dass dieses Transkript in allen gängigen Verzeichnissen validiert und mit der Bezeichnung NR\_033338 aufgeführt ist (Tabelle 24).



**Abbildung 53: Gebrauch eines alternativen Spleißdonors in *FAAP100* Intron 2. A: PCR-Produkte einer cDNA-Amplifikation entsprechend *FAAP100* Exon 1-3 einer nicht-FA-Kontrolle. Die Fragmente wurden durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Für die Größenbestimmungen wurde ein 100 bp-Marker aufgetragen. Die PCR-Amplifikate, die mit ihrer RefSeq-Identifikationsnummer gekennzeichnet wurden, weisen eine Größe von etwa 1,1 kb (NR\_033338) bzw. 900 bp (NM\_025161) auf. Zusätzlich sind in Klammern die Intensitäten der PCR-Banden angegeben. B: Sanger-Sequenzen der Transkripte. Mithilfe eines *forward*- sowie eines *reverse*-Primers wurden**

die PCR-Amplifikate sequenziert. Durch Analyse der Elektropherogramme konnte der Gebrauch eines alternativen Spleißdonors in Intron 2 bestätigt werden. Ausgehend vom Haupttranskript NM\_025161 werden 196 bp von Intron 2 exonisiert, wodurch das Transkript NR\_033338 entsteht. Die Exonisierung wurde in Orange hervorgehoben. Die angegebenen Positionen (regulär in Schwarz, verändert in Orange) sowie die Intron- und Exonangaben beziehen sich auf Transkript NM\_025161. **C: Alternativ gespleißte Sequenz von FAAP100 Intron 2.** Es ist ein Sequenzausschnitt des Transkriptes NM\_025161 im Bereich von FAAP100 Exon 2 (Großbuchstaben) und Intron 2 (Kleinbuchstaben) dargestellt. Der kanonische sowie der kryptische Spleißdonor sind mit einem orangen Rahmen markiert. Durch Nutzen des kryptischen Spleißdonors kommt es zur Exonisierung von 196 bp (c.290+1\_c290+196, NM\_025161), welche durch eine graue Hintergrundfläche hervorgehoben sind. In der resultierenden mRNA folgt direkt ein Stopcodon, welches durch einen roten Stern markiert ist.

An den Positionen c.290+197 und c.290+198 konnte ausgehend von Transkript NM\_025161, mithilfe verschiedener Vorhersageprogramme ein kryptischer Spleißdonor identifiziert werden (Abbildung 53C), dessen ermittelte Scores in Tabelle 22 zusammengefasst wurden. Anhand dieser Werte werden durch alle Programme beide GT-Dinukleotide als potentielle Spleißdonoren eingestuft. Für die alternativ genutzte 5'-Spleißstelle (NR\_033338) jedoch werden mit Ausnahme des Programmes NNSPLICE etwas niedrigere Werte im Vergleich zu den Scores des kanonischen Spleißdonors (NM\_025161) vorhergesagt. Somit scheint der kryptische Spleißdonor weniger häufig als der kanonische Spleißdonor genutzt zu werden. Dies steht in Diskrepanz zu den ermittelten Intensitäten der PCR-Produkte. Für die Bande des PCR-Produkts von NR\_033338 wurde eine 64%ige Intensität, für die des Amplifikats von NM\_025161 eine 36%ige Intensität ermittelt (Abbildung 53A).

**Tabelle 22: Vorhersage für den Gebrauchs des kanonischen sowie des kryptischen Spleißdonors in FAAP100 Intron 2 für die Entstehung der Transkripte NM\_025161 und NR\_033338.**

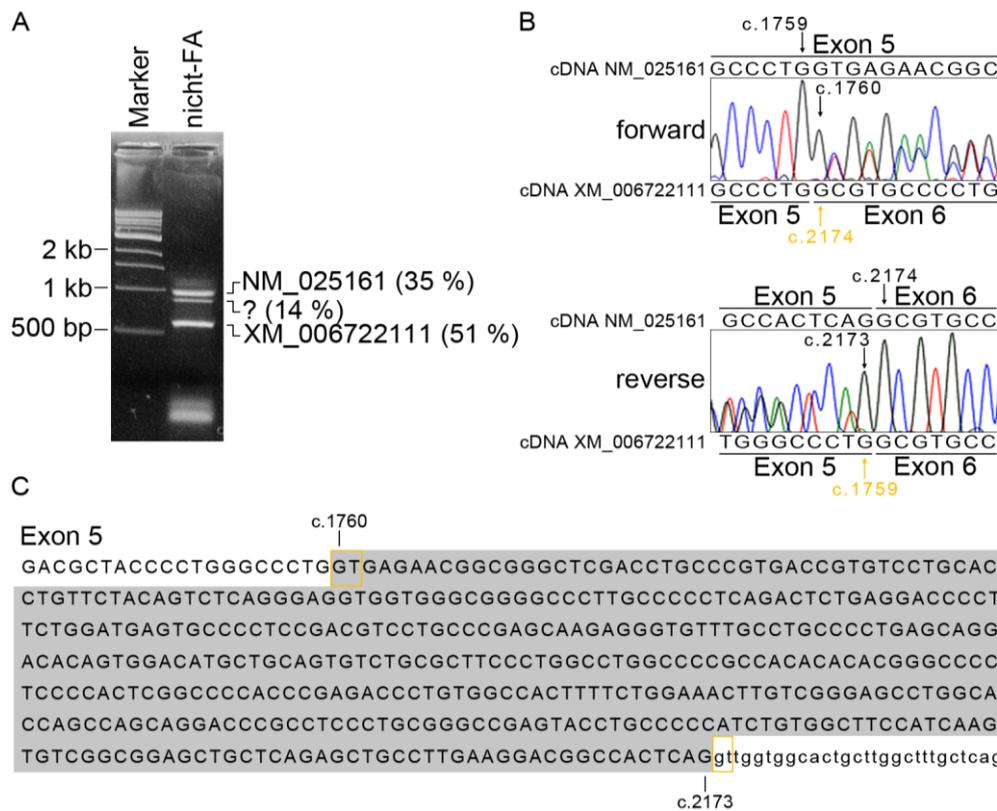
Vorhersageprogramm	Score für NM_025161	Score für NR_033338	Normalwerte bzw. Grenzbereiche*
Human Splicing Finder	96,9	82,7	potentielle Spleißstelle: >68 starke Spleißstelle: >80 möglicher Bereich: 0-100
MaxEntScan	10,1	7,8	potentielle Spleißstelle: >3 möglicher Bereich: 0-12
NNSPLICE	0,9	1,0	Minimum: 0,4 möglicher Bereich: 0-1
Splice Site Score Calculation	10,7	6,3	perfekte Spleißstelle: 12,6 durchschnittlicher Score: 8,1
GeneSplicer	13,6	8,3	möglicher Bereich: 0-15
SpliceSiteFinder-like	90,6	75,2	Minimum: 70 möglicher Bereich: 0-100
H-Bond Score	17,4	14,0	möglicher Bereich: 1,8-23,8

\*: Referenzen: Alamut Visual-Software (mögliche Bereiche, SpliceSiteFinder-like), jeweilige Homepage der Vorhersageprogramme (siehe Abschnitt 2. 14) bzw. für H-Bond Score (Erkelenz et al. 2014, Brillen et al. 2017).

Um eine mögliche Ursache der widersprüchlichen Ergebnisse zu finden, wurden Spleißing-Enhancer- sowie Spleißing-Silencer-Motive betrachtet. Dabei konnten im Bereich des Spleißdonors von NM\_025161 keine Spleißing-Silencer-Motive und im Bereich des Spleißdonors von NR\_033338 keine Spleißing-Enhancer-Motive ausgemacht werden. Somit scheint das

Ergebnis der *in silico*-Analyse überzeugender als das der semi-quantitativen Methode der Intensitätenermittlung. Durch den Gebrauch der alternativen Spleißstelle (NR\_033338) folgt in der mRNA direkt ein Stopcodon, sodass es zum Abbruch der Translation kommt. Falls daraus ein verkürztes Protein synthetisiert werden würde, wäre es nur aus 97 Aminosäuren aufgebaut und hätte ein Molekulargewicht von 10,68 kDa. Durch keinen der vorhandenen  $\alpha$ -FAAP100-Antikörper konnte ein Protein mit entsprechendem Gewicht auf einem Immunblot nachgewiesen werden. In den Datenbanken ist NR\_033338 mit NMD gekennzeichnet. Da folglich aus NR\_033338 kein Protein gebildet wird, wurde das Transkript nicht näher analysiert.

Dem amplifizierten cDNA-Fragment *FAAP100* entsprechend Exon 4-7 (Abbildung 54A) mit einer Größe von etwa 1 kb konnte die Wildtyp-Sequenz des Transkriptes NM\_025161 zugeordnet werden (Abbildung 54B). Für die Bande von etwa 900 bp war es nicht möglich, eine Sequenz zu ermitteln. Die Sequenzanalyse des PCR-Produktes mit ca. 600 bp ergab, dass ein Skipping von 414 Basenpaaren entsprechend des 3'-Bereichs von Exon 5 auftrat (c.1760\_2173del).



**Abbildung 54: Gebrauch eines alternativen Spleißdonors in *FAAP100* Exon 5. A: PCR-Produkte einer cDNA-Amplifikation entsprechend *FAAP100* Exon 4-7 einer nicht-FA-Kontrolle.** Die Fragmente wurden durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Für die Größenbestimmungen wurde ein 1 kb-Marker aufgetragen. Die PCR-Amplifikate, die mit ihrer RefSeq-Identifikationsnummer gekennzeichnet wurden, weisen eine Größe von etwa 1 kb (NM\_025161), 900 bp (?) bzw. 600 bp (XM\_006722111) auf. Für „?“ konnte keine Sequenz ermittelt werden. Zusätzlich sind in Klammern die Intensitäten der PCR-Banden angegeben. Im unteren Bereich des Gelbildes sind Primer-Wolken zu erkennen. **B: Sanger-Sequenzen der Transkripte.** Mithilfe eines *forward*- sowie eines *reverse*-Primers wurden die PCR-Amplifikate sequenziert. Durch Analyse der Elektropherogramme konnte der Gebrauch eines alternativen Spleißdonors in Exon 5 bestätigt werden. Ausgehend vom Haupttranskript NM\_025161 werden 414 bp von Exon 5 zusammen mit Intron 5 herausgespleißt, wodurch das Transkript XM\_006722111 entsteht. Die angegebenen Positionen (regulär in Schwarz, verändert in Orange) sowie die Exonangaben beziehen sich auf

Transkript NM\_025161. **C: Alternativ gespleißte Sequenz von *FAAP100* Exon 5.** Es ist ein Sequenzausschnitt des Transkriptes NM\_025161 im Bereich von *FAAP100* Exon 5 (Großbuchstaben) und Intron 5 (Kleinbuchstaben) dargestellt. Der kanonische sowie der kryptische Spleißdonor sind mit einem orangen Rahmen markiert. Durch Nutzen des kryptischen Spleißdonors kommt es zum Skipping von 414 bp (c.1760\_2173del, NM\_025161), welche durch eine graue Hintergrundfläche hervorgehoben sind.

Da auch hier keine potenziell verantwortliche Veränderung auf gDNA-Ebene (Spleißmutation) nachzuweisen war, muss ebenfalls von alternativem Spleißen ausgegangen werden. Eine *FAAP100*-Isoform mit partiellem Skipping von Exon 5 ist in den Datenbanken nicht beschrieben (Tabelle 24). Eine Ausnahme davon stellt die NCBI/RefSeq-Datenbank dar, in der das Transkript mit der Referenz XM\_006722111 bzw. das daraus translatierte Protein mit XP\_006722174 verzeichnet ist. Bei dem Transkript handelt es sich allerdings lediglich um ein bioinformatisch errechnetes Modell, welches experimentell bisher noch nicht nachgewiesen worden war. Die Untersuchung ergab, dass sich an den Positionen c.1760 und c.1761 des Transkriptes NM\_025161 ein kryptischer Spleißdonor mit kanonischem GT-Dinukleotid befindet, der alternativ für den Spleißprozess genutzt werden kann (Abbildung 54C). *In silico*-Spleiß-Scoreanalysen sind in Tabelle 23 aufgeführt. Beide GT-Dinukleotide werden folglich als potentielle Spleißdonoren eingestuft. Fünf der sechs verwendeten Programme sagen vorher, dass die 5'-Spleißstelle des Transkriptes XM\_006722111 mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für den Spleißprozess genutzt wird als der Spleißdonor des Transkriptes NM\_025161. Dies stimmt mit dem Ergebnis der Quantifizierung der PCR-Amplifikate überein, bei der für NM\_025161 eine Intensität von 35 %, für XM\_006722111 eine Intensität von 51 % ermittelt wurde (Abbildung 54A).

**Tabelle 23: Vorhersage für den Gebrauchs des kanonischen sowie des kryptischen Spleißdonors in *FAAP100* Intron 5 bzw. Exon 5 für die Entstehung der Transkripte NM\_025161 und XM\_006722111.**

Vorhersageprogramm	Score für NM_025161	Score für XM_006722111	Normalwerte bzw. Grenzbereiche*
Human Splicing Finder	86,6	91,8	potentielle Spleißstelle: >68 starke Spleißstelle: >80 möglicher Bereich: 0-100
MaxEntScan	8,1	7,5	potentielle Spleißstelle: >3 möglicher Bereich: 0-12
NNSPLICE	0,6	1,0	Minimum: 0,4 möglicher Bereich: 0-1
Splice Site Score Calculation	5,0	8,8	perfekte Spleißstelle: 12,6 durchschnittlicher Score: 8,1
GeneSplicer	5,1	9,4	möglicher Bereich: 0-15
SpliceSiteFinder-like	80,0	81,8	Minimum: 70 möglicher Bereich: 0-100
H-Bond Score	13,4	14,0	möglicher Bereich: 1,8-23,8

\*: Referenzen: Alamut Visual-Software (mögliche Bereiche, SpliceSiteFinder-like), jeweilige Homepage der Vorhersageprogramme (siehe Abschnitt 2. 14) bzw. für H-Bond Score (Erkelenz et al. 2014, Brillen et al. 2017).

Auf Proteinebene würde das alternative Spleißen zu einer In-frame-Deletion von 138 Aminosäuren führen (p.(E588\_G725del), NP\_079437). So könnte ein möglicherweise funktionelles Protein (XP\_006722174) mit einem Molekulargewicht von etwa 78,93 kDa exprimiert werden.

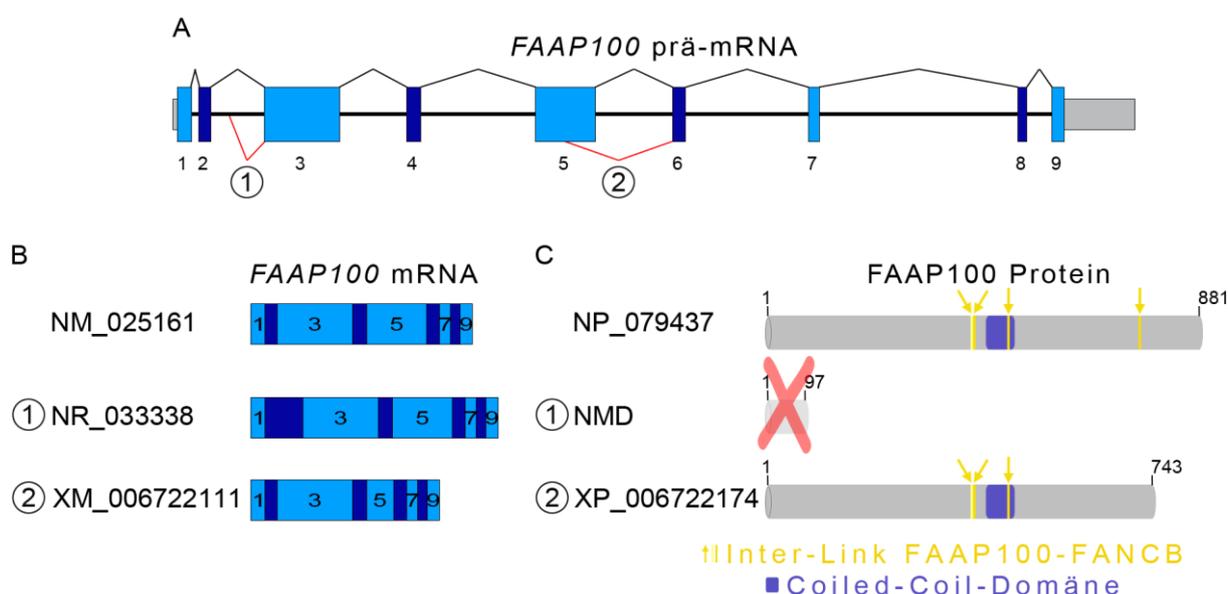
Die Gesamtergebnisse der Datenbankrecherchen sind in Tabelle 24 aufgelistet. Das Transkript NM\_025161 stellt die Hauptisoform von *FAAP100* dar, die neun Exons repräsentiert. Darüber hinaus sind weitere Isoformen verzeichnet, von denen allerdings nur NR\_033338, welches ebenfalls in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, validiert ist. Bei den nicht-gesicherten Isoformen handelt es sich um Annotationen, die bioinformatisch generiert wurden. Diese „Modell-Transkripte“ werden bei NCBI/RefSeq mit XM\_ bzw. XR\_ gekennzeichnet, wohingegen validierte Isoformen als NM\_ bzw. NR\_ bezeichnet werden. „M“ beschreibt dabei eine mRNA, „R“ eine nicht-codierende RNA. Entsprechende Proteine werden folglich mit NP\_ bzw. XP\_ benannt.

**Tabelle 24: In den Datenbanken verzeichnete FAAP100-Isoformen.**

FAAP100-Transkript- bzw. Translations-ID der Datenbanken			Proteinlänge [aa]	Proteingewicht [kDa]*	Gen-Typ
Ensembl	NCBI/RefSeq	UniProt			
ENST00000327787.12 ENSP00000333283	NM_025161.5 NP_079437.5	Q0VG06	881	93,45	codierend
ENST00000425898.2 ENSP00000399674	--	E7EVV8	530 (352_881)	56,66	codierend
ENST00000541246.1 ENSP00000438149	--	F5H095	300 (152_451)	31,09	codierend
ENST00000544302.1 ENSP00000444241	--	F5GZS4	249 (152_400)	25,83	codierend
ENST00000536161.1 ENSP00000443415	--	F5H5G6	172 (61_232)	18,05	codierend
ENST00000443656.6 ENSP00000395348	NR_033338.1	J3KQD8	97 (1_97)	10,68	NMD
ENST00000545865.1 ENSP00000459776	--	I3L2L9	110 (627_736)	11,75	NMD
--	--	A4ZI32	881 (1-881)	93,36	codierend
--	--	A0A024R8W1	730 (152_881)	77,05	codierend
--	--	B3KNQ3	530 (352_881)	56,6	codierend
--	XM_006722111.2 XP_006722174.1	--	743 (1_586 & 725_881)	78,93	codierend
--	XM_006722112.3 XP_006722175.1	--	730 (152_881)	77,06	codierend
--	XM_017025163.1 XP_016880652.1	--	730 (152_881)	77,06	codierend
--	XM_017025162.1 XP_016880651.1	--	730 (152_881)	77,06	codierend
--	XR_001752653.1	--	--	--	misc_RNA

hellgrau hinterlegte Einträge: validierte Transkripte bzw. Proteine; ohne Hintergrundfarbe: bioinformatisch erzeugte Transkripte bzw. Proteine; aa: Aminosäuren; kDa: Kilodalton; \*: durch das Programm *Protein Molecular Weight* ermitteltes mögliches Molekulargewicht der FAAP100-Proteine, falls diese stabil wären und kein NMD stattfinden würde; codierend: Protein codierend; misc (*miscellaneous*)-RNA: Transkript oder RNA-Produkt, das nicht als ein bekannter RNA-Typ definiert werden kann; für die Ensembl- bzw. NCBI/RefSeq-ID ist jeweils die verwendete Version hinter dem Punkt angegeben; die in der Spalte „Proteinlänge“ in Klammern gesetzten Zahlen kennzeichnen die Start- sowie End-Aminosäurepositionen der jeweiligen Proteine bezogen auf die FAAP100-Hauptproteininform NP\_079437. Verändert nach ensembl.org.

Eine Gegenüberstellung der in dieser Arbeit verifizierten alternativen Transkripte zeigt Abbildung 55. Ausgehend von der *FAAP100* prä-mRNA (Abbildung 55A) werden durch unterschiedliche Spleißvorgänge verschiedene reife *FAAP100* mRNAs generiert (Abbildung 55B). Das Transkript NR\_033338 wird wahrscheinlich durch NMD abgebaut, NM\_025161 sowie vermutlich auch XM\_006722111 werden in funktionelle Proteine translatiert (Abbildung 55C). Diese Proteine NP\_079437 und XP\_006722174 weisen Unterschiede in ihrer Länge auf, was sich auf die Anzahl der vorhandenen Inter-Links zwischen FAAP100 und FANCB auswirkt (Swuec et al. 2017). So sind in XP\_006722174 nur drei statt vier Inter-Links vorhanden. Ob es sich bei XP\_006722174 tatsächlich um ein funktionelles Protein handelt und welche Auswirkungen die Proteinverkürzung bezüglich der DNA-Schadensreparatur hat, wird in den weiteren Abschnitten dieser Arbeit analysiert. Dabei wird das bisher unbeschriebene Protein XP\_006722174 im Folgenden als FAAP100<sup>Δ138</sup> bezeichnet.

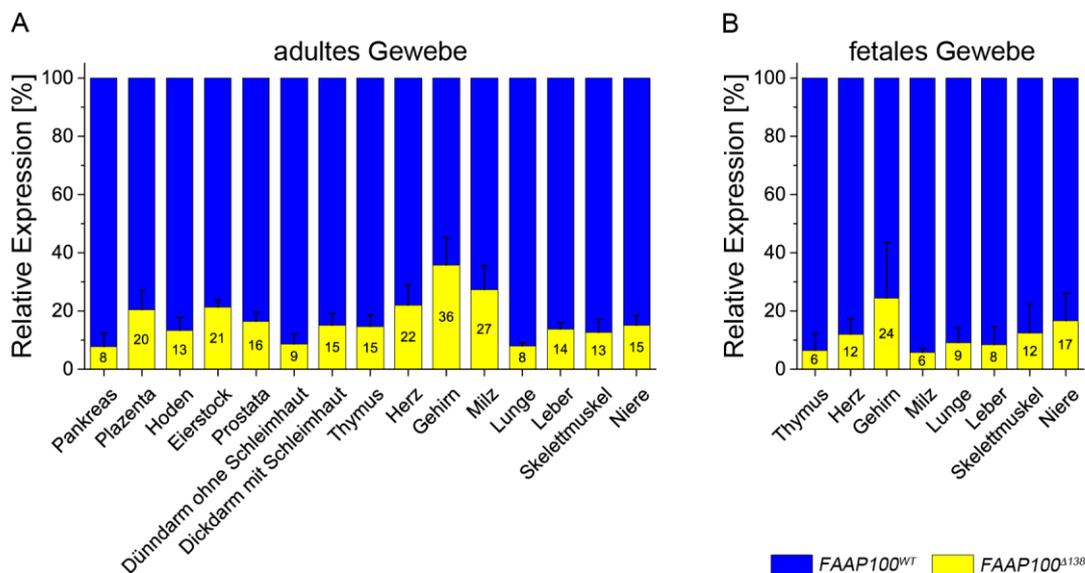


**Abbildung 55: Vergleich der identifizierten FAAP100-Transkripte. A: Reguläres und alternatives Spleißen der FAAP100 prä-mRNA.** Die UTR (grau) sowie die Exons 1-9 (hell- und dunkelblau) der FAAP100 prä-mRNA (schwarze horizontale Linie) wurden als Vierecke dargestellt. In schwarzen Zacken wurde das Spleißmuster der Hauptisoform NM\_025161, in roten Zacken das der in dieser Arbeit ebenfalls identifizierten Transkripte NR\_033338 (1) sowie XM\_006722111 (2) gekennzeichnet. **B: Durch alternatives Spleißen entstandene reife FAAP100 mRNAs.** Sie wurden mit ihrer jeweiligen Transkript-Identifikationsnummer, auf die im Fließtext genauer eingegangen wird, gekennzeichnet. Nur die ungeraden Exons (1-9, hellblau) wurden mit Ziffern benannt. Gerade Exons sind in dunkelblau markiert. Auf die Darstellung der UTRs wurde der Übersicht halber verzichtet. **C: Aus den mRNAs translatierte FAAP100-Proteine.** Die Transkripte NM\_025161 bzw. XM\_006722111 codieren für die Proteine NP\_079437 bzw. XP\_006722174 (NCBI/RefSeq-Datenbank). Das Transkript NR\_033338 (1) wird durch NMD (*Nonsense-mediated mRNA Decay*) abgebaut (NCBI/RefSeq-Datenbank), sodass kein Protein gebildet wird (rotes X). Es sind die Anzahl der Aminosäuren sowie die Coiled-Coil-Domäne (lila) und die Inter-Links (gelb) für eine Interaktion mit FANCB in den jeweiligen FAAP100-Proteinen (grau) angegeben (Ling et al. 2007, Swuec et al. 2017).

#### 4. 3. 2 Expressionsanalyse von FAAP100<sup>Δ138</sup> mittels qPCR

Die Analyse der alternativen Spleißstelle in Exon 5 von *FAAP100* durch verschiedene Vorhersageprogramme hatte ergeben, dass der kryptische Spleißdonor mit etwas höheren Scores genutzt zu werden scheint als der kanonische (Tabelle 23). Die Quantifizierung der PCR-Produkte zeigte ein

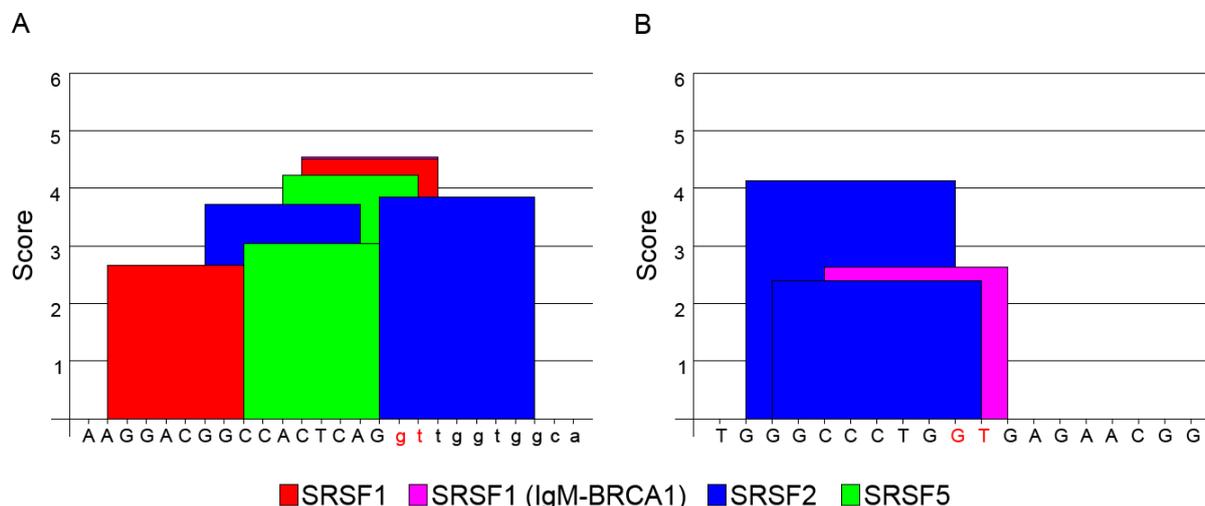
ähnliches Ergebnis. Um zu überprüfen, ob demnach das *FAAP100<sup>Δ138</sup>*-Transkript (XM\_006722111) stärker exprimiert wird als das *FAAP100<sup>WT</sup>*-Transkript (NM\_025161), wurde eine quantitative Real-Time PCR (qPCR) durchgeführt. Anhand eines kommerziellen cDNA-Panels wurde in 15 adulten sowie in acht fetalen Gewebeprobe die Expressionsstärke von *FAAP100<sup>Δ138</sup>* im Vergleich zu *FAAP100<sup>WT</sup>* untersucht. Das Experiment wurde in jeweils drei unabhängigen qPCR-Läufen durchgeführt, wobei jede Probe in Triplikaten analysiert wurde. Für die Auswertung wurden die ermittelten Werte der relativen Expression in Prozent dargestellt. Es zeigt sich, dass *FAAP100<sup>Δ138</sup>* in einer Stärke von 6-36 % im Vergleich zu *FAAP100<sup>WT</sup>* exprimiert wird. Für *FAAP100<sup>Δ138</sup>* wurde in adultem Gewebe (8-36 % Expression) die stärkste Abundanz im Gehirn gemessen. Die geringste Expressionsmenge dieses Transkriptes war sowohl in der Bauchspeicheldrüse als auch in der Lunge zu verzeichnen. Im fetalen Gewebe lag die *FAAP100<sup>Δ138</sup>*-Expression bei 6-24 % von *FAAP100<sup>WT</sup>*, wobei hier der geringste Wert im Milz- sowie im Thymusgewebe und der höchste Wert ebenfalls für das Gehirngewebe gemessen wurde.



**Abbildung 56: Relative Expressionsanalyse von Transkript *FAAP100<sup>Δ138</sup>*. Ergebnisse der qPCR von verschiedenen adulten (A) sowie von fetalen Gewebeprobe (B). Im Vergleich zu der relativen Expression von *FAAP100<sup>WT</sup>* (blau) wurde die relative Expression von *FAAP100<sup>Δ138</sup>* (gelb) ermittelt. Die Werte sind Prozent dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet, wobei jede Probe in Triplikaten analysiert worden war.**

So zeigt sich im Gesamtbild der Expressionsanalyse, dass zwar Schwankungen innerhalb der einzelnen Gewebeprobe sowohl im adulten als auch im fetalen Gewebe vorhanden sind, *FAAP100<sup>Δ138</sup>* aber generell weniger stark exprimiert wird als *FAAP100<sup>WT</sup>*. Somit wurden die Ergebnisse der Quantifizierung und der Score-Vorhersagen widerlegt. Dies ist vermutlich auf die Aktivität von Serin-Arginin-reiche Spleißfaktoren (SRSF) zurückzuführen, die an exonische Spleiß-Enhancer-Motive (ESE) binden können. Durch das Programm ESEfinder wurden die ESE-Motive der Transkripte *FAAP100<sup>Δ138</sup>* und *FAAP100<sup>WT</sup>* im Bereich der unterschiedlich genutzten Spleißstellen verglichen. Für *FAAP100<sup>WT</sup>* (Abbildung 57A) konnten vier ESE-Motive mehr, meist

auch mit höheren Scores, als für *FAAP100*<sup>Δ138</sup> (Abbildung 57B) ermittelt werden. So können im Vergleich zu *FAAP100*<sup>Δ138</sup> mehr Spleißfaktoren bei *FAAP100*<sup>WT</sup> binden, wodurch die Ausbildung des Spleißosoms gefördert und so der Spleißprozess verstärkt wird (Stamm et al. 2005). Dies wäre eine mögliche Ursache für die höhere Expression von *FAAP100*<sup>WT</sup> gegenüber *FAAP100*<sup>Δ138</sup>.



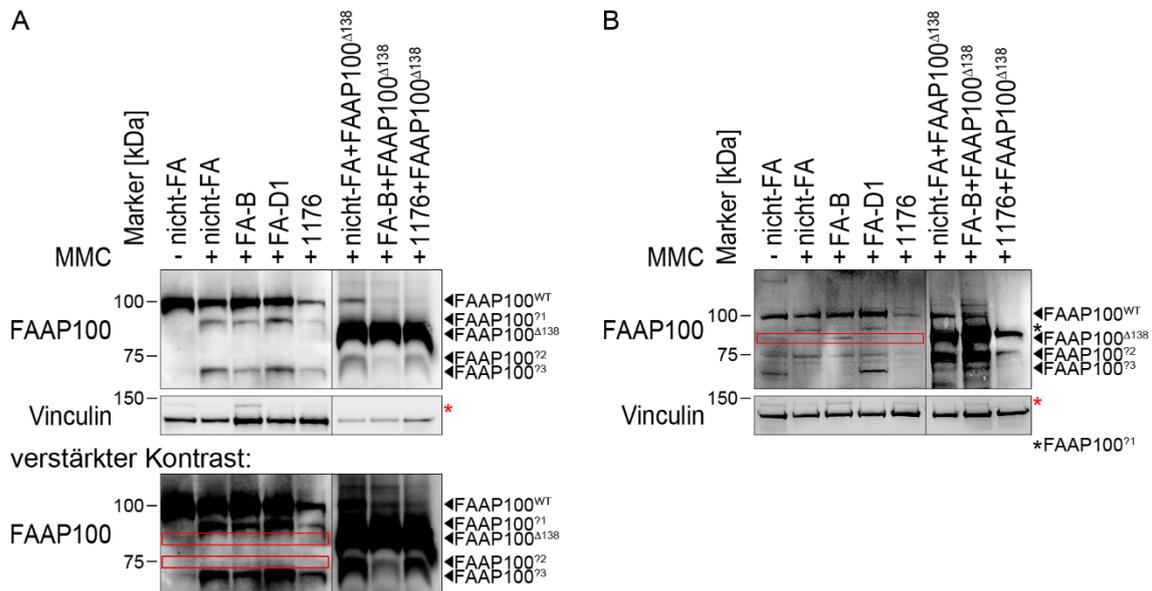
**Abbildung 57: Identifizierung exonischer Spleiß-Enhancer-Motive bei *FAAP100*<sup>WT</sup> (A) und *FAAP100*<sup>Δ138</sup> (B).** Durch das Programm ESEfinder wurden im Bereich des jeweiligen Spleißdonors von *FAAP100* Exon bzw. Intron 5 die exonischen Spleiß-Enhancer (ESE)-Motive mit ihren jeweiligen Scores für die Transkripte *FAAP100*<sup>WT</sup> und *FAAP100*<sup>Δ138</sup> ermittelt. Sie sind nach dem jeweilig bindenden Serin-Arginin-reichen Spleißfaktor (SRSF) in Rot, Pink, Blau bzw. Grün markiert. Es ist jeweils die Sequenz (Exon in Großbuchstaben, Intron in Kleinbuchstaben, bezogen auf NM\_025161) angegeben. Die GT-Dinukleotide der Spleißdonoren sind in roter Schrift hervorgehoben.

### 4. 3. 3 Proteinanalytische Untersuchungen von *FAAP100*<sup>Δ138</sup>

Nach der Expressionsanalyse wurde untersucht, ob *FAAP100*<sup>Δ138</sup>-Protein translatiert werden kann. Auf Immunblots wurden Proteinlysate parentaler Zellen sowie Proteinlysate von Zellen aufgetragen, die für eine Komplementationsanalyse mit *FAAP100*<sup>Δ138</sup> transduziert worden waren. Die Ergebnisse der Komplementationsstudien werden im nachfolgenden Abschnitt 4. 3. 4 beschrieben. Um einen Nachweis einer natürlichen *FAAP100*<sup>Δ138</sup>-Expression zu erbringen, wurden insgesamt acht kommerziell erworbene Antikörper, die gegen humanes *FAAP100* gerichtet waren, getestet. Zwei dieser Immunblots sind in Abbildung 58 dargestellt. Durch eine längere Laufzeit der SDS-Polyakrylamid-Gele wurde eine bessere Auftrennung unterschiedlich großer Proteine erreicht, sodass auf den Immunblots mehr Banden sichtbar wurden.

Durch den α-*FAAP100*-Antikörper ab181185 konnte für alle aufgetragenen Proteinlysate *FAAP100*<sup>WT</sup> mit einem Gewicht von etwa 100 kDa detektiert werden (Abbildung 58A). *FAAP100*<sup>Δ138</sup> mit einem Gewicht von etwa 79 kDa hingegen war bei normaler Exposition des Immunblots nur für die mit *FAAP100*<sup>Δ138</sup> transduzierten Zelllinien nachweisbar. Des Weiteren wurden bei allen Proteinlysaten eine *FAAP100*-Bande entsprechend einem Gewicht von etwa 82 kDa (*FAAP100*<sup>21</sup>), bei den Lysaten der mit *FAAP100*<sup>Δ138</sup> transduzierten Zelllinien eine *FAAP100*-Proteinbande entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 75 kDa (*FAAP100*<sup>22</sup>) und bei den Proteinlysaten aller nicht-transduzierten Zelllinien eine *FAAP100*-Bande entsprechend

einem Gewicht von etwa 70 kDa (FAAP100<sup>23</sup>) sichtbar. Verstärkte man im Nachhinein manuell den Kontrast der Immunblotaufnahme, konnte man eine sehr schwache FAAP100<sup>Δ138</sup>- sowie FAAP100<sup>22</sup>-Bande auch bei nicht-transduzierten Zelllinien erkennen.



**Abbildung 58: Nachweis verschiedener FAAP100-Isoformen durch Immunblots.** Mit Proteinlysaten transformierter parentaler Zelllinien sowie mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduzierter Zelllinien wurden Immunblots angefertigt. Für beide Immunblots diente Vinculin als Ladungskontrolle. FAAP100<sup>21-3</sup> weist auf Proteine hin, für die noch keine FAAP100-Isoformen identifiziert werden konnten. Roter \*: unspezifische Vinculin-Banden, kDa: Kilodalton. **A: FAAP100-Detektion durch Antikörper ab181185.** Insgesamt konnte ab181185 fünf FAAP100-Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht detektieren. Wurde der Kontrast verstärkt, waren diese Banden mit Ausnahme von FAAP100<sup>23</sup> sowohl bei den mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduzierten als auch bei den nicht-transduzierten Zelllinien nachweisbar. Mit einem roten Rahmen wurden FAAP100<sup>Δ138</sup> und FAAP100<sup>22</sup> hervorgehoben, die erst nach der Kontrastverstärkung durch ab181185 detektiert werden konnten. **B: FAAP100-Detektion durch Antikörper NBP1-90469.** Durch NBP1-90469 konnten für fast alle Zelllinien die gleichen FAAP100-Proteine wie durch ab181185 detektiert werden. Die Expression von FAAP100<sup>Δ138</sup> ließ sich auch bei Zelllinien ohne vorherige Transduktion mit FAAP100<sup>Δ138</sup> nachweisen (roter Rahmen). Schwarzer \*: FAAP100<sup>21</sup>.

Mithilfe des Antikörpers NBP1-90469 waren FAAP100<sup>WT</sup>, FAAP100<sup>21</sup>, FAAP100<sup>Δ138</sup>, FAAP100<sup>22</sup> sowie FAAP100<sup>23</sup> sowohl bei transduzierten als auch bei nicht-transduzierten Zelllinien nachweisbar (Abbildung 58B). Obwohl FAAP100<sup>Δ138</sup> nicht bei allen Zelllinien detektiert werden konnte, wurde durch den Antikörper NBP1-90469 die natürliche Expression von FAAP100<sup>Δ138</sup> bestätigt. Da beide Antikörper durch die FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien validiert worden waren (Abschnitt 4. 1. 6, Abbildung 22A), konnten Kreuzreaktionen der Antikörper ausgeschlossen werden. Demnach ist bewiesen, dass FAAP100<sup>Δ138</sup> translatiert wird und in nativer Form nachgewiesen werden kann.

Eine Zusammenfassung der Detektion der verschiedenen FAAP100-Banden durch die acht verwendeten Antikörper ist in Tabelle 25 dargestellt. Es wurden jeweils Protein-Banden mit Molekulargewichten in einem Bereich von 65-100 kDa ausgewertet. So konnte von zwei Antikörpern (ab80193, NBP1-90468) kein FAAP100<sup>WT</sup> mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa detektiert werden. FAAP100<sup>Δ138</sup> hingegen wurde nur durch zwei Antikörper (NBP1-

90469, ab181185) erkannt. Durch fast alle Antikörper ließ sich FAAP100<sup>21</sup> (etwa 82 kDa), durch fünf Antikörper FAAP100<sup>22</sup> (etwa 75 kDa) und durch alle Antikörper FAAP100<sup>23</sup> (etwa 70 kDa) nachweisen. Die Antikörper ab181185 und NBP1-90469 waren mithilfe der FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien erfolgreich validiert worden, wohingegen ab155209 nicht erfolgreich validiert werden konnte. Für alle anderen Antikörper steht eine Validierung noch aus. Nichtsdestotrotz könnte es sich aufgrund der Ergebnisse der beiden validierten Antikörper bei FAAP100<sup>21-3</sup> um weitere FAAP100-Proteinisoformen handeln. So ließe sich die Proteinbande FAAP100<sup>22</sup> (etwa 75 kDa) den in den Datenbanken hinterlegten Proteinen A0A024R8W1, XP\_006722175, XP\_016880652 sowie XP\_016880651 zuordnen (Abschnitt 4.3.1, Tabelle 24). Für diese Protein-Isoformen wird jeweils ein Molekulargewicht von 77,06 kDa vorhergesagt, was dem geschätzten Gewicht von FAAP100<sup>22</sup> (ca. 75 kDa) sehr nahekommt. Weder FAAP100<sup>21</sup> noch FAAP100<sup>23</sup> konnten anhand ihres jeweiligen Molekulargewichts einer weiteren hinterlegten Protein-Isoform zugeordnet werden. So wäre es möglich, dass FAAP100<sup>21</sup> und/oder FAAP100<sup>23</sup> bisher nicht identifizierte FAAP100-Isoformen darstellen. Allerdings könnten FAAP100<sup>21</sup>, FAAP100<sup>22</sup> sowie FAAP100<sup>23</sup> auch Degradationsprodukte von FAAP100<sup>WT</sup> sein.

**Tabelle 25: Detektion von mehreren FAAP100-Banden (FAAP100<sup>WT</sup>, FAAP100<sup>21</sup>, FAAP100<sup>22</sup>, FAAP100<sup>Δ138</sup> und FAAP100<sup>23</sup>) mit unterschiedlichen Molekulargewichten auf Immunblots durch verschiedene Antikörper.**

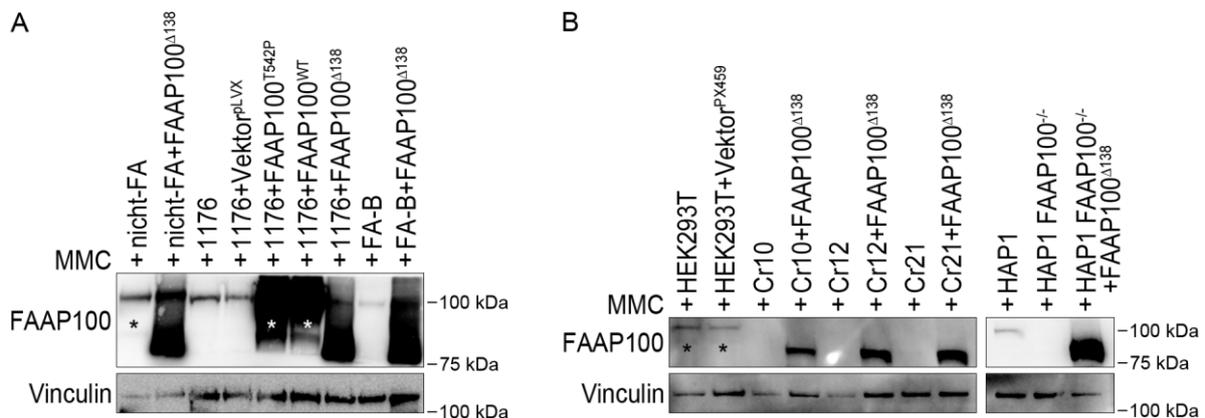
Antikörper-ID	Detektion von:				
	FAAP100 <sup>WT</sup> (ca. 100 kDa)	FAAP100 <sup>21</sup> (ca. 82 kDa)	FAAP100 <sup>Δ138</sup> (ca. 79 kDa)	FAAP100 <sup>22</sup> (ca. 75 kDa)	FAAP100 <sup>23</sup> (ca. 70 kDa)
ab155209	x	x	–	–	x
ab181185	x	x	x*	x*	x
ab80193	–	?	?	x	x
abx124104	x	x	–	–	x
STJ111323	x	x	–	–	x
NBP1-90469	x	x	x	x	x
NBP1-90468	–	?	?	x	x
orb183769	x	–	–	x	x

kDa: Kilodalton, x: FAAP100-Bande konnte detektiert werden, –: keine FAAP100-Bande konnte detektiert werden, ?: es konnte nicht eindeutig zwischen FAAP100<sup>21</sup> und FAAP100<sup>Δ138</sup> unterschieden werden, x\*: erst nach Kontrastverstärkung konnte die FAAP100-Bande detektiert werden.

#### 4.3.4 FAAP100<sup>Δ138</sup>-Komplementationsstudien an FAAP100-defizienten Zelllinien

Um die Funktion von FAAP100<sup>Δ138</sup>, zumindest innerhalb des FA-Signalwegs, zu untersuchen, wurde versucht, FAAP100-defiziente Zelllinien mit FAAP100<sup>Δ138</sup> zu komplementieren. Hierfür wurde *FAAP100<sup>Δ138</sup>*-cDNA in den lentiviralen Expressionsvektor pLVX-EF1α-IRES-Puro kloniert und anschließend die FAAP100-defizienten Zelllinien 1176, Cr10, Cr12, Cr21 und HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> sowie eine nicht-FA- und FA-B- Kontrollzelllinie damit transduziert. Der Einbau der *FAAP100<sup>Δ138</sup>*-cDNA in das Genom dieser Zelllinien wurde per Sanger-Sequenzierung (Daten nicht gezeigt) sowie durch Immunblotanalysen bestätigt.

Diese zeigten, dass bei den aufgetragenen Proteinlysaten der mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduzierten Zelllinien eine sehr starke FAAP100<sup>Δ138</sup>-Bande entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 79 kDa nachgewiesen werden konnte (Abbildung 59A und B). Zudem wurde für alle Zelllinien in Abbildung 59A FAAP100<sup>WT</sup> bzw. FAAP100<sup>T542P</sup> (beide ca. 100 kDa) detektiert. Für das Proteinlysate der Zelllinie nicht-FA wurde sehr schwach, für die Lysate der Zelllinien 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> und 1176+FAAP100<sup>WT</sup> wurde in größerer Menge jeweils eine FAAP100<sup>21</sup>-Bande entsprechend einem Gewicht von etwa 82 kDa sichtbar. Eine starke Überexpression der FAAP100-Proteine mit einem Gewicht von etwa 100 kDa konnte bei den mit FAAP100<sup>WT</sup> bzw. FAAP100<sup>T542P</sup> transduzierten 1176-Zelllinien beobachtet werden.



**Abbildung 59: Nachweis der FAAP100<sup>Δ138</sup>-Transduktion.** FAAP100-Immunblots der mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduzierten Fibroblasten- bzw. Amnionzelllinien (A) sowie der CRISPR/Cas9-Zelllinien (B). Mit den Proteinlysaten der Fibroblasten- und Amnionzelllinien sowie der Zelllinien HEK293T bzw. HAP1 wurde je ein FAAP100-Immunblot angefertigt. FAAP100<sup>Δ138</sup> (etwa 79 kDa) konnte nur bei den mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduzierten Zelllinien als überexprimierte Proteinbanden detektiert werden. Eine Überexpression von FAAP100<sup>WT</sup> bzw. FAAP100<sup>T542P</sup> (beide ca. 100 kDa) war bei den Lysaten der Zelllinien 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> bzw. 1176+FAAP100<sup>WT</sup> zu beobachten. Für diese Zelllinien sowie für nicht-FA, HEK293T und HEK293T+Vektor<sup>PX459</sup> konnte zudem FAAP100<sup>21</sup> (\*) detektiert werden. Für alle hier dargestellten Immunblots diente Vinculin als Ladungskontrolle. kDa: Kilodalton.

Bei den mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduzierten CRISPR/Cas9-Zelllinien (Abbildung 59B) fiel die Überexpression von FAAP100<sup>Δ138</sup> (etwa 79 kDa) im Vergleich zu der auf dem Immunblot in Abbildung 59A weniger stark aus. Gegenüber der FAAP100<sup>WT</sup>-Menge (ca. 100 kDa) der Kontrollzelllinien HEK293T, HEK293T+Vektor<sup>PX459</sup> sowie HAP1 war jedoch deutlich vermehrtes FAAP100<sup>Δ138</sup> nachweisbar. Aufgrund der insgesamt schwächeren Exposition dieses Immunblots konnte dementsprechend für Cr12 kein reduziertes FAAP100 mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa detektiert werden.

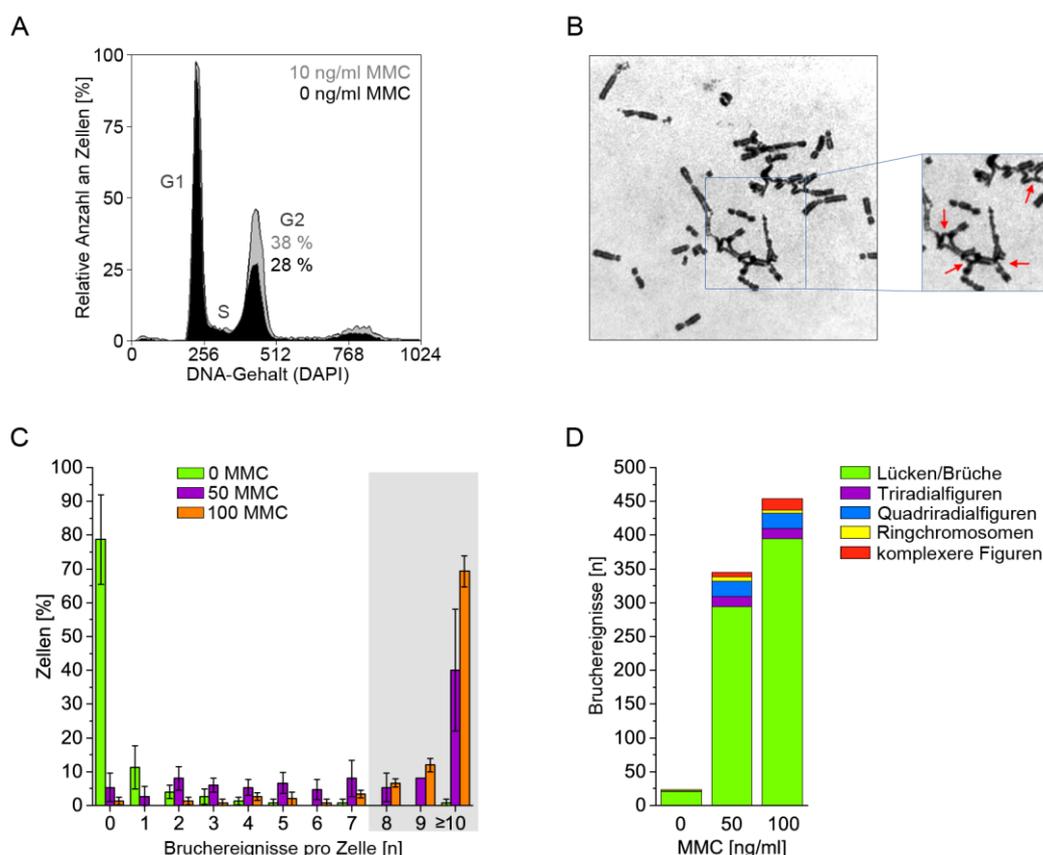
Durch die Detektion von überexprimiertem FAAP100<sup>Δ138</sup> ist eine erfolgreiche FAAP100<sup>Δ138</sup>-Transduktion bestätigt.

#### 4. 3. 4. 1 Zellzyklus- und Chromosomenbruchanalyse

Ein G2-Phase-Arrest im Zellzyklus sowie vermehrte Chromosomenbrüchigkeit sind typische Kennzeichen des zellulären FA-Phänotyps. Daher wurde durch eine Zellzyklus- und

Chromosomenbruchanalyse untersucht, ob FAAP100-defiziente Zelllinien durch FAAP100<sup>Δ138</sup> komplementiert werden können.

Nachdem FAAP100<sup>Δ138</sup> in die transformierte Amnionzelllinie 1176 eingebracht worden war, erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse des G2-Phase-Kompartiments im Zellzyklus (Abbildung 60A). In diesem waren 28 % (ohne MMC-Behandlung) bzw. 38 % (mit 10 ng/ml MMC-Behandlung) der Zellen der Linie 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> arretiert. Dieses Ergebnis steht in Analogie zur durchflusszytometrischen Messung der transformierten 1176-Amnionzellen, von denen sich 33 % bzw. 46 % in der G2-Phase befanden (Abschnitt 4. 1. 7. 2, Abbildung 25).



**Abbildung 60: Aspekte des zellulären FA-Phänotyps der Zelllinie 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup>.** **A: Zellzyklus-histogramme nach DAPI-Färbung.** Die Zellzyklusprofile zeigen die Proportionen der Phasen mit (grau) und ohne (schwarz) MMC-Behandlung. Der Anteil der sich jeweils in der G2-Phase befindlichen Zellen wurde miteinander verglichen. **B: Mikrofotografie einer Metaphase.** Die entsprechende Kultur der dargestellten Metaphase war mit 100 ng/ml MMC für 48 h inkubiert worden. Brüche und Radialfiguren sind durch rote Pfeile markiert. Die Originalmikrofotografie wurde mit einem 100x Objektiv aufgenommen. **C: Anteil der Zellen in Prozent klassifiziert nach Bruchereignissen pro Zelle.** Zellen, die unbehandelt geblieben waren, sind grün, Zellen, die für 48 h 50 ng/ml MMC bzw. 100 ng/ml MMC exponiert wurden, sind lila bzw. orange markiert. Eine graue Hintergrundfläche hebt die veränderten Bruchverteilungen hervor, die typisch für einen zellulären FA-Phänotyp sind. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit ihren Standardabweichungen angegeben. **D: Anzahl der Chromosomenbruchereignisse sowie der Chromosomenbrucharten in Abhängigkeit von der MMC-Konzentration.** Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Werte wurden nach Art des entsprechenden Bruchereignisses bzw. Rearrangements (Lücken/Brüche in Grün, Triradial- und Quadriradialfiguren in Lila bzw. Blau, Ringchromosomen in Gelb und komplexere Figuren in Rot) aufgedgliedert.

Auch die Untersuchung der Linie 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> hinsichtlich ihrer Chromosomenbrüchigkeit ergab ein ähnliches Ergebnis wie das der Linie 1176 (Abschnitt 4. 1. 7. 3, Abbildung 27 und Abbildung 28). Mit steigender MMC-Konzentration erhöhte sich sowohl der Anteil der Brüche pro Metaphase (Abbildung 60C) als auch die Gesamtzahl der Bruchereignisse bezogen auf die eingesetzte MMC-Konzentration (Abbildung 60D). Wiesen 79 % der unbehandelten Zellen keine Brüche auf, so konnten nach Behandlung mit 50 ng/ml bzw. 100 ng/ml MMC für 40 % bzw. 69 % der Metaphasen zehn oder mehr Bruchereignisse ermittelt werden. Ebenso wurden ohne MMC-Behandlung nur etwa 24, mit 50 ng/ml MMC bereits 345 und mit 100 ng/ml MMC ca. 454 Bruchereignisse in je 50 ausgezählten Metaphasen beobachtet, die sich auf Brüche, Radialfiguren, Ringchromosomen sowie komplexere Chromosomenfiguren aufteilten. Radialfiguren und Brüche sind in Abbildung 60B, einem beispielhaften Ausschnitt einer 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup>-Metaphase, dargestellt.

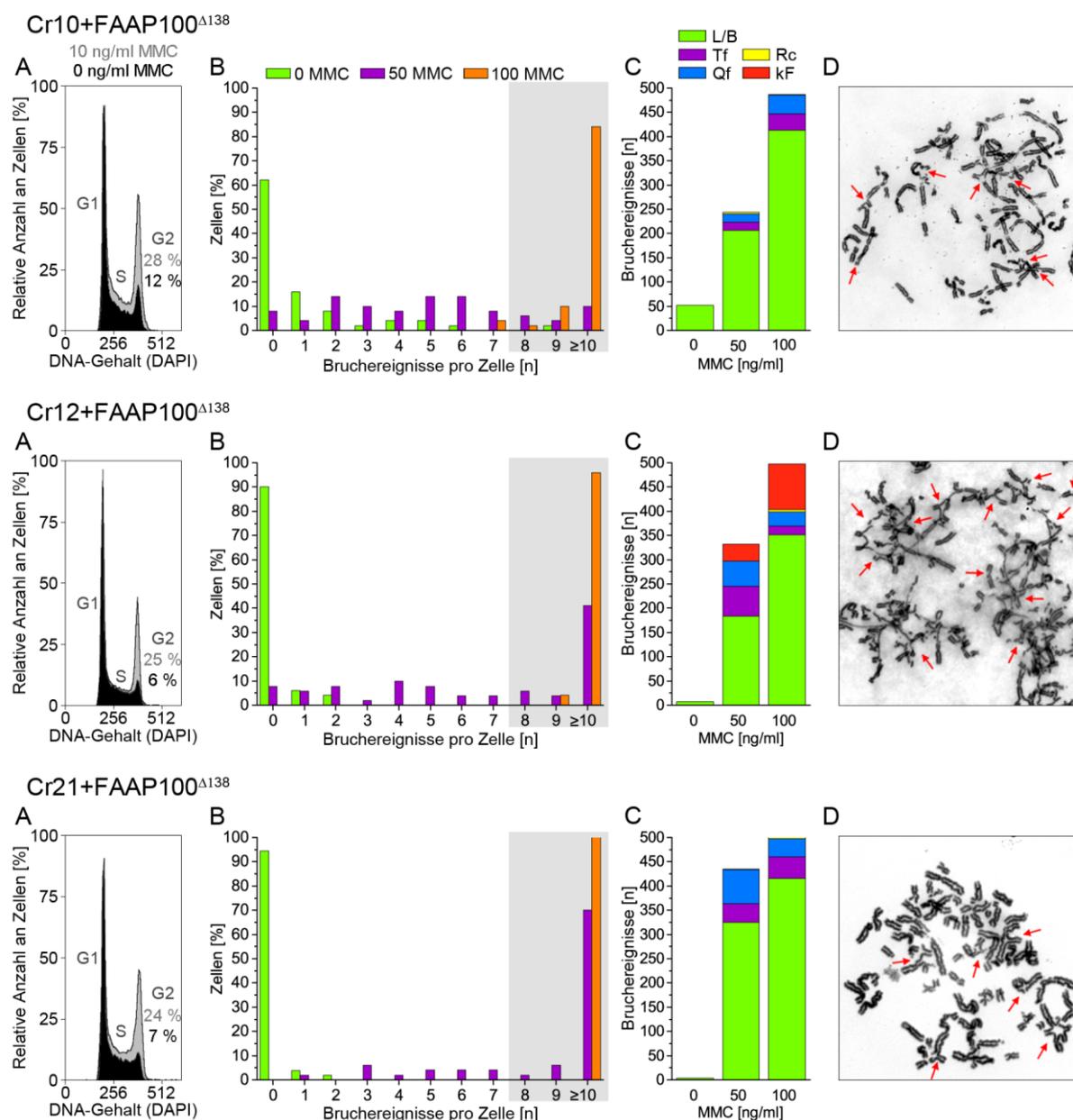
Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zelllinie 1176 durch FAAP100<sup>Δ138</sup> nicht komplementiert werden kann.

Des Weiteren wurden die mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduzierten CRISPR/Cas9-Zelllinien Cr10+FAAP100<sup>Δ138</sup>, Cr12+FAAP100<sup>Δ138</sup> sowie Cr21+FAAP100<sup>Δ138</sup> hinsichtlich eines G2-Phase-Arrestes sowie einer Chromosomenbrüchigkeit analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 61 dargestellt. Die jeweiligen Zellzyklusprofile (jeweils Abbildung 61A) zeigen, dass der Anteil der G2-Phase sowohl bei den Cr10+FAAP100<sup>Δ138</sup>-, den Cr12+FAAP100<sup>Δ138</sup>- als auch bei den Cr21+FAAP100<sup>Δ138</sup>-Zellen nach Behandlung der Kultur mit 10 ng/ml MMC um 16 %, 19 % bzw. 17 % anstieg. Somit sind die Zellzyklusprofile dieser mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduzierten Zelllinien mit denen der Linien Cr10, Cr12 bzw. Cr21 vergleichbar, die nach MMC-Inkubation einen Anstieg des G2-Phase-Anteils um 22-26 % aufwiesen (Abschnitt 4. 1. 7. 2, Abbildung 26A). Bei der HEK293T-Kontrollzelllinie war dagegen nach MMC-Behandlung nur ein Anstieg von 7 % zu beobachten.

Die Hypersensitivität gegenüber MMC konnte auch anhand einer Chromosomenbruchanalyse bestätigt werden. Cr10+FAAP100<sup>Δ138</sup>, Cr12+FAAP100<sup>Δ138</sup> sowie Cr21+FAAP100<sup>Δ138</sup> wiesen ohne MMC-Behandlung kaum Zellen mit Bruchereignissen auf, wohingegen der Anteil bzw. die Anzahl der Bruchereignisse in Abhängigkeit von der MMC-Konzentration stark zunahm (jeweils Abbildung 61B und C). Nach einer Behandlung mit 100 ng/ml MMC zeigten 84 % der Cr10+FAAP100<sup>Δ138</sup>-Zellen, 96 % der Cr12+FAAP100<sup>Δ138</sup>-Zellen und 100 % der Cr21+FAAP100<sup>Δ138</sup>-Zellen Chromosomen mit zehn oder mehr Bruchereignissen (jeweils Abbildung 61B). Folglich nahm auch die Anzahl der verschiedenen Chromosomenrearrangements zu. So konnte man, abgesehen von Brüchen bzw. Lücken in den Chromosomen, bei Cr10+FAAP100<sup>Δ138</sup>- sowie Cr21+FAAP100<sup>Δ138</sup>-Zellen vor allem Radialfiguren, bei Cr12+FAAP100<sup>Δ138</sup>-Zellen vor allem komplexere Figuren nach MMC-Inkubation beobachten (jeweils Abbildung 61C). Mikrofotografien einer beispielhaften Metaphase nach 100 ng/ml MMC-Behandlung, die Brüche und andere Chromosomenfiguren aufwiesen, sind jeweils in Abbildung

61D dargestellt.

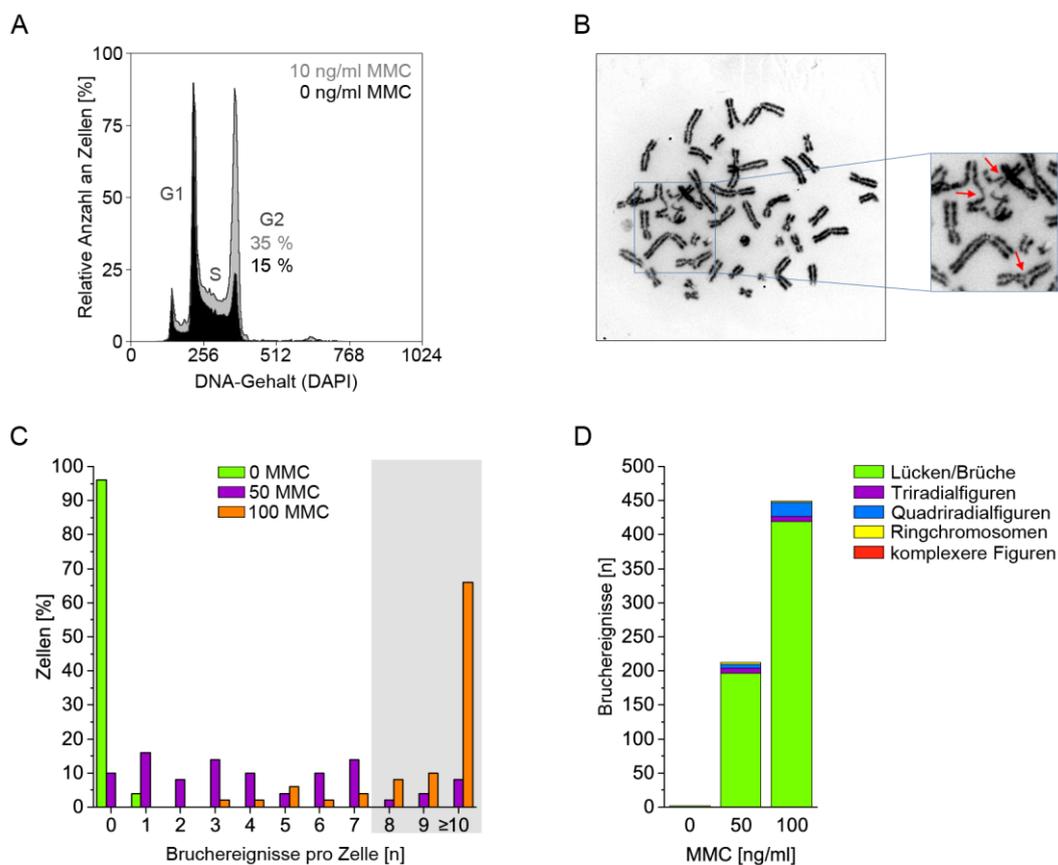
Diese Ergebnisse bestätigen für die Zelllinien Cr10, Cr12 und Cr21, dass durch FAAP100<sup>Δ138</sup> keine Komplementation des FA-Phänotyps dieser Zellen erreicht werden kann.



**Abbildung 61: Aspekte des zellulären FA-Phänotyps der CRISPR/Cas9-HEK293T-Zelllinien nach Transduktion mit FAAP100<sup>Δ138</sup>. A: Zellzyklushistogramme nach DAPI-Färbung.** Die Zellzyklusprofile zeigen die Proportionen der Phasen mit (grau) und ohne (schwarz) MMC-Behandlung. Die Anteile der sich jeweils in der G2-Phase befindlichen Zellen wurde miteinander verglichen. **B: Anteil der Zellen in Prozent klassifiziert nach Bruchereignissen pro Zelle.** Zellen, die unbehandelt geblieben waren, sind grün, Zellen, die für 48 h 50 ng/ml MMC bzw. 100 ng/ml MMC exponiert wurden, sind lila bzw. orange markiert. Eine graue Hintergrundfläche hebt die veränderten Bruchverteilungen hervor, die typisch für einen zellulären FA-Phänotyp sind. **C: Anzahl der Chromosomenbruchereignisse sowie der Chromosomenbrucharten in Abhängigkeit von der MMC-Konzentration.** Die Werte wurden je nach Art des entsprechenden Bruchereignisses bzw. Rearrangements aufgegliedert. L/B: Lücken/Brüche (grün), Tf: Triradialfiguren (lila), Qf: Quadriradialfiguren (blau), Rc: Ringchromosomen (gelb), kF: komplexere Figuren (rot). **D: Mikrofotografien je einer Metaphase.** Die entsprechenden Kulturen der dargestellten Metaphase waren mit 100 ng/ml MMC für 48 h inkubiert worden. Brüche,

Radial- sowie komplexere Figuren sind durch rote Pfeile markiert. Die Originalmikrofotografien wurden mit einem 100x Objektiv aufgenommen.

Mit der Zelllinie HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>+FAAP100<sup>Δ138</sup> konnten ähnliche Ergebnisse wie bei den anderen mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduzierten Zelllinien in Bezug auf die Zellzyklus- bzw. Chromosomenbruchanalysen erzielt werden. Die durchflusszytometrische Messung der HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>+FAAP100<sup>Δ138</sup>-Zellen ergab zum einen, dass diese Zelllinie, wie auch die Linie HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>+FAAP100<sup>WT</sup> (Abschnitt 4. 1. 7. 2, Abbildung 26B), einen weitgehend diploiden Chromosomensatz aufwies und zum anderen, dass die Zellen sensitiv auf Zugabe von 10 ng/ml MMC reagierten. So wurden in exponierten Kulturen 20 % mehr Zellen in der G2-Phase arretiert als ohne MMC-Behandlung (Abbildung 62A).



**Abbildung 62: Aspekte des zellulären FA-Phänotyps der HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>+FAAP100<sup>Δ138</sup>-Zelllinie.** **A: Zellzyklushistogramme nach DAPI-Färbung.** Die Zellzyklusprofile zeigen die Proportionen der Phasen mit (grau) und ohne (schwarz) MMC-Behandlung. Der Anteil der sich jeweils in der G2-Phase befindlichen Zellen wurde miteinander verglichen. **B: Mikrofotografie einer Metaphase.** Die entsprechende Kultur der dargestellten Metaphase war mit 100 ng/ml MMC für 48 h inkubiert worden. Brüche, Radial- sowie komplexere Figuren sind durch rote Pfeile markiert. Die Originalmikrofotografie wurde mit einem 100x Objektiv aufgenommen. **C: Anteil der Zellen in Prozent klassifiziert nach Bruchereignissen pro Zelle.** Zellen, die unbehandelt geblieben waren, sind grün, Zellen, die für 48 h 50 ng/ml MMC bzw. 100 ng/ml MMC exponiert wurden, sind in lila bzw. orange markiert. Eine graue Hintergrundfläche hebt die veränderten Bruchverteilungen hervor, die typisch für einen zellulären FA-Phänotyp sind. **D: Anzahl der Chromosomenbruchereignisse sowie der Chromosomenbrucharten in Abhängigkeit von der MMC-Konzentration.** Die Werte wurden je nach Art des entsprechenden Bruchereignisses bzw. Rearrangements (Lücken/Brüche in Grün, Triradial- und Quadriradialfiguren in Lila bzw. Blau, Ringchromosomen in Gelb und komplexere Figuren in Rot) aufgliedert.

In Abbildung 62B ist eine der 50 ausgezählten Metaphasen der Chromosomenbruchanalyse abgebildet, deren Zellen aus einer Kultur stammten, die mit 100 ng/ml MMC behandelt worden war. Sie wies eine Tri- sowie Quadriradialfigur und einen Chromosomenbruch auf. Während der Analyse konnten bei 96 % der unbehandelten Zellen keine Bruchereignisse beobachtet werden. Nach MMC-Inkubation traten vermehrt Zellen mit einer hohen Rate an Chromosomenbrüchen in den Metaphasen auf, sodass nach 100 ng/ml MMC-Behandlung 66 % der Zellen zehn oder mehr Brüche aufwiesen (Abbildung 62C). Ebenfalls nahm die Gesamtanzahl der Bruchereignisse in Abhängigkeit von der MMC-Konzentration zu. Ohne MMC-Behandlung konnten zwei Brüche, mit 50 ng/ml MMC 212 und mit 100 ng/ml MMC 449 Brüche nachgewiesen werden (Abbildung 62D). Bei der höchsten MMC-Konzentration waren neben Brüchen vor allem Quadriradialfiguren in den Metaphasen zu finden.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass auch die HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>-Zelllinie durch FAAP100<sup>Δ138</sup> nicht komplementiert werden kann.

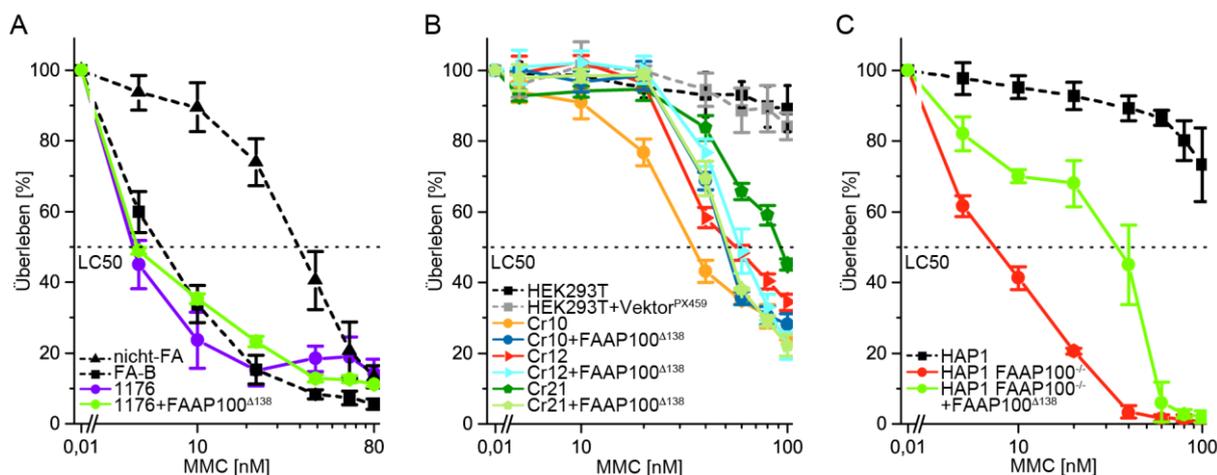
Während der Chromosomenbruchanalyse wurden alle Zelllinien, die mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduziert worden waren, stichprobenartig auf ihre Chromosomenanzahl pro Zelle überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 aufgeführt. Die Zelllinie 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> bzw. die CRISPR/Cas9-HEK293T-Zelllinien, die aus einer etablierten Laborzelllinie generiert worden waren, wiesen im Durchschnitt alle mehr als 57 Chromosomen pro Zelle auf. Durch das SV40 Large T-Antigen, mit dem die Zellen immortalisiert worden waren, kommt es zu Dysregulation der mitotischen Zellzyklus-Kontrollpunkte, wodurch Endoreduplikation und folglich Poly- und/oder Aneuploidie entstehen können (Chang et al. 1997, Velicescu et al. 2003). Dies zeigt sich auch in der hier nachgewiesenen Hypotriploidie der Zelllinien. Für die Zelllinie HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>, die mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduziert worden war, konnte kein haploider Chromosomensatz beobachtet werden. Stattdessen war mit 44,65 Chromosomen pro Zelle ein hypodiploider Chromosomensatz vorhanden, sodass die Tendenz dieser Zelllinie, sich zu einer diploiden Linie zu entwickeln, nachgewiesen ist (Essletzichler et al. 2014). Dies konnte bereits bei der Zellzyklusanalyse beobachtet werden.

**Tabelle 26: Gemittelte Chromosomenzahlen.**

Zelllinie	Chromosomenanzahl/Zelle	Anzahl der untersuchten Zellen	Zelllinie	Chromosomenanzahl/Zelle	Anzahl der untersuchten Zellen
1176 +FAAP100 <sup>Δ138</sup>	57,20	50	Cr10 +FAAP100 <sup>Δ138</sup>	60,57	21
HAP1 FAAP100 <sup>-/-</sup> +FAAP100 <sup>Δ138</sup>	44,65	23	Cr12 +FAAP100 <sup>Δ138</sup>	59,95	20
			Cr21 +FAAP100 <sup>Δ138</sup>	57,42	12

### 4.3.4.2 Überlebenskurven

Da die Überlebensfähigkeit von FA-Zellen nach Behandlung mit ICL-induzierenden Agenzien stark abnimmt, wurden zur Komplementationsanalyse der FAAP100-defizienten Zelllinien, die mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduziert worden waren, Überlebenskurven angefertigt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 63 dargestellt.



**Abbildung 63: Untersuchungen zur Komplementation mittels Überlebenskurven von FAAP100-defizienten Zelllinien nach Transduktion mit FAAP100<sup>Δ138</sup>.** Überleben der 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup>-Zelllinie (A), der mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduzierten CRISPR/Cas9-HEK293T-Zelllinien (B) sowie der HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>+FAAP100<sup>Δ138</sup>-Zelllinie (C) in Abhängigkeit von der MMC-Konzentration. In einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve wurden die Anteile der vitalen Zellen in Prozent aufgetragen, nachdem sie gegen die Anzahl der jeweils unbehandelten Kultur normalisiert worden waren (arbiträr 100 %). Die Mittelwerte sowie Standardabweichungen wurden aus Triplikaten (A) bzw. aus drei unabhängigen Experimenten (B und C) berechnet. Bei den Analysen wurden jeweils die FAAP100-defizienten Zelllinien sowie Kontrollzelllinien (gestrichelte Kurven) mitgeführt. Die gestrichelte horizontale Linie markiert die LC50 (letale Konzentration für 50 % der Zellen).

Die Zellen der Linie 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> reagierten sehr sensitiv gegenüber einer ansteigenden MMC-Konzentration, sodass das Ergebnis dem der 1176- sowie der FA-B-Zellen gleicht (Abbildung 63A). Demnach wurde die letale Konzentration 50 % sowohl für 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup>- als auch 1176-Zellen bei etwa 4 nM MMC, die der Zelllinie FA-B bei etwa 7 nM MMC ermittelt. Durch die Überlebenskurven der CRISPR/Cas9-HEK293T-Zelllinien, die in Abschnitt 4.1.7.4, Abbildung 33A dargestellt sind, wurde bereits gezeigt, dass sich Zellen des Typs HEK293T etwas weniger sensitiv gegenüber MMC verhalten als transformierte 1176- oder HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>-Zellen. Dieses Verhalten kann auch bei den Zelllinien Cr10+FAAP100<sup>Δ138</sup>, Cr12+FAAP100<sup>Δ138</sup> sowie Cr21+FAAP100<sup>Δ138</sup> beobachtet werden, die weiterhin eine Sensitivität gegenüber MMC aufwiesen (Abbildung 63B). So lag deren jeweilige LC50 bei einer Konzentration von etwa 55 nM MMC, während die von parental HEK293T-Zellen um ein Vielfaches höher geschätzt wird. Einen Unterschied in der LC50 konnte hingegen zwischen den Zelllinien HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> (LC50 bei etwa 7 nM MMC) und HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>+FAAP100<sup>Δ138</sup> (LC50 bei etwa 35 nM MMC) beobachtet werden (Abbildung 63C). Bei einer MMC-Konzentration von 100 nM wurden nur noch 2 % lebende HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>+FAAP100<sup>Δ138</sup>-Zellen nachgewiesen, was die

Hypersensitivität dieser Zelllinie gegenüber MMC unterstreicht.

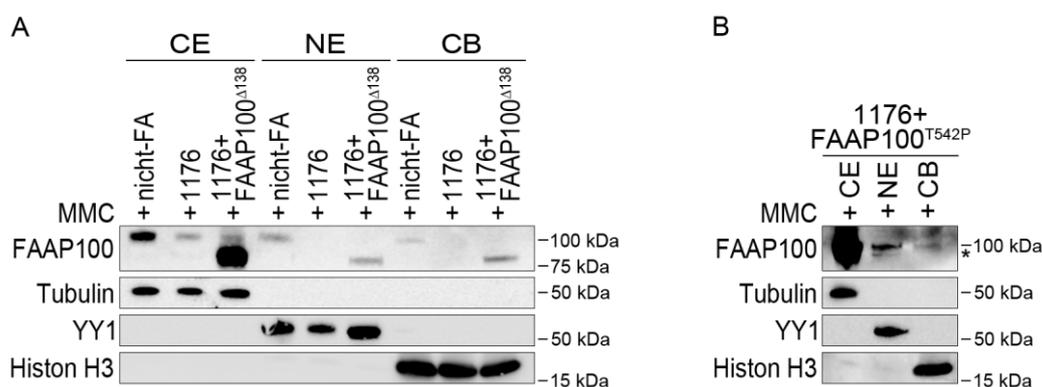
Durch Überlebenskurven von FAAP100-defizienten Zelllinien, die mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduziert wurden, wird abermals bestätigt, dass FAAP100-defiziente Zelllinien durch FAAP100<sup>Δ138</sup> nicht komplementiert werden können und weiterhin einen typischen zellulären FA-Phänotyp aufweisen.

So konnte weder durch Zellzyklus- und Chromosomenbruchanalysen noch durch Überlebensanalysen eine Komplementation der FAAP100-defizienten Zelllinien durch FAAP100<sup>Δ138</sup> nachgewiesen werden. Dennoch wurde weiterhin eine Translation des Transkriptes XM\_006722111 angenommen, sodass das postulierte Protein FAAP100<sup>Δ138</sup> hinsichtlich seiner Funktion charakterisiert wurde.

#### 4. 3. 5 Funktionelle Analyse des Proteins FAAP100<sup>Δ138</sup>

##### 4. 3. 5. 1 Kern- und Chromatinlokalisierung von FAAP100<sup>Δ138</sup>

In Abschnitt 4. 1. 8. 1 wurde gezeigt, dass FAAP100<sup>WT</sup> vom Zytoplasma in den Nukleus und ans Chromatin transportiert wird, was dagegen für natives FAAP100<sup>T542P</sup> nicht möglich war. Ob der Transport von FAAP100<sup>Δ138</sup> intakt oder ebenfalls gestört ist, wurde anhand von Proteinfractionierungen untersucht. So wurden jeweils Proteine des zytoplasmatischen Extrakts (CE), des nukleären Extrakts (NE) sowie der Chromatin-gebundenen Fraktion (CB) der Linien nicht-FA-Kontrolle, 1176 und 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> isoliert. In Abbildung 64A ist das Ergebnis dargestellt. Bei einer nicht-FA-Kontrolle konnte FAAP100<sup>WT</sup>-Protein mit einem Gewicht von etwa 100 kDa in allen drei Kompartimenten detektiert werden. Im Gegensatz dazu war FAAP100<sup>WT</sup> bei den Zelllinien 1176 sowie 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> nur im zytoplasmatischen Extrakt nachweisbar. FAAP100<sup>Δ138</sup> mit einem Molekulargewicht von etwa 79 kDa hingegen wurde nur für die Zelllinie 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup>, jedoch in allen drei untersuchten Zellkompartimenten, detektiert.



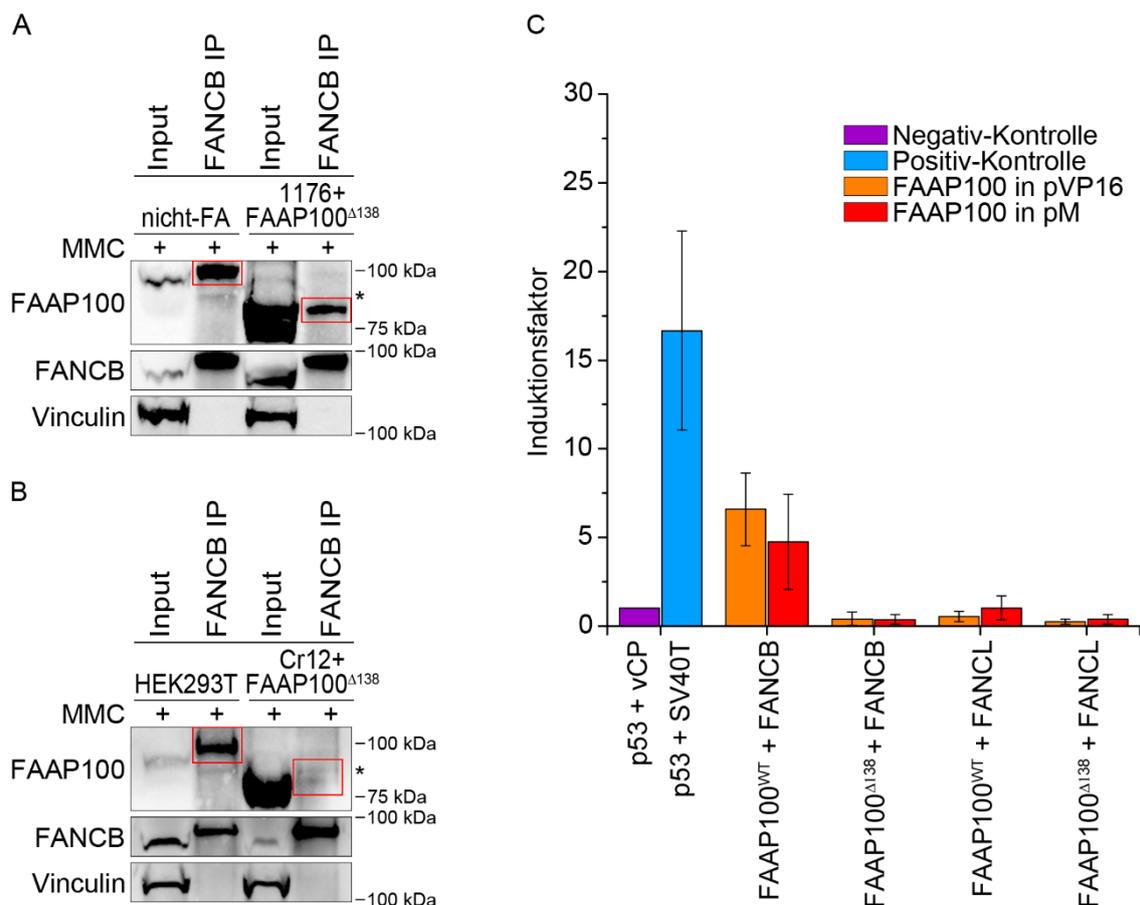
**Abbildung 64: Nachweis der Proteinlokalisierung bei der mit FAAP100<sup>Δ138</sup> bzw. FAAP100<sup>T542P</sup> transduzierten Zelllinie 1176. Proteinfractionierungen der Zelllinie 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> (A) bzw. der Zelllinie 1176+FAAP100<sup>T542P</sup>. Auf den Immunblots wurden jeweils Proteinextrakte aus drei unterschiedlichen Zellkompartimenten aufgetragen. CE: zytoplasmatischer Extrakt, NE: nukleärer Extrakt, CB: Chromatin-gebundene Fraktion. Mithilfe eines Antikörpers konnte die Lokalisation von FAAP100<sup>WT</sup> bzw. FAAP100<sup>T542P</sup> jeweils mit einem Gewicht von etwa 100 kDa sowie von FAAP100<sup>Δ138</sup> mit einem Gewicht von etwa 79 kDa nachgewiesen werden. Als Ladungskontrolle sowie Kontaminationsnachweis dienten je nach Zellkompartiment Tubulin, YY1 oder Histon H3. \*: unspezifische Banden, kDa: Kilodalton.**

Da FAAP100-defiziente Zelllinien durch FAAP100<sup>Δ138</sup> allerdings nicht komplementiert werden, waren aufgrund der starken Überexpression von FAAP100<sup>Δ138</sup> geringe Mengen dieses Proteins in den Nukleus und an das Chromatin gelangt. Ein ähnliches Ergebnis war bereits bei der Überexpression von FAAP100<sup>T542P</sup> (etwa 100 kDa) der Zelllinie 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> zu beobachten gewesen. Der Immunblot dieser Proteinextrakte, der in Abbildung 64B wiederholt dargestellt wird, zeigt, dass überexprimiertes FAAP100<sup>T542P</sup> in allen drei Zellkompartimenten lokalisiert war. Natives FAAP100<sup>T542P</sup> der Zelllinie 1176 hingegen konnte nur im Zytoplasma nachgewiesen werden (Abbildung 64A). Folglich muss auch die Überexpression von FAAP100<sup>Δ138</sup> dazu geführt haben, dass FAAP100<sup>Δ138</sup> im zytoplasmatischen, im nukleären Extrakt sowie in der Chromatin-gebundene Fraktion detektierbar war. Da der Nukleustransport von FAAP100 nur im Komplex LBP100 erfolgen kann, wurden Interaktionsstudien zur Bildung von LBP100<sup>Δ138</sup> durchgeführt. Damit sollte analysiert werden, ob durch FAAP100<sup>Δ138</sup> eine Interaktion mit FANCB aufgebaut werden kann. Falls diese nicht nachgewiesen werden sollte, wäre bestätigt, dass die hier ermittelte Lokalisation von FAAP100<sup>Δ138</sup> im Kern und am Chromatin tatsächlich auf eine Überexpression von FAAP100<sup>Δ138</sup> zurückzuführen ist.

#### 4. 3. 5. 2 Interaktionsstudien zur Komplexbildung von LBP100<sup>Δ138</sup>

Durch eine Sequenzanalyse war ermittelt worden, dass bei FAAP100<sup>Δ138</sup> ein Inter-Link FAAP100-FANCB weniger vorhanden ist verglichen mit FAAP100<sup>WT</sup> (Abschnitt 4. 3. 1, Abbildung 55C). Um zu analysieren, ob die Isoform FAAP100<sup>Δ138</sup> dennoch in der Lage ist, mit FANCB eine Interaktion einzugehen, wurden Co-Immunpräzipitationen sowie eine Analyse im *Mammalian Two-Hybrid* System durchgeführt.

Co-Immunpräzipitationen der Zelllinien 1176 und 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> (Abbildung 65A) sowie der Linien Cr12 und Cr12+FAAP100<sup>Δ138</sup> (Abbildung 65B) ergaben, dass bei den Zelllinien 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> und Cr12+FAAP100<sup>Δ138</sup> kein FAAP100-Protein mit einem Gewicht von etwa 100 kDa zusammen mit FANCB co-immunpräzipitiert wurde, was im Gegensatz dazu bei den Kontrollen nicht-FA- und HEK293T möglich war. Da in den mutanten Zelllinien kein FAAP100<sup>WT</sup> vorhanden ist, konnte bei diesen Zelllinien auch keine Interaktion zwischen FAAP100<sup>WT</sup> und FANCB nachgewiesen werden. Zwischen FAAP100<sup>Δ138</sup> und FANCB schien eine Interaktion stattzufinden, da das FAAP100<sup>Δ138</sup>-Protein mit einem Gewicht von etwa 79 kDa zusammen mit FANCB sowohl für die Zelllinie 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> als auch für Cr12+FAAP100<sup>Δ138</sup> präzipitiert wurde. Durch einen  $\alpha$ -FANCB- sowie einen  $\alpha$ -Vinculin-Antikörper wurde der Erfolg der Co-IPs kontrolliert. Da bei Co-IP-Experimenten einerseits Kontaminationsprobleme auftreten können (Sciuto et al. 2017) und andererseits durch die Proteinfraktionierung von FAAP100<sup>T542P</sup> der Zelllinie 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> (Abbildung 64B) gezeigt worden war, dass eine starke Überexpression von Proteinen zu widersprüchlichen Ergebnissen führen kann, wurde das Ergebnis der Co-IP durch eine Analyse im M2H-System überprüft.



**Abbildung 65: Interaktion von FAAP100<sup>Δ138</sup> mit FANCB bzw. FANCL. Co-Immünpräzipitationen von FAAP100<sup>Δ138</sup> in 1176 (A) sowie in Cr12 (B) mit FANCB.** Mithilfe eines  $\alpha$ -FANCB-Antikörpers wurden aus Gesamtproteinlysaten (Input) jeweils FANCB und dessen Interaktionspartner präzipitiert (FANCB IP). Durch einen  $\alpha$ -FAAP100-Antikörper erfolgte der Nachweis einer möglichen Proteininteraktion zwischen FAAP100 und FANCB, der für die Kontrollzelllinien nicht-FA sowie HEK293T für FAAP100<sup>WT</sup> mit einem Gewicht von etwa 100 kDa, für 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> sowie Cr12+FAAP100<sup>Δ138</sup> für FAAP100<sup>Δ138</sup> mit einem Gewicht von etwa 79 kDa positiv war (roter Rahmen). Ein  $\alpha$ -FANCB- sowie ein  $\alpha$ -Vinculin-Antikörper dienten zur Kontrolle des Experimentes. \*: unspezifische Banden, kDa: Kilodalton. **C: Induktion der Luciferase-Aktivität (Induktionsfaktor) in einem Mammalian Two-Hybrid System.** Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt und die daraus resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen in einem Balkendiagramm aufgetragen. Die Normalisierung erfolgte jeweils über die Negativkontrolle, sodass hierfür keine Standardabweichungen angegeben sind (Induktionsfaktor=1). Orange: FAAP100-cDNA im pVP16-Vektor, Bildung eines FAAP100-AD (Aktivierungsdomäne) Fusionsproteins. Rot: FAAP100-cDNA im pM-Vektor, Bildung eines FAAP100-BD (Bindedomäne) Fusionsproteins. Die cDNA des Partnerproteins befand sich in jeweils anderen Vektor. Für die Messungen wurde Proteinlysate transfizierter HEK293T-Zellen verwendet. SV40T: SV40 large T Antigen, vCP: virales Coat-Protein.

Mithilfe des Luciferase Assays war es nicht möglich, eine direkte Interaktion zwischen FAAP100<sup>Δ138</sup> und FANCB bzw. zwischen FAAP100<sup>Δ138</sup> und FANCL auszumachen (Abbildung 65C). Für beide Richtungen (FAAP100<sup>Δ138</sup> in pM sowie FAAP100<sup>Δ138</sup> in pVP16) lag der ermittelte Induktionsfaktor mit etwa 0,2-0,4 unter dem Wert der Negativkontrolle (1,0). Durch Untersuchungen im M2H- sowie im M3H-System war gezeigt worden (Abschnitt 4. 1. 8. 2, Abbildung 37), dass für eine indirekte Interaktion zwischen FAAP100 und FANCL zunächst eine Wechselwirkung zwischen FAAP100 und FANCB zustande kommen muss. Da FAAP100<sup>Δ138</sup> und FANCB allerdings nicht miteinander interagierten, konnte auch eine indirekte Interaktion zwischen FAAP100<sup>Δ138</sup> und

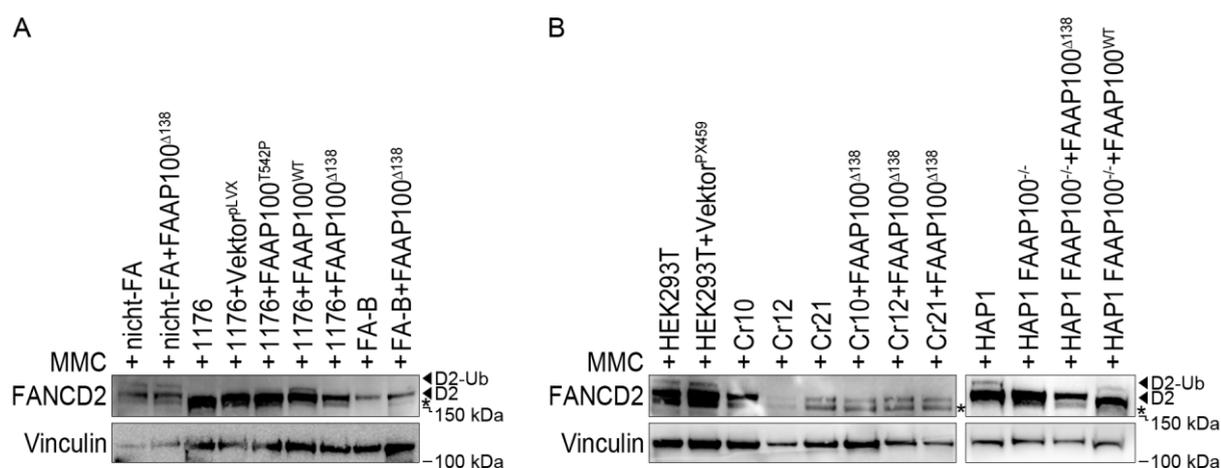
FANCL ausgeschlossen werden. Somit wurde auf die Durchführung einer M3H-Analyse mit FAAP100<sup>Δ138</sup> verzichtet.

Durch die Ergebnisse des M2H-Systems wird bestätigt, dass es sich bei der durch die Co-IP nachgewiesenen Interaktion zwischen FAAP100<sup>Δ138</sup> und FANCB in den Zelllinien 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> und Cr12+FAAP100<sup>Δ138</sup> um ein falsch-positives Ergebnis handelte, welches sich durch das M2H-System nicht verifizieren lässt. Eine Protein-DNA-Interaktion kann durch einen DNase-Verdau vor der Immunpräzipitation ausgeschlossen werden.

Da FAAP100<sup>Δ138</sup> und FANCB nicht miteinander interagieren, kann kein Subkomplex LBP100<sup>Δ138</sup> gebildet und dieser folglich nicht in den Nukleus und ans Chromatin transportiert werden. Somit bestätigt das Ergebnis des M2H-Systems weiterhin, dass aufgrund der starken Überexpression von FAAP100<sup>Δ138</sup> geringe Mengen an FAAP100<sup>Δ138</sup> in den Kern und an das Chromatin gelangt waren.

#### 4. 3. 5. 3 Monoubiquitinierung von FANCD2

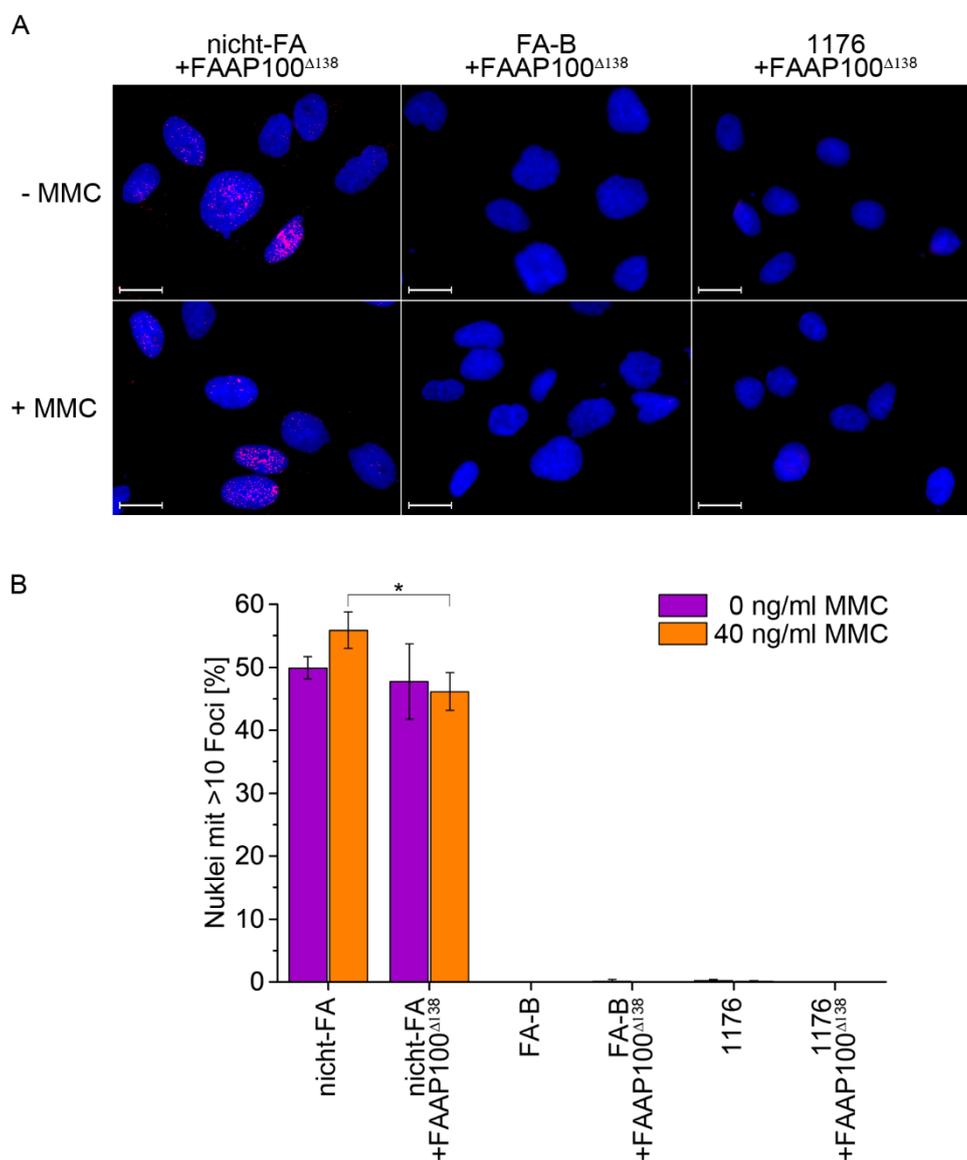
In Abschnitt 4. 1. 8. 3, Abbildung 39 war gezeigt worden, dass eine FANCD2-Monoubiquitinierungsreaktion nicht durch FAAP100<sup>T542P</sup>, sondern nur durch FAAP100<sup>WT</sup> vermittelt wird. Ob die posttranslationale Modifikation von FANCD2 durch FAAP100<sup>Δ138</sup> herbeigeführt werden kann, wurde mithilfe von FANCD2-Immunblots analysiert, auf denen Proteinlysate von mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduzierten Zelllinien aufgetragen worden waren. Für die Zelllinien 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> und FA-B+FAAP100<sup>Δ138</sup> (Abbildung 66A) sowie für Cr10+FAAP100<sup>Δ138</sup>, Cr12+FAAP100<sup>Δ138</sup>, Cr21+FAAP100<sup>Δ138</sup> und HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>+FAAP100<sup>Δ138</sup> (Abbildung 66B) konnte nur die unmodifizierte Form von FANCD2 detektiert werden. Demnach findet bei diesen Zelllinien keine FANCD2-Monoubiquitinierung und somit auch keine Komplementation dieser Zelllinien durch FAAP100<sup>Δ138</sup> statt.



**Abbildung 66: Nachweis der FANCD2-Monoubiquitinierung.** FANCD2-Immunblots der Zelllinie 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> (A) sowie der mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduzierten CRISPR/Cas9-Zelllinien (B). Mit den Proteinlysaten der Fibroblasten- und Amnionzelllinien sowie der Zelllinien HEK293T bzw. HAP1 wurde je ein Immunblot angefertigt. Für alle Zelllinien, die mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduziert worden waren, konnte keine Monoubiquitinierung von FANCD2 nachgewiesen werden. Vinculin diente jeweils als Ladungskontrolle. D2-Ub: monoubiquitiniertes FANCD2, D2: nicht-ubiquitiniertes FANCD2, \*: unspezifische Banden, kDa: Kilodalton.

#### 4. 3. 5. 4 Bildung von FANCD2-Foci

Da durch FAAP100<sup>Δ138</sup> keine FANCD2-Monoubiquitinierungsreaktion ausgelöst wird, kann folglich auch keine DNA-Schadensreparatur eingeleitet werden. Dies wurde durch indirekte Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis der FANCD2-Foci-Bildung bestätigt. So kann nach Einbringen von FAAP100<sup>Δ138</sup> in die 1176- bzw. in die FA-B-Zelllinie keine FANCD2-Foci-Formation sowohl mit als auch ohne MMC-Behandlung beobachtet werden (Abbildung 67A). Dagegen war in den Nuklei einer nicht-FA+FAAP100<sup>Δ138</sup>-Zelllinie eine FANCD2-Foci-Bildung nachweisbar.



**Abbildung 67: FANCD2-Foci-Bildung nach Transduktion mit FAAP100<sup>Δ138</sup>.** **A: Mikrofotografien der indirekten Immunfluoreszenzpräparate.** Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. Durch einen fluoreszenzgekoppelten  $\alpha$ -FANCD2-Antikörper konnten FANCD2-Foci detektiert werden (rot). Die Zellen waren zuvor mit 0 ng/ml MMC (- MMC) bzw. 40 ng/ml MMC (+ MMC) für 16 h inkubiert worden. Die Maßstabsbalken (weiße Balken jeweils unten links in den Fotografien) kennzeichnen eine Länge von 20  $\mu$ m. **B: Statistische Auswertung der Zellen mit über zehn FANCD2-Foci pro Zellkern.** Es sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Es wurden jeweils  $\geq 500$  Zellkerne pro Zelllinie ohne bzw. mit MMC-Behandlung ausgewertet. Signifikanzen zwischen nicht-FA und nicht-FA+FAAP100<sup>Δ138</sup> wurden mit dem doppelten t-Test ermittelt: \*  $p \leq 0,05$ .

Eine statistische Auswertung ist in Abbildung 67B dargestellt. 50 % (ohne MMC-Behandlung) bzw. 56 % (mit 40 ng/ml MMC-Behandlung) der nicht-FA-Zellkerne wiesen über zehn Foci pro Nukleus auf und waren demnach positiv für die Bildung von FANCD2-Foci. Nach Transduktion dieser Zelllinie mit FAAP100<sup>Δ138</sup> wurden bei 48 % (ohne MMC) bzw. 46 % (mit MMC) der Zellen FANCD2-Foci beobachtet. Somit war die unbehandelte nicht-FA+FAAP100<sup>Δ138</sup>-Zelllinie für 2 % weniger ihrer Nuklei Foci-positiv gegenüber der parentalen nicht-FA-Zelllinie, was allerdings nicht signifikant war. Nach MMC-Inkubation wurden 10 % weniger Foci-positive nicht-FA+FAAP100<sup>Δ138</sup>-Zellkerne ermittelt als in der ebenfalls mit MMC behandelten parentalen Zelllinie. Dieser Unterschied war mit  $p \leq 0,05$  signifikant. Die Zelllinien FA-B, FA-B+FAAP100<sup>Δ138</sup>, 1176 und 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> wiesen dagegen keine bzw. kaum (<0,2 %) FANCD2-Foci auf.

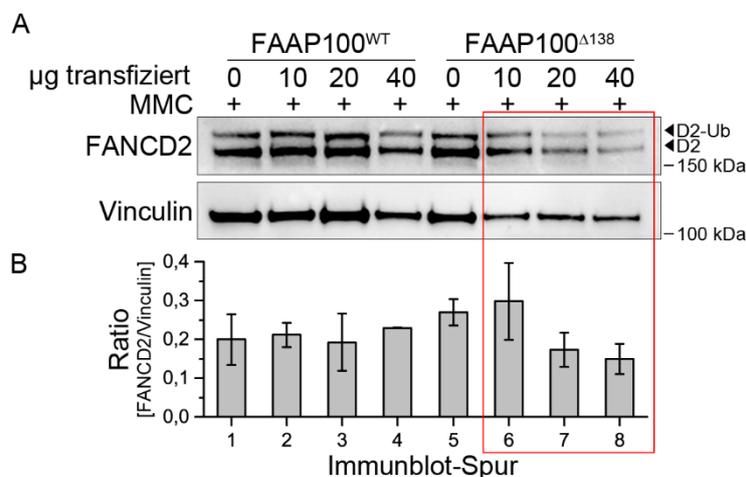
Somit ist bestätigt, dass die FA-Zelllinien 1176 und FA-B nicht durch FAAP100<sup>Δ138</sup> komplementiert werden können und in deren Zellen folglich keine DNA-Schadensreparatur aktiviert wird. Darüber hinaus scheint FAAP100<sup>Δ138</sup> einen negativen Effekt auf die nicht-FA-Kontrolle auszuüben, da für die Zelllinie nicht-FA+FAAP100<sup>Δ138</sup> weniger Foci-positive Nuklei als bei der parentalen Zelllinie nicht-FA ermittelt werden konnten.

#### 4. 3. 5. 5 Degradierung von FANCD2 durch FAAP100<sup>Δ138</sup>

Durch Bouffard et al. konnte gezeigt werden, dass eine alternative FANCE-Isoform (FANCEΔ4) einen dominant-negativen Effekt aufweist und die Degradierung von FANCD2 fördert (Bouffard et al. 2015). Durch indirekte Immunfluoreszenz waren nach der Transduktion mit FAAP100<sup>Δ138</sup> in nicht-FA-Zellen weniger FANCD2-Foci-positive Zellkerne beobachtet worden als bei der parentalen nicht-FA-Zelllinie. Damit war ein erster Hinweis darauf gegeben, dass FAAP100<sup>Δ138</sup>, ähnlich wie FANCEΔ4, einen dominant-negativen Effekt auf FANCD2 haben könnte.

Dies wurde durch FANCD2-Immunblots näher analysiert. Hierfür wurden U2OS-Zellen mit unterschiedlichen Mengen an FAAP100<sup>WT</sup> bzw. FAAP100<sup>Δ138</sup> transduziert und aus ihnen Proteinlysate gewonnen. Ein FANCD2-Immunblot ist in Abbildung 68A gezeigt. Obwohl durch die Ladungskontrolle Vinculin nachgewiesen wurde, dass das SDS-Polyakrylamid-Gel nicht in jeder Spur mit einer gleichen Proteinkonzentration beladen worden war, kann vor allem eine Abnahme von sowohl ubiquitiniertem als auch nicht-ubiquitiniertem FANCD2 in Abhängigkeit der FAAP100<sup>Δ138</sup>-Konzentration beobachtet werden. Um die Mengenunterschiede der Proteine auszugleichen, wurde die Intensität der detektierten Banden auf die Ladungskontrolle Vinculin normalisiert. Die Ratio-Mittelwerte sowie Standardabweichungen, die anhand von zwei unterschiedlichen FANCD2-Immunblots berechnet wurden, sind in Abbildung 68B dargestellt. Es wurde bestätigt, dass bei ansteigender FAAP100<sup>Δ138</sup>-Menge eine Abnahme der FANCD2-Menge zu verzeichnen ist. Allerdings hätte dann für unbehandelte U2OS-Zellen (Abbildung 68B, Spur 5) ein höherer Ratiowert FANCD2/Vinculin zu ermitteln gewesen sein sollen als mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transfizierten U2OS-Zellen (Abbildung 68B, Spur 6-8); das war nicht der Fall. Des Weiteren wurde erwartet, dass alle unbehandelten U2OS-Zellen einen vergleichbaren Ratiowert aufweisen

(Abbildung 68B, Spur 1 und Spur 5), was für diese Immunblots jedenfalls nicht bestätigt werden konnte. Für ansteigende Konzentrationen von transfiziertem FAAP100<sup>WT</sup> wurde jeweils ein etwa ähnlicher Ratiowert berechnet (Abbildung 68B, Spur 2-4).



**Abbildung 68: Nachweis der FANCD2-Degradierung durch FAAP100<sup>Δ138</sup>.** **A: FANCD2-Immunblot.** Die aufgetragenen Proteinextrakte wurden aus U2OS-Zellen isoliert, die zuvor mit verschiedenen FAAP100<sup>WT</sup>- bzw. FAAP100<sup>Δ138</sup>-Konzentrationen transfiziert worden waren. Mithilfe eines  $\alpha$ -FANCD2-Antikörpers wurde die Degradierung von FANCD2 analysiert. Vinculin diente als Ladungskontrolle. D2-Ub: monoubiquitiniertes FANCD2, D2: nicht-ubiquitiniertes FANCD2, kDa: Kilodalton. **B: Ratioberechnungen.** Um eine ungleichmäßige Beladung der Proteinmengen auf den Immunblots auszugleichen und die FANCD2-Expression der Zelllinien direkt miteinander vergleichen zu können, wurden jeweils die Ratios FANCD2/Vinculin berechnet. Die Mittelwerte sowie Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Immunblots wurden in einem Balkendiagramm aufgetragen. Der rote Rahmen markiert die ermittelte Abnahme der FANCD2-Menge in Abhängigkeit der FAAP100<sup>Δ138</sup>-Konzentration.

Durch diese Ergebnisse sowie den Nachweis eines reduzierten Anteils der FANCD2-Foci-positiven Nuklei bei der Zelllinie nicht-FA+FAAP100<sup>Δ138</sup> gegenüber der Zelllinie nicht-FA sind Hinweise gegeben, dass FAAP100<sup>Δ138</sup> einen degradierenden Einfluss auf FANCD2 haben könnte.

Zusammenfassend lässt sich durch die Analyse von FAAP100<sup>Δ138</sup> feststellen, dass FAAP100-defiziente Zelllinien nicht durch die Isoform FAAP100<sup>Δ138</sup> komplementiert werden können. Somit übernimmt FAAP100<sup>Δ138</sup> keine positive Funktion innerhalb des FA-Signalweges, könnte jedoch einen regulatorischen, dominant-negativen Effekt gegenüber FANCD2 aufweisen. Weitere Untersuchungen zur Prüfung dieser Hypothese sind auf dem Weg.

## 5 DISKUSSION

Ein Protein mit der Bezeichnung BLAP100 bzw. FAAP100 wurde 2003 zum ersten Mal in der Literatur erwähnt (Meetei et al. 2003b). Es wurde als Bestandteil von sowohl mit BLM- als auch mit FANCA-aufgereinigten Multiprotein-Komplexen nachgewiesen und als Mitglied des sogenannten BRAFT-Komplexes identifiziert. Primär zogen Meetei et al. (2003b) in dieser Arbeit eine Verbindung zwischen FA und dem Bloom-Syndrom, das durch pathogene Mutationen in *BLM* ausgelöst wird, insofern als bei beiden Erkrankungen Ähnlichkeiten bestimmter chromosomaler Veränderungen bestehen und genomische Instabilität und eine Krebs-Disposition vorliegt. Durch die Publikation von Ling et al. (2007) wurde FAAP100 als integraler Bestandteil des FA/BRCA-Signalweges etabliert (Ling et al. 2007). Dort wurde gezeigt, dass FAAP100 eine essentielle Komponente des FA-Kernkomplexes darstellt und für die Aktivierung der FA-assoziierten DNA-Schadensreparatur, sprich der FANCD2-Monoubiquitinierung, notwendig ist. Dies wurde später von verschiedenen anderen Forschungsgruppen bestätigt (Huang et al. 2014, Rajendra et al. 2014, Swuec et al. 2017, van Twest et al. 2017). Obwohl FAAP100 seit über zehn Jahren als FA-Kandidatengen gilt, konnte bisher kein FA-Patient mit biallelischen pathogenen FAAP100-Mutationen identifiziert werden (Ling et al. 2007).

### 5.1 *In vitro* Knockdown und Knockout von FAAP100

Um mögliche Folgen von *FAAP100*-Mutationen zu analysieren, wurde das Gen *in vitro* herunterreguliert bzw. ausgeschaltet. Bereits von Ling et al. (2007) war nach posttranskriptionellem *FAAP100*-Silencing sowie durch Knockout in DT40-Hühnerzellen ein zellulärer FA-Phänotyp beschrieben worden (Ling et al. 2007). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Methoden ebenfalls angewandt, welche zu einer Bestätigung eines zellulären FA-Phänotyps nach einem FAAP100-Knockdown bzw. -Knockout führten. Zusätzlich generierte ich durch das CRISPR/Cas9-System Mutationen in *FAAP100* und analysierte deren Auswirkungen auf die Proteinfunktion.

#### 5.1.1 Keine FANCD2-Monoubiquitinierung nach Knockdown von FAAP100

Ein Immunblot bestätigte das erfolgreiche Knockdown von FAAP100 durch siRNA. Allerdings war die Expression von GAPDH als Positivkontrolle nicht vollständig herunterreguliert, sodass geringe Mengen an GAPDH in den Proteinlysaten detektiert wurden. Zudem war anhand der Ladungskontrolle Vinculin ersichtlich, dass verglichen mit Kontrollen reduzierte Mengen von Proteinlysaten der siFAAP100-behandelten Zellen aufgetragen worden waren. Infolgedessen ist nicht auszuschließen, dass nur aufgrund der geringeren Proteinkonzentration kein FAAP100 detektiert werden konnte. Somit wäre es möglich, dass die Genexpression von *FAAP100*, ähnlich wie bei *GAPDH*, nicht vollständig herunterreguliert wurde. Ling et al. (2007) hatten das *FAAP100*-Silencing mit regulärer siRNA sowie mit SMARTpool ON-TARGETplus FAAP100 siRNA

durchgeführt (Ling et al. 2007). Letzteres System verwendete ich für das Experiment ebenfalls. Mit dieser verbesserten siRNA-Technik konnten Ling et al. (2007) dennoch keinen kompletten Knockdown, sondern nur eine etwa 90%ige Reduzierung der FAAP100-Menge erreichen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ling et al. (2007), bei denen die FANCD2-Monoubiquitinierung zwar verringert, jedoch immer noch vorhanden war, wurde in der vorliegenden Arbeit nach dem FAAP100-Knockdown keine FANCD2-Monoubiquitinierung mehr detektiert. Diese Tatsache lässt ein nahezu vollständiges Knockdown vermuten und bestätigt die Beteiligung von FAAP100 an der Monoubiquitinierungsreaktion sowie die *upstream*-Eingruppierung von FAAP100 in den FA/BRCA-Signalweg. Allerdings war auf diesen FANCD2-Immunblot im Vergleich zu einem nicht-FA-Kontrollprotein ebenfalls eine geringere Proteinmenge der siFAAP100-Zellen aufgetragen worden, was durch einen  $\alpha$ -XPF-Antikörper nachgewiesen wurde. Infolgedessen kann keine eindeutige 100%ige Herunterregulierung der *FAAP100*-Expression durch die Immunblots bewiesen werden. Daher wurden für weitere Versuche die  $\Delta$ FAAP100-DT40-Zellen von Ling et al. (2007) verwendet (Ling et al. 2007).

### 5. 1. 2 Zellulärer FA-Phänotyp der $\Delta$ FAAP100-DT40-Zellen

Die durch Ausrekombination des größten Teils von FAAP100 in DT40-Hühnerzellen erreichte vollständige Defizienz des Proteins und der daraus resultierende zelluläre FA-Phänotyp sind bei Ling et al. (2007) beschrieben (Ling et al. 2007). In deren Arbeit wurden durch Überlebenskurven eine Hypersensitivität dieser  $\Delta$ FAAP100-DT40-Zellen gegenüber Cisplatin sowie eine fehlende FANCD2-Monoubiquitinierung nachgewiesen. Damit wurde ein FA-typischer zellulärer Phänotyp in den FAAP100-Knockout-Zellen der Spezies Huhn bestätigt. Dieser ließ sich in der hier vorliegenden Arbeit durch FAAP100<sup>WT</sup>, jedoch nicht durch FAAP100<sup>T547P</sup>, komplementieren. Bei p.(T547P) handelt es sich um die analoge FAAP100-Mutation von Fetus 1176, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert worden war, in der Spezies Huhn. Somit war eine Beteiligung von FAAP100<sup>T547P</sup> an der DNA-Schadensreparatur in Huhn-Zellen ausgeschlossen. Um die Auswirkungen von FAAP100-Mutationen in einem humanen Zellsystem zu analysieren, wurden durch das CRISPR/Cas9-System biallelische *FAAP100*-Mutationen in HEK293T-Zellen generiert. Dies hatte neben der Spezies Mensch den Vorteil, dass im Gegensatz zu den  $\Delta$ FAAP100-DT40-Zellen nur einzelne Basen in *FAAP100* verändert wurden. Damit entsprachen die Mutationen der FAAP100-CRISPR/Cas9-Zellen eher der Mutation des Fetus 1176 und waren aufgrund des gleichen genetischen Hintergrundes mit anderen FA-Patientenzelllinien vergleichbar.

### 5. 1. 3 *FAAP100*-Editierung durch das CRISPR/Cas9-System

#### 5. 1. 3. 1 Generierung von *FAAP100*-Mutationen in HEK293T-Zellen

Mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems wurden die drei Sublinien von HEK293T-Zellen, nämlich Cr10, Cr12 und Cr21, generiert, die jeweils eine unterschiedliche homozygote Mutation in *FAAP100* Exon 5 tragen. Dies bestätigte ich auf DNA-Ebene durch Sanger-Sequenzierung bzw.

auf Proteinebene durch einen Immunblot. Durch diesen wurde für Cr12 ein vermindertes FAAP100-Level, für Cr10 und Cr21 fehlende FAAP100-Expression nachgewiesen.

Die Effizienz der erfolgreichen Generierung biallelischer Mutationen in *FAAP100* lag insgesamt bei 1,1 %. Die Hauptursache dieser niedrigen Erfolgsrate lässt sich vor allem auf die inaktive Puromycin-Selektionskassette der Vektoren PX459 bzw. PX462 zurückführen. Auf der Homepage des Vertreibers Addgene, von dem die Plasmide bezogen worden waren, (<http://www.addgene.org/48139/> und <http://www.addgene.org/48141/>) war während der Versuchsdurchführung veröffentlicht worden, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vektoren PX459 sowie PX462 jeweils eine Punktmutation in der Sequenz des Puromycin-Resistenzgens tragen. Zwar wird von Addgene angegeben, dass dieser Basenaustausch nicht in allen Zelltypen zur Inaktivierung der Selektionskassette führt, jedoch wiesen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten HEK293T- und auch U2OS-Zellen, die mit PX459 bzw. PX462 transfiziert worden waren, keine Puromycin-Resistenz auf. Somit wurden durch die Puromycin-Behandlung auch Zellen, die das Cas9-Nickase- bzw. Cas9-Nuklease-Plasmid aufgenommen hatten, getötet. Addgene bietet mittlerweile neue Versionen der Vektoren (PX459v2 und PX462v2) an, welche die Wildtyp-Sequenz des Puromycin-Resistenzgens enthalten. Mit diesen sollten Zellen mit aufgenommenem Plasmid durch Puromycin selektiert werden können und infolgedessen würde die Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems insgesamt zu einer höheren Effizienz einer Knockout-Generierung führen.

Des Weiteren könnte durch Steigerung der Transfektionseffizienz, die zum einen von der Wahl des Transfektionsreagenzes und zum anderen von dem verwendeten Zelltyp abhängig ist, eine höhere Erfolgsrate bei der Generierung von Knockouts erzielt werden. So konnte beispielsweise bei U2OS-Zellen durch Transfektion der Cas9-Plasmide mit Lipofectamine 2000 eine Editierungseffizienz von nur 15 % erreicht werden, wohingegen diese bei HEK293FT-Zellen bei 49 % lag (Liang et al. 2015). Dies dürfte auch erklären, warum im Rahmen der vorliegenden Arbeit *FAAP100* in U2OS-Zellen nicht homozygot mutiert werden konnte. Für die Transfektion der Cas9- und der Cas9n-Plasmide verwendete ich Lipofectamine 3000, welches laut Herstellerangaben bei U2OS-Zellen eine zweifach höhere Transfektionseffizienz als Lipofectamine 2000 aufweist (ThermoFisher Scientific, *Application Note: Improve genome editing outcomes in biologically relevant cell models:* [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Lipofectamine3000AppNote\\_GenomeEditing.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Lipofectamine3000AppNote_GenomeEditing.pdf)). Dennoch konnte keine Genveränderung für U2OS-Zellen und bei nur drei HEK293T-Zelllinien homozygote *FAAP100*-Mutationen erzeugt werden.

Liang et al. (2015) publizierten weiterhin, dass im Allgemeinen die Erfolgsrate einer Geneditierung höher ausfällt, wenn für die Transfektion der Zellen statt eines Cas9-Plasmids direkt RNA (Cas9-mRNA und gRNA) bzw. Protein (Cas9-gRNA-Ribonukleoprotein-Komplex, Cas9 RNP) verwendet wird. So war in deren Veröffentlichung bei Verwendung von RNA eine 70%ige (HEK293FT-Zellen) bzw. 20%ige (U2OS-Zellen), bei Verwendung von Protein eine 51%ige

(HEK293FT-Zellen) bzw. 18%ige (U2OS-Zellen) Editierungs-Effizienz erreicht worden (Liang et al. 2015). Wurde Cas9 RNP durch Elektroporation in die Zellen eingebracht, erreichte die Geneditierung sogar eine Erfolgsrate von 88 % (HEK293FT) bzw. 70 % (U2OS) in den überlebenden Zellen. Für die Transfektion von Cas9-Proteinen und gRNA-Ribonukleoprotein wurden von Yu et al. (2016) mehrere Transfektionsreagenzien verglichen, wobei sie durch Lipofectamine CRISPRMAX eine um etwa 40 % gesteigerte Genomeditierungseffizienz erzielen konnten als durch Lipofectamine 3000 (Yu et al. 2016).

Bei einem erneuten Ansatz zur Generierung von *FAAP100*-Mutationen sollte man demnach bevorzugt Cas9 RNP statt PX459 verwenden und dies durch Elektroporation oder durch Transfektion mit Lipofectamine CRISPRMAX in die Zellen einbringen.

Mittlerweile hat sich das CRISPR-System weiterentwickelt und es wurden neue Nukleasen beschrieben. Eine davon ist die Nuklease Cpf1, welche aus den Bakteriengattungen *Prevotella* und *Francisella 1* stammt (Zetsche et al. 2015). Anders als die Cas9-Nuklease benötigt sie für das Schneiden der DNA keine tracrRNA, sondern übt ihre Funktion als Cpf1-crRNA-Komplex aus. Dadurch weist das CRISPR/Cpf1-System mit seiner gRNA, die nur aus ca. 42 nt besteht, insgesamt eine geringere Größe als das CRISPR/Cas9-System (gRNA aus ca. 100 nt) auf. Dadurch ist es einfacher zu synthetisieren und kann auch besser in Zellen eingebracht werden. Ein weiterer Vorteil dieses Systems besteht darin, dass die Cpf1-Nuklease die PAM-Sequenz 5'-TTN benötigt und so auch in AT-reichen Genomregionen schneiden kann, wohingegen SpCas9 auf GC-reiche Regionen limitiert ist. Zudem erzeugt die Cpf1-Nuklease DNA-DSBs mit 5'-Überhängen, die 4-5 Nukleotide lang sind, welche eine Reparatur über die HR fördern. Da die Cas9-Nuklease nur drei Nukleotide *upstream* ihrer PAM-Sequenz schneidet und glatte Enden erzeugt, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass durch das anschließende NHEJ die PAM-Sequenz zerstört und so ein wiederholtes Schneiden unterbunden wird. Dahingegen befindet sich die Schnittstelle von Cpf1 18-23 Nukleotide *downstream* der PAM-Sequenz, sodass diese durch den Reparaturmechanismus kaum beeinflusst wird, selbst wenn er NHEJ wäre (Zetsche et al. 2015). So erscheint es sinnvoller, das neuere CRISPR/Cpf1-System zu verwenden, wenn bestimmte Mutationen über ein co-transfiziertes Reparatur-Template eingebracht werden sollen.

Für diese Arbeit war unter anderem vorgesehen, eine weitere Zelllinie mit der homozygoten Substitution c.1624A>C zu generieren, welche beim Fetus 1176 identifiziert worden war. Damit sollte die Pathogenität der Mutation in direkter Weise bestätigt und die Mutation näher charakterisiert werden. Es wurde versucht, die Substitution mithilfe zweier Cas9-Nickasen, welche durch zwei einzelsträngige DNA-Einschnitte 5'-Überhänge erzeugen, zu generieren. Dies gelang im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht. Für einen wiederholenden Versuch sollte man daher die Cpf1-Nuklease nutzen, um die Chance der Reparatur durch HR zu erhöhen. Neben ihrer geringeren Größe wäre ein weiterer Vorteil, dass, im Gegensatz zu den zwei Cas9-Nickasen, nur

ein einziges Plasmid neben dem FAAP100-Template-Vektor, welcher c.1624A>C enthält, transfiziert werden muss.

Während dieser Arbeit konnte ich zwei Zelllinien generieren, die c.1624A>C auf nur einem Allel aufweisen. Mögliche Ursachen für die monoallelische Substitution könnten sein, dass nur eine Nickase aktiv war und folglich nur ein Allel geschnitten wurde oder dass ein homologer Arm während des Reparaturmechanismus nicht rekombinierte. Des Weiteren könnten die Nickasen auch nach Einfügen der Mutation noch aktiv gewesen sein, sodass ein wiederholtes Schneiden auftrat und durch die anschließende Reparatur wieder die wildtypische Base eingefügt wurde. Diesem Vorgang könnte man entgegenwirken, indem man in die PAM-Sequenz des Template-Vektors eine stille Mutation einfügt, sodass nach der HR, in der Teile der Template-Vektor-Sequenz in das Genom der Zelle übernommen werden, kein wiederholtes Schneiden möglich ist. Mehrfache DNA-Einschnitte muss man auch bei der Cas9-Nuklease in Betracht ziehen. So besteht die Möglichkeit, dass es sich bei editierten Sublinien, die eine Überlagerung im Elektropherogramm aufwiesen, nicht um eine Mischung aus wildtypischen und mutierten Zellen handelte, sondern dass hier ein wiederholtes Schneiden der Cas9-Nuklease stattgefunden hatte. So könnten durch das anschließende NHEJ weitere Mutationen auf unterschiedlichen Allelen entstanden sein, die sich im Elektropherogramm als Überlagerung widerspiegelten.

### **5. 1. 3. 2 Zellulärer FA-Phänotyp der FAAP100-CRISPR/Cas9-Zellen und Komplementationsanalyse**

Die Zellen der selbst generierten FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien Cr10, Cr12 und Cr21 sowie die kommerziell erworbenen HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>-Zellen reagierten hypersensitiv gegenüber MMC, was sich in einem induzierten G2-Phase-Arrest, einer induzierten Chromosomenbrüchigkeit sowie einer herabgesetzten Überlebensrate in Abhängigkeit von ansteigenden MMC-Konzentrationen zeigte. Zudem konnte in diesen Zellen keine FANCD2-Monoubiquitinierung mithilfe eines Immunblots nachgewiesen werden. Dies spiegelt das Ergebnis der siFAAP100-HeLa-Zellen wieder und bestätigt somit, dass FAAP100 *upstream* der FANCD2-Monoubiquitinierung innerhalb des FA-Signalweges lokalisiert ist (Ling et al. 2007). In dieser Hinsicht wiesen die FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien einen zellulären FA-Phänotyp auf, der mit dem anderer FA-Zelllinien vergleichbar ist. Dieser FA-typische Phänotyp konnte bei den Zelllinien Cr10, Cr12 sowie HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> durch FAAP100<sup>WT</sup> komplementiert werden, wonach nach MMC-Behandlung die Ergebnisse der Zellzyklus-, der Chromosomenbruchanalyse sowie der Überlebenskurven mit den Ergebnissen der parentalen HEK293T- bzw. HAP1-Zelllinien vergleichbar waren. Darüber hinaus war in den komplementierten Zelllinien die Monoubiquitinierung von FANCD2 nachweisbar. Die Zelllinie Cr21+FAAP100<sup>WT</sup> hingegen wies weiterhin eine FA-typische Hypersensitivität gegenüber MMC und das Fehlen der FANCD2-Monoubiquitinierung auf. Folglich konnte Cr21 nicht durch FAAP100<sup>WT</sup> komplementiert werden. Um zu bestätigen, dass dieses Ergebnis nicht nur auf den verwendeten Komplementationsansatz zurückzuführen war,

wurden alle Experimente mit zwei weiteren, unabhängigen Komplementationsansätzen dieser Zelllinie wiederholt. Diese zeigten allerdings auch eine Hypersensitivität gegenüber MMC, die nicht durch *FAAP100*<sup>WT</sup> komplementiert wurde.

Der Misserfolg der Komplementation dieser Zelllinie könnte auf sogenannte Off-Target-Effekte zurückzuführen sein. Ein Schneiden an einem nicht erwünschten DNA-Locus kann auftreten, wenn entweder eine dem PAM-Motiv (z. B. 5'-NAG) oder dem Protospacer-Element sehr ähnliche Sequenz vorliegt (Hsu et al. 2013). In dieser Arbeit waren durch fünf unterschiedliche CRISPR/Cas9-Tools für das Protospacer-Element *cr3* keine Off-Targets (<3 Basenfehlpaarungen) vorhergesagt worden. Für *cr2* wurden die Gene *CALML6* sowie *KANK1* mit jeweils zwei Basenfehlpaarungen als potentielle Off-Targets identifiziert. Aufgrund der Funktion dieser Gene, die jeweils nicht im Zusammenhang mit der DNA-Schadensreparatur steht, wurde von ihrer näheren Analyse abgesehen. Immer aber bleibt die Möglichkeit, dass andere Gene als *FAAP100* verändert worden waren, da unter Umständen bis zu fünf Basenfehlpaarungen von einer gRNA toleriert werden können (Fu et al. 2013). Die biallelische *FAAP100*-Mutation c.1583\_c.1586del in Cr21 ist allerdings durch Verwendung von zwei Cas9n-Nickaseplasmiden erzeugt worden, wodurch die Off-Target-Aktivität um ein 50-1 500-Faches im Vergleich zu der einer einzigen Cas9-Nuklease reduziert wird (Ran et al. 2013a). Sollte der zelluläre FA-Phänotyp bei Cr21+*FAAP100*<sup>WT</sup> tatsächlich auf Off-Target-Effekte zurückzuführen sein, müsste durch das Schneiden der Nickasen und die anschließende Reparatur ein Gen verändert worden sein, welches ebenfalls am FA-Signalweg beteiligt ist. In Anbetracht der etwa 20 000-25 000 Gene des Menschen (International Human Genome Sequencing 2004) erscheint eine Wahrscheinlichkeit von 0,11 % doch eher gering, dass eines der bisher 22 bekannten FA-Gene durch die zwei Cas9n-Plasmide mutiert worden war. Eine vielversprechende Möglichkeit, um herauszufinden, ob bei Cr21 neben *FAAP100* ein weiteres Gen verändert worden war, wäre eine Analyse durch das *Whole Genome Sequencing*. Mithilfe einer mitgeführten Referenz, z. B. gDNA des Fetus 1176, könnte man die komplette Genomsequenz der beiden Zelllinien vergleichen und so sicher bestätigen oder ausschließen, dass allein c.1583\_c.1586del in *FAAP100* zum Entstehen des zellulären FA-Phänotyps bei Cr21 führt. Mittlerweile wurden weitere Methoden beschrieben, um mögliche Off-Targets zu identifizieren. Beispielsweise können durch eine inaktive Form der Cas9-Nuklease alle Targets markiert, durch Chromatin-Immunpräzipitation aufgereinigt und schließlich sequenziert werden (Kuscu et al. 2014).

Eine zweite Ursache für das Fortbestehen des charakteristischen zellulären FA-Phänotyps bei Cr21+*FAAP100*<sup>WT</sup> wäre, dass p.(V528Efs\*52) in *FAAP100* eine dominant-negative Mutation darstellt, welche die Funktion von *FAAP100*<sup>WT</sup> beeinflusst. Ein dominant-negativer Effekt auf die Funktion des Wildtyp-Proteins war bereits bei Missense-Mutationen in *FANCR/RAD51* sowie *FANCF* beschrieben worden (Wu et al. 2010, Ameziane et al. 2015, Wang et al. 2015). So wiesen nicht-FA-Zellen, die mit *RAD51*<sup>T131P</sup> bzw. mit *FANCF*<sup>A349P</sup> transfiziert bzw. transduziert worden waren, beispielsweise eine Hypersensitivität gegenüber MMC auf, welche zuvor nicht nachweisbar

gewesen war (Wu et al. 2010, Wang et al. 2015). Bei Cr21 allerdings war durch das CRISPR/Cas9-System in *FAAP100* eine Frameshift-Mutation generiert worden, die laut *in silico*-Analysen zu einem Protein mit einem Gewicht 60,8 kDa führt. Folglich würde bei *FAAP100*<sup>V528Efs\*52</sup> einer der vier Inter-Links für die Interaktion mit FANCB fehlen. Dieser Umstand allein kann die MMC-Hypersensitivität von Cr21 erklären ohne einen zusätzlichen dominant-negativen Effekt annehmen zu müssen. Der gleiche Inter-Link wäre auch nicht bei *FAAP100*<sup>I545Nfs\*44</sup> von Cr10 vorhanden, für welches ein Molekulargewicht von 62 kDa vorhergesagt worden war. Cr10 jedoch konnte durch *FAAP100*<sup>WT</sup> komplementiert werden. Eine Expression der *FAAP100*-Proteine bei Cr21 sowie bei Cr10 konnte durch eine Immunblotanalyse mit dem Antikörper NBP1-90469 nicht bestätigt werden. Dieser bindet an ein Epitop im Bereich der Aminosäuren 196-311 und hätte trunkiertes *FAAP100* für Cr10 sowie für Cr21 nachweisen müssen. Demnach sind *FAAP100*<sup>V528Efs\*52</sup> und *FAAP100*<sup>I545Nfs\*44</sup> entweder instabil oder werden durch NMD abgebaut. Alternativ wäre es möglich, dass diese Proteine in einer so geringen Menge exprimiert werden, dass mit Hilfe des Antikörpers NBP1-90469 kein Signal detektiert werden konnte. In allen denkbaren Szenarien erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass *FAAP100*<sup>V528Efs\*52</sup> einen dominant-negativen Effekt auf *FAAP100*<sup>WT</sup> ausüben kann. Die tatsächliche Ursache der misslungenen Komplementation von Cr21 durch *FAAP100*<sup>WT</sup> bleibt im Rahmen dieser Arbeit also offen.

## 5. 2 Validierung von Antikörpern

Durch Proteinlysate der selbst generierten bzw. der kommerziell erworbenen *FAAP100*-CRISPR/Cas9-Zellen führte ich Immunblotanalysen zur Validierung von  $\alpha$ -*FAAP100*-Antikörpern durch. Mit Ausnahme von Cr12 kommt es in allen *FAAP100*-CRISPR/Cas9-Zelllinien durch die eingefügten Mutationen zu einer vorzeitigen Termination der Translation. Mit dem Antikörper ab155209 konnte kein trunkiertes bzw. ausgeknocktes *FAAP100* dieser Zelllinien nachgewiesen werden. Stattdessen detektierte er scheinbar sowohl in den Proteinlysaten der Kontrollzelllinien als auch in denen aller CRISPR/Cas9-Zelllinien *FAAP100* mit einem Gewicht von etwa 100 kDa in untereinander vergleichbarer Menge. Für Cr10, Cr21 sowie HAP1 *FAAP100*<sup>-/-</sup> war dies formal gesehen nicht möglich. Vermutlich ist es auf Kreuzreaktionen des Antikörpers zurückzuführen (Baker 2015), dass er an nicht-Target-Proteine band und so ein falsch-positives Ergebnis zeigte. Ferner konnte für ab155209 keine Überexpression transduzierter Zelllinien ausgemacht werden, was ebenfalls auf eine Kreuzreaktion des Antikörpers hinweist. 2011 wurden von Egelhofer und Kollegen über 200 Antikörper getestet, die gegen 57 unterschiedliche Histonmodifikationen gerichtet waren, davon 127 mithilfe von Immunblots. In Kernextrakt-Proteinproben aus *D. melanogaster* und *C. elegans* detektierten diese bei 26 % ein falsches Protein und bei 11 % gar kein Signal. Antikörper zeigten in humanen Gesamtzell-Proteinproben auf Immunblots eine noch höhere Rate an Kreuzreaktionen, die jedoch nicht näher klassifiziert wurden

(Egelhofer et al. 2011). Die Autoren dieser Veröffentlichung weisen darauf hin, dass es unabdingbar ist, Antikörper auf ihre Spezifität hin zu testen.

Durch die FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien war es möglich, die Spezifität von  $\alpha$ -FAAP100-Antikörpern zu überprüfen. Im Gegensatz zu ab155209 detektierten die beiden  $\alpha$ -FAAP100-Antikörper ab181185 und NBP1-90469 für Cr10, Cr21 sowie HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> kein FAAP100-Protein mit einem wildtypischen Molekulargewicht von etwa 100 kDa. Für Cr12 war das FAAP100-Signal reduziert. Somit waren ab181185 und NBP1-90469 spezifisch und damit erfolgreich validiert. Die Antikörper sind gegen unterschiedliche Epitope von FAAP100 gerichtet (ab181185: Epitop im Bereich der Aminosäure 750 bis zum C-Terminus, NBP1-90469: Epitop im Bereich der Aminosäuren 196-311), wodurch die Detektion verschiedener FAAP100-Proteinisoformen möglich wird. Bei ab181185 handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, wohingegen NBP1-90469 polyklonal ist. Obwohl für monoklonale Antikörper eine höhere Spezifität beschrieben wurde (Kimura et al. 2008), war kein Unterschied bei der Detektion von FAAP100-Protein durch ab181185 bzw. NBP1-90469 zu erkennen. Beide detektierten Wildtyp-FAAP100 bei den Kontrollzelllinien und eine verminderte FAAP100-Menge bei Cr12. Sie zeigten darüber hinaus überexprimiertes FAAP100 bei Zelllinien, die mit FAAP100<sup>WT</sup> oder FAAP100<sup>T542P</sup> transduziert worden waren.

Auch der verwendete  $\alpha$ -FANCB-Antikörper (ab186729) konnte nicht spezifisch FANCB nachweisen. Er detektierte im Proteinlysat der verwendeten FA-B-Zelllinie analog zu den Lysaten der Kontrollzelllinien ein Signal bei einem Molekulargewicht von ca. 98 kDa. Aufgrund der hemizygoten Mutation in dieser Zelllinie (c.829dup, p.(C277Lfs\*31)) wies das Protein, falls es translatiert werden würde, allerdings nur ein Gewicht von 35,2 kDa auf. Daraufhin wurden weitere  $\alpha$ -FANCB-Antikörper getestet. Im Rahmen dieser Arbeit blieb eine Validierung jedoch ohne Erfolg.

Aktuell haben mehrere Firmen, darunter auch Abcam, begonnen, ihr Antikörper-Portfolio mithilfe von Knockout- und/oder Knockdown-Zellen neu zu validieren. Abcam nutzt hierfür die über das CRISPR/Cas9-System generierten Knockout-Zellen von Horizon Discovery und verspricht auf der Homepage (<http://www.abcam.com/primary-antibodies/knockout-validation>), alle unspezifischen Antikörper aus ihrem Angebot zu nehmen. So ist seit kurzer Zeit der  $\alpha$ -FAAP100-Antikörper ab155209 nicht mehr zu erwerben und auch das Produkt ab186729 ( $\alpha$ -FANCB) dürfte bald nicht mehr zur Verfügung stehen.

### 5.3 *FAAP100* als FA-Gen

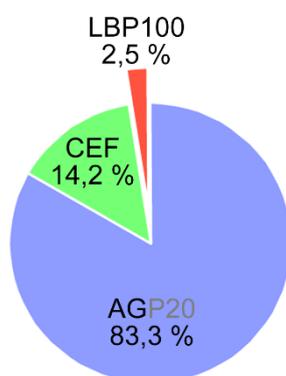
#### 5.3.1 Typischer FA-Phänotyp durch c.1624A>C in *FAAP100* bei Fetus 1176

Anhand eines typischen zellulären FA-Phänotyps, der sich durch einen spontanen sowie induzierten G2-Phase-Arrest im Zellzyklus, einer induzierten Chromosomenbrüchigkeit sowie einer herabgesetzten Überlebensrate der Zellen nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen an ICL-induzierenden Agenzien zeigte und mit den Zellen anderer FA-Patienten vergleichbar war, konnte in Verbindung mit den vorliegenden FA-typischen Fehlbildungen für den Fetus 1176 die Verdachtsdiagnose FA bestätigt werden. Als Ursache wurde durch eine molekulargenetische Analyse homozygot die Substitution c.1624A>C in *FAAP100* Exon 5 identifiziert, welche innerhalb der Familie von Fetus 1176 segregiert und auf Proteinebene zur Missense-Mutation p.(T542P) führt. Die Zelllinie 1176 konnte mit wildtypischer *FAAP100*-cDNA, aber nicht durch den pLVX-Leervektor bzw. der *FAAP100*-cDNA mit c.1624A>C, komplementiert werden. Damit wurde der typische zelluläre FA-Phänotyp aufgehoben und bewiesen, dass p.(T542P) in *FAAP100* ursächlich für FA bei 1176 war.

Die Auffälligkeiten des Fetus, die bei einer Ultraschalluntersuchung und postmortal festgestellt worden waren, zeigten sich in Herzfehlern (größerer, muskulärer oder Inlet-Ventrikelseptumdefekt, kleiner Ausflusstrakt), einem Hydrozephalus sowie einer Radius- und Daumenaplasie und dem pathologischen maternalen Doppler, welcher auf eine Wachstumsretardierung schließen ließ. In der FA-Literatur werden diese Merkmale mit 6 % (Herz), 20 % (Mikro- und Hydrozephalus), 7 % (Radius) und 40 % (Mikrosomie) angegeben (Shimamura & Alter 2010). Daneben konnte während der Ultraschalluntersuchung bei dem Fetus eine Duodenalstenose oder -atresie mit Double-Bubble-Phänomen festgestellt werden. Diese Kombination von Auffälligkeiten wird auch oftmals bei der VACTERL-H-Assoziation beschrieben, wobei die Duodenalstenose bzw. -atresie in gleicher Weise wie eine Ösophagusatresie (*esophageal atresia*) gewertet werden kann (Alter & Rosenberg 2013). Von Faivre et al. (2005) wurden bei 5 % von 245 untersuchten FA-Patienten ein VACTERL-Phänotyp und von Alter und Giri (2016) bei 33 % (18/54 FA-Patienten) eine VACTERL-H-Assoziation beschrieben (Faivre et al. 2005, Alter & Giri 2016). Somit wies der Fetus 1176 durch die Herzfehler, der Duodenalatresie, der Radiusaplasie und dem Hydrozephalus mindestens die vier Merkmale CEL-H (*cardiac anomalies, esophageal atresia, limb anomalies, hydrocephalus*) von VACTERL-H-Patienten auf und ihm kann definitionsgemäß ebenfalls die Diagnose VACTERL-H zugeordnet werden (Alter & Rosenberg 2013). Ob noch weitere Übereinstimmungen wie z. B. renale Strukturanomalien bei 1176 vorlagen, bleibt offen. Alter und Rosenberg publizierten 2013 für FA-VATER-Patienten eine geringere Lebenserwartung sowie eine frühere Krebsentstehung im Vergleich zu FA-Patienten ohne VATER-Phänotyp (Alter & Rosenberg 2013). Dagegen wurde drei Jahre später nur eine leichte Tendenz ermittelt, dass FA-Patienten mit VACTERL-H-Assoziation eine geringere

Lebenserwartung aufweisen als FA-Patienten ohne diese Merkmale (Alter & Giri 2016). Hinsichtlich eines BMF sowie einer Krebsentstehung waren jedoch keine Unterschiede zwischen FA-Patienten mit und ohne VACTERL-H-Assoziation feststellbar. Frameshift-Mutationen bei drei FA-L-Fällen wiesen einen sehr schweren FA-VACTERL-Phänotyp auf (Vetro et al. 2015). In einem Fall wurde die Schwangerschaft abgebrochen, sodass keine Aussage über eine Lebensfähigkeit getroffen werden konnte. Die anderen beiden Kinder starben sehr früh postnatal. Alle klinischen Merkmale, die bei Fetus 1176 diagnostiziert worden waren, wurden auch bei zwei bzw. bei allen drei der bei Vetro et al. beschriebenen FA-L-Fälle festgestellt. So wiesen beispielsweise alle drei Kinder Herzfehler, Wachstumsretardierung, Radiusaplasie sowie Ösophagus- bzw. Analtresie auf. Hydrozephalus (VACTERL-H) wurde bei einem Abort sowie einem lebend geborenen Kind diagnostiziert. Hinsichtlich eines klinischen Verlaufs, insbesondere ob Knochenmarksversagen, das namensgebende FA-Merkmal, aufgetreten wäre oder eine Tumorbildung, kann bei 1176 keine Aussage getroffen werden. Aufgrund der bereits bei der Ultraschalluntersuchung ermittelten Fehlbildungen des Herzens, des Verdauungstraktes sowie des Kopfes wäre ein schwererer Verlauf der FA wahrscheinlich gewesen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Mutationen in *FAAP100* prinzipiell pränatal letal sind. Ein Argument dafür ist, dass *FAAP100* seit über zehn Jahren als FA-Kandidatengen angesehen wird und dennoch kein Patient mit Mutationen in diesem Gen identifiziert werden konnte (Ling et al. 2007). Als möglicherweise häufig pränatal letal wurden biallelische Null-Mutationen in *FANCD2*, *FANCI* sowie in *FANCD1* diskutiert (Howlett et al. 2002, Kalb et al. 2007, Sims et al. 2007).

Betrachtet man nun nach der Identifizierung von c.1624A>C in *FAAP100* bei 1176 die Verteilung der drei Subkomplexe der *upstream* des ID2-Komplexes gelegenen Proteine, die sich für eine intakte *FANCD2*-Monoubiquitinierung zusammenlagern müssen, können nach wie vor dem Modul LBP100 mit 2,5 % die wenigsten FA-Patienten (28 FA-B, 7 FA-L, 1 *FAAP100*) zugewiesen werden (Abbildung 69).



**Abbildung 69: Verteilung der FA-Kernkomplex-Komplementationsgruppen nach Identifizierung der pathogenen Mutation c.1624A>C in *FAAP100*.** Die meisten FA-Patienten weisen Mutationen in *FANCA* oder *FANG* auf. Somit nimmt der Subkomplex AGP20 den größten Anteil bei der Verteilung der FA-Kernkomplex-Komplementationsgruppen ein (blau). Die zweitgrößte Gruppe stellt der Subkomplex CEF dar (grün). Die wenigsten FA-Patienten weisen Mutationen in *FANCL*, *FANCB* oder *FAAP100* auf (rot). In dem Gen *FAAP20* wurden bisher keine Patientenmutationen identifiziert, daher ist es mit einer grauen Schriftfarbe markiert. Mit Ausnahme von *FAAP100* (Ergebnis der vorliegenden Arbeit) wurde die Patientenzuordnung zu den FA-Komplementationsgruppen der *Fanconi Anemia Mutation Database* (<http://www2.rockefeller.edu/fanconi/>) entnommen.

Dies könnte andeuten, dass vor allem Mutationen in *FANCA* oder *FANCG* vergleichsweise leichter toleriert werden und mit einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit verbunden sind als

Mutationen in *FANCB*, *FANCL* oder *FAAP100*. Obwohl es für FA keine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation gibt (Neveling et al. 2009), spiegelt die Verteilung der Komplementationgruppen die Wichtigkeit der einzelnen Gene bezüglich ihrer Funktion innerhalb des FA-Signalweges wider und hebt LBP100 als das bedeutendste Modul hervor (Huang et al. 2014). Als Teil des katalytischen Moduls nimmt FAAP100 eine essentielle Rolle ein, was anhand von funktionellen Analysen nachgewiesen wurde.

## 5. 4 Auswirkungen von FAAP100-Mutationen auf den FA-Signalweg sowie die DNA-Schadensreparatur

### 5. 4. 1 Fehlende Komplexbildung von LBP100 bei mutiertem FAAP100

Für FAAP100 wurde gezeigt, dass das Protein ein fester Bestandteil des FA-Kernkomplexes und für die intakte Ausbildung des katalytischen LBP100-Subkomplexes essentiell ist (Ling et al. 2007, Huang et al. 2014, Swuec et al. 2017). Die Interaktion zwischen FAAP100 und *FANCB* findet direkt über vier Inter-Link-Positionen statt (Swuec et al. 2017). Zudem wurde in FAAP100 sowie in *FANCB* eine potentielle Coiled-Coil-Domäne beschrieben, über die eine direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen und mit anderen FA-Kernkomplex-Proteinen vermittelt werden könnte (Ling et al. 2007). Zwischen FAAP100 und *FANCL* wird eine Wechselwirkung nur ausgeübt, wenn *FANCB* vorhanden ist (Ling et al. 2007). Durch das *Mammalian Two- bzw. Three-Hybrid* System konnte ich dies innerhalb der vorliegenden Arbeit bestätigen. Darüber hinaus wurde mit dieser Methode die Auswirkung der Aminosäuresubstitution p.(T542P) des Fetus 1176 im Hinblick auf die LBP100-Subkomplexausbildung untersucht. Es zeigte sich, dass als Folge von p.(T542P) in FAAP100 keine Interaktion zwischen FAAP100<sup>T542P</sup> und *FANCB* ausgebildet wird. Durch Co-Immunpräzipitationen konnte diese Beobachtung bestätigt und nachgewiesen werden, dass FAAP100 und *FANCB* in Cr12-Zellen, in denen die FAAP100-Mutation p.(L543\_S551del) vorliegt, ebenfalls nicht miteinander interagieren. Weder p.(T542P) noch p.(L543\_S551del) sind in einer Region der vier Inter-Links bzw. in der potentiellen Coiled-Coil-Domäne lokalisiert (Ling et al. 2007, Swuec et al. 2017), sondern liegen über 60 Aminosäuren vom nächsten Inter-Link bzw. etwa 45 Aminosäuren von der Coiled-Coil-Domäne entfernt. So ist es nicht möglich, direkte Rückschlüsse auf die Ursache der fehlenden FAAP100-*FANCB*-Interaktion zu ziehen. Da für FAAP100 bisher keine Proteinstruktur beschrieben wurde, bleibt die genaue Ursache der gestörten Proteininteraktion offen. Möglicherweise üben die veränderten Proteinsequenzen trotz der Entfernung zu den Inter-Links bzw. zur Coiled-Coil-Domäne auf diese einen Einfluss aus oder ebenso könnte in der mutierten Region eine weitere wichtige Proteindomäne liegen, die für die Interaktion mit *FANCB* essentiell ist. *In silico*-Analysen ergaben, dass sowohl p.(T542P) als auch p.(L543\_S551del) in einem  $\beta$ -Faltblatt lokalisiert sind. Vermutlich wird durch die Mutation jeweils die Proteinfaltung beeinträchtigt und so der Funktionsverlust von FAAP100 hervorgerufen.

Aufgrund der fehlenden Wechselwirkung zwischen FAAP100<sup>T542P</sup> und FANCB war für FAAP100<sup>T542P</sup> auch mithilfe des *Mammalian Three-Hybrid* Systems keine indirekte Interaktion mit FANCL nachweisbar. Somit war bestätigt, dass der Subkomplex LBP100 nicht gebildet werden kann.

Abgesehen von Cr12 wiesen die durch das CRISPR/Cas9-System generierten Zelllinien Cr10, Cr21 sowie HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup> allesamt Frameshift-Mutationen auf, die zu keiner FAAP100-Translation führten. Aber auch wenn FAAP100 in diesen Zellen exprimiert würde, wäre eine intakte Funktion im Zusammenhang mit der DNA-Schadensreparatur unwahrscheinlich. Denn mögliche trunkierte FAAP100-Proteine würden entweder nur drei der vier Inter-Link-Positionen (Cr10, Cr21) bzw. gar keine Inter-Links sowie keine Coiled-Coil-Domäne (HAP1 FAAP100<sup>-/-</sup>) aufweisen. So könnte FAAP100 in diesen Zelllinien nicht mit FANCB, und folglich auch nicht mit FANCL, interagieren.

#### 5. 4. 2 Degradierung von FANCB und FANCL durch mutiertes FAAP100

Aufgrund der FAAP100-Mutationen, die zu einem Fehlen der direkten oder indirekten Interaktion zwischen FAAP100 und FANCB bzw. FANCL führen, kann keine Komplexbildung von LBP100 stattfinden. Dies bestätigte auch unser Kooperationspartner Yanbin Zhang, Miami, dem es aufgrund von p.(T542P) in FAAP100 nicht gelang, LBP100<sup>T542P</sup> als Komplex aufzureinigen, was im Gegensatz für LBP100<sup>WT</sup> möglich war. Nur mit intaktem FAAP100 kann ein stabiler LBP100-Komplex gebildet werden. Das Vorhandensein aller drei Proteine ist demnach für die Funktion des katalytischen Moduls essentiell. Fehlt eine Komponente, führt dies zur Instabilität und Degradierung der jeweils beiden anderen Proteine (Ling et al. 2007, Swuec et al. 2017). So wurde von Swuec et al. (2017) publiziert, dass FANCB nicht ohne FAAP100 aufgereinigt werden konnte. Da FAAP100 keine direkte Interaktion mit FANCL ausbildet, war es den Autoren auch nicht möglich, ein FANCL-FAAP100-Heterodimer aufzureinigen. Im Gegensatz dazu gelang es, BP100 ohne FANCL zu isolieren. BP100 ohne FANCL wies allerdings eine sehr hohe Flexibilität auf, die erst durch FANCL stabilisiert werden konnte (Swuec et al. 2017). Die Instabilität bzw. Degradierung einzelner LBP100-Komponenten als Folge der FAAP100-Mutationen untersuchte ich in der vorliegenden Arbeit anhand von Verdünnungsblots. Für 1176-, Cr12- sowie FA-B-Zellen ließ sich eine FAAP100-Expression nachgewiesen, die jedoch im Vergleich zur FAAP100-Menge von Kontrollzellen (nicht-FA, HEK293T, FA-A) reduziert war. Umgekehrt wurde in 1176- sowie in FA-B-Zellen eine verminderte FANCL-Menge detektiert. Im Gegensatz dazu war das Proteinlevel von FANCB in 1176- sowie in Cr12-Zellen etwa mit dem von Kontrollzellen vergleichbar und kaum reduziert. Dabei ist zu bedenken, dass die FA-B-Zelllinie nach *in silico*-Analysen ein trunkiertes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa aufweisen würde, falls es nicht durch NMD abgebaut wird oder instabil wäre. Da der  $\alpha$ -FANCB-Antikörper ab186729 für diese Zelllinie allerdings ein Protein von etwa 98 kDa detektierte, war bestätigt, dass ab186729 aufgrund von Kreuzreaktionen unspezifisch war. So ist anzunehmen, dass die nicht-reduzierte FANCB-Proteinmenge in 1176- sowie in Cr12-Zellen ein falsches Ergebnis

widerspiegelt. Die von Ling et al. (2007) durchgeführten Immunblotanalysen mit Proteinlysaten aus Zellen, in denen FAAP100 durch siRNA herunterreguliert worden war, zeigten sowohl ein deutlich reduziertes FANCB- als auch FANCL-Level (Ling et al. 2007). Demnach müsste die FANCB-Menge der 1176- und der Cr12-Zellen eigentlich ebenfalls vermindert sein. Stünde zur Bestätigung dieser Annahme ein validierter  $\alpha$ -FANCB-Antikörper zur Verfügung, wäre es möglich, zu beweisen, dass Mutationen in FAAP100 bzw. in FANCB neben der eigenen Proteinexpression auch die der jeweils anderen LBP100-Proteine beeinflussen. Ling et al. (2007) gelang es, in Proteinextrakten aus FA-L- und aus FA-B-Zellen vermindertes FAAP100 nachzuweisen (Ling et al. 2007). Zudem ermittelten Medhurst et al. (2006) und Meetei et al. (2004) in Proteinextrakten bzw. -lysaten aus FA-B-Zellen bzw. aus mit siRNA gegen *FANCB* transfizierten Zellen vermindertes FANCL (Meetei et al. 2004, Medhurst et al. 2006). Auf Basis dieser Literaturangaben kann, mit Ausnahme der in der vorliegenden Arbeit detektierten, scheinbar normalen FANCB-Menge, durch die Immunblotanalysen bestätigt werden, dass die Stabilität des Subkomplexes LBP100 von jeder einzelnen Komponente abhängt und sich die Proteine gegenseitig vor Degradierung schützen (Ling et al. 2007). Um eine funktionelle Einheit zu bilden, müssen demnach FANCL, FANCB sowie FAAP100 als intakte Proteine exprimiert werden, was durch pathogene Mutationen verhindert wird.

Die RNA-Expressionsstärke im Falle von *FAAP100*-Mutationen im Vergleich zum Wildtyp könnte durch eine qPCR untersucht werden. Mithilfe von die Mutation flankierenden Primern oder zusätzlich durch Allel-spezifische Primer würde man *FAAP100*-cDNA von RNA aus 1176- bzw. aus Cr12- sowie aus nicht-FA-Zellen amplifizieren, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen quantifizieren und auf diesem Wege die Expressionsstärke der jeweiligen *FAAP100*-RNA ermitteln. Durch den Vergleich der Ergebnisse erhielt man eine eindeutige Aussage, wie stark die Transkription von *FAAP100* mit c.1624A>C (1176) bzw. mit c.1627\_c.1653del (Cr12) im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist. Auf gleiche Weise könnte auch die Expression von *FANCL* und *FANCB* untersucht werden.

#### **5. 4. 3 Kein Nukleustransport von mutiertem FAAP100**

Damit die Monoubiquitinierung des ID2-Komplexes, das Schlüsselereignis des FA-Signalweges, stattfinden kann, muss der Transport der FA-Kernkomplex-Proteine zur Schadensstelle erfolgen. Durch Ling et al. (2007) war gezeigt worden, dass der LBP100-Subkomplex nur als Einheit und in Abhängigkeit von FANCA sowie FANCM in den Nukleus transportiert werden kann (Ling et al. 2007). Durch *in silico*-Analysen innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde ermittelt, dass weder FANCL noch FAAP100 ein eigenes Kernlokalisierungssignal besitzen, und demnach ein Nukleustransport von LBP100 als Einheit wahrscheinlich ist. In der Literatur wurden für FAAP100 und FANCL bisher ebenfalls keine NLS beschrieben. Einzig für FANCB wurden potentielle nukleäre Lokalisationssequenzen publiziert (Meetei et al. 2004), die durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in silico*-Analysen bestätigt wurden.

Durch die Ergebnisse der Interaktionsstudien war bewiesen, dass aufgrund der Mutationen p.(T542P) der Zelllinie 1176 sowie p.(L543\_S551del) der Zelllinie Cr12 keine LBP100-Subkomplexbildung erfolgt. Demnach war zu erwarten, dass der Transport von mutiertem FAAP100 in den Zellkern gestört sein sollte, was durch subzelluläre Proteinfractionierung und anschließende Immunblotanalyse bestätigt wurde. So ist FAAP100<sup>T542P</sup> bzw. FAAP100<sup>L543\_S551del</sup> der Zelllinien 1176 bzw. Cr12- nur im Zytoplasma lokalisiert. Es kann nicht in den Zellkern und somit auch nicht ans Chromatin transportiert werden, wo die Monoubiquitinierung von FANCD2 stattfindet.

#### 5. 4. 4 Keine Aktivierung der DNA-Schadensreparatur durch mutiertes FAAP100

Der genaue Ablauf der FANCD2-Monoubiquitinierung, wodurch die FA-abhängige DNA-Schadensreparatur aktiviert wird, ist bis heute nicht in vollem Umfang geklärt. Allerdings ist bekannt, dass die Monoubiquitinierung nur vollständig erfolgen kann, wenn sich die Subkomplexe LBP100 und CEF in korrekter Weise zusammenfinden (Huang et al. 2014, van Twest et al. 2017). *In vitro* wurde gezeigt, dass AGP20 für diesen Prozess nicht absolut notwendig ist, sondern eher eine Rolle bei der Lokalisation des katalytischen Moduls des FA-Kernkomplexes an der Schadensstelle einnimmt. Das Ausschalten von AGP20 oder CEF *in vitro* führte dazu, dass nur noch eine schwache Monoubiquitinierung von FANCD2 nachweisbar war. Wurde hingegen das katalytische Modul LBP100 herunterreguliert, war überhaupt keine Monoubiquitinierung mehr zu verzeichnen (Huang et al. 2014, Rajendra et al. 2014). Für Patientenzellen hingegen ist es weniger bedeutend, in welchem dieser *upstream*-Proteine biallelische Mutationen vorliegen, denn für die meisten Mutationen in ihnen konnte keine FANCD2-Monoubiquitinierung nachgewiesen werden (Huang et al. 2014, Rajendra et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit zeigte ich, dass sowohl bei 1176- als auch bei allen FAAP100-CRISPR/Cas9-Zellen FANCD2 nicht monoubiquitiniert werden kann. Für HeLa-Zellen, in denen FAAP100 mittels siRNA herunterreguliert worden war, traf dies ebenfalls zu. Diese Ergebnisse bestätigen, dass FAAP100 *upstream* des ID2-Komplexes lokalisiert ist und bei der FANCD2-Monoubiquitinierung eine essentielle Rolle einnimmt (Ling et al. 2007). Durch die Komplementation von 1176- sowie von FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien mit FAAP100<sup>WT</sup> konnte die Monoubiquitinierung von FANCD2 wiederhergestellt werden. Damit wird die FA-abhängige DNA-Schadensreparatur aktiviert, was anhand der Bildung von FANCD2-Foci überprüft wurde. So bleibt in 1176-Zellen die Reparatur durch HR aus, erkennbar daran, dass 1176-Zellen kaum Foci-positive Zellkerne aufwiesen. Dagegen wurde bei der komplementierten Zelllinie 1176+FAAP100<sup>WT</sup> eine FANCD2-Foci-Formation beobachtet, die mit derjenigen von nicht-FA-Zelllinien vergleichbar war. So kann in diesen Zellen der FA-abhängige DNA-Reparaturmechanismus aktiviert werden.

Durch die biochemische Analysen von Yanbin Zhang, Miami, wurde der Einfluss der FAAP100-Mutation p.(T542P) auf die Stärke der Monoubiquitinierung *in vitro* überprüft. Lag in diesem System neben FANCB und FANCL das mutierte FAAP100<sup>T542P</sup> vor, so wurde etwa nur ein Drittel

der FANCD2-Monoubiquitinierung erreicht, die durch LBP100<sup>WT</sup> vermittelt worden war. Sie war somit etwa mit dem Monoubiquitinierungslevel vergleichbar, das durch die katalytische Funktion von FANCL alleine erreicht werden konnte. Von Rajendra et al. (2014) war ebenfalls in einem definierten biochemischen System gezeigt worden, dass der Subkomplex LBP100 eine fünf- bis sechsfach höhere Aktivität bei der FANCD2-Ubiquitinierungsreaktion aufweist als FANCL alleine (Rajendra et al. 2014). Die Wissenschaftler publizierten darüber hinaus, dass durch FANCL alleine nur eine sehr schwache und zudem unspezifische Ubiquitinierung von FANCD2 erfolgen kann. Für eine stabile FANCD2-Monoubiquitinierung ist als minimale Einheit jedoch LBP100 erforderlich. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Ubiquitinierungsaktivität von FANCL wies eine vergleichbare Stärke wie die FANCL-Aktivität in der Studie von Rajendra et al. (2014) auf. So ist anzunehmen, dass die geringe Ubiquitinierungsaktivität von LBP100<sup>T542P</sup> ebenfalls unspezifisch ist.

Es wurde auch gezeigt, dass ohne FANCL gar keine FANCD2-Monoubiquitinierungsaktivität gemessen werden kann. Bei Anwesenheit von FANCL wurde sie durch das Hinzufügen von FANCB oder FAAP100<sup>WT</sup> gesteigert. Doch erst wenn der intakte LBP100<sup>WT</sup>-Subkomplex in seiner Gesamtheit vorlag, war die stärkste Monoubiquitinierung von FANCD2 messbar. Durch Swuec et al. (2017) war beschrieben worden, dass zwei FANCB-Moleküle zusammen mit zwei FAAP100-Molekülen das Zentrum des katalytischen Moduls bilden und nur bei deren Präsenz zwei FANCL-Moleküle richtig positioniert werden können (Swuec et al. 2017). Durch die Mutation p.(T542P) in FAAP100 wird keine Interaktion mit FANCB aufgebaut, was durch das *Mammalian Two-Hybrid* System sowie die Co-Immünpräzipitation bewiesen worden war. Dadurch kommen kein stabiles Gerüst aus BP100 für die Bindung von FANCL und folglich keine stabile FANCD2-Monoubiquitinierungsreaktion zustande.

Eine maximale Monoubiquitinierung von FANCD2 erfolgt jedoch erst, wenn neben LBP100 auch CEF vorliegt (van Twest et al. 2017). AGP20 scheint für diesen Prozess nicht essentiell zu sein, jedoch vermuteten Huang et al. (2014), dass AGP20 die Lokalisierung von LBP100 an die DNA-Schadensstelle unterstützt (Huang et al. 2014). Da auch publiziert wurde (van Twest et al. 2017), dass ohne FAAP100 zwar der CEF-Komplex noch an LB binden kann, jedoch AGP20 nicht länger mit diesen Proteinen assoziiert ist, könnte es möglich sein, dass über FAAP100 die Wechselwirkung des katalytischen Moduls LBP100 mit AGP20 ausgebildet wird und FAAP100 damit das Bindeglied für die korrekte Rekrutierung des katalytischen Moduls zum Schadensort darstellt.

## 5.5 *In vivo* Knockout von Faap100 anhand eines Mausmodells

Um ein Gen einer neuen FA-Komplementationsgruppe zuzuweisen, sollten in mindestens zwei Patienten pathogene FA-Mutationen nachgewiesen werden (Joenje et al. 2000). Da für die zwei zuletzt beschriebenen FA-Gene *FANCV* und *FANCW* jeweils nur ein FA-Patient identifiziert

werden konnte, wurden in diesen Fällen *in vivo*-Modelle hinzugezogen. Für die Charakterisierung von FANCV stand bereits ein Mausmodell zur Verfügung, für FANCW wurde innerhalb der Studie eine Knockout-Maus hergestellt (Watanabe et al. 2013, Bluteau et al. 2016, Knies et al. 2017). Beide Tiermodelle zeigten einen mit den bereits vorhandenen FA-Mäusen vergleichbaren Phänotyp. Für die *in vivo*-Charakterisierung von FAAP100 wurde ebenfalls das Mausmodell genutzt und nach der erfolgreichen Herstellung der Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse deren äußerer sowie zellulärer FA-Phänotyp analysiert.

### 5. 5. 1 Schwerer klinischer FA-Phänotyp der Faap100<sup>-/-</sup>- sowie Faap100<sup>+/-</sup>-Mäuse

Die Genotypenverteilung der Nachkommen von Faap100<sup>+/-</sup>-Mäusen erfolgte hoch signifikant nicht nach den Mendelschen Vererbungsregeln. Der Anteil von Faap100<sup>-/-</sup>-Mäusen lag mit 6 % stark unter den erwarteten 25 %. Damit ist ein Hinweis auf embryonale Letalität gegeben. Diese Beobachtung ist vereinbar mit den Erkenntnissen zu einigen anderen FA-Mausmodellen (Pirouz et al. 2013, Watanabe et al. 2013, Hodkinson et al. 2014, Knies et al. 2017). Der Anteil von 6% Faap100<sup>-/-</sup>-Mäusen unter den Nachkommen von Faap<sup>+/-</sup>-Mäusen war vergleichsweise gering, bedeutet jedoch keine vollständige embryonale Letalität, wie es beispielsweise für Knockouts von *Fancd1*, *Fancn*, *Fanco*, *Fancr*, *Fancs* und *Fancu* beschrieben worden ist (Gowen et al. 1996, Lim & Hasty 1996, Ludwig et al. 1997, Deans et al. 2000, Kuznetsov et al. 2007, Rantakari et al. 2010). Für die Lebensfähigkeit der Fanc1<sup>-/-</sup>-Maus war es relevant, welchen genetischen Hintergrund die Tiere aufwiesen. So waren lediglich homozygote Knockout-Mäuse eines reinen 129/Sv oder eines 129/Sv \* C57BL/6 F1 Hintergrundes embryonal letal (Agoulnik et al. 2002). Für den Faap100<sup>-/-</sup>-Knockout innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde ein C57BL/6-Mausstamm verwendet. Knockouts bei C57BL/6-Mäusen scheinen allgemein einen schwereren Phänotyp hervorzurufen als FA-Gen-Knockouts bei anderen Mausstämmen. Dies konnte beispielsweise an *Fancd2*<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt werden, bei denen perinatale Letalität und Mikrophthalmie nur bei einem C57BL/6-Hintergrund auftraten (Houghtaling et al. 2003). Die embryonale Letalität für Fanc1<sup>-/-</sup>-Mäuse war jedoch nicht in einem reinen C57BL/6-Stamm zu verzeichnen gewesen (Agoulnik et al. 2002). Folglich ist es auch für Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht auszuschließen, dass der Knockout in Mäusen mit einem anderen genetischen Hintergrund als C57BL/6 vollständig embryonal letal sein könnte.

Die Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen Hypogonadismus auf und zeigten keine Spermien- und Eizellfollikel-Bildung. Somit waren diese Tiere infertil und die Züchtung von Faap100<sup>-/-</sup>-MEFs musste durch Kreuzung von Faap100<sup>+/-</sup>-Mäusen erfolgen. Des Weiteren wurde durch Längen- und Gewichtsmessungen eine Wachstumsretardierung der Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse ersichtlich. Infertilität bzw. reduzierte Fertilität sowie Wachstumsretardierung (vergleiche Abschnitt 1. 7, Tabelle 2) sind die häufigsten klinischen Phänotypen von FA-Mäusen (Bakker et al. 2013).

Darüber hinaus wurden in einigen Faap100<sup>-/-</sup>-Mäusen Anophthalmie, Extremitäten-Anomalien und Hydrozephalus beobachtet. Die Anteile solcher Tiere waren jedoch aufgrund der geringen

Anzahl untersuchter Faap100<sup>+/-</sup>-Mäuse nicht signifikant von der berichteten basalen Fehlbildungsrate in C57BL/6-Inzuchtstämmen unterschiedlich. In den bisherigen eigenen Versuchsreihen wiesen allerdings nur Faap100<sup>+/-</sup>- und Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse Anomalien auf. Bei keiner Faap100<sup>+/+</sup>-Maus konnten ein Hydrozephalus oder Anomalien der Augen beobachtet werden. So sollte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Fehlbildungen tatsächlich um einen FA-Phänotyp handelt bzw. ein basaler Phänotyp durch das Ausknocken von Faap100 verstärkt wurde. Verglichen mit anderen FA-Mäusen ähnelt dieser Phänotyp am stärksten dem von Fancp<sup>-/-</sup>-Mäusen, für die Infertilität, Wachstumsretardierung, Hydrozephalus, Mikrophthalmie und teilweise embryonale Letalität bei Tieren mit Entwicklungsanomalien beschrieben worden sind (Crossan et al. 2011). Die Faap100-Maus in der vorliegenden Arbeit, welche Anomalien an allen Extremitäten aufwies, wurde ebenfalls tot geboren. Allerdings handelte es sich hierbei nicht um einen Faap100<sup>-/-</sup>- sondern um einen Faap100<sup>+/-</sup>-Genotyp. Bei je einer weiteren Faap100<sup>+/-</sup>-Maus wurde ein Hydrozephalus bzw. eine Anophthalmie des rechten Auges verzeichnet. Aufgrund des rezessiven Erbgangs von FA (Ausnahme *FANCR*) würde man davon ausgehen, dass heterozygote FA-Mäuse keine Auffälligkeiten zeigen. Dass es sich bei 50 % der Faap100-Tiere (3/6 Tieren), die Anomalien aufwiesen, um einen heterozygoten Genotyp handelt, muss man eine partielle Penetranz des Faap100-Knockouts bei Mäusen vermuten. Auch reflektiert dieses Phänomen vielleicht die Schwere des Phänotyps infolge des Faap100-Knockouts. Bei Fancp<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde Leukopenie und Thrombozytopenie beschrieben (Crossan et al. 2011). In einem Alter von sechs Monaten konnten bei Faap100<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Abweichungen von normalen Blutwerten festgestellt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt kann allerdings keine Aussage gemacht werden, ob sich im fortschreitenden Alter die Blutwerte verschlechtern. Langzeit-Blutuntersuchungen stehen noch aus. Ebenso muss für Faap100<sup>-/-</sup>-Tiere die mögliche Entwicklung maligner Tumore offenbleiben, da auch hierfür eine Beobachtung über einen größeren Zeitraum nötig ist. Bei Fancp<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden die Endpunkte Erschöpfung hämatopoetischer Stammzellen und Krebshäufigkeit innerhalb einer Zwei-Jahres-Studie analysiert (Crossan et al. 2011).

Überwiegend zeigen FA-Mäuse einen schwereren Phänotyp, wenn ein *downstream*-Gen im Vergleich zu einem *upstream*-FA-Gen ausgeknockt wurde. Vergleicht man Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Fancb<sup>-/-</sup>- und Fanc1<sup>-/-</sup>-Mäusen, die neben Infertilität aufgrund von Hypogonadismus nur eine Wachstumsretardierung aufweisen (Agoulnik et al. 2002, Du et al. 2015, Kato et al. 2015), wird bei Faap100<sup>-/-</sup>-Mäusen ein FA-Phänotyp ersichtlich, welcher ähnlich bisher nur für *downstream*-Mäuse publiziert worden war. *Upstream* konnten nur für eine der Fanca<sup>-/-</sup>-Mäuse neben Hypogonadismus, Wachstumsretardierung und Mikrophthalmie auch kraniofasziale Fehlbildungen beschrieben werden, aber nur wenn der genetische Hintergrund ein C57BL/6-Stamm war (Wong et al. 2003). Somit liegt trotz weniger bisher analysierter Faap100<sup>-/-</sup>-Mäuse die Vermutung nahe, dass sie einen schweren unter den beobachteten *upstream*-FA-Maus-Phänotypen aufweisen.

### 5. 5. 2 Typischer zellulärer FA-Phänotyp der *Faap100*<sup>-/-</sup>-Mäuse

Primäre und immortalisierte *Faap100*<sup>-/-</sup>-MEFs wiesen Hypersensitivität gegenüber MMC auf, was sich in einer erhöhten Chromosomeninstabilität bzw. einem G2-Phase-Arrest sowie einer herabgesetzten Überlebensfähigkeit zeigte. Damit gleicht der zelluläre *Faap100*<sup>-/-</sup>-Phänotyp dem anderer FA-Mäuse (Bakker et al. 2013). Des Weiteren spiegelt er sowohl die zellulären Merkmale der 1176-, der *FAAP100*-CRISPR/Cas9-Zellen sowie der  $\Delta$ *FAAP100*-DT40-Zellen wider. Die Zellen des Genotyps *Faap100*<sup>+/-</sup> waren hingegen mit dem Phänotyp der *Faap100*<sup>+/+</sup>-Zellen vergleichbar. Dies steht in Kontrast zu den beobachteten Merkmalen der *Faap100*<sup>+/-</sup>-Tiere, wobei Anomalien, Fehlbildungen und Infertilität nur sehr eingeschränkt mit zellulären Sensitivitäten gegenüber artifiziellen Substanzen vergleichbar sind.

Da das *Faap100*<sup>-/-</sup>-Mausmodell typische FA-Manifestationen aufweist, leistet es einen wesentlichen Beitrag, um *FAAP100* als neues FA-Gen zu bestätigen. Der äußere Phänotyp der *Faap100*<sup>-/-</sup>-Mäuse erinnert an den relativ schweren klinischen Phänotyp des Fetus 1176. Dieser wies ebenfalls einen Hydrozephalus auf, aber eine Generalisation eines Einzelfalles ist natürlich nicht beabsichtigt. Offen bleibt weiterhin die Frage nach der Lebensfähigkeit von *FAAP100*-Patienten. *Faap100*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten zwar vermehrte embryonale Letalität, sind aber grundsätzlich lebensfähig. So muss abgewartet werden, ob weitere Patienten mit *FAAP100*-Mutationen identifiziert werden können.

## 5. 6 Identifizierung alternativer *FAAP100*-Spleißprodukte

Alternatives Spleißen führt zu einer vermehrten Diversität der mRNA-Expression und Proteinisoformen im Genom. Durch den Spleißprozess kommt es in etwa 25-35 % aller alternativen prä-mRNA-Produkte zu einer Verschiebung des Leserahmens oder zu der Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons (Lewis et al. 2003, Stamm et al. 2005). Die Mehrheit dieser Produkte wird durch NMD abgebaut. Defekte auf Ebene des prä-RNA-Spleißens tragen erheblich zur Entstehung von Krankheiten bei (Baralle & Buratti 2017). Funktionelle Transkripte können jedoch eine bedeutende funktionelle Rolle einnehmen wie z. B. in der embryonalen Entwicklung, der Gewebe-spezifischen Genexpression oder bei der Entstehung von Krankheiten (Stamm et al. 2005). Auch für viele FA-Gene wurden alternative Isoformen beschrieben. Für *FANCC*, *FANCE* und *FANCL* wurden beispielsweise Isoformen in gesunden Kontroll- sowie in Brustkrebszelllinien identifiziert, die zu einem funktionalen Protein führten (Bélanger et al. 2013, St-Laurent Pedneault et al. 2013, Bouffard et al. 2015). Für *FAAP100* konnte ich während dieser Arbeit ebenfalls alternative Spleißisoformen identifizieren und validieren. In den gängigen Datenbanken (Ensembl, NCBI/RefSeq, UniProt) sind insgesamt 15 unterschiedliche Isoformen von *FAAP100* verzeichnet, wovon bisher nur zwei validiert wurden. Bei diesen handelt es sich um das allgemein gültige Haupttranskript NM\_025161 und um das Transkript NR\_033338.

Durch Amplifikation und anschließende Sequenzanalyse verschiedener cDNAs konnte ein alternativer Spleißdonor in *FAAP100* Intron 2 identifiziert werden. Durch verschiedene Vorhersageprogramme wird er als potentielle Spleißstelle eingestuft. Ihr Gebrauch führt zur Entstehung des Transkriptes NR\_033338. Für dieses wird in den Datenbanken NMD angegeben, was sich in der vorliegenden Arbeit durch FAAP100-Immunblotanalysen bestätigen ließ.

Daneben identifizierte ich einen kryptischen Spleißdonor in *FAAP100* Exon 5, welcher ebenfalls als potentielle Spleißstelle eingestuft wird. Bei dem alternativen Spleißprodukt handelt es sich um Transkript XM\_006722111, welches nur in der NCBI/RefSeq-Datenbank hinterlegt ist. Diese Referenz ist jedoch ein rein bioinformatisch erzeugtes Transkript, welches bis zur vorliegenden Arbeit nicht validiert worden war. Bezogen auf das *FAAP100*-Haupttranskript NM\_025161 kommt es bei Gebrauch des kryptischen Spleißdonors zum Herausspleißen von 138 Aminosäuren in *FAAP100* Exon 5, wodurch ein trunkiertes Protein (FAAP100<sup>Δ138</sup>) translatiert wird. Dies bestätigte ich durch Expressions- sowie Immunblotanalysen.

### 5. 6. 1 Expression und Translation von FAAP100<sup>Δ138</sup>

Durch quantitative Real-Time PCR (qPCR) konnte ich die Expression von *FAAP100*<sup>Δ138</sup> nachweisen. *FAAP100*<sup>Δ138</sup> wird in allen untersuchten Geweben, jedoch in einer geringeren Stärke als *FAAP100*<sup>WT</sup> (NM\_025161), exprimiert. Da es sich bei der durchgeführten qPCR um eine relative Methode handelte, können keine Aussagen über die genauen Kopienzahlen des Transkriptes in den einzelnen Geweben getroffen werden. Auf eine absolute Quantifizierung wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet.

Da die Proben bei den durchgeführten Untersuchungen manuell pipettiert wurden, können kleine Schwankungen bei den eingesetzten Volumina und somit eine geringe Unsicherheit in den Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden. Um exakte Ergebnisse zu erzielen, müssten genau justierte Pipetten oder noch besser ein automatisiertes Pipettierverfahren verwendet werden. Für eine absolute Quantifizierung der jeweiligen Transkripte würden sich auch andere Methoden wie digitale PCR oder RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) anbieten (Morley 2014, Kukurba & Montgomery 2015). Die bioinformatische Auswertung der RNA-Sequenzierungsergebnisse ist allerdings sehr anspruchsvoll, da vor allem verschiedene Normalisierungsstrategien zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können (Soneson & Delorenzi 2013). Mithilfe von RNA-Seq wäre es zudem in einem Ansatz möglich, neue Transkripte oder alternativ gespleißte Gene zu identifizieren (Kukurba & Montgomery 2015).

Durch Immunblotanalysen, die mit den in dieser Arbeit validierten  $\alpha$ -FAAP100-Antikörpern ab181185 und NBP1-90469 durchgeführt wurden, wurde die Translation von nativem FAAP100<sup>Δ138</sup> nachgewiesen. Durch diese beiden sowie mit fünf weiteren Antikörpern wurden im Bereich von 65-100 kDa weitere FAAP100-Proteinbanden detektiert: FAAP100<sup>21</sup> (etwa 82 kDa), FAAP100<sup>22</sup> (etwa 75 kDa) und FAAP100<sup>23</sup> (etwa 70 kDa). Dabei könnte es sich entweder um

degradiertes FAAP100<sup>WT</sup> oder um weitere FAAP100-Isoformen handeln. Aufgrund seines Molekulargewichtes ließ sich allerdings nur FAAP100<sup>22</sup> vier möglichen FAAP100-Proteinisofomen zuordnen, die in den Datenbanken hinterlegt waren. Bei der Aufklärung, ob es sich bei FAAP100<sup>21</sup>, FAAP100<sup>22</sup> und/oder FAAP100<sup>23</sup> tatsächlich um translatierte FAAP100-Proteine handelt, könnte die Methode der RNA-Sequenzierung und ein anschließender Knockdown durch siRNAs, die spezifisch gegen FAAP100<sup>21</sup>, FAAP100<sup>22</sup> bzw. FAAP100<sup>23</sup> gerichtet sind, hilfreich sein.

### 5. 6. 2 Dysfunktionalität von FAAP100<sup>Δ138</sup> im FA/BRCA-Signalweg

Um die Frage zu beantworten, ob FAAP100<sup>Δ138</sup> ein funktionelles Protein darstellt bzw. eine Rolle in der DNA-Schadensreparatur spielt, wurde versucht, die FAAP100-defizienten Zelllinien 1176, Cr10, Cr12, Cr21 und HAP FAAP100<sup>-/-</sup> mit FAAP100<sup>Δ138</sup> zu komplementieren. Dies gelang allerdings nicht, da diese Zelllinien weiterhin hypersensitiv gegenüber MMC reagieren, was sich anhand eines G2-Phase-Arrests, einer erhöhten Chromosomenbrüchigkeit und einer herabgesetzten Überlebensrate der Zellen nach Inkubation mit ansteigenden MMC-Konzentrationen nachweisen ließ.

Im Vergleich zu FAAP100<sup>WT</sup> fehlt dem trunkierten Protein FAAP100<sup>Δ138</sup> eine der Interaktionsregionen FAAP100-FANCB (aa 698-716). Dabei handelt es sich um die gleiche Region, die auch bei den FAAP100-CRISPR/Cas9-Zelllinien Cr10 und Cr21 entfällt. Analog zu diesen Zellen war bei FAAP100<sup>Δ138</sup> durch Anwendung des *Mammalian Two-Hybrid* Systems keine Interaktion zwischen FAAP100 und FANCB nachweisbar. Folglich kann auch keine Wechselwirkung mit FANCL entstehen und damit kein Subkomplex LBP100<sup>Δ138</sup> gebildet werden. Die durch die Co-IPs nachgewiesene geringe Interaktion zwischen FAAP100<sup>Δ138</sup> und FANCB in den Zellen 1176+FAAP100<sup>Δ138</sup> und Cr12+FAAP100<sup>Δ138</sup> war allein auf die starke Überexpression von FAAP100<sup>Δ138</sup> zurückzuführen und war bei normaler Expression von FAAP100<sup>Δ138</sup> nicht nachweisbar. So war auch die die Lokalisation von überexprimiertem FAAP100<sup>Δ138</sup> im Kern und am Chromatin, die durch Proteinfractionierungen und eine anschließende Immunblotanalyse nachgewiesen wurde, allein auf die verstärkte FAAP100<sup>Δ138</sup>-Menge zurückzuführen. Diese Interpretation wurde durch eine Proteinfractionierung von 1176+FAAP100<sup>T542P</sup> unterstützt, bei der überexprimiertes FAAP100<sup>T542P</sup> ebenfalls im Kern und am Chromatin detektiert wurde. Diese Lokalisation war jedoch durch die Fraktionierung des mutierten FAAP100-Proteins parentaler 1176-Zellen, das sich nur im Zytoplasma befand, ausgeschlossen. Da keine Bildung des Subkomplexes LBP100<sup>Δ138</sup> erfolgt, kann FAAP100<sup>Δ138</sup> nicht in den Nukleus und folglich nicht ans Chromatin transportiert werden, da dies nur als intakter Komplex möglich ist (Ling et al. 2007). Somit kann durch FAAP100<sup>Δ138</sup> keine DNA-Schadensreparatur eingeleitet werden, was durch das Fehlen der FANCD2-Monoubiquitinierung sowie der FANCD2-Foci-Bildung in mit FAAP100<sup>Δ138</sup> transduzierten FAAP100-defizienten Zelllinien bestätigt wurde. Eine Funktionalität von FAAP100<sup>Δ138</sup> innerhalb des FA-Signalweges ist somit ausgeschlossen.

Dies traf auch auf Isoformen von FANCC, -E oder -L zu (Bélanger et al. 2013, St-Laurent Pedneault et al. 2013, Bouffard et al. 2015). Entsprechende defiziente Zelllinien wurden durch das Wildtyp-Protein, jedoch nicht durch das jeweilige alternative Spleißprodukt, komplementiert.

Alternative Proteinisoformen können jedoch auch Funktionen aufweisen. So wurde beispielsweise für eine FANCL-Isoform (FAVL), für die allerdings keine Komplementationsstudien durchgeführt worden waren, eine Assoziation bei der Entstehung von Krebs nachgewiesen (Zhang et al. 2010). Durch FAVL wurde die Expression von FANCL sowie die Menge an monoubiquitiniertem FANCD2 reduziert, was zu einer Beeinträchtigung des FA-Signalweges führte. Des Weiteren erhielten FAVL-überexprimierte Zellen einen Wachstumsvorteil und verursachten in Mäusen Xenografttumore. Somit könnte FAVL einen potentiellen onkogenen Faktor darstellen (Zhang et al. 2010).

### 5. 6. 3 Dominant-negativer Effekt von FAAP100<sup>Δ138</sup> auf den FA/BRCA-Signalweg

Durch die Abnahme des Anteils FANCD2-Foci-positiver Nuklei bei einer Kontrollzelllinie nicht-FA+FAAP100<sup>Δ138</sup> gegenüber deren parentaler Kontrollzelllinie war ein Hinweis auf einen negativen Effekt von FAAP100<sup>Δ138</sup> auf den FA-Signalweg gegeben, der sich durch einen FANCD2-Monoubiquitinierungsassay weiter verstärkte. FANCD2-Immunblots, die mithilfe von Proteinlysaten aus mit unterschiedlichen Konzentrationen an FAAP100<sup>WT</sup> bzw. FAAP100<sup>Δ138</sup> transfizierten U2OS-Zellen angefertigt worden waren, zeigten bei Zunahme der transfizierten FAAP100<sup>Δ138</sup>-Konzentration eine stetige Verringerung der gesamt-FANCD2-Proteinmenge. Ein ähnliches Ergebnis eines solchen dominant-negativen Effekts auf FANCD2 war auch für die alternative FANCE-Isoform FANCEΔ4 ermittelt worden (Bouffard et al. 2015). Sie nimmt Einfluss auf die FANCD2-Proteinexpression und fördert eine FANCD2-Degradierung, was durch die Untersuchungen mit Verwendung eines Proteasom-Inhibitors (MG132) bestätigt wurde. Dieser wirkte der FANCD2-Degradierung entgegen, sodass bei mit FANCEΔ4 transfizierten und zusätzlich mit MG132-behandelten Zellen ein Anstieg des FANCD2-Proteinlevels beobachtet wurde. Solch ein Nachweis steht für FAAP100<sup>Δ138</sup> aktuell noch aus. Falls sich dieser bestätigen sollte, würde auch FAAP100<sup>Δ138</sup> einen dominant-negativen Effekt auf den FA-Signalweg ausüben und damit die Aktivierung der DNA-Schadensreparatur verhindern. So wäre es möglich, dass FAAP100<sup>Δ138</sup> den Signalweg in Zellen, in denen er nicht gebraucht wird, herunterreguliert. Dies stünde auch mit der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen relativ hohen Expression von FAAP100<sup>Δ138</sup> im Gehirngewebe in Einklang. Da es sich bei Neuronen um sich nicht teilende Zellen handelt, findet kein Zellzyklus statt (Aranda-Anzaldo & Dent 2017). Das Wiedereintreten in den Zellzyklus würde für sie den Zelltod durch Apoptose bedeuten. Folglich sind Inhibitoren nötig, die die Zellproliferation verhindern (Pajalunga et al. 2007). Dementsprechend ist der FA/BRCA-Signalweg nur in sehr frühen Entwicklungsstadien des Nervensystems aktiv (Orii et al. 2006) und in postmitotischen Neuronen herunterreguliert. Dabei könnte FAAP100<sup>Δ138</sup> eine Rolle als Inhibitor einnehmen. Falls dies zuträfe, wäre auch ein Einsatz von FAAP100<sup>Δ138</sup> als Anti-Krebs-Medikament

denkbar. Die DNA-Schadensreparatur würde in Tumorzellen gehemmt werden, sodass sich diese nicht reparieren können und zugrunde gehen.

## 5.7 Fazit

Durch die vorliegende Arbeit wurde gezeigt, dass *FAAP100* als ein neues FA-Gen klassifiziert werden kann. Dies wurde anhand einer humanen Fetus-Zelllinie bewiesen, welche eine biallelische *FAAP100*-Mutation aufwies und deren zellulärer FA-Phänotyp mit wildtypischer *FAAP100*-cDNA komplementiert werden konnte. Unterstützt wurde dieser Nachweis *in vitro* durch *FAAP100*-CRISPR/Cas9- und  $\Delta$ *FAAP100*-DT40-Zelllinien sowie *in vivo* durch ein *Faap100*<sup>-/-</sup>-Mausmodell. Sowohl die Zelllinien als auch das Mausmodell wiesen ebenfalls einen charakteristischen FA-Phänotyp auf. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *FAAP100* eine bedeutendere Rolle innerhalb des FA-Signalweges einnimmt als bisher angenommen. Zum einen scheinen *FAAP100*-Mutationen einen schwereren humanen als auch murinen FA-Phänotyp, welcher auch zu embryonaler Letalität führen kann, als andere *upstream*-FA-Komplementationsgruppen zu verursachen. Zum anderen kann die Monoubiquitinierung von FANCD2 ohne *FAAP100*<sup>WT</sup> nicht stattfinden, sodass die Funktion des FA-Signalwegs, nämlich die Gewährleistung der genomischen Stabilität, nicht aufrechterhalten werden kann.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit eine bisher nicht-validierte *FAAP100*-Isoform (*FAAP100* <sup>$\Delta$ 138</sup>) identifiziert und näher charakterisiert. *FAAP100*-defiziente Zelllinien konnten durch diese nicht komplementiert werden. Allerdings wurden Hinweise auf einen dominant-negativen Effekt dieses alternativen Transkripts gefunden, der zur Herunterregulierung des FA-Signalwegs führt. Dies muss jedoch durch weitere Experimente bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten somit einen wertvollen Beitrag, um einerseits die Funktion von *FAAP100* und andererseits die des FA-Signalweges besser zu verstehen. Des Weiteren bieten sie eine vielversprechende Grundlage für zukünftige Forschungs- sowie Therapieansätze.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdullah, U. B., et al. (2017). RPA activates the XPF-ERCC1 endonuclease to initiate processing of DNA interstrand crosslinks. *EMBO J* **36**(14): 2047-2060.
- Acevedo, J., et al. (2016). Direct Binding to Replication Protein A (RPA)-coated Single-stranded DNA Allows Recruitment of the ATR Activator TopBP1 to Sites of DNA Damage. *J Biol Chem* **291**(25): 13124-13131.
- Adzhubei, I. A., et al. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* **7**(4): 248-249.
- AgoulNIK, A. I., et al. (2002). A novel gene, Pog, is necessary for primordial germ cell proliferation in the mouse and underlies the germ cell deficient mutation, gcd. *Hum Mol Genet* **11**(24): 3047-3053.
- Ahnesorg, P., et al. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* **124**(2): 301-313.
- Ali, A. M., et al. (2012). FAAP20: a novel ubiquitin-binding FA nuclear core-complex protein required for functional integrity of the FA-BRCA DNA repair pathway. *Blood* **119**(14): 3285-3294.
- Alpi, A., et al. (2007). UBE2T, the Fanconi anemia core complex, and FANCD2 are recruited independently to chromatin: a basis for the regulation of FANCD2 monoubiquitination. *Mol Cell Biol* **27**(24): 8421-8430.
- Alter, B. P. (2003). Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. *Cancer* **97**(2): 425-440.
- Alter, B. P. (2007). Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 29-39.
- Alter, B. P. and N. Giri (2016). Thinking of VACTERL-H? Rule out Fanconi Anemia according to PHENOS. *Am J Med Genet A* **170**(6): 1520-1524.
- Alter, B. P., et al. (2018). Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up. *Haematologica* **103**(1): 30-39.
- Alter, B. P. and P. S. Rosenberg (2013). VACTERL-H Association and Fanconi Anemia. *Mol Syndromol* **4**(1-2): 87-93.
- Altschul, S. F., et al. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**(3): 403-410.
- Ameziane, N., et al. (2015). A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51. *Nat Commun* **6**: 8829.
- Anand, R., et al. (2016). Phosphorylated CtIP Functions as a Co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 Endonuclease in DNA End Resection. *Mol Cell* **64**(5): 940-950.
- Andreassen, P. R., et al. (2004). ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev* **18**(16): 1958-1963.
- Apostolou, S., et al. (1996). Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene. *Nat Genet* **14**(3): 324-328.
- Aranda-Anzaldo, A. and M. A. Dent (2017). Why Cortical Neurons Cannot Divide, and Why Do They Usually Die in the Attempt? *J Neurosci Res* **95**(4): 921-929.
- Araujo, S. J., et al. (2000). Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. *Genes Dev* **14**(3): 349-359.
- Arya, M., et al. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* **5**(2): 209-219.
- Auerbach, A. D. (2009). Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res* **668**(1-2): 4-10.
- Auerbach, A. D. and R. G. Allen (1991). Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **51**(1): 1-12.
- Austin, C. P., et al. (2004). The knockout mouse project. *Nat Genet* **36**(9): 921-924.
- Badr, C. E. and B. A. Tannous (2011). Bioluminescence imaging: progress and applications. *Trends Biotechnol* **29**(12): 624-633.
- Baker, M. (2015). Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature* **521**(7552): 274-276.
- Bakker, S. T., et al. (2013). Learning from a paradox: recent insights into Fanconi anaemia through studying mouse models. *Dis Model Mech* **6**(1): 40-47.
- Bakker, S. T., et al. (2009). Fancm-deficient mice reveal unique features of Fanconi anemia complementation group M. *Hum Mol Genet* **18**(18): 3484-3495.
- Bakker, S. T., et al. (2012). Fancf-deficient mice are prone to develop ovarian tumours. *J Pathol* **226**(1): 28-39.
- Bakr, A., et al. (2016). Impaired 53BP1/RIF1 DSB mediated end-protection stimulates CtIP-dependent end resection and switches the repair to PARP1-dependent end joining in G1. *Oncotarget* **7**(36): 57679-57693.
- Baralle, D. and E. Buratti (2017). RNA splicing in human disease and in the clinic. *Clin Sci (Lond)* **131**(5): 355-368.

- Barrangou, R., et al. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**(5819): 1709-1712.
- Barroso, E., et al. (2006). FANCD2 associated with sporadic breast cancer risk. *Carcinogenesis* **27**(9): 1930-1937.
- Bélanger, S., et al. (2013). Impaired Effects of a *FANCC* Splicing Isoform in FANCD2-Brca1 DNA Repair Pathway. *J Genet Syndr Gene Ther* **4**(5): 144.
- Bergink, S., et al. (2012). Recognition of DNA damage by XPC coincides with disruption of the XPC-RAD23 complex. *J Cell Biol* **196**(6): 681-688.
- Berwick, M., et al. (2007). Genetic heterogeneity among Fanconi anemia heterozygotes and risk of cancer. *Cancer Res* **67**(19): 9591-9596.
- Bluteau, D., et al. (2016). Biallelic inactivation of REV7 is associated with Fanconi anemia. *J Clin Invest* **126**(9): 3580-3584.
- Bogliolo, M., et al. (2017). Biallelic truncating FANCM mutations cause early-onset cancer but not Fanconi anemia. *Genet Med*.
- Bogliolo, M., et al. (2013). Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet* **92**(5): 800-806.
- Borukhov, S., et al. (1993). Transcript cleavage factors from *E. coli*. *Cell* **72**(3): 459-466.
- Bouffard, F., et al. (2015). Analysis of a FANCD2 Splice Isoform in Regard to DNA Repair. *J Mol Biol* **427**(19): 3056-3073.
- Bowman-Colin, C., et al. (2013). Palb2 synergizes with Trp53 to suppress mammary tumor formation in a model of inherited breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(21): 8632-8637.
- Brillen, A. L., et al. (2017). Analysis of Competing HIV-1 Splice Donor Sites Uncovers a Tight Cluster of Splicing Regulatory Elements within Exon 2/2b. *J Virol* **91**(14).
- Brouns, S. J., et al. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* **321**(5891): 960-964.
- Budzowska, M., et al. (2015). Regulation of the Rev1-pol zeta complex during bypass of a DNA interstrand cross-link. *EMBO J* **34**(14): 1971-1985.
- Butturini, A., et al. (1994). Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* **84**(5): 1650-1655.
- Buys, S. S., et al. (2017). A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer* **123**(10): 1721-1730.
- Callen, E., et al. (2005). A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood* **105**(5): 1946-1949.
- Carette, J. E., et al. (2011). Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* **477**(7364): 340-343.
- Carr, I. M., et al. (2006). Interactive visual analysis of SNP data for rapid autozygosity mapping in consanguineous families. *Hum Mutat* **27**(10): 1041-1046.
- Carreau, M. (2004). Not-so-novel phenotypes in the Fanconi anemia group D2 mouse model. *Blood* **103**(6): 2430.
- Castella, M., et al. (2015). FANCI Regulates Recruitment of the FA Core Complex at Sites of DNA Damage Independently of FANCD2. *PLoS Genet* **11**(10): e1005563.
- Catucci, I., et al. (2017). Individuals with FANCM biallelic mutations do not develop Fanconi anemia, but show risk for breast cancer, chemotherapy toxicity and may display chromosome fragility. *Genet Med*.
- Ceccaldi, R., et al. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol* **26**(1): 52-64.
- Cerabona, D., et al. (2016). Leukemia and chromosomal instability in aged *Fancc*<sup>-/-</sup> mice. *Exp Hematol* **44**(5): 352-357.
- Chang, T. H., et al. (1997). Disregulation of mitotic checkpoints and regulatory proteins following acute expression of SV40 large T antigen in diploid human cells. *Oncogene* **14**(20): 2383-2393.
- Chen, L., et al. (2008). Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J Biol Chem* **283**(12): 7713-7720.
- Chen, M., et al. (1996). Inactivation of *Fac* in mice produces inducible chromosomal instability and reduced fertility reminiscent of Fanconi anaemia. *Nat Genet* **12**(4): 448-451.
- Chen, Q., et al. (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4337-4341.

- Cheng, N. C., et al. (2000). Mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia homolog Fanca. *Hum Mol Genet* **9**(12): 1805-1811.
- Ciccia, A., et al. (2007). Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. *Mol Cell* **25**(3): 331-343.
- Cohn, M. A., et al. (2007). A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell* **28**(5): 786-797.
- Coin, F., et al. (2008). Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIIH. *Mol Cell* **31**(1): 9-20.
- Collins, N. B., et al. (2009). ATR-dependent phosphorylation of FANCA on serine 1449 after DNA damage is important for FA pathway function. *Blood* **113**(10): 2181-2190.
- Cong, L., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**(6121): 819-823.
- Connor, F., et al. (1997). Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation. *Nat Genet* **17**(4): 423-430.
- Critchlow, S. E., et al. (1997). Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol* **7**(8): 588-598.
- Crossan, G. P., et al. (2011). Disruption of mouse Slx4, a regulator of structure-specific nucleases, phenocopies Fanconi anemia. *Nat Genet* **43**(2): 147-152.
- Dagg, C. P. (1966). Teratogenesis. *Biology of the Laboratory Mouse*. E. L. Green, New York: McGraw-Hill: 309-328.
- Daley, J. M. and P. Sung (2013). RIF1 in DNA break repair pathway choice. *Mol Cell* **49**(5): 840-841.
- de Winter, J. P., et al. (2000a). Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am J Hum Genet* **67**(5): 1306-1308.
- de Winter, J. P., et al. (2000b). The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat Genet* **24**(1): 15-16.
- de Winter, J. P., et al. (2000c). The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG. *Hum Mol Genet* **9**(18): 2665-2674.
- de Winter, J. P., et al. (1998). The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat Genet* **20**(3): 281-283.
- Deans, A. J. and S. C. West (2009). FANCM connects the genome instability disorders Bloom's Syndrome and Fanconi Anemia. *Mol Cell* **36**(6): 943-953.
- Deans, B., et al. (2000). Xrcc2 is required for genetic stability, embryonic neurogenesis and viability in mice. *EMBO J* **19**(24): 6675-6685.
- Deeg, H. J., et al. (1996). Malignancies after marrow transplantation for aplastic anemia and fanconi anemia: a joint Seattle and Paris analysis of results in 700 patients. *Blood* **87**(1): 386-392.
- Dorsman, J. C., et al. (2007). Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cell Oncol* **29**(3): 211-218.
- Drost, R., et al. (2011). BRCA1 RING function is essential for tumor suppression but dispensable for therapy resistance. *Cancer Cell* **20**(6): 797-809.
- Du, W., et al. (2015). Fancb deficiency impairs hematopoietic stem cell function. *Sci Rep* **5**: 18127.
- Dueva, R. and G. Iliakis (2013). Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Translational Cancer Research* **2**(3): 163-177.
- Egelhofer, T. A., et al. (2011). An assessment of histone-modification antibody quality. *Nat Struct Mol Biol* **18**(1): 91-93.
- Elmore, E. and M. Swift (1975). Growth of cultured cells from patients with Fanconi anemia. *J Cell Physiol* **87**(2): 229-233.
- Erkelenz, S., et al. (2014). Genomic HEXploring allows landscaping of novel potential splicing regulatory elements. *Nucleic Acids Res* **42**(16): 10681-10697.
- Essletzbichler, P., et al. (2014). Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res* **24**(12): 2059-2065.
- Eyal, O., et al. (2008). Improved growth velocity during thyroid hormone therapy in children with Fanconi anemia and borderline thyroid function. *Pediatr Blood Cancer* **51**(5): 652-656.
- Faivre, L., et al. (2005). Should chromosome breakage studies be performed in patients with VACTERL association? *Am J Med Genet A* **137**(1): 55-58.
- Fanconi, G. (1927). Familiäre infantile perniziösartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische Erziehung (Wien)*. **117**: 257-280.

- Fei, J. and J. Chen (2012). KIAA1530 protein is recruited by Cockayne syndrome complementation group protein A (CSA) to participate in transcription-coupled repair (TCR). *J Biol Chem* **287**(42): 35118-35126.
- Fousteri, M., et al. (2006). Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Mol Cell* **23**(4): 471-482.
- Fu, C., et al. (2016a). Dearth and Delayed Maturation of Testicular Germ Cells in Fanconi Anemia E Mutant Male Mice. *PLoS One* **11**(8): e0159800.
- Fu, C., et al. (2016b). Primary Ovarian Insufficiency Induced by Fanconi Anemia E Mutation in a Mouse Model. *PLoS One* **11**(3): e0144285.
- Fu, Y., et al. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* **31**(9): 822-826.
- Garcia-Higuera, I., et al. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* **7**(2): 249-262.
- Garner, E., et al. (2013). Human GEN1 and the SLX4-associated nucleases MUS81 and SLX1 are essential for the resolution of replication-induced Holliday junctions. *Cell Rep* **5**(1): 207-215.
- Gasiunas, G., et al. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(39): E2579-2586.
- Gell, D. and S. P. Jackson (1999). Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic Acids Res* **27**(17): 3494-3502.
- Giampietro, P. F., et al. (1997). Diagnosis of Fanconi anemia in patients without congenital malformations: an international Fanconi Anemia Registry Study. *Am J Med Genet* **68**(1): 58-61.
- Giri, N., et al. (2007). Endocrine abnormalities in patients with Fanconi anemia. *J Clin Endocrinol Metab* **92**(7): 2624-2631.
- Glanz, A. and F. C. Fraser (1982). Spectrum of anomalies in Fanconi anaemia. *J Med Genet* **19**(6): 412-416.
- Goodarzi, A. A., et al. (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J* **25**(16): 3880-3889.
- Gowen, L. C., et al. (1996). Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet* **12**(2): 191-194.
- Gross, M., et al. (2002). Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res* **98**(2-3): 126-135.
- Guinan, E. C., et al. (1994). Evaluation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of pancytopenia in children with fanconi anemia. *J Pediatr* **124**(1): 144-150.
- Heigwer, F., et al. (2014). E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat Methods* **11**(2): 122-123.
- Hilbers, F. S., et al. (2016). Functional Analysis of Missense Variants in the Putative Breast Cancer Susceptibility Gene XRCC2. *Hum Mutat* **37**(9): 914-925.
- Hira, A., et al. (2015). Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet* **96**(6): 1001-1007.
- Ho, G. P., et al. (2006). Phosphorylation of FANCD2 on two novel sites is required for mitomycin C resistance. *Mol Cell Biol* **26**(18): 7005-7015.
- Hodgkins, A., et al. (2015). WGE: a CRISPR database for genome engineering. *Bioinformatics* **31**(18): 3078-3080.
- Hodskinson, M. R., et al. (2014). Mouse SLX4 is a tumor suppressor that stimulates the activity of the nuclease XPF-ERCC1 in DNA crosslink repair. *Mol Cell* **54**(3): 472-484.
- Houghtaling, S., et al. (2003). Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Genes Dev* **17**(16): 2021-2035.
- Howlett, N. G., et al. (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* **297**(5581): 606-609.
- Hsu, P. D., et al. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* **31**(9): 827-832.
- Huang, Y., et al. (2014). Modularized functions of the Fanconi anemia core complex. *Cell Rep* **7**(6): 1849-1857.
- Inano, S., et al. (2017). RFD3-Mediated Ubiquitination Promotes Timely Removal of Both RPA and RAD51 from DNA Damage Sites to Facilitate Homologous Recombination. *Mol Cell* **66**(5): 622-634 e628.
- International Human Genome Sequencing, C. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**(7011): 931-945.
- Ishiai, M., et al. (2008). FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol* **15**(11): 1138-1146.
- Isono, M., et al. (2017). BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. *Cell Rep* **18**(2): 520-532.

- Jinek, M., et al. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**(6096): 816-821.
- Joenje, H., et al. (1981). Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. *Nature* **290**(5802): 142-143.
- Joenje, H., et al. (2000). Complementation analysis in Fanconi anemia: assignment of the reference FA-H patient to group A. *Am J Hum Genet* **67**(3): 759-762.
- Jonkers, J., et al. (2001). Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet* **29**(4): 418-425.
- Kalb, R., et al. (2007). Hypomorphic mutations in the gene encoding a key Fanconi anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype. *Am J Hum Genet* **80**(5): 895-910.
- Kalter, H. (1968). Sporadic congenital malformations of newborn inbred mice. *Teratology* **1**(2): 193-199.
- Karousis, E. D., et al. (2016). Nonsense-mediated mRNA decay: novel mechanistic insights and biological impact. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **7**(5): 661-682.
- Kato, Y., et al. (2015). FANCB is essential in the male germline and regulates H3K9 methylation on the sex chromosomes during meiosis. *Hum Mol Genet* **24**(18): 5234-5249.
- Kent, W. J. (2002). BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res* **12**(4): 656-664.
- Kiiski, J. I., et al. (2014). Exome sequencing identifies FANCM as a susceptibility gene for triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(42): 15172-15177.
- Kim, H., et al. (2012). Regulation of Rev1 by the Fanconi anemia core complex. *Nat Struct Mol Biol* **19**(2): 164-170.
- Kim, J. M., et al. (2008). Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24. *Blood* **111**(10): 5215-5222.
- Kim, Y., et al. (2011). Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nat Genet* **43**(2): 142-146.
- Kimura, H., et al. (2008). The organization of histone H3 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Cell Struct Funct* **33**(1): 61-73.
- Klein Douwel, D., et al. (2014). XPF-ERCC1 acts in Unhooking DNA interstrand crosslinks in cooperation with FANCD2 and FANCP/SLX4. *Mol Cell* **54**(3): 460-471.
- Knies, K., et al. (2017). Biallelic mutations in the ubiquitin ligase RFW3 cause Fanconi anemia. *J Clin Invest* **127**(8): 3013-3027.
- Knoch, J., et al. (2012). Rare hereditary diseases with defects in DNA-repair. *Eur J Dermatol* **22**(4): 443-455.
- Koentgen, F., et al. (2016). Exclusive transmission of the embryonic stem cell-derived genome through the mouse germline. *Genesis* **54**(6): 326-333.
- Kontgen, F., et al. (1993). Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice. *Int Immunol* **5**(8): 957-964.
- Koomen, M., et al. (2002). Reduced fertility and hypersensitivity to mitomycin C characterize Fancg/Xrcc9 null mice. *Hum Mol Genet* **11**(3): 273-281.
- Kotecki, M., et al. (1999). Isolation and characterization of a near-haploid human cell line. *Exp Cell Res* **252**(2): 273-280.
- Kubbies, M., et al. (1985). Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent edomitosis in Fanconi anemia cells. *Am J Hum Genet* **37**(5): 1022-1030.
- Kuehl, J. (2011). Kandidaten für den FA-/BRCA-DNA-Reparatur-Signalweg – proteinanalytische und genetische Untersuchungen.
- Kukurba, K. R. and S. B. Montgomery (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harb Protoc* **2015**(11): 951-969.
- Kumar, P., et al. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* **4**(7): 1073-1081.
- Kuscu, C., et al. (2014). Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol* **32**(7): 677-683.
- Kuznetsov, S., et al. (2007). RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females. *J Cell Biol* **176**(5): 581-592.
- Laine, J. P., et al. (2006). TFIIH enzymatic activities in transcription and nucleotide excision repair. *Methods Enzymol* **408**: 246-263.
- Lefkowsky, H. B., et al. (2015). Transcriptional and post-transcriptional regulation of nucleotide excision repair genes in human cells. *Mutat Res* **776**: 9-15.

- Leveille, F., et al. (2004). The Fanconi anemia gene product FANCF is a flexible adaptor protein. *J Biol Chem* **279**(38): 39421-39430.
- Levran, O., et al. (2005). The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* **37**(9): 931-933.
- Lewis, B. P., et al. (2003). Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 189-192.
- Li, S. C., et al. (1996). Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6676-6681.
- Liang, C. C., et al. (2016). The FANCD2-FANCI complex is recruited to DNA interstrand crosslinks before monoubiquitination of FANCD2. *Nat Commun* **7**: 12124.
- Liang, L., et al. (2008). Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* **36**(10): 3297-3310.
- Liang, X., et al. (2015). Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol* **208**: 44-53.
- Lim, D. S. and P. Hasty (1996). A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol Cell Biol* **16**(12): 7133-7143.
- Lim, E. T., et al. (2014). Distribution and medical impact of loss-of-function variants in the Finnish founder population. *PLoS Genet* **10**(7): e1004494.
- Ling, C., et al. (2007). FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway. *EMBO J* **26**(8): 2104-2114.
- Litim, N., et al. (2013). Polymorphic variations in the FANCA gene in high-risk non-BRCA1/2 breast cancer individuals from the French Canadian population. *Mol Oncol* **7**(1): 85-100.
- Litman, R., et al. (2005). BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCF. *Cancer Cell* **8**(3): 255-265.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods* **25**(4): 402-408.
- Lo Ten Foe, J. R., et al. (1996). Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nat Genet* **14**(3): 320-323.
- Lobitz, S. and E. Velleuer (2006). Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. *Nat Rev Cancer* **6**(11): 893-898.
- Long, D. T., et al. (2014). BRCA1 promotes unloading of the CMG helicase from a stalled DNA replication fork. *Mol Cell* **56**(1): 174-185.
- Long, D. T., et al. (2011). Mechanism of RAD51-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science* **333**(6038): 84-87.
- Longerich, S., et al. (2014). Regulation of FANCD2 and FANCI monoubiquitination by their interaction and by DNA. *Nucleic Acids Res* **42**(9): 5657-5670.
- Longerich, S., et al. (2009). FANCI binds branched DNA and is monoubiquitinated by UBE2T-FANCL. *J Biol Chem* **284**(35): 23182-23186.
- Ludwig, T., et al. (1997). Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of Brca1, Brca2, Brca1/Brca2, Brca1/p53, and Brca2/p53 nullizygous embryos. *Genes Dev* **11**(10): 1226-1241.
- Ludwig, T., et al. (2001). Tumorigenesis in mice carrying a truncating Brca1 mutation. *Genes Dev* **15**(10): 1188-1193.
- Ma, C. J., et al. (2017). Protein dynamics of human RPA and RAD51 on ssDNA during assembly and disassembly of the RAD51 filament. *Nucleic Acids Res* **45**(2): 749-761.
- Machida, Y. J., et al. (2006). UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation. *Mol Cell* **23**(4): 589-596.
- Makarova, K. S., et al. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct* **1**: 7.
- Makarova, K. S., et al. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* **9**(6): 467-477.
- Mansour, W. Y., et al. (2010). The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res* **38**(18): 6065-6077.
- Marteijn, J. A., et al. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(7): 465-481.

- Mason, R. M., et al. (1996). The joining of non-complementary DNA double-strand breaks by mammalian extracts. *Nucleic Acids Res* **24**(24): 4946-4953.
- Matsuzaki, K., et al. (2015). FANCI suppresses microsatellite instability and lymphomagenesis independent of the Fanconi anemia pathway. *Genes Dev* **29**(24): 2532-2546.
- McAllister, K. A., et al. (2002). Cancer susceptibility of mice with a homozygous deletion in the COOH-terminal domain of the Brca2 gene. *Cancer Res* **62**(4): 990-994.
- McCauley, J., et al. (2011). X-linked VACTERL with hydrocephalus syndrome: further delineation of the phenotype caused by FANCB mutations. *Am J Med Genet A* **155A**(10): 2370-2380.
- Medhurst, A. L., et al. (2006). Evidence for subcomplexes in the Fanconi anemia pathway. *Blood* **108**(6): 2072-2080.
- Meetei, A. R., et al. (2003a). A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* **35**(2): 165-170.
- Meetei, A. R., et al. (2004). X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet* **36**(11): 1219-1224.
- Meetei, A. R., et al. (2005). A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet* **37**(9): 958-963.
- Meetei, A. R., et al. (2003b). A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Mol Cell Biol* **23**(10): 3417-3426.
- Mimitou, E. P. and L. S. Symington (2010). Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *EMBO J* **29**(19): 3358-3369.
- Montague, T. G., et al. (2014). CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res* **42**(Web Server issue): W401-407.
- Morley, A. A. (2014). Digital PCR: A brief history. *Biomol Detect Quantif* **1**(1): 1-2.
- Moser, J., et al. (2007). Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol Cell* **27**(2): 311-323.
- Moser, J., et al. (2005). The UV-damaged DNA binding protein mediates efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions. *DNA Repair (Amst)* **4**(5): 571-582.
- Motycka, T. A., et al. (2004). Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52. *J Biol Chem* **279**(14): 13634-13639.
- Mozdarani, H., et al. (2011). Evaluation of concentration and storage effects of mitomycin C in the diagnosis of Fanconi anemia among idiopathic aplastic anemia patients. *Indian J Hum Genet* **17**(3): 145-151.
- Munoz, I. M., et al. (2009). Coordination of structure-specific nucleases by human SLX4/BTBD12 is required for DNA repair. *Mol Cell* **35**(1): 116-127.
- Naegeli, O. (1931). *Blutkrankheiten und Blutdiagnostik. Lehrbuch der Klinischen Hämatologie.*
- Nakai, K. and P. Horton (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in Biochemical Sciences* **24**(1): 34-35.
- Nathan, D. G., et al. (2003). Inherited bone marrow failure syndromes. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. Philadelphia, Saunders: 280 to 365.
- Navarro, S., et al. (2006). Hematopoietic dysfunction in a mouse model for Fanconi anemia group D1. *Mol Ther* **14**(4): 525-535.
- Navarro, S., et al. (2015). Perspectives on gene therapy for Fanconi anemia. *Expert Opinion on Orphan Drugs* **3**(8): 899-910.
- Neveling, K., et al. (2009). Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. *Mutat Res* **668**(1-2): 73-91.
- Ng, P. C. and S. Henikoff (2001). Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* **11**(5): 863-874.
- Nimonkar, A. V., et al. (2011). BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev* **25**(4): 350-362.
- Nishi, R., et al. (2005). Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Mol Cell Biol* **25**(13): 5664-5674.
- Ochi, T., et al. (2015). DNA repair. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science* **347**(6218): 185-188.
- Ogi, T., et al. (2010). Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. *Mol Cell* **37**(5): 714-727.
- Oostra, A. B., et al. (2012). Diagnosis of fanconi anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia* **2012**: 238731.
- Orii, K. E., et al. (2006). Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(26): 10017-10022.
- Pace, P., et al. (2002). FANCE: the link between Fanconi anaemia complex assembly and activity. *EMBO J* **21**(13): 3414-3423.

- Pagano, G., et al. (2005). Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype. *Eur J Haematol* **75**(2): 93-100.
- Pajalunga, D., et al. (2007). Critical requirement for cell cycle inhibitors in sustaining nonproliferative states. *J Cell Biol* **176**(6): 807-818.
- Park, D. J., et al. (2012). Rare mutations in XRCC2 increase the risk of breast cancer. *Am J Hum Genet* **90**(4): 734-739.
- Park, J. Y., et al. (2016). Complementation of hypersensitivity to DNA interstrand crosslinking agents demonstrates that XRCC2 is a Fanconi anaemia gene. *J Med Genet*.
- Paustian, L., et al. (2016). Androgen therapy in Fanconi anemia: A retrospective analysis of 30 years in Germany. *Pediatric Hematology and Oncology* **33**(1): 5-12.
- Pawlikowska, P., et al. (2014). Defective endomitosis during megakaryopoiesis leads to thrombocytopenia in *Fanca*<sup>-/-</sup> mice. *Blood* **124**(24): 3613-3623.
- Peiffault de Latour, R., et al. (2013). Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Fanconi anemia: the European Group for Blood and Marrow Transplantation experience. *Blood* **122**(26): 4279-4286.
- Pickel, S. (2015). Konsequenzen der zellulären Defizienz des Fanconi-Anämie-Kernkomplex-Proteins FAAP100.
- Pirouz, M., et al. (2013). A critical function of Mad2l2 in primordial germ cell development of mice. *PLoS Genet* **9**(8): e1003712.
- Raghunandan, M., et al. (2015). FANCD2, FANCI and BRCA2 cooperate to promote replication fork recovery independently of the Fanconi Anemia core complex. *Cell Cycle* **14**(3): 342-353.
- Rajendra, E., et al. (2014). The genetic and biochemical basis of FANCD2 monoubiquitination. *Mol Cell* **54**(5): 858-869.
- Ran, F. A., et al. (2015). In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* **520**(7546): 186-191.
- Ran, F. A., et al. (2013a). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* **154**(6): 1380-1389.
- Ran, F. A., et al. (2013b). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* **8**(11): 2281-2308.
- Rantakari, P., et al. (2010). Inactivation of *Palb2* gene leads to mesoderm differentiation defect and early embryonic lethality in mice. *Hum Mol Genet* **19**(15): 3021-3029.
- Raschle, M., et al. (2008). Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. *Cell* **134**(6): 969-980.
- Ray, F. A., et al. (1990). SV40 T antigen alone drives karyotype instability that precedes neoplastic transformation of human diploid fibroblasts. *J Cell Biochem* **42**(1): 13-31.
- Raya, A., et al. (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* **460**(7251): 53-59.
- Reid, S., et al. (2007). Biallelic mutations in *PALB2* cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet* **39**(2): 162-164.
- Rickman, K. A., et al. (2015). Deficiency of UBE2T, the E2 Ubiquitin Ligase Necessary for FANCD2 and FANCI Ubiquitination, Causes FA-T Subtype of Fanconi Anemia. *Cell Rep* **12**(1): 35-41.
- Roa, B. B., et al. (1996). Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Nat Genet* **14**(2): 185-187.
- Robinson, J. T., et al. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**(1): 24-26.
- Rohleder, F., et al. (2016). FANCM interacts with PCNA to promote replication traverse of DNA interstrand crosslinks. *Nucleic Acids Res* **44**(7): 3219-3232.
- Rosenberg, P. S., et al. (2011). How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. *Am J Med Genet A* **155A**(8): 1877-1883.
- Rosendorff, J., et al. (1987). Fanconi anemia: another disease of unusually high prevalence in the Afrikaans population of South Africa. *Am J Med Genet* **27**(4): 793-797.
- Sallmyr, A., et al. (2008). Up-regulation of WRN and DNA ligase IIIalpha in chronic myeloid leukemia: consequences for the repair of DNA double-strand breaks. *Blood* **112**(4): 1413-1423.
- Sanger, F., et al. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Sarkar, S., et al. (2006). DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase zeta. *EMBO J* **25**(6): 1285-1294.
- Sasaki, M. S. and A. Tonomura (1973). A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res* **33**(8): 1829-1836.

- Sato, K., et al. (2012). DNA robustly stimulates FANCD2 monoubiquitylation in the complex with FANCI. *Nucleic Acids Res* **40**(10): 4553-4561.
- Sawyer, S. L., et al. (2015). Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype. *Cancer Discov* **5**(2): 135-142.
- Scheckenbach, K., et al. (2012). Treatment of the bone marrow failure in Fanconi anemia patients with danazol. *Blood Cells Mol Dis* **48**(2): 128-131.
- Schindler, D. and H. Hoehn (1988). Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am J Hum Genet* **43**(4): 429-435.
- Schroeder, T. M., et al. (1964). [Spontaneous chromosome aberrations in familial panmyelopathy]. *Humangenetik* **1**(2): 194-196.
- Schwarz, J. M., et al. (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* **11**(4): 361-362.
- Schwertman, P., et al. (2016). Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**(6): 379-394.
- Schwertman, P., et al. (2012). UV-sensitive syndrome protein UVSSA recruits USP7 to regulate transcription-coupled repair. *Nat Genet* **44**(5): 598-602.
- Sciuto, M. R., et al. (2017). Two-Step Co-Immunoprecipitation (TIP) Enables Efficient and Highly Selective Isolation of Native Protein-Complexes. *Mol Cell Proteomics*.
- Seroussi, E. and S. Lavi (1993). Replication protein A is the major single-stranded DNA binding protein detected in mammalian cell extracts by gel retardation assays and UV cross-linking of long and short single-stranded DNA molecules. *J Biol Chem* **268**(10): 7147-7154.
- Serra, H., et al. (2013). Roles of XRCC2, RAD51B and RAD51D in RAD51-independent SSA recombination. *PLoS Genet* **9**(11): e1003971.
- Seyschab, H., et al. (1995). Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* **85**(8): 2233-2237.
- Shah, S., et al. (2013). Assessment of SLX4 Mutations in Hereditary Breast Cancers. *PLoS One* **8**(6): e66961.
- Shigechi, T., et al. (2012). ATR-ATRIP kinase complex triggers activation of the Fanconi anemia DNA repair pathway. *Cancer Res* **72**(5): 1149-1156.
- Shimamura, A. and B. P. Alter (2010). Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev* **24**(3): 101-122.
- Sievers, F., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**: 539.
- Sims, A. E., et al. (2007). FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol* **14**(6): 564-567.
- Simsek, D., et al. (2011). DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. *PLoS Genet* **7**(6): e1002080.
- Singh, T. R., et al. (2009). Impaired FANCD2 monoubiquitination and hypersensitivity to camptothecin uniquely characterize Fanconi anemia complementation group M. *Blood* **114**(1): 174-180.
- Singh, T. R., et al. (2010). MHF1-MHF2, a histone-fold-containing protein complex, participates in the Fanconi anemia pathway via FANCM. *Mol Cell* **37**(6): 879-886.
- Smogorzewska, A., et al. (2007). Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* **129**(2): 289-301.
- Sommers, J. A., et al. (2009). FANCI uses its motor ATPase to destabilize protein-DNA complexes, unwind triplexes, and inhibit RAD51 strand exchange. *J Biol Chem* **284**(12): 7505-7517.
- Soneson, C. and M. Delorenzi (2013). A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* **14**: 91.
- St-Laurent Pedneault, C., et al. (2013). Regulated Expression of a FANCL Splicing Variant as a Potential Modifier of DNA Repair Activity. *J Genet Syndr Gene Ther* **4**(5): 143.
- Stamm, S., et al. (2005). Function of alternative splicing. *Gene* **344**: 1-20.
- Staresinic, L., et al. (2009). Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *EMBO J* **28**(8): 1111-1120.
- Stemmer, M., et al. (2015). CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PLoS One* **10**(4): e0124633.
- Stoepker, C., et al. (2011). SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nat Genet* **43**(2): 138-141.

- Strathdee, C. A., et al. (1992). Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* **356**(6372): 763-767.
- Struewing, J. P., et al. (1997). The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* **336**(20): 1401-1408.
- Suckow, M. A., et al. (2001). *The laboratory mouse*, CRC Press Inc.
- Sugasawa, K., et al. (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* **2**(2): 223-232.
- Swuec, P., et al. (2017). The FA Core Complex Contains a Homo-dimeric Catalytic Module for the Symmetric Mono-ubiquitination of FANCI-FANCD2. *Cell Rep* **18**(3): 611-623.
- Sy, S. M., et al. (2009). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(17): 7155-7160.
- Takata, M., et al. (2000). The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol* **20**(17): 6476-6482.
- Takata, M., et al. (2001). Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol* **21**(8): 2858-2866.
- Tanaka, H., et al. (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* **404**(6773): 42-49.
- The UniProt, C. (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* **45**(D1): D158-D169.
- Thompson, E. R., et al. (2012). Exome sequencing identifies rare deleterious mutations in DNA repair genes FANCC and BLM as potential breast cancer susceptibility alleles. *PLoS Genet* **8**(9): e1002894.
- Tian, M., et al. (2004). Growth retardation, early death, and DNA repair defects in mice deficient for the nucleotide excision repair enzyme XPF. *Mol Cell Biol* **24**(3): 1200-1205.
- Timmers, C., et al. (2001). Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell* **7**(2): 241-248.
- Tkac, J., et al. (2016). HELB Is a Feedback Inhibitor of DNA End Resection. *Mol Cell* **61**(3): 405-418.
- Tomida, J., et al. (2013). A novel interplay between the Fanconi anemia core complex and ATR-ATRIP kinase during DNA cross-link repair. *Nucleic Acids Res* **41**(14): 6930-6941.
- Uehlinger, E. (1929). Konstitutionelle Infantile (Perniciosaartige) Anämie. *Klinische Wochenschrift* **8**(32): 1501-1503.
- van Twest, S., et al. (2017). Mechanism of Ubiquitination and Deubiquitination in the Fanconi Anemia Pathway. *Mol Cell* **65**(2): 247-259.
- Vaz, F., et al. (2010). Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nat Genet* **42**(5): 406-409.
- Velicescu, M., et al. (2003). Aneuploidy and telomere attrition are independent determinants of crisis in SV40-transformed epithelial cells. *Cancer Res* **63**(18): 5813-5820.
- Velleuer, E. and R. Dietrich (2014). Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma. *Mol Cell Pediatr* **1**(1): 9.
- Verlander, P. C., et al. (1995). Carrier frequency of the IVS4 + 4 A->T mutation of the Fanconi anemia gene FAC in the Ashkenazi Jewish population. *Blood* **86**(11): 4034-4038.
- Vetro, A., et al. (2015). Loss-of-Function FANCL Mutations Associate with Severe Fanconi Anemia Overlapping the VACTERL Association. *Hum Mutat* **36**(5): 562-568.
- Virts, E. L., et al. (2015). AluY-mediated germline deletion, duplication and somatic stem cell reversion in UBE2T defines a new subtype of Fanconi anemia. *Hum Mol Genet* **24**(18): 5093-5108.
- Volker, M., et al. (2001). Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell* **8**(1): 213-224.
- Wada, E., et al. (1989). Acute lymphoblastic leukemia following treatment with human growth hormone in a boy with possible preanemic Fanconi's anemia. *Jpn J Clin Oncol* **19**(1): 36-39.
- Wagner, J. E., et al. (2007). Unrelated donor bone marrow transplantation for the treatment of Fanconi anemia. *Blood* **109**(5): 2256-2262.
- Waisfisz, Q., et al. (1999). Spontaneous functional correction of homozygous fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nat Genet* **22**(4): 379-383.
- Wajnrajch, M. P., et al. (2001). Evaluation of growth and hormonal status in patients referred to the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics* **107**(4): 744-754.
- Walker, J. R., et al. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**(6847): 607-614.

- Walsh, C. E., et al. (1994). A functionally active retrovirus vector for gene therapy in Fanconi anemia group C. *Blood* **84**(2): 453-459.
- Wang, A. T., et al. (2015). A Dominant Mutation in Human RAD51 Reveals Its Function in DNA Interstrand Crosslink Repair Independent of Homologous Recombination. *Mol Cell* **59**(3): 478-490.
- Wang, C. Y., et al. (2013a). The role of ROS toxicity in spontaneous aneuploidy in cultured cells. *Tissue Cell* **45**(1): 47-53.
- Wang, H., et al. (2013b). The interaction of CtIP and Nbs1 connects CDK and ATM to regulate HR-mediated double-strand break repair. *PLoS Genet* **9**(2): e1003277.
- Wang, J., et al. (2014). PTIP associates with Artemis to dictate DNA repair pathway choice. *Genes Dev* **28**(24): 2693-2698.
- Wang, M., et al. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res* **34**(21): 6170-6182.
- Wang, W. and B. A. Malcolm (2002). Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using QuikChange site-directed mutagenesis. *Methods Mol Biol* **182**: 37-43.
- Wang, X., et al. (2007). Chk1-mediated phosphorylation of FANCD1 is required for the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cell Biol* **27**(8): 3098-3108.
- Watanabe, N., et al. (2013). The REV7 subunit of DNA polymerase zeta is essential for primordial germ cell maintenance in the mouse. *J Biol Chem* **288**(15): 10459-10471.
- Weksberg, R., et al. (1979). Specific cellular defects in patients with Fanconi anemia. *J Cell Physiol* **101**(2): 311-323.
- Whitney, M. A., et al. (1996). Germ cell defects and hematopoietic hypersensitivity to gamma-interferon in mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia C gene. *Blood* **88**(1): 49-58.
- Wilson, J. B., et al. (2008). FANCG promotes formation of a newly identified protein complex containing BRCA2, FANCD2 and XRCC3. *Oncogene* **27**(26): 3641-3652.
- Wong, J. C., et al. (2003). Targeted disruption of exons 1 to 6 of the Fanconi Anemia group A gene leads to growth retardation, strain-specific microphthalmia, meiotic defects and primordial germ cell hypoplasia. *Hum Mol Genet* **12**(16): 2063-2076.
- Wu, Y., et al. (2010). Fanconi anemia group J mutation abolishes its DNA repair function by uncoupling DNA translocation from helicase activity or disruption of protein-DNA complexes. *Blood* **116**(19): 3780-3791.
- Xia, B., et al. (2007). Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat Genet* **39**(2): 159-161.
- Xu, G., et al. (2015). REV7 counteracts DNA double-strand break resection and affects PARP inhibition. *Nature* **521**(7553): 541-544.
- Yan, Z., et al. (2010). A histone-fold complex and FANCM form a conserved DNA-remodeling complex to maintain genome stability. *Mol Cell* **37**(6): 865-878.
- Yang, Y., et al. (2001). Targeted disruption of the murine Fanconi anemia gene, *Fanccg/Xrcc9*. *Blood* **98**(12): 3435-3440.
- Yousoufian, H. (1996). Natural gene therapy and the Darwinian legacy. *Nat Genet* **13**(3): 255-256.
- Yu, X., et al. (2016). Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. *Biotechnol Lett* **38**(6): 919-929.
- Yuan, F., et al. (2009). FANCI protein binds to DNA and interacts with FANCD2 to recognize branched structures. *J Biol Chem* **284**(36): 24443-24452.
- Yuan, F., et al. (2012). Fanconi anemia complementation group A (FANCA) protein has intrinsic affinity for nucleic acids with preference for single-stranded forms. *J Biol Chem* **287**(7): 4800-4807.
- Zapotoczny, G. and J. Sekelsky (2017). Human Cell Assays for Synthesis-Dependent Strand Annealing and Crossing over During Double-Strand Break Repair. *G3 (Bethesda)* **7**(4): 1191-1199.
- Zecca, M., et al. (2014). HLA-haploidentical T cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with Fanconi anemia. *Biol Blood Marrow Transplant* **20**(4): 571-576.
- Zetsche, B., et al. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* **163**(3): 759-771.
- Zhang, J., et al. (2015). DNA interstrand cross-link repair requires replication-fork convergence. *Nat Struct Mol Biol* **22**(3): 242-247.
- Zhang, J., et al. (2010). FAVL elevation in human tumors disrupts Fanconi anemia pathway signaling and promotes genomic instability and tumor growth. *J Clin Invest* **120**(5): 1524-1534.

## 7 ANHANG

### 7.1 Primersequenzen

#### 7.1.1 Spezies Mensch

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
<b>FAAP100 gDNA</b>	
FAAP100_5U1R_forB	GCGCACGATGGCCGGCGCCG
FAAP100_Ex1_for	GAGTCCCTGCAGCGCGTCCCTT
FAAP100_Ex2_forSeq	GCGTGAAAATGAAGACCGCGG
FAAP100_Ex2_rev	CTTAACCATGTGAACCCCACTTACTA
FAAP100_Ex3_forA	TTGTCAAGAGTATCCTTCGTGGGG
FAAP100_Ex3_revA	CTCTGTCITCAAGGCCCTATG
FAAP100_Ex3_forB	CCAAATGCCCTTGTCAAGATCCTC
FAAP100_Ex3_revB	GAAGGCGGCCTGATAGTAGC
FAAP100_Ex4_for	TTTGAAGGGAAACGCCAGACTGTC
FAAP100_Ex4_rev	ACACTCACACCCAGGACGAC
FAAP100_Ex5_forA	ACCCACCGTGTGCTTGTCTGT
FAAP100_Ex5_revA	ACCACCTCCCCTGAGACTGTAGAA
FAAP100_Ex5_forB	CTCCGCCATCACCTACACCA
FAAP100_Ex5_revB	GGGCAACAGAGCAAGTTCCT
FAAP100_Ex5b_revSeq	ATCCCCAAGGCTGAGCAAAGC
FAAP100_Int5_for	TAAAGAGACAGGAACTTGCTCTGTGCCCCA
FAAP100_Int5_rev	TCTGCACCTGCGACACAGAGGGTCTCAC
FAAP100_Ex6_for	CCACCCAACGTAGGACTTGT
FAAP100_Ex6_rev	GTGGAACCCGCTATGACTTC
FAAP100_Ex7_for	AAGCTAAACCAGGGTACTGAGCTC
FAAP100_Ex7_rev	ACTTGGATCTTCTTACAACCTCC
FAAP100_Ex8_for	GGAGGGCAGGAAGTCGAGAT
FAAP100_Ex8_rev	ACGCAGCCTGGCCCGGACAC
FAAP100_Ex9_for	AGTGTCTTCTTCCCGGACCAC
FAAP100_Ex9_rev	CTCGGTTGCTCCCAATCAGA
<b>FAAP100 cDNA</b>	
FAAP100_cEx1_for	ATGGCCGGCGCCGCGC
FAAP100_cEx1_forB	TCCGCTACCTGGCGGGCTT
FAAP100_cEx3_for	ATGGCCAGCTCTGCTGTGTGAT
FAAP100_cEx3_rev	AAATTCTCTGCAGCTTCTGCAGCC
FAAP100_ex3mutF	GTCTACGAGCCAGGATGACAG
FAAP100_ex3mutR	CGAGACGACACTGCAGATGTTC
FAAP100_cEx4_for	GAGCTGCTGTCTGGAATTGGCA
FAAP100_cEx5_revB	CTGAAGCTGCTGCTGTTCTCTAG
FAAP100_ex5mutF	GCGGAACAAGGCACTGACAAGCCTCAAC
FAAP100_ex5mutR	CGCAGACACTGCAGCATGTCCACTG
FAAP100_cEx6_for	CTGCAGTGGCTCCTTGTCTGAG
FAAP100_cEx7_rev	ACTTGAATCTCCACGGCCTGGAT
FAAP100_cEx9_rev	TCACAGCAGGATGAGGCTGGG
<b>FANCB gDNA</b>	
FANCB_Ex 3ivs_for	CTGTATAGGCTCCTGTCTCTAGAAAGCAGA
FANCB_Ex3_for	TGGAATGACTAGCAAACAAGC
FANCB_Ex3_rev	TAAGGACCCCTTAGGCCATCC
FANCB_3B_F	GATCAGCACAAAAGACTTGATATTGTGGA
FANCB_3B_R	CATAGCCTAGTTTTAAAACCTCAAACGCA
FANCB_3C_F	AGAAGTGGAAATTAACCTCCCTTACATTG
FANCB_3C_R	ACATAAGTCACCACACTGCTGTAAGCA
FANCB_3D_F	CTAAAGGAATGTTGTTTATCTGAGGAAG

FANCB_3D_R	CAATAAGACTCCAGAATGAACTCTATGA
FANCB_4F	TGACAACTACATGAAACAAAAGGAC
FANCB_4R	CATTTGTTGAAAGGAGATTCAATG
FANCB_Ex5b_for (JK)	AGGGAAACTGTTCTGACTGGAT
FANCB_Ex5b_rev (JK)	ACCATTTTTACCCAAGCACAA
FANCB_6F	TGAATTGATAAGCACATTTGGA
FANCB_6R	GATCCACTGAGCAGCATTT
FANCB_7F	TAAGCCCTAGCCAAAAGCAC
FANCB_7R	AGATCATCCCCTGCACTCC
FANCB_8AF	TTGTTTGTATGACATTTAATCATCAA
FANCB_9F	GGTAATTTTGTGGCACTTTTAGA
FANCB_9R	TACAAAACACATGCGGATCG
FANCB_10A_F	TCAATGCTCACGTACATAATTGG
FANCB_10B_F	TGGCATTTACTTTGGAGAAGG
FANCB_10B_R	GGAGGCATATAGCAAGTAGAACC
<b>FANCB cDNA</b>	
FANCB_c.1F	ATGACTAGCAAACAAGCAATGTC
FANCB_c.506F	CTATTCAGTGGGCAGGGGAGATTG
FANCB_c.1039F	GACTCCTGAACTCAGACTGCCTG
FANCB_c.1784F	GCACTGTACTGCTACAAAATTATGG
FANCB_c.1189R	CTGTTTCTAGAGGTGGAACCACC
FANCB_c.1858R	CTCTGCCACACACAACATAACGATC
FANCB_c.2580R	TTATAAATTACTCAGTTTCTGTGCAGC
FANCB_c.2558R	GCAGCAAAGTCTGATTTCAACTGAACC
<b>FANCL cDNA</b>	
FANCL 686R	GCAATTCTGCGTGTCTGTTG
FANCL 355F	GGAACTCTTGGTTGGGATAAAC
FANCL 293F	GACAAGAGCTGTATGCACTAC
FANCL 745F	CCTGAGTGCTTCTTTCTTGGAG
FANCL 671F	CAGCACGCAGAATTGCATTAGG
FANCL 896R	TCCAGGATAGCACGAGCTG
FANCL_c.1F	ATGGCGGTGACGGAAGCGAGCCTG
FANCL_c.926F	CTATGGATTGTGGAATTTGTTATGC
FANCL_c.1143R	TCAGTGTTTCCITCCAGACATTTTAAAG
FANCL_c.580R	CTGACTATAAATGCTTATTAAGGAGC
FANCL_c.1100R	CAATATGGACATTCACCAAATATGATG
<b>Primer zum Prüfen von Restriktionsschnittstellen</b>	
FAAP100_cVek_rev	CGCCCTCCTGGTTCGTACACGT
FAAP100_cVek_for	TGCAGTACCTCCGCCAGATCCA
Vek_FAAP100_rev	CGGTGGACAGGAAGACCTCTGCCTC
Vek_FA-B_for	CAGAAGGGAAAAATATCCATCC
Vek_FA-B_rev	TGAACAAATACTTTTGTTCCTCTG
Vek_FA-L_for	GTGTGGACAACCTTCCATCA
Vek_FA-L_rev	AATCTTCAGGCAACACTATCCTA
FANCB_rev2	CCATTCTCTGACATGTAATATGGGTGT
FANCB_rev3	CCAGTGGACTTCTGAACAAATACTTTG
FANCL_rev2	CCACTAAGTATTGTTCTCAGCTGCC
<b>Primer zum Prüfen der Klonierungen</b>	
PX459rev (pCas9_rev10)	CAAGTTGATAACGGACTAGCCTTA
PX459for (LKO.1 5')	GACTATCATATGCTTACCGT
pLVX_seq_for	TCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGT
pLVX_seq_rev	GGCAATATGGTGGAAAATAACATATAGA
pCMV-mcs1-for	CGGAGCCTATGGAAAAACGCCAG
pCMV-mcs1-rev	GAACATACGTCAATTGACGTCA
pCMV-bleo-for	GGAACGGTGCATTGGAACGGACCG
pCMV-bleo-rev	TGTGAAATTTGTGATGCTATTGC
T7_for (für pBlueScript II SK (+))	TAATACGACTCACTATAGGG

T3_rev (für pBlueScript II SK (+))	GCAATTAACCCCTCACTAAAGG
pM_for_seq	TCGGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAA
pM/vP_rev_seq	ATTATGATCATTACTTATCTAGAAGCT
pVP16_for_seq	TTCCGAGTTTGGAGCAGATGTTTACCGATG
pVP_AD_msc_for	GCCGACTTCGAGTTTGAG
pVP16_AD_for	GACGAGCTCCACTTAGACGGCGAGGA
pM_BD_for	GCTATTCCAGAAGTAGTGAAGAGGCT
pM_BD_for2	GAGGAGATCTAAGCTGCCTCCTGAAAAG
pCas9_for1	GATACAAGGCTGTTAGAGAGATAAATTG
pCas9_for2	ACGTATTAGTCATCGCTATTACCATG
pCas9_for3	TTGGACCGGTGCCACCATGGACTA
pCas9_for4	GAAACTGGTGGACAGCACCGACAAG
pCas9_for5	TCTATGATCAAGAGATACGACGAGC
pCas9_for6	ACGAGCTGACCAAAGTGAAATACGT
pCas9_for7	AGGACATCCAGAAAAGCCCAGGTGT
pCas9_for8	TTTCGACAATCTGACCAAGGCCGAGA
pCas9_for9	CACCGTGCAGAAAAGTGCTGAGCA
pCas9_for10	GTGGAACAGCACAAGCACTACCTG
pCas9_for11	GCCACATCGAGCGGGTCACCGA
pCas9_for12	GAGGATTTGGGAAGAGAATAGCAG
pCas9_for13	CGTTTACAATTTTATGGTGCCTCT
pCas9_for14	GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATG
pCas9_for15	CCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCT
pCas9_rev1	GTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCC
pCas9_rev2	TCCCGGAGACGGTTCACAGCTTGTCT
pCas9_rev4	AGACAGGTCGATCCGTGTCTCGTA
pCas9_rev5	CTGCACCTCGGTCTTTTTTCAGGATA
pCas9_rev6	AGGCACGATATGGTCCACATCGTA
pCas9_rev7	CCAGGAAGTCCTTGTCTTTGATAA
pCas9_rev8	AGAGCTTTCAGCAGGGTTCAGGTCCT
pCas9_rev9	CTTCCGTCTGGTGTATCTTCTTCTG
<b>Primer für FAAP100 Blunt-End-Klonierung</b>	
CRISPR_blunt_e4for	AGCACTGGCTTCGGGACGTTTCAGAG
CRISPR_blunt_i5rev	CCAGGAGCAGCTGGGAGAGGGAG
FAAP100_5UTR_for	TCTGACGGGCCCGCGCGCACGAT
FAAP100_3UTR_rev	GCAGGCCCGCCTGGTTCACAGCAG
<b>qPCR-Primer</b>	
qPCR_F100_for_neu	GAGAACAGCAGCAGCTTCAGCC
qPCR_F100_rev_neu	CTCCCTGAGACTGTAGAACAGCGT
qPCR_F100_del_neu2	CACAGGGGCACGCCAGGG
<b>Primer zur Nachsequenzierung nicht abgedeckter Exonbereiche der WES-Daten</b>	
FAA_1F_B_gDNA	TCTCTTCAGGACCAACCCCA
FAA_1R_B_gDNA	CGGTTCGAAACCATCACAGC
FANCM_Ex14m_for	ATCTTGCCAGTGACACCTTTATCACTC
FANCM_EX14m_rev	ACACTCTGTTAATAACACACACGGTTC
FAM_Ex18_F(1)	GGGATTACAGACATGCATCACT
FAM_Ex18_R(1)	TGCACGTACCACATTTAATTACC
FANCE_Ex1_for	GTCTCCCAACGCCGAGGAGAGCT
FANCE_Ex1_rev	CAGGCCGTGCTGAAGGGGCTT
FAAP16/API1D1_Ex1_for (MHF1)	CCACCTCCGAGAGCAAGCTGA
FAAP16/API1D1_Ex1_rev (MHF1)	CGCGGCAGTTAAGCCAACGCAT
<b>Mutagenese-Primer</b>	
Mut_pM+414inframe_for	GTATCGCCGGAATTCCTATCTGACGGGCCCGCG
Mut_pM+414inframe_rev	CGCGGGCCCGTCAGATGGGAATTCGGCGATAC
Mut_FAAP100_for_neu	CTTCAGCCTGGACCAGGGGTGGCCCCTGTGCATCCAGGTGCTCAC
Mut_FAAP100_rev_neu	GTGAGCACCTGGATGCACAGGGGCCACCCCTGGTCCAGGCTGAAG

7. 1. 2 Spezies Maus

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
<b>Mausprimer gDNA</b>	
MausF100ex1for	GTAAAGCCTGGAGGCGGCACC
MausF100ex2rev	CTACTGGGACAAACCTTCACAACCTAG
MausF100ex3forA	GACCTACCTGCTGAATGGCCTG
MausF100ex3forB	GCCTACTCAGAGCAAGTCAGGTTAC
MausF100ex3rev	GGAGTGAGTGAACCTTCTGGTCTGTG
MausF100Ex3revKO	GACACCTCTGAATGGCTCATAAACAG
MausF100Ex3forKO	CTAGTTGTGAGAGGTTTGTCCCAGTAG
MausF100Ex3revA	GCCAGGGTGACCAGCATATCATC
<b>Mausprimer cDNA</b>	
MausF100C3for	GATCCTCCACCACCTAGAGGAG
MausF100C3rev	CTCCTCTAGGTGGTGGAGGATC

Von Ozone benutzte Sonden für das Screening der ES-Zellklone durch Southern Hybridisierung

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
Sonde 5P	CTGTTTCTGGTCACCAATGAAGTCATGCCGCTGCAGGTATCAGCTCTGCTGCCCTTTTCTCTCTTTCTCAGATCCTAAGGACAGGTGTGAAGCTCGGTGTCAAGAGATAGCTACCCTATGCACAGCATGTGAGAATGTGCCCTAGGGACCCAGAGCTGAGACTGTCCCTGTTGCATAGCCTCAGAGCCAATGTCTTGAGTCTGACCTTATGACCTTCCACTCTCACCTATGGCCAGCAGCGTTAATGGCCTGAGCCAGAAGTTTGCAGCTTCCAGGTCTGCACACACCATTGTGCATTTAGAGACACCAAAAGGGAGAGTGGATGTGAATGGTTTGCAGATGGTAGGTGCTCTCTGAACAGAGCAGGGCAGCAGGTCCACCAGGAAGCCTGTGTGCATGCCCTGGGCACCTCACAGTTTGTAGCGTCCGGTCTTTGCATGGTCTTTCTTTGCTTGTGAGATCCACAGAAATGCAAAGAAGATGGGAACAAGTCACC
Sonde P3	AAAGATCTGCCCTTCAAGGTCTGACCAGACTGAGGCTACTGGCTCCTGCCACCTTACCTCACAGGGCATTTACACGGGAGTCTATCCATCCTACAGGACAGAGTTCTCCTAGAGGGCAGTTAGGAAGTGGAACGGGCCGCTCTAGACACCGCGTTGACTCTGTACAAGACTGGCTTTTGTAAACCTCATCCCCAGGGTACCAGCTGACCTTGGCCCCAGACGGCTGTAAAGAGCCCTGTCCACAACCTTGTCCCCAAGGCTCCTCTTGCCCAAGGGACATACACCTGTATGTACTGTGCTTTCAACAAGTTAGAGAGGCTGGCTCAACCCACAGGACATAAAGGGCCACCTTGGAAAACGGAGGTGTCTGCTGGGCTGCACTGGCTTTGGTCTCTGTGAGAGTCCACAATTATGAATGTCCCCTACTTGGCGTTATACCCAGAGATGGGGAGGCTCTCCTTAGCCTGAGCTGGAGCACGTGTCTCAGGGGCTGGTGTGATGCTGCCCTACCTCCTCAGCCTTCCCTAGAC
Sonde NeoP	GACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTGAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGCGTTTCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGCGAAGTGCCGGGCGAGGATCTCCTGTCTATCACCTTGGTCTGCCCAGAAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCCGGCGGCTGCATACGCTTGTCCGGCTACTGCCCATTGACACCAAGCGAAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAFCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACCTGTTCCGCGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTGTGACCCATGCGGATGCCTGCTTGGCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGG

**Von Ozgene benutzte Primer und Sonden (*Probe*) für die Genotypisierung durch qPCR**

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Nachweis/Ziel
PrimeTime Probe	TGTCGAGATATCTAGACCCAGCTTTCTTGT	Amplifikation des konditionalen KO-Allels nach Kreuzung mit Flp-Maus (Entfernung der Sequenz zwischen den Frt-Stellen).
PrimeTime Primer 1	ACGATACCACGATATCAACAAGT	
PrimeTime Primer 2	TGCGACTATAGAGATATCAACCAC	
Dye-Quencher Mod	AM/ZEN/IBFQ	
PrimeTime Probe	TCTGAGCTCGCCATCAGTTCATTGG	Amplifikation des KI/KO-Allels nach Kreuzung mit Cre-Maus (Entfernung der Sequenz zwischen den loxP-Stellen).
PrimeTime Primer 1	GCCGGAACCGAAGTTCCTATTC	
PrimeTime Primer 2	TTGAAAGCTGCTGTGGGAGATG	
Dye-Quencher Mod	FAM/ZEN/IBFQ	
PrimeTime Probe	TGCTTCCTCAGCACTACCTTTAGC	Amplifikation des Flp-Transgens, vorhanden am ROSA26-Locus.
PrimeTime Primer 1	ATTGAGGAGTGGCAGCATATAG	
PrimeTime Primer 2	GGTAGTCTAGTACCTCCTGTGATA	
Dye-Quencher Mod	FAM/ZEN/IBFQ	
PrimeTime Probe	CGCAGGTGTAGAGAAGGCACCTTAGC	Amplifikation des Cre-Transgens, vorhanden am ROSA26-Locus.
PrimeTime Primer 1	CTGACGGTGGGAGAATGTTAAT	
PrimeTime Primer 2	CATCGCTCGACCAGTTTATGTT	
Dye-Quencher Mod	FAM/ZEN/IBFQ	
PrimeTime Probe	ATGCAGTCCGTGGTTGGATGAGTT	Amplifikation von <i>Tert</i> auf Chromosom 13 (MGI: 1202709). <i>Housekeeping gene</i> für die Normalisierung der qPCR.
PrimeTime Primer 1	GAGACAATGGGTGGCAGTAA	
PrimeTime Primer 2	GCTTGGAGTCAGAGACCATAAG	
Dye-Quencher Mod	HEX/ZEN/IBFQ	

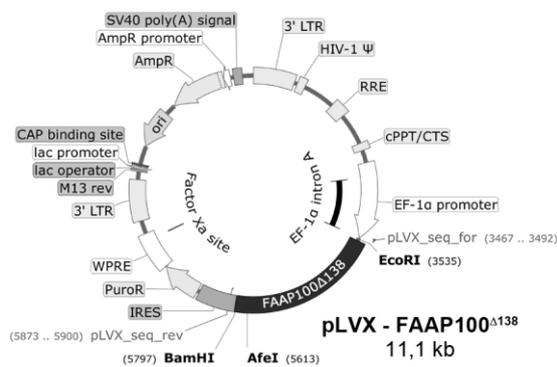
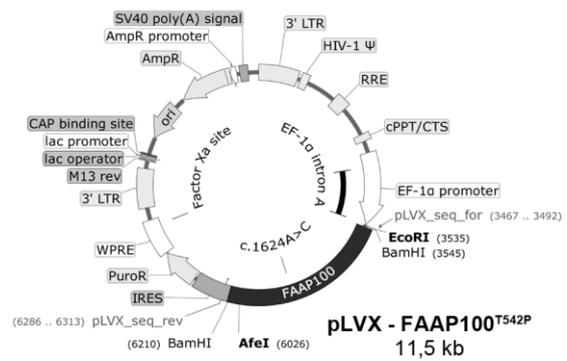
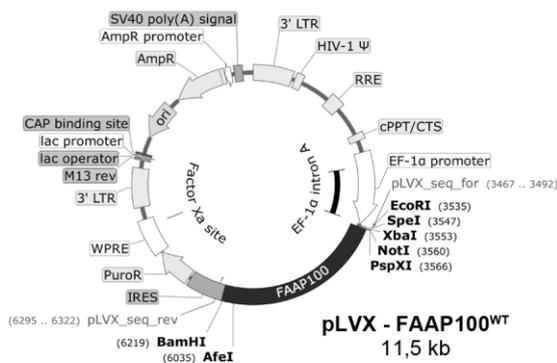
KO: Knockout, KI: Knockin

**Von Ozgene benutzte Primer und Sonden (*Probe*) für die mRNA-Expressionsanalyse durch RT-qPCR**

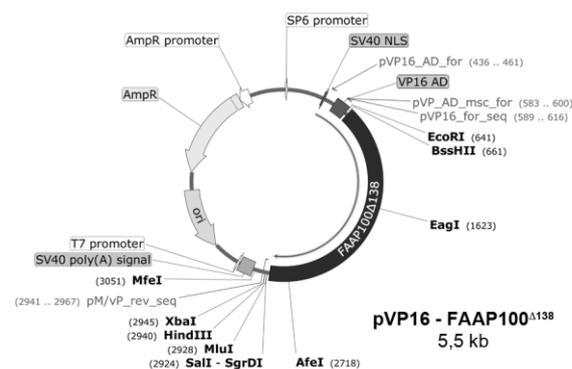
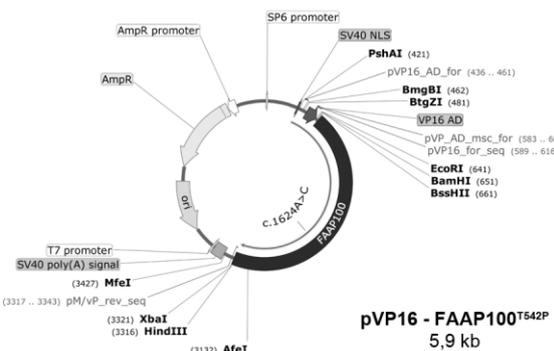
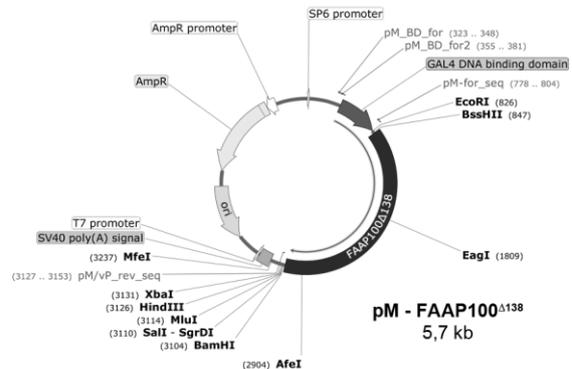
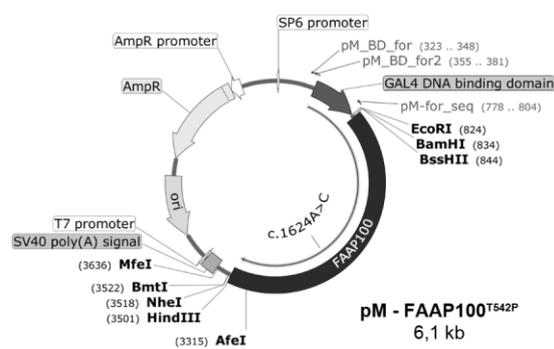
Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Nachweis/Ziel
PrimeTime Probe	/56-FAM/CCTACAGGT/ZEN/AGCACCGAGCTCCT/3IABkFQ/	Amplifikation von <i>Faap100</i> Exon 3-4
PrimeTime Primer 2	AGCCAGCTTGAACATCTGC	
PrimeTime Primer 1	CCTCAGAGTTCAAGTCCAGAC	
PrimeTime Probe	/56-FAM/AGGGCTCAA/ZEN/ATCCGTACAGCTAC/3IABkFQ/	Amplifikation von <i>Faap100</i> Exon 6-8
PrimeTime Primer 2	GTCAACCTCACCGTCCAT	
PrimeTime Primer 1	TCTGTATTCGTCTGATGATGGC	

## 7.2 Vektorkarten

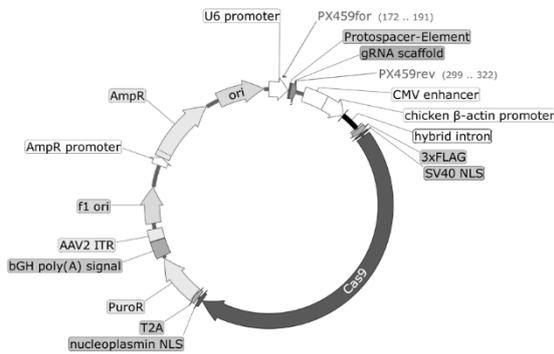
### 7.2.1 Vektoren für die Komplementationsstudien



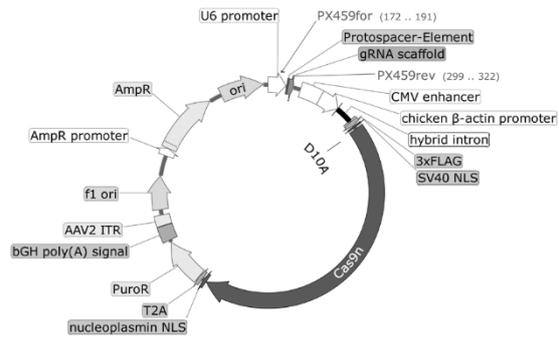
### 7.2.2 Vektoren für das Mammalian Two- bzw. Three-Hybrid System



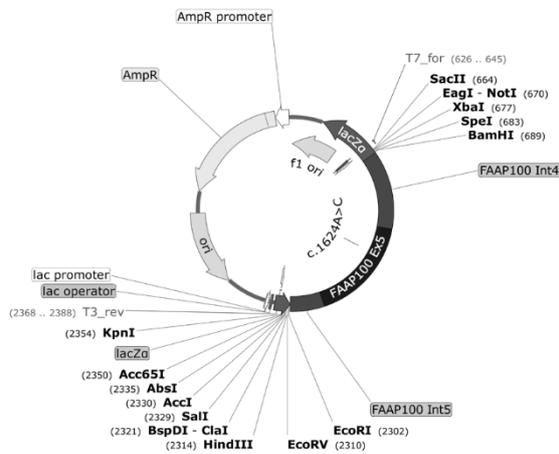
### 7. 2. 3 Vektoren für das CRISPR/Cas9-System



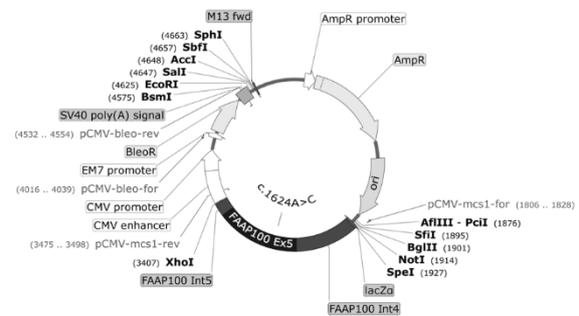
**pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) - gRNA**  
9,2 kb



**pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) - gRNA**  
9,2 kb



**pBlueScript II SK (+) - FAAP100<sup>T542P</sup> (Ex5+Int)**  
4,6 kb



**pCMV/Zeo - FAAP100<sup>T542P</sup> (Ex5+Int)**  
5,1 kb

## 7.3 Abkürzungsverzeichnis

% v/v	Volumenprozent	dHJ	doppelte Holliday-Junction-Struktur
°C	Grad Celsius	D-Loop	<i>displacement loop</i>
∞	Unendlichzeichen	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
A	Adenin	DMSO	Dimethylsulfoxid
aa	Aminosäure(n)	DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
AC	Amnionzellen	dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
ad	auf(füllen)	DSB	Doppelstrangbruch
AD	Aktivierungsdomäne	dsDNA	Doppelstrang-DNA
AGP20	Komplex aus FANCA, FANCG und FAAP20	dup	Duplikation
alt-EJ	alternatives <i>end joining</i>	E	Glutaminsäure
AML	akute myeloische Leukämie	e.g.	<i>exempli gratia</i> , zum Beispiel
BD	DNA-Bindedomäne	EBV	Epstein-Barr-Virus
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
BLAT	<i>BLAST-like alignment tool</i>	EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
BMF	<i>bone marrow failure</i> , Knochenmarkversagen	ESE	Spleiß-Enhancer-Motive
bp	Basenpaar(e)	ES-Zellen	embryonalen Stammzellen
BT	Bis-Tris	ExAC	Exome Aggregation Consortium
C (Aminosäure)	Cystein	FA	Fanconi-Anämie
C (Nukleinbase)	Cytosin	FAAP	Fanconi-Anämie assoziiertes Protein
c.	cDNA-Position	FBS	<i>fetal bovine serum</i>
ca.	circa	FCS	<i>fetal calf serum</i>
Cas9	Cas9-Nuklease	FLAG-Tag	Tag mit der Aminosäuresequenz DYKDDDDK
Cas9 RNP	Cas9-gRNA-Ribonukleoprotein-Komplex	fs	Frameshift
Cas9n	Cas9-Nickase	G (Aminosäure)	Glycin
Cas-Gene	CRISPR-assozierte Gene	G (Nukleinbase)	Guanin
CB	<i>chromatin bound</i> , Chromatin-gebunden	g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
CCD-Detektor	<i>Charge Coupled Device</i> -Detektor	gDNA	genomische DNA
CDDP	Cisplatin	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA	GG-NER	Globale Genom-NER
CE	<i>cytoplasmatic extract</i> , zytoplasmatischer Extrakt	gRNA	<i>guide RNA</i> , Leit-RNA
CEF	Komplex aus FANCC, FANCE und FANCF	GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i> , Graft-versus-Host-Reaktion
CML	chronische myeloische Leukämie	h	Stunde(n)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
Co-IP	Co-Immunpräzipitation	hg18, hg19	<i>Homo sapiens (human) genome assembly</i>
Cpf1	Cpf1 Nuklease	HGNC	HUGO Gen-Nomenklatur-Kommission
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>	HJ	Holliday-Junction-Struktur
crRNA	CRISPR-RNA	HLA	humanes Leukozytenantigen
Ct	<i>Threshold Cycle</i> , Schwellenwert	HNSCCs	<i>head and neck squamous cell carcinomas</i> , Plattenepithelkarzinome im Hals- und Kopfbereich
d	Tag(e)	HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
D2	nicht-monoubiquitiniertes FANCD2	HR	Homologe Rekombination
D2-Ub	monoubiquitiniertes FANCD2	HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
dbSNP	<i>Database of Short Genetic Variation</i>	HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
ddH <sub>2</sub> O	<i>Double-distilled water</i>	HUGO	Human Genome Organisation
DEB	Diepoxybutan	I	Isoleucin
del	Deletion	ICL	<i>Interstrand-Crosslink</i>
ID2-Komplex	Komplex aus FANCD2 und FANCI	nt	Nukleotide
IGV	Integrative Genomics Viewer	O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff, Disauerstoff

IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media	P	Prolin
IMPC	International Mouse Phenotyping Consortium	p.	Aminosäureposition im Protein
IP	Immunpräzipitation	PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen	PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	PBS-T	PBS mit 1 % Tween 20
kb	Kilobasen(paare)	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
kDa	Kilodalton	PE	Protospacer-Element
kF	komplexere Figuren	PenStrep	Penicillin-Streptomycin
KI	Knock-in	PI	Propidiumiodid
KO	Knockout	PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
KOMP	Knockout Mouse Project	p-Wert	<i>probability</i> -Wert, Wahrscheinlichkeits-Wert
L	Leucin	Qf	Quadriradialfiguren
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter	qPCR	quantitative Real-Time PCR
L/B	Lücken/Brüche	R	Arginin
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> bzw. Luria-Bertani-Medium	Rc	Ringchromosomen
LBP100	Komplex aus FANCL, FANCB und FAAP100	RefSeq	NCBI Reference Sequence Database
LC50	letale Konzentration für 50 % der Zellen	RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
LCL	<i>lymphoblastoid cell line</i> , lymphoblastoide Zelllinie	RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
LDS	Litiumdodecylsulfat	ROI	<i>Region Of Interest</i>
M	IUPAC Nukleotid-Code für die Basen Adenin oder Cytosin	ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffverbindungen
M, µM, nM	Molar, Mikromolar, Nanomolar	RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
m, nm	mol, nanomol	RT-qPCR	Reverse Transkriptase-qPCR
M2/3H	<i>Mammalian Two/Three Hybrid</i>	s	Sekund(en)
Mb	Megabase(n)	S	Serin
MDS	myelodysplastisches Syndrom	SaCas9	Endonuklease Cas9 aus <i>Staphylococcus aureus</i>
MEF	murine embryonale Fibroblasten	SDSA	<i>synthesis-dependent strand annealing</i>
MEM	Minimum Essential Medium	SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	sgRNA	<i>single-guide</i> RNA
min	Minute(n)	siRNA	<i>small interfering</i> RNA
misc	<i>miscellaneous</i>	SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
MMC	Mitomycin C	SpCas9	Endonuklease Cas9 aus <i>Streptococcus pyogenes</i>
MMEJ	<i>microhomology-mediated end joining</i>	SQ-Wert	<i>Starting Qunatity</i>
mRNA	<i>messenger</i> RNA, Boten-RNA	SRSF	Serin-Arginin-reiche Spleißfaktoren
MTC-Panel	<i>Multiple Tissue cDNA Panel</i>	SSA	<i>single strand DNA annealing</i>
N (Aminosäure)	Asparagin	ssDNA	Einzelstrang-DNA
N (Nukleinbase)	beliebige Nukleinbase	SV40	Simian Virus
NCBI	National Center for Biotechnology Informatio	SV40T	SV40 large T-Antigen
NE	nukleärer Extrakt	T (Aminosäure)	Threonin
NEB	New England Biolabs	T (Nukleinbase)	Thymin
NeoR	Neomycin-Resistenz	TA	Tris-Acetat
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur	TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>	TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>	TC-NER	Transkriptions-gekoppelte-NER
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisationssignal	td	<i>Touchdown</i>
nm	Nanometer	Tf	Triradialfiguren
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA Decay</i>	TLS	Translasionssynthese
tracrRNA	<i>trans-activating</i> CRISPR RNA	vCP	virales Coat-Protein
UAS	<i>upstream activating sequence</i>	WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>
UCSC	Genombrowser der University of California, Santa Cruz	WT	Wildtyp

UniProt	Universal Protein Resource	x g	g-Wert, Relative Zentrifugalbeschleunigung
UTR	<i>untranslated region</i> , untranslatierter Bereich	z. T.	zum Teil
V	Valin	z. B.	zum Beispiel
VACTERL(-H)	vertebrale Anomalien, <b>A</b> nalatresie, kardiale Fehlbildungen ( <i>cardial</i> ), tracheoösophageale Fisteln, Ösophagusatresie ( <i>esophageal atresia</i> ), renale Struktur anomalies, Gliedmaßenanomalien ( <i>limb</i> ), <b>H</b> ydrozephalus	$\alpha$ $\lambda$	anti Wellenlänge