

Aus der Medizinischen Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der Funktion von hSNM1B/Apollo im
Fanconi-Anämie/BRCA-Reparaturweg

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maren Schmiester

aus Oldenburg (Oldb)

Datum der Promotion: 22.09.2017

Abkürzungsverzeichnis

aa	„amino acids”, Aminosäuren
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
DCP	„DNA-protein crosslink”, DNA-Protein-Vernetzung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
FA	Fanconi-Anämie
FAAP	Fanconi-Anämie assoziiertes Protein
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FL	volle Länge
GTP	Guanosintriphosphat
h	„hours”, Stunden
HR	Homologe Rekombination
<i>hSNM1B/Apollo</i>	menschliches hSNM1B/Apollo-Gen
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICL	„interstrand crosslink”, DNA-Interstrangvernetzung
IP	Immunopräzipitation
IR	„ionizing radiation”, ionisierende Strahlung
kDa	Molekulargewicht in Kilodalton
M	molar
<i>mSNM1B/Apollo</i>	Murines hSNM1B/Apollo-Gen
min	Minuten
MMC	Mitomycin C
MRN	Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex
mRNA	„messenger RNA”, Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	„non-homologous end-joining”, nicht-homologe Endverknüpfung
RPA	Replikationsprotein A
rpm	„rotations per minute”, Rotationen pro Minute
sek	Sekunden
SIM	SUMO-bindende Domäne
siRNA	„small interfering RNA”, kleine eingreifende Ribonukleinsäure
STABW	Standardabweichung
TIF	„telomere dysfunction-induced foci”, Telomerdysfunktion-induzierte Foci
TLS	Translasionssynthese
Ub	Ubiquitin
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

1	Zusammenfassung	8
2	Abstract	9
3	Einleitung	11
3.1	Zellzyklus und Zellzykluskontrolle.....	11
3.2	ICL-Reparatur in verschiedenen Phasen des Zellzyklus.....	12
	3.2.1 Transläsionssynthese.....	14
	3.2.2 Nukleotidexzisionsreparatur.....	15
	3.2.3 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	15
3.3	Die Fanconi-Anämie.....	16
	3.3.1 Klinisches Bild.....	16
	3.3.2 Diagnosestellung und therapeutische Möglichkeiten.....	17
3.4	Der Fanconi-Anämie/BRCA-Reparaturweg.....	18
	3.4.1 Molekulare Mechanismen des FA/BRCA-Reparaturwegs.....	18
	3.4.2 Der FA/BRCA-Reparaturweg koordiniert die Funktion von strukturspezifischen Nukleasen.....	20
	3.4.3 Der FA/BRCA-Reparaturweg und NHEJ.....	21
	3.4.4 Der FA/BRCA-Reparaturweg und die Zellzykluskontrolle.....	22
	3.4.5 Der FA/BRCA-Reparaturweg und hämatopoetische Stammzellen.....	22
	3.4.6 Der FA/BRCA-Reparaturweg und reaktive Aldehyde.....	23
3.5	Aufbau und Funktionen des Proteins hSNM1B/Apollo.....	24
	3.5.1 Das hSNM1B/Apollo-Gen und sein Proteinprodukt.....	24
	3.5.2 Die Funktionen von hSNM1B/Apollo in der DNA-Reparatur.....	25
	3.5.3 Die Funktionen von hSNM1B/Apollo bei der Aufrechterhaltung der Telomerintegrität.....	26
4	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	27
5	Material	29
5.1	Zellreihen.....	29
5.2	Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	29
	5.2.1 Zellkultur Materialien.....	29
	5.2.2 Western Blot und Immunopräzipitation.....	30
	5.2.3 Antikörper.....	30
	5.2.4 Bakterien.....	31
	5.2.5 Expressionsplasmide.....	31
	5.2.6 Restriktionsenzyme.....	31
	5.2.7 siRNAs.....	31
	5.2.8 Kits.....	31
	5.2.9 Sonstige Chemikalien und Reagenzien.....	32
5.3	Geräte.....	33
	5.3.1 Inkubationssysteme.....	33
	5.3.2 Zentrifugen.....	33
	5.3.3 Mikroskope.....	33
	5.3.4 Sonstige Geräte.....	33
5.4	Software.....	34
5.5	Verwendete Lösungen und Puffer.....	34
	5.5.1 Proteinanalytik.....	34
	5.5.2 Bakterienkulturmedien und -platten.....	35
	5.5.3 DNA-Plasmidpräparation.....	35

5.5.4	Nukleinsäureaufarbeitung und -analytik.....	36
5.5.5	Weitere Lösungen und Puffer.....	36
6	Methoden	37
6.1	Zellkultur.....	37
6.1.1	Kultivierung und Ernte.....	37
6.1.2	Zellzahlbestimmung.....	38
6.1.3	Acetaldehyd-Behandlung.....	38
6.2	Proteinbiochemische Methoden.....	38
6.2.1	Proteinextraktion.....	38
6.2.2	(Ko-)Immunopräzipitation.....	39
6.2.3	Protein-Gelelektrophorese.....	40
6.2.4	Western Blot.....	40
6.2.5	Proteindetektion.....	41
6.2.6	Quantifizierung von Proteinbanden.....	42
6.2.7	Strippen von Membranen.....	43
6.2.8	Immunfluoreszenz.....	43
6.3	Molekularbiologische Methoden.....	45
6.3.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	45
6.3.2	Herstellung der hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-Expressionsplasmide.....	45
6.3.3	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-Expressionsplasmiden zur Interaktionsanalyse.....	49
6.3.4	In-vitro Translation von hSNM1B/Apollo, FANCP/SLX4 und ihrer Teilstücke.....	51
6.3.5	Ko-Immunopräzipitation in-vitro translaterter Proteine.....	54
6.3.6	Funktionsprüfung der in-vitro translaterter Proteine.....	55
6.3.7	Transiente Transfektion von U2OS-Zellen mit small interfering RNAs (siRNAs).....	55
6.4	Zellbiologische Methoden.....	56
6.4.1	Kolonienbildungsstudien.....	56
6.4.2	Bestimmung der mittelten inhibitorischen Acetaldehyd-Konzentration (IC ₅₀).....	57
6.5	Chromosomenbruchanalysen.....	57
6.5.1	Induzierte Chromosomenschädigung durch Acetaldehyd.....	57
6.5.2	Chromosomenaufarbeitung.....	57
6.5.3	Chromosomenauswertung.....	58
7	Ergebnisse	59
7.1	Untersuchung der Interaktion von hSNM1B/Apollo mit FANCP/SLX4.....	59
7.1.1	Herstellung der hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-kodierenden Plasmide.....	59
7.1.2	Ko-Immunopräzipitationsstudien mit ektopisch exprimiertem hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4.....	61
7.1.3	Ko-Immunopräzipitationsstudien mit in-vitro translaterter hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4.....	65
7.2	Untersuchung der Bindung von hSNM1B/Apollo an andere hSNM1B/Apollo-Moleküle.....	69
7.2.1	Ko-Immunopräzipitation von Myc-hSNM1B/Apollo mit Flag-hSNM1B/Apollo und Eingrenzung der Bindungsstelle.....	69
7.2.2	Ko-Immunopräzipitationsstudien mit in-vitro translaterter Myc-hSNM1B/Apollo und Flag-hSNM1B/Apollo.....	70
7.2.3	Funktionsprüfung der in-vitro translaterter Proteine für die hSNM1B/Apollo-hSNM1B/Apollo-Interaktionsanalyse.....	72
7.3	Quantifizierung von Telomer-assoziierten Proteinen nach FANCP/SLX4-, FANCA- oder FANCD2-Depletion.....	73

7.3.1	<i>Quantifizierung der TRF1-Menge</i>	74
7.3.2	<i>Quantifizierung der TRF2-Menge</i>	74
7.4	Untersuchung der Acetaldehyd-Sensitivität von hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-depletierten Zellen	76
7.4.1	<i>FANCD2-Monoubiquitinierung</i>	76
7.4.2	<i>Kolonienbildungsstudien</i>	78
7.4.3	<i>Chromosomenbrüchigkeit</i>	83
7.5	Dizentrische Chromosomen bei hSNM1B/Apollo-depletierten U2OS-Zellen	88
7.6	Ko-Lokalisation von TRF1- und γ H2AX-Foci bei hSNM1B/Apollo-depletierten U2OS-Zellen	89
8	Diskussion	92
8.1	hSNM1B/Apollo bindet an FANCP/SLX4	92
8.1.1	<i>Komplexe Interaktion von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4</i>	93
8.1.2	<i>hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4-Teilstücke interagieren nicht im zellfreien System</i>	98
8.2	hSNM1B/Apollo bindet weitere hSNM1B/Apollo-Moleküle	99
8.3	Wechselwirkungen zwischen dem FA/BRCA-Reparaturweg und den telomerassoziierten Proteinen TRF1 und TRF2	101
8.4	Bedeutung von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 für die zelluläre Acetaldehyd-Sensitivität	102
8.4.1	<i>Acetaldehyd aktiviert den FA-BRCA-Reparaturweg nach Depletion von hSNM1B/Apollo oder FANCP/SLX4</i>	102
8.4.2	<i>hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 agieren nicht epistatisch in der zellulären Antwort auf Acetaldehyd-induzierte DNA-Schäden</i>	103
8.4.3	<i>Acetaldehyd induziert chromosomale Aberrationen unabhängig von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4</i>	106
8.5	Dizentrische Chromosomen bei hSNM1B/Apollo-depletierten U2OS-Zellen	109
8.6	Telomerdysfunktion bei hSNM1B/Apollo-depletierten U2OS-Zellen	111
9	Ausblick	112
10	Literaturverzeichnis	114
11	Eidesstattliche Versicherung	122
12	Lebenslauf	124
13	Publikationsliste	125
14	Danksagung	126

1 Zusammenfassung

Einleitung: Die Fanconi-Anämie (FA) ist ein seltenes Chromosomeninstabilitätssyndrom, das sich durch kongenitale Fehlbildungen, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von malignen Erkrankungen und Knochenmarkversagen manifestiert. Ursächlich ist eine Störung der zellulären Reparatur von DNA-Interstrangvernetzungen (ICLs), deren Entstehung vermutlich hauptsächlich durch reaktive Aldehyde wie Acetaldehyd bedingt wird. Aktuell sind 19 Gene bekannt, die für FA-Proteine kodieren (FANCA-FANCT); diese bilden gemeinsam mit anderen Proteinen den FA/BRCA-DNA-Reparaturweg. Die Nuklease hSNM1B/Apollo ist neben ihrer Funktion beim Schutz der Telomere ebenfalls an der ICL-Reparatur beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ihre Rolle im FA/BRCA-Reparaturweg charakterisiert.

Methodik: Ko-Immunopräzipitationsstudien mit endogenen, ektopisch exprimierten und *in-vitro* translatierten Proteinen wurden durchgeführt, um die Interaktion von hSNM1B/Apollo und dem FA-Protein FANCP/SLX4 zu untersuchen und ihre Bindungsdomänen zu kartieren. Dieselbe Methode wurde zur Charakterisierung der hSNM1B/Apollo-Multimerbildung verwendet. Zur Analyse der Telomerfunktionen von FANCP/SLX4, FANCD2 und FANCA wurden nach ihrer Depletion in U2OS-Zellen die zellulären Mengen der Telomer-assoziierten Proteine TRF1 und TRF2 im Western Blot quantifiziert. Außerdem wurden Telomerdysfunktion-induzierte Foci (TIFs) in hSNM1B/Apollo-depletierten Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Kolonienbildungsstudien und Chromosomenbrüchigkeitsuntersuchungen lieferten Erkenntnisse über den Effekt einer Acetaldehyd-Behandlung auf hSNM1B/Apollo- oder/und FANCP/SLX4-depletierte-Zellen.

Ergebnisse: Eine Bindung von hSNM1B/Apollo an endogenes FANCP/SLX4 konnte gezeigt werden, im zellfreien System bestand diese Interaktion jedoch nicht. Die Ergebnisse der Versuche zur Kartierung der Proteinbindungsstellen deuteten auf mindestens zwei separate Interaktionsdomänen hin. Auch die Bindung von hSNM1B/Apollo an weitere hSNM1B/Apollo-Moleküle bestand nur zwischen zellulär synthetisierten Proteinen und wird über mehrere Domänen vermittelt. Die Depletion von FANCP/SLX4 führte zu einer signifikanten Reduktion der zellulären TRF2-Menge und eine hSNM1B/Apollo-Depletion ging mit einem signifikanten Anstieg an dizentrischen Chromosomen und TIFs einher. Nur FANCP/SLX4-depletierte Zellen wiesen eine gesteigerte, aber milde Sensitivität gegenüber Acetaldehyd auf.

Schlussfolgerungen: Die Ergebnisse dieser Untersuchungen liefern weitere Beweise für die duale Funktion von hSNM1B/Apollo bei der DNA-Schadensantwort und der Aufrechterhaltung der Telomerintegrität. Über eine komplexe und womöglich über post-translationale Modifikationen vermittelte Interaktion bindet die Nuklease an FANCP/SLX4 und ist darüber direkt mit dem FA/BRCA-Reparaturweg verbunden. Zudem induziert ihre Depletion eine Telomerdysfunktion mit Hinweisen für Telomerfusionen. Da hSNM1B/Apollo-depletierte Zellen bekanntermaßen Hypersensitivitäten gegenüber ICL-induzierenden Substanzen aufweisen, gibt die fehlende Acetaldehyd-Hypersensitivität Anlass zur kritischen Hinterfragung des aktuellen Wissensstands über den primären Schädigungsmechanismus des Aldehyds. Die milde Acetaldehyd-Hypersensitivität von FANCP/SLX4-depletierten Zellen bekräftigt Schlussfolgerungen anderer Studien, nach denen Mutationen in verschiedenen FA-Genen unterschiedlich ausgeprägte zelluläre Empfindlichkeiten gegenüber demselben DNA-schädigenden Agens bedingen können.

2 Abstract

Objectives: Fanconi Anemia (FA) is a genetic disorder manifesting in congenital defects, increased risk of cancer and bone marrow failure. The primary defect lies in the inability of affected cells to repair DNA interstrand crosslinks (ICLs), many of which are likely caused by reactive aldehydes such as acetaldehyde. To date, there are 19 known genes that encode FA proteins (FANCA-FANCT), all of which function in the FA/BRCA DNA repair pathway. In addition to protecting telomeres, the nuclease hSNM1B/Apollo is also involved in the repair of ICLs. The experiments performed here examine the role of hSNM1B/Apollo within the FA/BRCA pathway.

Methods: Co-immunoprecipitation experiments were performed with endogenous, ectopically expressed and *in-vitro* translated proteins to analyze the interaction between hSNM1B/Apollo and the FA protein FANCP/SLX4 and to map their binding domains. The same method was used to study the binding of hSNM1B/Apollo to other hSNM1B/Apollo molecules. The functions of FANCP/SLX4, FANCD2 and FANCA at telomeres in U2OS cells were examined after their depletion by quantifying the cellular amounts of the telomeric proteins TRF1 and TRF2 on Western Blots. Telomere dysfunction-induced foci (TIFs) were analyzed via immunofluorescence microscopy after hSNM1B/Apollo depletion. Colony survival and

chromosome breakage assays were performed to examine the effects of acetaldehyde-exposure on hSNM1B/Apollo- or/and FANCP/SLX4-depleted cells.

Results: While hSNM1B/Apollo was shown to bind endogenous FANCP/SLX4, this interaction could not be confirmed with *in-vitro* translated proteins. Mapping of the interacting domains suggested at least two separate binding areas. Similarly, only endogenously produced hSNM1B/Apollo was able to bind other hSNM1B/Apollo molecules and multiple binding sites mediate this interaction. The depletion of FANCP/SLX4 lead to a significant reduction of TRF2 and depleting cells of hSNM1B/Apollo significantly increased the amounts of dicentric chromosomes and TIFs. A mild hypersensitivity for acetaldehyde was observed only in FANCP/SLX4-depleted cells.

Conclusion: These results further establish the dual role of hSNM1B/Apollo compromised of DNA-damage repair and telomere maintenance. Via a complex interaction with FANCP/SLX4, which is possibly being mediated by post-translational modifications, the nuclease is directly linked to the FA/BRCA-pathway. Its' depletion induces telomere dysfunction with signs of telomere fusions. Since hSNM1B/Apollo-depleted cells show hypersensitivities towards ICL-inducing agents, their lack of hypersensitivity towards acetaldehyde raises questions regarding the primary DNA-damaging mechanism of this particular aldehyde. The mild hypersensitivity observed in FANCP/SLX4-depleted cells supports conclusions of other studies suggesting that mutations in different FA genes can lead to distinctive cellular sensitivities for specific DNA-damaging agents.

3 Einleitung

In jeder der etwa 10^{13} Zellen des menschlichen Körpers entstehen täglich mehrere Zehntausend schädliche Veränderungen am Erbmateriale. Ursächlich sind chemische oder physikalische Noxen, die sowohl endogen als auch exogen auf die Zellen einwirken. Je nach Art und Lokalisation der Läsionen werden die Funktionen der betroffenen Zelle in unterschiedlichen Ausmaßen beeinträchtigt. Eine unerkannte Akkumulation von DNA-Schäden kann durch die daraus resultierenden Mutationen die Lebensfähigkeit der Zelle oder sogar des ganzen Organismus bedrohen.^{1 2} Zum Schutz ihrer genomischen Integrität besitzen alle Zellen Mechanismen zur Erkennung und zur effektiven Reparatur von DNA-Schäden. Handelt es sich um eine irreparable Schädigung, kommt es entweder zum dauerhaften Proliferationsstopp oder zur Einleitung des programmierten Zelltods, der Apoptose. An diesen komplexen Prozessen sind verschiedene Signalkaskaden beteiligt, die gemeinsam als DNA-Schadensantwort bezeichnet werden.³

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fanconi-Anämie (FA), die durch Mutationen in verschiedenen an der DNA-Reparatur beteiligten Genen verursacht wird. Im Speziellen wurde untersucht, welche Rolle die Nuklease DCLRE1B in dem bei der Fanconi-Anämie beeinträchtigtem DNA-Reparaturweg spielt. Da der offizielle Name dieser Nuklease in der Literatur kaum Verwendung findet, wird sie auch in dieser Arbeit mit dem synonym gebrauchten Namen hSNM1B/Apollo bezeichnet. Im Folgenden sollen zur Darlegung des Hintergrunds der Fragestellung zunächst die Mechanismen der DNA-Schadenserkennung und -Reparatur umrissen werden.

3.1 Zellzyklus und Zellzykluskontrolle

Der Zellzyklus wird von jeder proliferierenden Zelle in aufeinander folgenden Phasen durchlaufen. Er wird unterteilt in die M(Mitose)-Phase, in der die Kernteilung stattfindet, und die Interphase, die unter anderem der Verdopplung der DNA dient. Die Interphase besteht aus der G1(„gap“)-, der S(Synthese)-Phase und der G2-Phase. In der S-Phase wird die zelluläre DNA repliziert, während in der G1- und in der G2-Phase Vorbereitungen auf die folgende S- bzw. M-Phase erfolgen. Die G1-Phase ist von besonderer Bedeutung, da hier über die Weiterentwicklung der Zelle entschieden wird. Die Zelle kann einen weiteren Teilungszyklus durchlaufen oder in die G0-Phase übergehen, in der vorübergehend oder auch dauerhaft keine Zellteilung stattfindet.⁴ Am Übergang der G1- zur S-Phase, innerhalb der S-Phase und am

Übergang der S- zur G2-Phase durchläuft die Zelle Kontrollpunkte (Checkpoints) zur Sicherstellung der geregelten Zellteilung. Sich teilende Zellen können die Checkpoints nur passieren, wenn alle Prozesse der vorausgegangenen Zellzyklus-Phase einwandfrei abgeschlossen wurden. Kann dies aufgrund von Schäden an der DNA nicht geschehen, so wird der Teilungszyklus angehalten.⁵ Die Signalisierung von DNA-Schäden erfolgt über ein komplexes Netzwerk aus Sensor-, Mediator- und Effektorproteinen. In Säugerzellen spielen die Proteinkinasen ATM (Ataxia telangiectasia mutated), ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) und DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) herausragende Rollen als Mediatoren. ATM und DNA-PK werden an DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) rekrutiert und dort aktiviert. Bei ATR wird die Aktivierung durch von Replikationsprotein A (RPA) umgebener Einzelstrang-DNA, die bei verschiedenen DNA-Läsionen entsteht, vermittelt.^{6 7} ATM, ATR und DNA-PK können wiederum die Proteinkinasen Chk1 und Chk2 aktivieren und gemeinsam mit diesen und weiteren Proteinen die Aktivität von verschiedenen Cyklin-abhängigen Kinasen regulieren. Aktive Cyklin-abhängige Kinasen sind für das Voranschreiten des Zellzyklus essenziell; ihre Inhibition am G1/S-, intra-S- und S/G2-Checkpoint führt zum Arrest der Zellteilung. Diese Pause in der Zellteilung wird zur Beseitigung der DNA-Schäden genutzt.⁸ Weitere ATM/ATR/DNA-PK-vermittelte Signalkaskaden führen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53, der wiederum Zellzyklusarrest, DNA-Reparaturmechanismen oder Apoptose einleiten kann.^{9 10}

3.2 ICL-Reparatur in verschiedenen Phasen des Zellzyklus

Es gibt viele verschiedene Arten von Schäden am Erbgut: Unter anderem können einzelne DNA-Basen verloren gehen, Basen-Addukte gebildet werden oder Pyrimidin-Dimere entstehen. Außerdem können Einzel- oder Doppelstrangbrüche oder kovalente Bindungen zwischen den DNA-Doppelsträngen ausgebildet werden („interstrand crosslinks“, ICLs). Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene DNA-Reparaturmechanismen entwickelt, die auf die Behebung bestimmter DNA-Schäden spezialisiert sind.^{5 11}

ICLs sind besonders schwerwiegende Läsionen, da sie das Öffnen des DNA-Doppelstrangs und somit das Ablesen und das für die Zellteilung notwendige Verdoppeln der DNA verhindern. 1973 wurde zum ersten Mal beschrieben, dass FA-Zellen eine gesteigerte Sensitivität gegenüber DNA-Interstragvernetzenden Substanzen aufweisen.¹² Eine Unfähigkeit zur adäquaten Reparatur von ICLs liegt der FA zugrunde. Die speziellen ICL-Reparaturmechanismen sind daher von besonderem Interesse für diese Arbeit und werden im Folgenden genauer erläutert.

Da ICLs die Replikation und die Transkription der DNA blockieren, müssen sie sowohl in proliferierenden als auch in nicht proliferierenden Zellen schnellstmöglich repariert werden. Je nachdem, ob sich die Zelle innerhalb oder außerhalb der S-Phase befindet, erfolgt die Reparatur von ICLs S-Phase-abhängig oder S-Phase-unabhängig.¹³ In beiden Fällen schneiden zunächst Nukleasen am selben DNA-Strang 5'-wärts und 3'-wärts der Läsion und lösen sie somit heraus. Findet die Reparatur unabhängig von der DNA-Replikation statt, entsteht durch diesen Prozess eine Lücke in einem der DNA-Einzelstränge, während das ausgeschnittene Oligonukleotid weiterhin mit dem gegenüberliegenden DNA-Einzelstrang verbunden ist. Klassische Modelle der Replikations-abhängigen ICL-Reparatur gingen davon aus, dass die Kollision einer Replikationsgabel mit der Läsion die Reparatur einleitet. Neuere Ergebnisse, die an *Xenopus*-Ei-Extrakten gewonnen wurden, lieferten genauere Einblicke in den Ablauf der ICL-Reparatur und legen nahe, dass erst bei der Kollision von zwei Replikationsgabeln das Herauslösen eines ICLs veranlasst werden kann.¹⁴ In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass eine einzelne Replikationsgabel ein ICL zunächst umgehen und dann eine Reparatur induzieren kann.¹⁵ In jedem Fall führt das Herauslösen der Läsion innerhalb der S-Phase zur Entstehung einer Einzelstranglücke und einem Doppelstrangbruch in dem komplementären DNA-Strang.

Zur Reparatur der Einzelstranglücke kommen sowohl beim S-Phase-unabhängigen als auch beim S-Phase-abhängigen Reparaturweg die Enzyme der Transläsionssynthese und der Nukleotidexzisionsreparatur zum Einsatz. Bei der S-Phase-abhängigen ICL-Reparatur werden entstandene DSB im Anschluss repariert.¹⁶⁻¹⁹ In Abbildung 1 ist ein aktuelles, vereinfachtes Modell der ICL-Reparatur innerhalb und außerhalb der S-Phase dargestellt. Die angesprochenen Reparaturmechanismen werden unten genauer erläutert.

Mechanismen der DNA-ICL-Reparatur

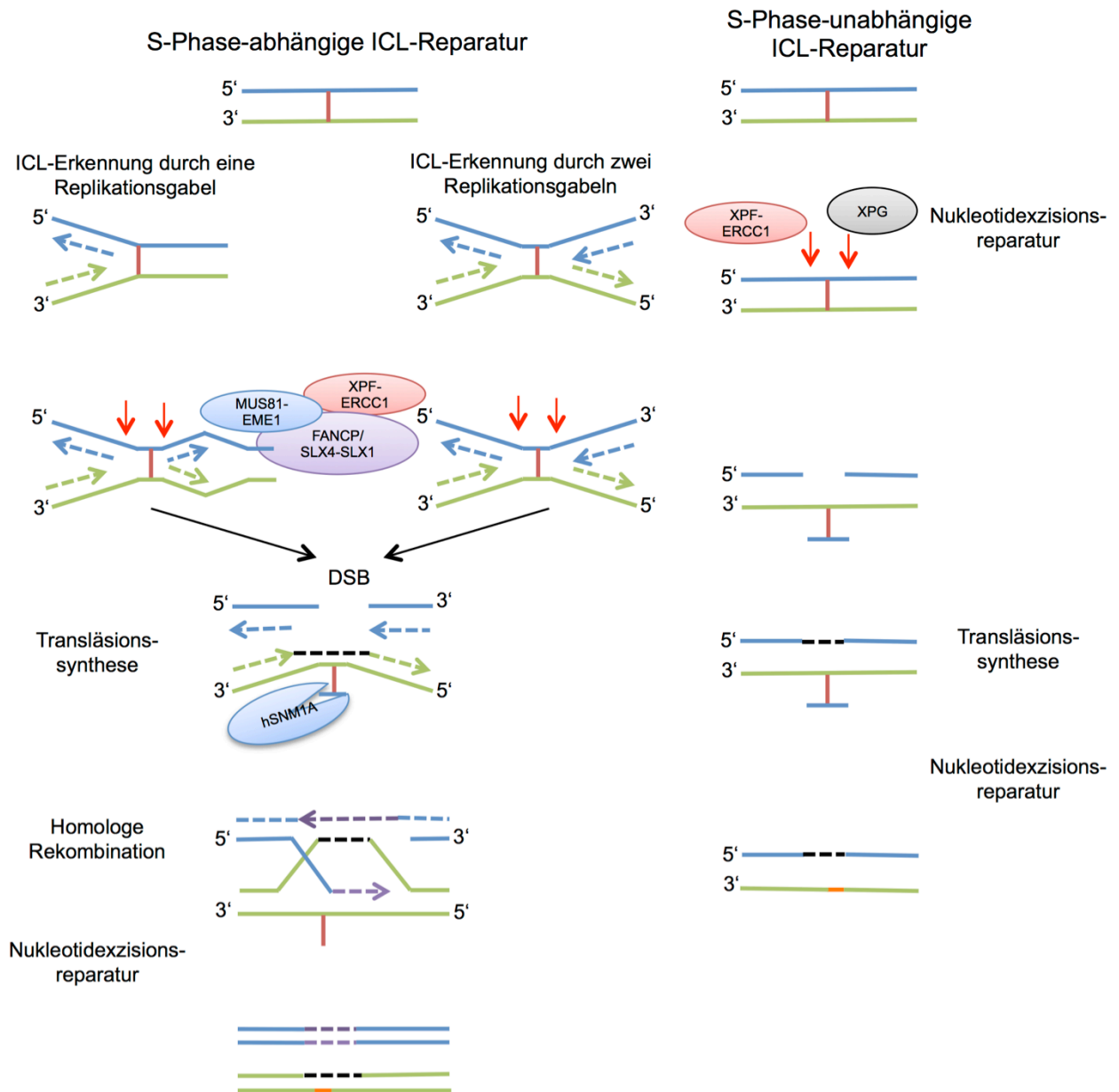


Abbildung 1 Vereinfachte Darstellung der S-Phase-abhängigen und S-Phase-unabhängigen ICL-Reparaturmechanismen.^{18 19} Die Abbildung zeigt schematisch die wichtigsten Schritte der ICL-Reparatur in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Die kovalente DNA-Interstrangvernetzung ist rot, die Schwesterchromatiden blau bzw. grün, mittels Transläsionssynthese synthetisierte DNA schwarz, mittels homologer Rekombination synthetisierte DNA violett und mittels Nukleotidexzisionsreparatur synthetisierte DNA orange dargestellt. Rote Pfeile deuten Inzisionen der DNA durch Nukleasen an. Nur einige der beteiligten Proteine sind genannt. Erklärung im Text.

3.2.1 Transläsionssynthese

Die Transläsionssynthese (TLS) ist ein Schadentoleranzmechanismus von Zellen, der eine Fortführung der DNA-Replikation ermöglicht, auch wenn Schäden das Voranschreiten der

DNA-Polymerasen δ und ϵ blockieren. Spezielle Polymerasen haben die Fähigkeit, über Läsionen hinweg zu synthetisieren und somit das Abbrechen der Replikation zu verhindern. Sie sind fehleranfälliger als die Polymerasen der regulären DNA-Replikation, aber essenziell für die Wiederherstellung einer strukturell intakten DNA. Im Rahmen der ICL-Reparatur wird dieser Mechanismus nach dem Herauslösen der Läsion zur Reparatur der Einzelstrangspalte angewendet.^{18 20}

3.2.2 Nukleotidexzisionsreparatur

Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) ist bei der S-Phase-unabhängigen ICL-Reparatur an dem Herauslösen des ICLs beteiligt und dient bei beiden Reparaturmechanismen der abschließenden Entfernung der herausgelösten Läsion.¹⁸ Sie ist außerdem der wichtigste Mechanismus von Säugerzellen zur Entfernung von sperrigen DNA-Läsionen wie Pyrimidin-Dimeren, die durch UV-Strahlen entstehen können. Wird ein entsprechender Schaden an der DNA entdeckt, schneidet die Nuklease ERCC1-XPF den betroffenen Einzelstrang 5'-wärts von der Läsion. Verschiedene Polymerasen können durch DNA-Reparatur-Synthese den geschädigten Abschnitt wiederherstellen. Die Nuklease XPG schneidet anschließend 3'-wärts von der Läsion, der geschädigte DNA-Strang wird entfernt und der neu synthetisierte DNA-Abschnitt ligiert.^{21 22}

3.2.3 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Zellen besitzen verschiedene Mechanismen zur Reparatur von DSB, unter anderem die Homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe Endverknüpfung („non-homologous end-joining“, NHEJ). Im Rahmen der ICL-Reparatur entstandene DSB werden für gewöhnlich durch HR repariert, aufgrund ihrer Bedeutung für das Krankheitsbild der Fanconi-Anämie werden jedoch beide Reparaturwege genauer dargestellt.

3.2.3.1 Homologe Rekombination

Bei der HR wird der homologe DNA-Abschnitt des Schwesterchromatids zur Reparatur eines DSB herangezogen. Diese Art der Reparatur findet hauptsächlich in der S- und der G2-Phase des Zellzyklus statt und gilt als weitestgehend fehlerfrei. Zunächst kommt es zur End-Resektion im Bereich des DSB, sodass an dem 3'-Ende einsträngige DNA entsteht. Rad51, das Schlüsselenzym der HR, bindet an die einsträngige DNA und vermittelt die Invasion des geschädigten Chromatids an die homologe Sequenz auf dem intakten Schwesterchromatid.^{18 23} Es finden ein Strangaustausch und eine Basenpaarung an den homologen DNA-Sequenzen statt.

Das intakte Schwesterchromatid wird als Vorlage zur Replikation und somit zur Reparatur des geschädigten Schwesterchromatids genutzt. Anschließend gibt es mehrere mögliche Verläufe der HR, bei einigen entstehen DNA-Überkreuzstrukturen (Holliday-Junctions). In jedem Fall folgt der Reparatur ein Ligationsschritt und nach der Trennung der DNA-Stränge liegen wieder zwei intakte Moleküle vor.^{24 25}

3.2.3.2 Nicht-homologe Endverknüpfung

Im Gegensatz zur HR findet die Reparatur von DSB bei der NHEJ unabhängig von Sequenzhomologien statt. Bei dieser Form der DSB-Reparatur, die in allen Phasen des Zellzyklus erfolgt und der meist genutzte DSB-Reparaturweg in Säugerzellen ist, werden die aus den DSB resultierenden DNA-Enden miteinander ligiert. Hierbei kommt es fast immer zu Veränderungen der Sequenz, meistens zu kleinen Deletionen. Dennoch spielt die NHEJ besonders wegen ihrer schnellen Kinetik unter anderem bei der Verhinderung von Translokationen und somit bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität eine wichtige Rolle.^{16 23 26}

3.3 Die Fanconi-Anämie

3.3.1 Klinisches Bild

Im Jahr 1927 beschrieb der schweizerische Pädiater Guido Fanconi den Fall dreier Brüder, die diverse angeborene Fehlbildungen aufwiesen und an einer der perniziösen Anämie ähnelnden Erkrankung verstarben.²⁷ Die nach ihm benannte Fanconi-Anämie tritt mit einer Häufigkeit von 1:100.000-400.000 Geburten auf und wird meistens autosomal-rezessiv vererbt.^{19 28} Klassischerweise manifestiert sich die FA klinisch über Fehlbildungen, Knochenmarkversagen und ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung maligner Erkrankungen.

Häufige angeborene Fehlbildungen bei FA-Patienten sind Malformationen der Daumen, Radiushypo- oder -aplasie, Kleinwuchs, Mikrozephalie und eine abnorme Fazies. Des Weiteren kann es zu Pigmentierungsstörungen der Haut, Veränderungen der Reproduktionsorgane oder Störungen der Nieren-, Herz-Kreislauf- oder gastrointestinalen Funktionen kommen. Bis zu ein Drittel der Betroffenen weisen jedoch keine dieser Merkmale auf.^{29 30}

Aufgrund ihrer Schwere stehen die hämatologischen Manifestationen der FA im Mittelpunkt der medizinischen Betreuung der Patienten im Kindesalter. Typischerweise kommt es bereits innerhalb der ersten Lebensdekade zu einer progressiven Rückbildung des Knochenmarks mit

Panzytopenie, wobei eine Thrombozytopenie oder Leukopenie der Anämie oft vorrausgeht. Die kumulative Inzidenz des Knochenmarkversagens bei FA-Patienten im Alter von 40 Jahren wird auf 90% geschätzt, die der malignen hämatologischen Erkrankungen auf 33%.³¹ Hier dominiert vor allem die akute myeloische Leukämie, das Erkrankungsrisiko ist im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung etwa 500-fach erhöht. Außerdem haben FA-Patienten ein gesteigertes Risiko für die Entwicklung von soliden Tumoren: Besonders Plattenepithelkarzinome des Kopfes, Halses, Ösophagus und der anogenitalen Region sind häufig, ebenso Tumoren der Brust oder des Gehirns. Aufgrund der Therapieerfolge im Laufe der letzten Jahrzehnte gewinnen diese Erkrankungen an klinischer Relevanz, da FA-Patienten höhere Lebensalter erreichen und somit die Gefahr der Tumorentwicklung, besonderes nach erfolgter hämatopoetischer Stammzelltransplantation, steigt.³²⁻³⁶ Trotz einer Verbesserung der Überlebensrate erreichen nur knapp 40% von FA-Patienten ihr 30. Lebensjahr.³⁷

3.3.2 Diagnosestellung und therapeutische Möglichkeiten

Die Diagnosestellung der FA erfolgt über eine Chromosomenbruchanalyse aus Lymphozyten des peripheren Bluts, die mit der DNA-Interstragvernetzenden Substanz Mitomycin C (MMC) behandelt werden. FA-Zellen weisen spontan eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit auf, die durch eine MMC-Behandlung dramatisch verstärkt wird. Neben einfachen Chromatidbrüchen finden sich auch komplizierte Austauschfiguren unter Beteiligung von zwei oder mehr Chromosomen. Eine DNA-Sequenzanalyse dient der Identifikation des genetischen Subtyps des FA-Patienten.^{29 30}

Aufgrund der schwerwiegenden hämatologischen Komplikationen der FA beinhaltet die Therapie bei etwa der Hälfte aller Patienten eine hämatopoetische Stammzelltransplantation, hierbei stellen jedoch die gesteigerte Empfindlichkeit der FA-Zellen gegenüber Bestrahlung und Chemotherapeutika sowie Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen besondere Herausforderungen dar.^{33 37 38} Zur symptomatischen Therapie werden Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate verabreicht; die Gabe von Wachstumsfaktoren zur Anregung der Synthese von neutrophilen Granulozyten muss vorsichtig geschehen, da diese Faktoren die Entwicklung von Leukämien begünstigen können. Androgene werden zur Stimulierung der Blutbildung verabreicht, Nebenwirkungen wie Virilisierung und Leberadenome limitieren jedoch auch ihren Einsatz.^{29 39}

3.4 Der Fanconi-Anämie/BRCA-Reparaturweg

Die Fanconi-Anämie stellt sich genetisch sehr heterogen dar: Derzeit sind 19 verschiedene Gene bekannt, bei denen biallelische Mutationen das Krankheitsbild hervorrufen (*FANCA-FANCT*). Eine Ausnahme ist *FANCB*, dieses Gen wird X-chromosomal-rezessiv vererbt. Während die FA-Proteine essenziell für die S-Phase-abhängige ICL-Erkennung- und Reparatur sind, wird ihre Rolle in der Beseitigung von ICLs außerhalb der S-Phase noch diskutiert. Neben ihrer Bedeutung für die ICL-Reparatur wird vermutet, dass FA-Proteine den fehleranfälligen Aktivitäten der NHEJ teilweise entgegenwirken, an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind und die normale Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen ermöglichen. Interessanterweise sind nahezu alle FA-Proteine auch an anderen DNA-Reparaturwegen und Mechanismen zur Erhaltung der genomischen Integrität beteiligt, sodass sich bei genauer Betrachtung ihrer Funktionen ein äußerst komplexes Netzwerk der zellulären DNA-Reparatur darstellt.^{16 18} Monoallelische Mutationen in den FA-Genen *BRCA1 (FANCS)* und *BRCA2 (FANCD2)* erhöhen die Wahrscheinlichkeit der Brustkrebsentwicklung. Um die Verbindung zwischen FA und Brustkrebs zu unterstreichen, wurde der durch die FA-Proteine koordinierte und durchgeführte Mechanismus der ICL-Reparatur „FA/BRCA-Reparaturweg“ genannt.⁴⁰

3.4.1 Molekulare Mechanismen des FA/BRCA-Reparaturwegs

ICLs verhindern das Auftrennen des DNA-Doppelstrangs und bedingen somit ein Verharren der Replikationsgabel vor der Läsion. Dies führt zur Rekrutierung des FA-Proteins FANCM, das mit den Fanconi-Anämie-assoziierten Proteinen (FAAP) FAAP 24, FAAP 10 und FAAP 16 einen Komplex bildet und sich an das Chromatin anlagert. FANCM und FAAP 24 bedingen die Anlagerung von RPA an die DNA, was wiederum, wie in Absatz 3.1 beschrieben, die Rekrutierung und Aktivierung von ATR ermöglicht.^{41 42} Aktiviertes ATR initiiert nun über Phosphorylierungen verschiedene Signalkaskaden und trägt zur Aktivierung des S-Phase-Checkpoints und somit zum Zellzyklusarrest bei.⁴³

Neben FANCM und den genannten Fanconi-Anämie-assoziierten Proteinen werden die FA-Proteine A, B, C E, F, G und L sowie die FA-assoziierten Proteine FAAP 20 und FAAP 100 zum DSB rekrutiert. Diese Proteine bilden gemeinsam den sogenannten „FA core complex“, der sich durch eine Ubiquitin(Ub)-Ligase-Funktion auszeichnet. Die Monoubiquitinierung von FANCD2 durch den FA core complex an Lysin 561 und, wenn auch weniger bedeutsam, von FANCI an Lysin 523 wird als Aktivierungsschritt des FA/BRCA-Reparaturwegs angesehen.¹⁶

FANCD2^{Ub}-FANCI^{Ub} wird anschließend ebenfalls an das Chromatin gebunden und unterstützt sowohl über den Umbau der Replikationsgabel als auch über die Koordination von Effektorproteinen wie strukturspezifischen Endonukleasen, TLS-Polymerasen und HR-Proteinen die ICL-Reparatur.^{19 44} Viele dieser Effektorproteine sind ebenfalls FA-Proteine. Andere tragen zur ICL-Reparatur bei, jedoch sind noch keine Mutationen in den entsprechenden Genen bei FA-Patienten gefunden worden. Der gesamte Prozess der DNA-Reparatur unter Nutzung der Proteine des FA/BRCA-Reparaturwegs kann mehrere Stunden dauern und wird durch die Deubiquitinierung von FANCD2 und FANCI beendet.^{45 46} In Tabelle 1 sind alle zurzeit bekannten FA-Gene, die Häufigkeit mit der ihre mutierte Version bei FA-Patienten auftritt und ihre wichtigsten Funktionen aufgezählt.

Tabelle 1 Menschliche FA-Gene, ihre Häufigkeit bei FA-Patienten und ihre Funktion.^{28 29 47}

FANC Symbol (abweichender Gen-Name)	Prozent von FA-Patienten	Funktion
<i>FANCA</i>	60-70	FA core complex
<i>FANCB</i>	2	FA core complex
<i>FANCC</i>	14	FA core complex
<i>FANCD1 (BRCA2)</i>	3	Homologe Rekombination
<i>FANCD2</i>	3	FANCD2 ^{Ub} -FANCI ^{Ub} , koordiniert Effektorproteine
<i>FANCE</i>	3	FA core complex
<i>FANCF</i>	2	FA core complex
<i>FANCG</i>	10	FA core complex
<i>FANCI</i>	1	FANCD2 ^{Ub} -FANCI ^{Ub} , koordiniert Effektorproteine
<i>FANCI (BRIP1)</i>	2	Homologe Rekombination, 5'-3'-Helikase
<i>FANCL</i>	0,2	FA core complex, Ubiquitin-Ligase
<i>FANCM</i>	0,2	FA core complex, DNA-Translokase
<i>FANCN (PALB2)</i>	0,7	Homologe Rekombination
<i>FANCO (RAD51C)</i>	0,2	Homologe Rekombination
<i>FANCP (SLX4)</i>	0,2	Bindet und reguliert die Funktion der Nukleasen XPF-EFCC1, MUS81-EME1 und SLX1
<i>FANCO (ERCC4)</i>	0,5-1,0	Bildet mit XPF eine FANCP-abhängige Nuklease, ICL-Aushaken, NER
<i>FANCR (RAD51)</i>	keine Daten	Homologe Rekombination
<i>FANCS (BRCA1)</i>	0,1	Homologe Rekombination, Hemmung des NHEJ
<i>FANCT (UBE2T)</i>	keine Daten	Ubiquitin-Ligase, Zusammenarbeit mit FANCL

In Abbildung 2 sind die molekularen Mechanismen des FA/BRCA-Reparaturwegs schematisch dargestellt.

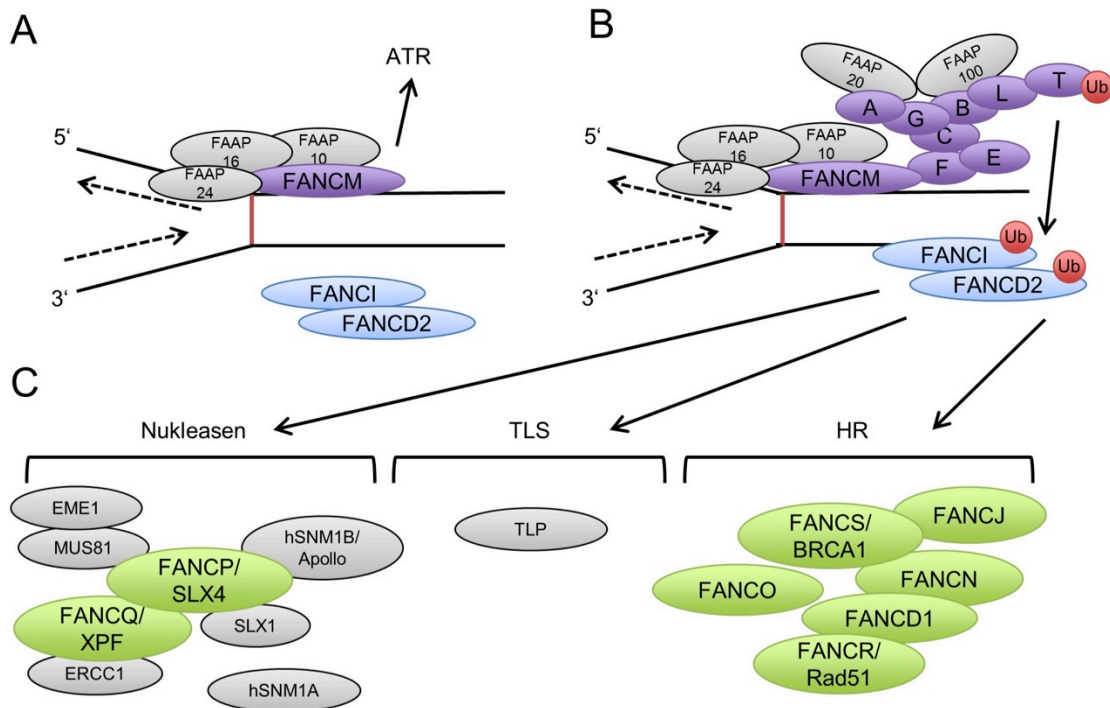


Abbildung 2 Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen des FA/BRCA-Reparaturwegs.¹⁹ Die kovalente DNA-Interstrangvernetzung (ICL) ist rot, die FA core complex Proteine violett, FANCD2^{Ub}-FANCI^{Ub} blau und FA-Effektorproteine grün dargestellt. Grau dargestellte Proteine sind am FA/BRCA-Reparaturweg beteiligt, wurden aber bei FA-Patienten noch nicht in mutierter Form gefunden. A) FANCM und assoziierte Proteine werden zu einem ICL rekrutiert. B) Rekrutierung des FA core complex und Ubiquitinierung von FANCD2 und FANCI. C) FANCD2^{Ub}-FANCI^{Ub} induzieren und kontrollieren die Funktionen von Nukleasen, Transläsionspolymerasen (TLP) für die Transläsionssynthese (TLS) und Mediatoren der homologen Rekombination (HR). Ub: Ubiquitin. Erklärung auch im Text.

3.4.2 Der FA/BRCA-Reparaturweg koordiniert die Funktion von strukturspezifischen Nukleasen

Die in Absatz 3.2 beschriebene Reparatur von ICLs basiert auf einer genau aufeinander abgestimmten Reihenfolge von präzise lokalisierten DNA-Schnitten, die von strukturspezifischen Nukleasen vorgenommen werden. Der FA/BRCA-Reparaturweg koordiniert dabei die Aktivität dieser Proteine, unter anderem von XPF-ERCC1, MUS81-EME1, hSNM1A, hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4.^{16 18 19}

Der Nukleasenkomplex XPF-ERCC1 ist essenziell bei der NER und spielt unabhängig davon eine wichtige Rolle bei der ICL-Reparatur. Es wird davon ausgegangen, dass XPF-ERCC1 mindestens eine der beiden Schnitte zum Herauslösen einer ICLs vornimmt.⁴⁸ Im Jahr 2013

wurde XPF als Fanconi-Anämie Protein FANCD1 identifiziert und ist damit ein weiteres FA-Protein, das zuvor als NER-Protein bekannt war.^{49 50}

MUS81-EME1 ist ein Komplex aus zwei Endonukleasen, dessen Rolle im FA/BRCA-Reparaturweg noch nicht genau geklärt ist. Einige Modelle schlagen vor, dass MUS81-EME1 wie XPF-ERCC1 am Aushaken der ICLs beteiligt ist, andere gehen davon aus, dass die Prozessierung der verharteten Replikationsgabel unter anderem durch MUS81-EME1 vorgenommen wird oder dass MUS81-EME1 an der Auflösung der Holliday Junctions beteiligt ist.^{18 51 52} MUS81 interagiert unter anderem mit hSNM1B/Apollo und mit FANCP/SLX4.⁵³⁻⁵⁶

Mutationen im *FANCP/SLX4*-Gen wurden erstmals im Jahr 2011 bei FA-Patienten beschrieben.⁵⁷ FANCP/SLX4 besitzt selber keine katalytischen Domänen, spielt aber durch seine Nukleasen-Zubringerfunktion eine integrale Rolle im FA/BRCA-Reparaturweg. So bindet FANCP/SLX4 unter anderem die Nukleasen XPF-ERCC1, MUS81-EME1 und SLX1, die für eine adäquate zelluläre Antwort auf ICLs notwendig sind.^{58 59} Des Weiteren ist FANCP/SLX4 an der Auflösung von Holliday Junctions beteiligt.^{52 54} Außerdem trägt FANCP/SLX4 zu der Homöostase der Chromosomenenden, den Telomeren, bei: Über die Interaktion mit dem Telomer-assoziierten Protein TRF2 bringt FANCP/SLX4 die oben genannten Nukleasen an die Telomere. XPF-ERCC1, MUS81-EME1 und SLX1 spielen wichtige Rollen bei der Instandhaltung der dortigen DNA-Strukturen.⁶⁰

hSNM1A und hSNM1B/Apollo sind 5'-3' Exonukleasen, die an der ICL-Reparatur beteiligt sind. Aktuell wird angenommen, dass hSNM1A nach den initialen Schnitten 3'-wärts und 5'-wärts von der Läsion das herausgelöste Oligonukleotid abbaut und so ein geeignetes Substrat für die Transläsionspolymerasen bereitstellt.⁶¹ Aufgrund der herausragenden Bedeutung von hSNM1B/Apollo für die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit widmet sich Abschnitt 3.5 ausführlich diesem Protein.

3.4.3 Der FA/BRCA-Reparaturweg und NHEJ

In der G₀- und der G₁-Phase des Zellzyklus ist die NHEJ der vorherrschende Prozess der DSB-Reparatur, in den anderen Phasen kann neben diesem fehleranfälligen Reparaturmechanismus auch die meist fehlerfrei verlaufende HR eingesetzt werden. Welcher Weg von der Zelle eingeschlagen wird, ist von vielen komplexen Faktoren abhängig. Der FA/BRCA-Reparaturweg soll an der Entscheidung beteiligt sein, indem er die Einleitung von HR im Rahmen der ICL-Reparatur begünstigt. Ohne einen funktionsfähigen FA/BRCA-Reparaturweg könnte es also

aufgrund von NHEJ-bedingten Reparaturfehlern zu einer Akkumulation von Chromosomenaberrationen kommen – dies ist eine mögliche Erklärung für den Phänotyp von FA-Patientenzellen.¹⁶ Diese Theorie wurde mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen in verschiedenen Studien geprüft. Zum Teil konnte der FA-Phänotyp durch eine Störung des NHEJ-Reparaturwegs aufgehoben werden, zum Teil geschah das nur eingeschränkt oder gar nicht.⁶²⁻⁶⁵ Trotzdem ist NHEJ-bedingte DNA-Schädigung in FA-Zellen von großer Relevanz, da Inhibitoren bestimmter NHEJ-Proteine sehr spezifische Therapieoptionen für FA-Patienten darstellen könnten.¹⁶

3.4.4 Der FA/BRCA-Reparaturweg und die Zellzykluskontrolle

Die Proteine des FA/BRCA-Reparaturwegs sind an verschiedenen zellulären Checkpoints beteiligt, daher weisen FA-Zellen Störungen des Zellzyklus auf.⁶⁶ Seit längerem ist bekannt, dass FA-Zellen mit Mutationen in Genen, die für FA core complex-Proteine oder für FANCD2 kodieren, aufgrund von Mängeln beim S-Phase-Checkpoint keinen adäquaten Zellzyklusarrest als Antwort auf ICLs induzieren können.^{43 67} Dies ist darauf zurückzuführen, dass viele FA-Proteine essenziell für die Aktivierung der ICL-induzierten Zellzyklus-Checkpoints während der DNA-Synthese sind.⁶⁸ ICLs, die aufgrund dieser defekten Zellzykluskontrolle nicht repariert werden, führen zu Sekundärläsionen wie Einzel- oder Doppelstrangbrüchen oder -spalten. Neuere Studien zeigten außerdem, dass FA-Proteine auch an der Sicherstellung des geregelten Ablaufs der Mitose beteiligt sind. Der mitotische Spindel-Checkpoint garantiert, dass die Teilung der Chromatiden in der Anaphase erst dann stattfindet, wenn alle Zentromere mit den Mikrotubuli des Spindelapparats verbunden sind. Dieser Checkpoint ist nach einer Depletion von vielen FA-Proteinen in menschlichen HeLa-Zellen defekt, wodurch es zu einer ungleichen Verteilung der Chromosomen und zur Aneuploidie kommen kann.⁶⁹

3.4.5 Der FA/BRCA-Reparaturweg und hämatopoetische Stammzellen

Neben seiner Funktion bei der DNA-Schadensantwort gibt es seit einigen Jahren Hinweise, dass der FA/BRCA-Reparaturweg auch am Schutz hämatopoetischer Stammzellen beteiligt ist. So konnte gezeigt werden, dass eine Depletion verschiedener FA-Proteine in menschlichen Stammzellen die Produktion von hämatopoetischen Vorläuferzellen reduziert.⁷⁰ Außerdem wurden bei sehr jungen FA-Patienten schon vor der klinischen Manifestation eines Knochenmarkversagens deutlich niedrigere Anzahlen von Stammzellen im Knochenmark gemessen als bei einer gesunden Vergleichsgruppe. Zudem wurde in FA-mutierten Knochenmarkzellen eine Hyperaktivität des Transkriptionsfaktors p53 festgestellt, der als

„Wächter des Genoms“ bei zellulärem Replikationsstress und DNA-Schäden einen Zellzyklusarrest einleitet. Diese Ergebnisse legen nahe, dass FA-Patienten bereits bei Geburt geringe Anzahlen an hämatopoetischen Stammzellen besitzen, die zudem weniger proliferativ sind. Die Funktion von FA-Proteinen beim Schutz der hämatopoetischen Stammzellen liefert eine mögliche Erklärung für das früh auftretende Knochenmarkversagen bei FA-Patienten.^{16 71}

3.4.6 Der FA/BRCA-Reparaturweg und reaktive Aldehyde

Die Hypersensitivität von FA-Zellen gegenüber DNA-vernetzenden Substanzen gilt als gesichert, jedoch konnte die primäre Quelle der DNA-Schäden, die die Erkrankung bei FA-Patienten auslösen, noch immer nicht mit abschließender Sicherheit identifiziert werden.⁷²

Seit einigen Jahren wird der Frage nachgegangen, ob reaktive Aldehyde wie Formaldehyd oder Acetaldehyd den FA-Phänotyp verursachen. Beide Moleküle können verschiedene DNA-Schäden bedingen. Sie werden und über Nahrungsmittel aufgenommen, fallen bei der Verstoffwechslung an oder entstehen als Nebenprodukt des zellulären Metabolismus.^{73 74} Verschiedene Studien zeigten, dass der FA/BRCA-Reparaturweg an der Neutralisierung von Formaldehyd- und Acetaldehyd-induzierter Genotoxizität beteiligt ist. So konnte nachgewiesen werden, dass die Monoubiquitinierung von FANCD2 durch Acetaldehyd stimuliert wird.⁷⁵ Außerdem weisen DT40-Zellen (B-Zelllinie, Huhn), die Mutationen in verschiedenen FA-Genen tragen, gesteigerte Sensitivitäten gegenüber Acetaldehyd auf. Zudem belegten Untersuchungen am Mausmodell, dass das Acetaldehyd-katalysierende Enzym ALDH2 für *Fancd2*^{-/-}-Embryos essenziell ist, ihre embryonale Entwicklung jedoch durch *Aldh2*^{+/-}-Mütter gewährleistet werden kann. Nach drei bis sechs Monaten sterben jedoch ein Großteil dieser Mäuse aufgrund von akuten Leukämien.⁷⁴ Die Mäuse, die nicht an einer akuten Leukämie erkranken, entwickeln spontan aplastische Anämien, die denen von FA-Patienten sehr ähneln. Interessanterweise konnte in dieser Untersuchung die Acetaldehyd-Sensitivität auf die unreifen hämatopoetischen Vorläuferzellen zurückgeführt werden, während reifere Vorläuferzellen keine gesteigerte Empfindlichkeit aufwiesen.⁷⁶ Mäuse mit Mutationen in beiden *Fancd2*-Allelen und einem Nullstatus für *ALDH5*, dem Gen, das das wichtigste Enzym für den Formaldehyd-Abbau kodiert, entwickeln sogar deutlich schneller als *Fancd2*^{-/-}*Aldh2*^{-/-}-Mäuse ein Knochenmarkversagen.⁷⁷

Auch bei menschlichen FA-Patienten wurde bereits gezeigt, dass eine gleichzeitig bestehende ALDH2-Defizienz das Auftreten einer Knochenmarkinsuffizienz dramatisch beschleunigt.⁷⁸ Acetaldehyd-induzierte DNA-Schäden könnten demnach entscheidend zur Entstehung und zum

Schweregrad der Fanconi-Anämie beitragen. Sollte sich dies bestätigen, könnten bei FA-Patienten therapeutisch ALDH2-Agonisten eingesetzt werden, um endogene Aldehyde zu senken. Allerdings liegen noch keine Daten vor, die den Nutzen einer solchen Therapie für FA-Patienten untermauern.²⁹

3.5 Aufbau und Funktionen des Proteins hSNM1B/Apollo

Um ein besseres Verständnis der DNA-Reparaturmechanismen in Säugerzellen zu gewinnen, wurden diese Prozesse in der Vergangenheit bei niederen Organismen untersucht. Nach einer Behandlung von Hefezellen (*Sacharomyces cerevisiae*) mit der ICL-induzierenden Kombination aus Psoralen und UVA-Strahlen wurden mit dieser Methode unter anderem *Pso2*-Mutanten aufgrund ihrer gesteigerten Sensitivität gegenüber diesen Substanzen isoliert.⁷⁹ Das *Pso2*-Protein spielt eine wichtige Rolle bei der ICL-Reparatur in Hefezellen. *Pso2* ist Mitglied der SNM1-Nukleasenfamilie, die sich strukturell aufgrund von zwei konservierten Domänen ähneln (Metallo- β -Lactamase Domäne und β -CASP Domäne).⁸⁰ Beim Menschen wurden mehrere Homologe von *Pso2* gefunden, unter anderem hSNM1A, hSNM1B/Apollo und hSNM1C/Artemis. Diese drei Proteine sind alle an DNA-Reparaturwegen beteiligt, unterscheiden sich aber in ihren genauen Funktionen.⁸¹ Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das Protein hSNM1B/Apollo, das selbst eine duale Rolle in der DNA-Reparatur und der Aufrechterhaltung der Telomerintegrität ausübt.

3.5.1 Das hSNM1B/Apollo-Gen und sein Proteinprodukt

Die vollständige proteincodierende Sequenz des *hSNM1B/Apollo*-Gens wurde von *Demuth et al.*⁸² im Jahr 2004 identifiziert. Das Gen befindet sich auf dem Chromosom 1p13.1–13.3 und besteht aus vier Exons. Es kodiert für ein 532 Aminosäuren langes Protein, das ein Molekulargewicht von etwa 58 kDa aufweist. Die Ähnlichkeit zu *Pso2* ist auf den N-Terminus beschränkt.⁸² In Abbildung 3 ist die genomische Organisation sowie das kodierte hSNM1B/Apollo-Protein schematisch abgebildet.

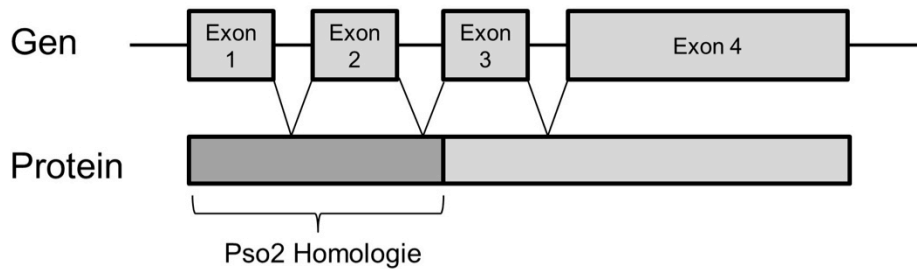


Abbildung 3 Schematische Darstellung der genomischen Organisation des *hSNM1B/Apollo*-Gens und das kodierte Protein.⁸² Die vier Exons, die *hSNM1B/Apollo* auf der genomischen DNA kodieren, und der Bereich mit Sequenzhomologie zum Pso2-Protein sind markiert.

3.5.2 Die Funktionen von *hSNM1B/Apollo* in der DNA-Reparatur

Studien zur Funktion von *hSNM1B/Apollo* zeigten, dass eine Depletion des Proteins mittels RNA-Interferenz zu einer Steigerung der zellulären Sensitivität gegenüber verschiedenen DNA-schädigenden Agenzien führt. Insbesondere DNA-Interstrangvernetzende Substanzen wie MMC werden von *hSNM1B/Apollo*-defizienten Zellen schlecht toleriert und bedingen einen Anstieg von chromosomalen Aberrationen, sodass *hSNM1B/Apollo* eine Rolle in der ICL-Reparatur zugesprochen wird.^{53 82-84} *hSNM1B/Apollo*-defiziente Zellen weisen außerdem defekte G2/M- und S-Phase-Checkpoints nach einer Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen auf.^{53 85} Ähnliche Störungen wurden auch in FA-Zellen beobachtet.^{43 67} Zudem zeichnen sich *hSNM1B/Apollo*-depletierte Zellen durch einen defekten Prophase-Checkpoint aus.⁸³ Gut vereinbar mit diesen Erkenntnissen ist, dass *hSNM1B/Apollo* an der Aktivierung von DNA-Schäden signalisierenden Proteinen wie NBS1, ATM, Chk1 und Chk2 beteiligt ist.^{53 85 86} Mehrere Bindungspartner von *hSNM1B/Apollo* geben weitere Hinweise auf die Funktionen des Proteins: *hSNM1B/Apollo* bindet unter anderem an den MRN-Komplex, der an der Erkennung und Reparatur von DSB beteiligt ist. Eine Verbindung von *hSNM1B/Apollo* zum FA/BRCA-Reparaturweg besteht durch die Interaktion des Proteins mit FANCD2, jedoch findet die FANCD2-Monoubiquitinierung im Rahmen der ICL-Reparatur unabhängig von *hSNM1B/Apollo* statt.^{53 82} Eine weitere Interaktion besteht mit der Nuklease MUS81-EME1, vermutlich kooperieren die Proteine zusammen bei der Prozessierung einer verharteten Replikationsgabel im Rahmen der ICL-Reparatur.⁵³ Auch unabhängig von der ICL-Reparatur scheint *hSNM1B/Apollo* replikationsassoziierten DNA-Schäden entgegenzuwirken.⁸⁷ All diese Ergebnisse etablieren *hSNM1B/Apollo* als wichtigen Faktor der Zellzykluskontrolle und der ICL-Reparatur. Abbildung 4 fasst die Funktionen von *hSNM1B/Apollo* bei der ICL-Reparatur schematisch zusammen.

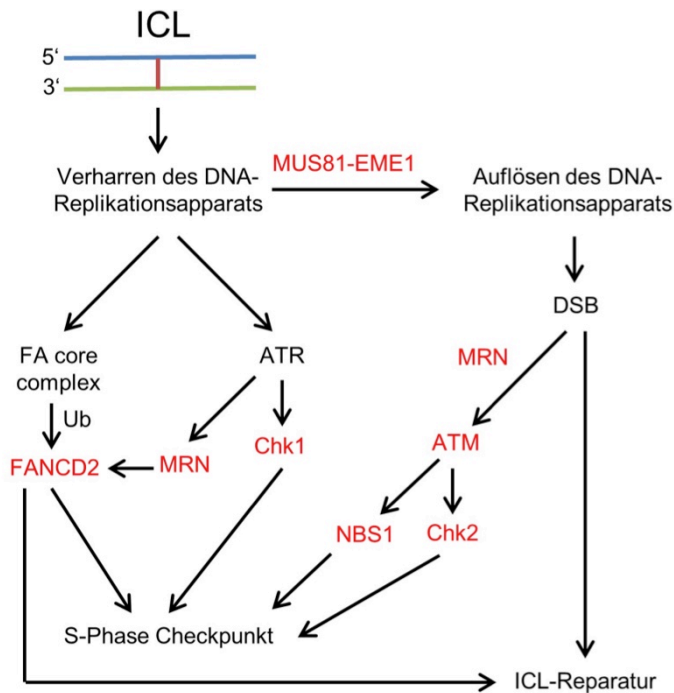


Abbildung 4 Modell der Rolle von hSNM1B/Apollo bei der ICL-Reparatur.^{53 86} Rot dargestellte Proteine sind Bindungspartner von hSNM1B/Apollo und/oder werden in ihrer Funktion vermutlich durch hSNM1B/Apollo beeinflusst. Erklärung im Text.

3.5.3 Die Funktionen von hSNM1B/Apollo bei der Aufrechterhaltung der Telomerintegrität

TRF2 wurde von mehreren Arbeitsgruppen als direkter hSNM1B/Apollo-Bindungspartner identifiziert.^{85 88-90} TRF2 ist eine Komponente des Shelterin-Komplexes, der den Aufbau und die Integrität der Telomerstrukturen gewährleistet.⁹¹ Die Proteine TRF2 und hSNM1B/Apollo beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Funktion, denn eine siRNA-vermittelte hSNM1B/Apollo-Depletion verstärkt den bekannten TRF2-Mangel-Phänotyp: Betroffene Zellen behandeln ihre eigenen Telomere wie DNA-Schäden und versuchen diese mit NHEJ zu reparieren; dabei kommt es zu vermehrten Telomerfusionen. Im Gegenzug reduziert eine TRF2-Depletion die 5'-3'-Exonukleaseaktivität von hSNM1B/Apollo.⁸⁹ An embryonalen Fibroblasten der Maus mit Nullmutationen im *mSnm1b/Apollo*-Gen konnte die Bedeutung der Funktionen der Nuklease an den Telomeren eindrücklich gezeigt werden: Die 5'-3'-Exonukleaseaktivität des Proteins trägt maßgeblich zur Bereitstellung des 3'-Einzelstrangüberhangs bei neu-synthetisierten Leitstrag-Telomeren bei. Erst diese Einzelstrang-Resektion ermöglicht die Bindung von weiteren Telomerfaktoren, die die Chromosomenenden vor der Prozessierung durch NHEJ und somit vor Fusionsereignissen schützen.^{92 93} Diese Schutzfunktion von SNM1B/Apollo vor den potentiell genotoxischen Folgen von NHEJ konnte im Mausmodell bestätigt werden: *mSnm1b/Apollo*-

Nullmutanten-Mäuse weisen Entwicklungsverzögerungen und Fehlbildungen in mehreren Organsystemen auf und versterben perinatal. Eine gleichzeitige Störung des NHEJ-Reparaturwegs durch eine Mutation im dem für NHEJ essenziellen Gen *Ku70* führt jedoch zu einer Aufhebung des letalen *mSnm1b/Apollo*^{-/-}-Phänotyps.⁹⁴

Beim Menschen sind aktuell keine biallelischen *hSNM1B/Apollo* Mutationen bekannt, möglicherweise sind diese nicht mit dem Leben vereinbar. Bei einem Patienten mit Hoyeraal-Hreidarsson-Syndrom, einer genetisch bedingten Krankheit, die sich vorzeitiges Altern, Knochenmarkversagen und eine gestörte Immunantwort auszeichnet, konnte jedoch eine abnorme *hSNM1B/Apollo*-mRNA-Variante gefunden werden. Die Identifizierung der zugrundeliegenden Mutation gelang nicht. Die identifizierte mRNA kodiert für ein C-terminal um etwa 100 Aminosäuren verkürztes Protein, dem die Bindungsdomäne für TRF2 fehlt. Interessanterweise zeigen betroffene Zellen deutliche Zeichen einer Telomerdysfunktion, aber keine gesteigerte Sensitivität gegenüber DNA-Interstragvernetzenden Substanzen. Möglicherweise ist also die duale Funktion von *hSNM1B/Apollo* in DNA-Reparatur und der Aufrechterhaltung der Telomerintegrität auf einen modularen Aufbau des Proteins zurückzuführen.⁹⁵

4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In den 24 Jahren seit der Entdeckung des ersten FA-Gens gab es einen immensen Zuwachs an Wissen über die Ursachen der Erkrankung und darüber hinaus über die Mechanismen der Zellzykluskontrolle und der zellulären DNA-Reparatur. Obwohl die Bedeutung des FA/BRCA-Reparaturwegs als integraler Teil der DNA-Schadensantwort mittlerweile gesichert ist, sind viele Details bezüglich seiner genauen Abläufe und Interaktionen mit anderen DNA-Reparaturwegen noch nicht ergründet. Ein genaues Verständnis dieses Signalwegs ist jedoch essenziell, um die Ursachen des Knochenmarkversagens und der Tumorentstehung sowohl bei FA-Patienten als auch bei Krebs-Patienten mit Mutationen in FA-Genen zu verstehen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Funktionen von *hSNM1B/Apollo*, einer für die adäquate zelluläre Antwort auf DNA-Schäden essentielle Nuklease. Die grundlegende Hypothese lautet, dass *hSNM1B/Apollo* am FA/BRCA-Reparaturweg beteiligt ist. Mehrere Beobachtungen unterstützen diese Annahme: *hSNM1B/Apollo*-depletierte menschliche HeLa-Zellen zeigen eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber der DNA-Interstragvernetzenden Substanz MMC wie FA-Zellen.^{82 84} Außerdem ist *hSNM1B/Apollo*, wie viele FA-Proteine, für

den kontrollierten Ablauf der S-Phase essenziell.⁵³ Zudem wird sowohl dem FA/BRCA-Reparaturweg als auch hSNM1B/Apollo eine Rolle im Schutz der DNA vor den schädigenden Effekten von NHEJ zugesprochen.⁹³ Auch konnte gezeigt werden, dass hSNM1B/Apollo an FANCD2 bindet und dass die Proteine beim zellulären Überleben nach ICL-Induktion epistatisch agieren, was eine Beteiligung am selben Reparaturweg nahelegt.⁸⁴ Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist daher, zur genaueren Charakterisierung der Funktion von hSNM1B/Apollo im FA/BRCA-Reparaturweg beizutragen.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde das FA-Protein FANCP/SLX4 als Kandidat für einen weiteren hSNM1B/Apollo-Bindungspartner, der im FA/BRCA-Reparaturweg agiert, identifiziert. Grundlage dieser Überlegung ist zum Ersten die beschriebene Nukleasen-Zubringerfunktion von FANCP/SLX4 und darauf aufbauend die Überlegung, dass auch hSNM1B/Apollo zu den Nukleasen gehören könnte, die an FANCP/SLX4 binden. Zudem spielen sowohl FANCP/SLX4 als auch hSNM1B/Apollo neben ihrer Funktion in der DNA-Schadensantwort eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Telomerintegrität. Beide Proteine binden das Telomer-assoziierte Protein TRF2.⁸⁵ Die Interaktion von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 wurde in dieser Arbeit mittels Ko-Immunopräzipitationsstudien mit endogenen, ektopisch exprimierten und *in-vitro* translatierten Proteinen untersucht.

Die Funktion von FANCP/SLX4 an den Telomeren ist noch nicht genau ergründet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich eine Depletion von FANCP/SLX4 oder anderen FANC-Proteinen auf die zelluläre Menge Telomer-assoziiierter Proteine auswirkt. Mittels Immunfluoreszenzanalysen wurde zudem die Induktion von Telomerdysfunktion in menschlichen U2OS-Zellen nach hSNM1B/Apollo-Depletion geprüft.

Des Weiteren wurde untersucht, ob hSNM1B/Apollo-depletierte Zellen eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Acetaldehyd aufweisen. Acetaldehyd wird seit einigen Jahren als potentieller Verursacher der genotoxischen DNA-Läsionen angesehen, die bei einer Funktionsstörung im FA/BRCA-Reparaturweg nicht behoben werden können.²⁹ Eine zelluläre Hypersensitivität gegenüber Acetaldehyd nach hSNM1B/Apollo-Depletion würde die Rolle der Nuklease im FA/BRCA-Reparaturweg zusätzlich untermauern. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden hier Kolonienbildungsstudien und Chromosomenbrüchigkeitsanalysen durchgeführt.

5 Material

5.1 Zellreihen

Name	Art der Zellreihe	Herkunft
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen	Institut für medizinische Genetik und Humangenetik, Charité - Universitätsmedizin Berlin
U2OS	Humane Osteosarkomzellen	Institut für medizinische Genetik und Humangenetik, Charité - Universitätsmedizin Berlin

5.2 Chemikalien und Verbrauchsmittel

5.2.1 Zellkultur Materialien

Material	Hersteller
Blue Caps (15/50 ml)	Becton Dickinson
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (mit 4,5 g/L Glucose)	Gibco/life technologies
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Gibco/life technologies
Fetales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf
Penicillin-Streptomycin (10.000 Units Penicillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml)	PAN Biotech
Petrischalen (3,5 cm/10 cm)	Falcon
Pipettenspitzen	Sarstedt
Sterilpipetten (5/10/25 ml)	Sarstedt
Transferpipetten (2,5 mL)	Sarstedt
Trypsin/EDTA	PAN Biotech
Zellkulturflaschen	Falcon
Zellkulturflaschen (50/250/500 ml)	Becton Dickinson
Zellkulturplatten (6 well/24 well)	Falcon

5.2.2 Western Blot und Immunopräzipitation

Material	Hersteller
Dynabeads Protein G	Novex/life technologies
Magermilchpulver	Frema
NuPAGE Antioxidant	Novex/life technologies
NuPAGE Bis-Tris-Gel (4-12%)	Novex/life technologies
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Novex/life technologies
NuPAGE MOPS Laufpuffer (20x)	Novex/life technologies
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	Novex/life technologies
NuPAGE Transferpuffer (20x)	Novex/life technologies
NuPAGE Tris-Acetate Gel (3-8%)	Novex/life technologies
NuPAGE Tris-Actetat Laufpuffer (20x)	Novex/life technologies
Ponceau S Lösung	Fluka
PVDF/Filter Paper Sandwich (Porengröße 0,45 µm)	Invitrogen
SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard	Invitrogen
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Western Lightning plus ECL Chemilumineszenz-Substrat	Perkin Elmer

5.2.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Klonalität	Spezies	Konjugation	Katalognr.
Anti-Actin	Abcam	monoklonal	Maus	-	ab8226
Anti-c-Myc	Sigma aldrich	monoklonal	Maus	-	M4439
Anti-c-Myc-Biotin	Sigma aldrich	monoklonal	Maus	Biotin	B7554
Anti-FANCA	Bethyl Labs	polyklonal	Kaninchen	-	A301-980A
Anti-FANCP	Bethyl Labs	polyklonal	Kaninchen	-	A302-269A
Anti-FANCP	Bethyl Labs	polyklonal	Kaninchen	-	A302-270A
Anti-FANCD2	Abcam	polyklonal	Kaninchen	-	ab2187
Anti-Flag-Bio	Sigma aldrich	monoklonal	Maus	Biotin	F9291
Anti-Flag	Sigma aldrich	monoklonal	Maus	-	F3165
Anti-TRF1	Abcam	monoklonal	Kaninchen	-	EPR6313
Anti-TRF1	Santa Cruz	polyklonal	Ziege		sc-6165
Anti-TRF2	Imgenex	monoklonal	Maus	-	Img-124A
Anti-γH2AX	Upstate	monoklonal	Maus		05-636
Anti-Maus-IgG	Amersham	polyklonal	Schaf	HRP	NA931V
Anti-Kaninchen-IgG	Amersham	polyklonal	Esel	HRP	NA934V
Anti-hSNM1B (VMRC10)	selbst-generiert	polyklonal	Kaninchen	-	-
Anti-hSNM1B (Ab-1)	selbst-generiert	polyklonal	Kaninchen	-	-
Anti-Kaninchen-IgG	Thermo Fisher	polyklonal	Ziege	Alexa 488	A-11008
Anti-Maus-IgG	Thermo Fisher	polyklonal	Ziege	Alexa 488	A-11001
Anti-Ziege-IgG	Thermo Fisher	polyklonal	Esel	Alexa 568	A-110057

5.2.4 Bakterien

Stamm	Herkunft
E.Coli DH5 α	Institut für medizinische Genetik und Humangenetik, Charité Universitätsmedizin Berlin

5.2.5 Expressionsplasmide

Plasmid	Herkunft	Markierung
pCMV-Tag2B	Institut für medizinische Genetik und Humangenetik, Charité - Universitätsmedizin Berlin	Flag
pCMV-Tag3B	Institut für medizinische Genetik und Humangenetik, Charité - Universitätsmedizin Berlin	Myc
pDEST-Myc	Harvard Medical School, Boston	Myc
pEF5/FRT/V5- DEST	Institut für medizinische Genetik und Humangenetik, Charité - Universitätsmedizin Berlin	Myc

5.2.6 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Hersteller
BamHI	New England BioLabs
BSrGI	New England BioLabs
HpaI	New England BioLabs
NdeI	New England BioLabs
PstI	New England BioLabs
SalI	New England BioLabs
SapI	New England BioLabs

5.2.7 siRNAs

Zielprotein	Sequenz	Herkunft
FANCA	AAGGGUCA GAGGGAAAAUAUU	Dharmacon Research
FANCD2	CACCUCAUACUGUUACUGCUU	selbst-generiert
FANCP/SLX4	AGCGGCAUUUGAGUCUGCAGGUGAA	Invitrogen
hSNM1B/Apollo	GAAGCUGCCCACCAGAUUGdTdT	Dharmacon Research
Material	Hersteller	
AllStars negative control siRNA	Qiagen	

5.2.8 Kits

Kit	Hersteller
mMESSAGE mMACHINE T3 High Yield Capped RNA Transcription Kit	Ambion
QIAGEN Plasmid Purification Maxi Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Wheat Germ Extract	Promega

5.2.9 Sonstige Chemikalien und Reagenzien

Material	Hersteller
Chloroform	Merck
Glucose	Acros Organics
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific
Accustain Formalin Solution, neutral buffered, 10%	Sigma aldrich
Acetaldehyd	Sigma aldrich
Agarose	Roth
Ampicillin	Sigma aldrich
Bacto Agar	Becton Dickinson
Bacto tryptone	Becton Dickinson
Bacto Yeast extract	Becton Dickinson
Borsäure	MP Biomedicals
Bromphenolblau	Roth
BSA	New England BioLabs
Complete Mini, Protease Inhibitor Tabletten	Roche
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck Millipore
Eisessig	Merck
Entellan	Merck
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Serva
Ficoll 400	Applichem
Giemsa-Azur-Eosin-Methylenblaufärbelösung	Merck
Glycerol	Sigma aldrich
H ₂ O _{DEPC}	Invitrogen
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Kanamycin	Sigma aldrich
KCl	Merck Millipore
Längenstandard „Lamda/EcoRI/HindIII“ für Agarose-Gele	selbst-generiert
Lipofectamin 2000	Invitrogen
Lysozym	Merck Millipore
Mercaptoethanol	Sigma aldrich
Methanol	Merck
NaAc	Merck
NaCl	Roth
NaOH	Merck
NEB Puffer 10x	New England BioLabs
Oligofectamin	Invitrogen
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Gibco
Parafilm	Brand
RNase A (100 mg/mL)	Qiagen
RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega
Phenol	Merck

SDS	MP Biomedicals
Streptavidin HRP conjugate	Amersham
T7 RNA Polymerase	Promega
Tris-HCL (pH 7,5), 1 mmol/L	Gibco
Tris-HCl pH 8.0	Gibco/life technologies
Triton-X100	MP Biomedicals
Tween 20	Sigma aldrich

5.3 Geräte

5.3.1 Inkubationssysteme

Gerät	Hersteller
Brutschränke	Heraeus
Thermoschüttler	Eppendorf

5.3.2 Zentrifugen

Gerät	Hersteller
Tischzentrifuge „Biofuge Primo“	Heraeus
Tischzentrifuge „Heraeus Fresco 21“	Heraeus
Zentrifuge „Megafuge 2.0“	Heraeus
Zentrifuge „Varifuge 3.OR“	Heraeus

5.3.3 Mikroskope

Gerät	Hersteller
Fluoreszenzmikroskop „Axiophot“, Filter Set 13	Zeiss
Kamerasystem „SensiCam“	PCO
Lichtmikroskop „Axiostar“	Zeiss

5.3.4 Sonstige Geräte

Gerät	Hersteller
Branson Sonifier 450	Branson
Chemilumineszenz Detektionsgerät „Chemi Smart 5000“	Viber Lourmat
Elektrophorese-Kammer für Agarose-Gele	PeqLab Biotechnologie
Fluoreszenz Detektionsgerät „G:Box“	Syngene
Laminair Flow-Arbeitsbank	Heraeus
Nanophotometer	Implen
Partikelzähler „Coulter Counter“	Beckman Coulter
Rotationsgerät „Roller Apparatus Modul III“	Wheaton Instruments
Vortex „Genie 2“	Scientific Industries
Wasserbad	GFL
Gelelektrophoresekammer „XCell SureLock Mini-Cell“	Novex/life technologies

5.4 Software

Programm	Hersteller
Chemi-Capt 5000, Version 15.1	Viber Lourmat
Clone Manager 6, Version 6.0	Sci & Ed Software
ImageQuant, Version 5.2	GE Healthcare
Microsoft Excel 2013	Microsoft
Photoshop CS, Version 8.0.1	Adobe
SPSS, Version 23	IBM

5.5 Verwendete Lösungen und Puffer

5.5.1 Proteinanalytik

IP-Lysepuffer

Komponenten	Zusammensetzung
Tris HCL, pH 7,5	50 mmol/L
NaCl	150 mmol/L
ETDA, pH 8,0	5 mmol/L
Triton X 100	0,3% (v/v)
Complete Mini	1 Tablette auf 10 mL

MOPS-Laufpuffer für Gelelektrophorese

Komponenten	Zusammensetzung
NuPAGE MOPS Laufpuffer (20x)	1/20
NuPAGE Antioxidant	0,125% (v/v)

Tris-Acetat-Laufpuffer für Gelelektrophorese

Komponenten	Zusammensetzung
NuPAGE TA-Laufpuffer (20x)	1/20
NuPAGE Antioxidant	0,125% (v/v)

Transferpuffer für Gelelektrophorese

Komponenten	Zusammensetzung
NuPAGE Transferpuffer (20x)	1/20
NuPAGE Antioxidant	0,25% (v/v)
Methanol	10% bzw. 20% (v/v)

TBS-T

Komponenten	Zusammensetzung
Tris-HCl, pH 7,5	20 mol/L
NaCl	137 mol/L
Tween 20	0,1% (v/v)

5.5.2 Bakterienkulturmedien und -platten

LB-Platten (500 mL)

Komponenten	Zusammensetzung
Bacto tryptone	5,0 g
Bacto Yeast extract	2,5 g
Bacto Agar	7,5 g
NaCl	5,0 g
H ₂ O _{dd}	add 500 mL

SOB Medium (1 L)

Komponenten	Zusammensetzung
Bacto Trypton	20 g
Yeast Extract	5 g
NaCl, 5 mol/L	2 mL
KCl, 2 mol/L	1,25 mL
H ₂ O _{dd}	add 1000 mL

SOC Medium (1 L)

Komponenten	Zusammensetzung
Bacto Trypton	20 g
Yeast Extract	5 g
NaCl, 5 mol/L	2 mL
KCl, 2 mol/L	1,25 mL
Glucose, 2 mol/L	1 mL
H ₂ O _{dd}	add 1000 mL

Antibiotikazusätze: Kanamycin Endkonzentration: 25 µg/mL
Ampicillin Endkonzentration: 125 µg/mL

5.5.3 DNA-Plasmidpräparation

MPI Puffer 10x

Komponenten	Zusammensetzung
Tris-HCl pH 8.0	250 mmol/L
EDTA	100 mmol/L
Glucose	500 mmol/L

Arbeitslösung MPI Puffer 1x

Komponenten	V für 10 mL
MPI 10x	1 mL
H ₂ O _{dd}	9 mL
Lysozym	1 Spatelspitze
RNAse A (100 mg/mL)	10 µL

MPII Puffer

Komponenten	Zusammensetzung
NaOH	0,2 mol/L
SDS	1% (v/v)

MPIII Puffer

Komponenten	Zusammensetzung
NaAc, pH 4.8	3 mol/L

MPIV Puffer

Komponenten	Zusammensetzung
Tris-HCl pH 8.0	50 mmol/L
NaAc, pH 4.8	100 mmol/L

TE Puffer

Komponenten	Zusammensetzung
Tris-HCl, pH 8	10 mmol/L
EDTA, pH 8	1 mmol/L

5.5.4 Nukleinsäureaufarbeitung und -analytik

Ladepuffer „A“ für Nukleinsäuren

Komponenten	Zusammensetzung
Ficoll 400	20 % (v/v)
EDTA, pH 8.0	5 mmol/L
Bromphenolblau	0,05% (w/v)

TBE-Laufpuffer

Komponenten	Zusammensetzung
Tris-HCl, pH 8.0	900 mmol/L
Borsäure	900 mmol/L
EDTA, pH 8.0	40 mmol/L

5.5.5 Weitere Lösungen und Puffer

Giemsapuffer 10x

Komponenten	Zusammensetzung
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	250 mmol/L
KHPO ₄	250 mmol/L

10%-Giemsa-Färbelösung

Komponenten	Zusammensetzung
Giemsapuffer 10x	10% (v/v)
Giemsa-Färbelösung	10% (v/v)

PCA

Komponenten	Zusammensetzung
Phenol (TE-gesättigt)	49% (v/v)
Chloroform	49% (v/v)
Isoamylalkohol	2% (v/v)

Stripping-Puffer

Komponenten	Zusammensetzung
Tris-HCl, pH 7,5	62 mmol/L
SDS	20% (v/v)
Mercaptoethanol	110 mmol/L

6 Methoden

6.1 Zellkultur

Zur Gewährleistung steriler Arbeitsbedingungen erfolgte die Zellkultivierung unter einer Laminair Flow-Arbeitsbank. Das verwendete Zellkulturmedium (DMEM) wurde mit 10% fetalem Kälberserum und Antibiotika (100 Einheiten/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin) versetzt und bei 4°C gelagert. Die Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 21% O₂ in Zellkulturflaschen oder -schalen inkubiert.

Kryokonservierte Zellen wurden aufgetaut, in 4 mL Zellkulturmedium aufgenommen und in einer 25 cm² Zellkulturflasche im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 21% O₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium ausgetauscht um den Kryokonservator (DMSO) zu entfernen.

6.1.1 Kultivierung und Ernte

Der Wachstumszustand der Zellen wurde durch regelmäßige lichtmikroskopische Kontrollen begutachtet. Erreichten die Zellen eine Konfluenz von etwa 80-90%, wurden sie zur weiteren Verwendung geerntet, zur Passagierung verdünnt oder zum Einfrieren in 10%-DMSO-Zellkulturmedium aufgenommen. Dazu wurde bei den adhärennten U2OS-Zellen das Zellkulturmedium mit einem sterilen Glaspipettenaufsatz abgesaugt, die Zellen mit PBS

gewaschen und Trypsin/EDTA hinzugegeben, um eine Ablösung der Zellen vom Untergrund der Kulturflasche zu erreichen. Die Enzymreaktion wurde anschließend durch die Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt. HEK293-Zellen sind nur schwach adhärent, daher erfolgte die Ablösung vom Kulturflaschenuntergrund durch Spülung mit dem eigenen Zellkulturmedium.

6.1.2 Zellzahlbestimmung

Nach der Zellernte wurden 200 µL der Zellsuspension in 10 mL isotoner Lösung verdünnt und die Zellzahl in einem Partikelzählungsgerät bestimmt. Die zu messende Partikelgröße wurde auf 10-30 µm, die durchschnittliche Größe von Fibroblasten, eingestellt.

6.1.3 Acetaldehyd-Behandlung

Zur Behandlung der Zellen mit Acetaldehyd wurde die Stammlösung zunächst im Verhältnis 1:4 mit kaltem, sterilem Wasser verdünnt, um weiteres Pipettieren zu erleichtern und dem Verdunsten des bei Raumtemperatur sehr flüchtigen Stoffes vorzubeugen. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert und mit dem Kulturmedium zur gewünschten Konzentration verdünnt. Es folgte die Behandlung der Zellen für die angegebenen Zeiträume, wenn möglich wurden die Kulturschalen mit Parafilm abgedichtet.

6.2 Proteinbiochemische Methoden

6.2.1 Proteinextraktion

Nach der Ernte wurde die Zellsuspension für 10 min abzentrifugiert. Bei der Ernte aus 6-well-Kulturschalen wurden die Zellen dafür in 1,5 mL Zellkulturmedium aufgenommen, in 2 mL Eppendorfgefäße überführt und in der Heraeus Fresco 21 Tischzentrifuge bei 6000 rpm zentrifugiert. Bei der Ernte aus 75cm² Kulturflaschen wurden die Zellen in 10 mL Zellkulturmedium aufgenommen, in 15 mL Falcons überführt und die Zentrifugation in der Heraeus Megafuge 2.0 Zentrifuge bei 1000 rpm durchgeführt. Das Zellkulturmedium wurde anschließend abgesaugt, das Zellpellet mit 1,5 mL bzw. 10 mL PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellpellets wurden dann in 1,5 mL PBS aufgenommen, in 1,5 mL Eppendorfgefäße überführt und bei 4°C und 6000 rpm für 5 min in der Heraeus Fresco 21 Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Die Zellpellets wurden anschließend in der Regel in 100 µL frisch angesetztem IP-Lysepuffer pro 1 x 10⁶ Zellen gelöst. Zellpellets, die für eine Immunopräzipitation (IP) aufgearbeitet werden sollten, wurden in 500 µL IP-Lysepuffer aufgenommen. Die Zellyse erfolgte stets bei 4°C für 1 h unter Rotation.

Anschließend wurden die Lysate zur Scherung der enthaltenen DNA sonifiziert (Output Control 3, Duty Cycle 70%, 30 sek) und bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das proteinhaltige Lysat wurde so weitestgehend von den Nukleinsäuren getrennt und anschließend in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Proteinlysate wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

6.2.2 (Ko-)Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation ermöglicht es, bestimmte Proteine selektiv aus einem Proteinlysate zu isolieren. Dazu wird ein spezifischer Antikörper gegen das Zielprotein zu dem Proteinlysate gegeben und so die Bildung von Immunkomplexen aus diesem Antikörper und dem Zielprotein eingeleitet. Zur Präzipitation der Immunkomplexe wurden hier Protein G-gekoppelte Magnetbeads verwendet, die an die F_c-Fragmente der Antikörper binden. Die Ko-Immunopräzipitation ist ein Verfahren zur Untersuchung von Proteininteraktionen und basiert auf dem Nachweis von Bindungspartnern des Zielproteins, die ebenfalls in den präzipitierten Immunkomplexen enthalten sind.

Für jedes aufgearbeitete Proteinlysate wurden 25 µL Protein G-gekoppelte Magnetbeads entnommen, dreimal mit je 500 µL PBS gewaschen und in 50 µL IP-Lysepuffer aufgenommen. Die gewaschenen Magnetbeads wurden zusammen mit einer definierten Menge des jeweiligen Antikörpers zu den Proteinlysaten gegeben (siehe nachfolgende Tabelle) und bei 4°C unter Rotation über Nacht inkubiert.

Antikörper	Spezies	Eingesetzte Menge je IP
Anti-FANCP/SLX4 (A302-269A, Bethyl Labs)	Kaninchen	5 µL
Anti-hSNM1B/Apollo (Ab-1, selbst-generiert)	Kaninchen	3 µL
Anti-Flag (F3165, Sigma aldrich)	Maus	1 µL
Anti-c-Myc (M4439, Sigma aldrich)	Maus	2 µL

Zur Separierung der Magnetbeads mitsamt den gebundenen Immunkomplexen vom Restlysate wurde ein magnetischer Eppendorfgefäßständer verwendet. Die Magnetbeads wurden dreimal in je 500 µL IP-Lysepuffer resuspendiert und gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Magnetbeads in je 20 µL LDS Sample Buffer (1x) aufgenommen und zur Ablösung der Immunkomplexe für 5 min bei 100°C im Wasserbad gekocht. Anschließend wurden die

Immunkomplexe mit dem Magnetständer von den Magnetbeads getrennt, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

6.2.3 Protein-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine aus den Zell- oder Immunopräzipitationslysaten erfolgte elektrophoretisch nach ihrer Größe in vorgefertigten Gelen mit Hilfe einer Gelelektrophoresekammer. Zu den Proben wurde zunächst 10% des Probenvolumens an 10-fachem Sample Reducing Agent gegeben; es folgte eine 10-minütige Denaturierung der Proteine im Thermoschüttler bei 70°C , um ihre Sekundärstruktur aufzubrechen. Je nach der Größe der untersuchten Proteine wurden verschiedene Gele, Laufpuffer und Laufzeiten verwendet. Neben den denaturierten Proteinlysaten wurde stets ein kommerziell hergestellter Größenmarker aufgetragen. Der Einlauf der Proben in das Gel wurde in der Regel bei 110 V durchgeführt, der eigentliche Lauf anschließend bei 150 V.

6.2.4 Western Blot

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit dem Tank-Blotting-Verfahren auf eine zuvor mit Methanol aktivierte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Porengröße $0,45\ \mu\text{m}$) übertragen. Je nachdem, ob kleine oder große Proteine übertragen werden sollten, wurde der Transferpuffer mit 20% oder 10% Methanol angesetzt. Methanol steigert die Bindung der Proteine an die Membran, kann jedoch auch die Präzipitation von großen Proteinen erleichtern und ihren Transfer somit verhindern. Die Transferschwämme, das Filterpapier und die aktivierte PVDF-Membran wurden in Transferpuffer getränkt und die Transfer-Komponenten wie unten skizziert zusammengestellt.

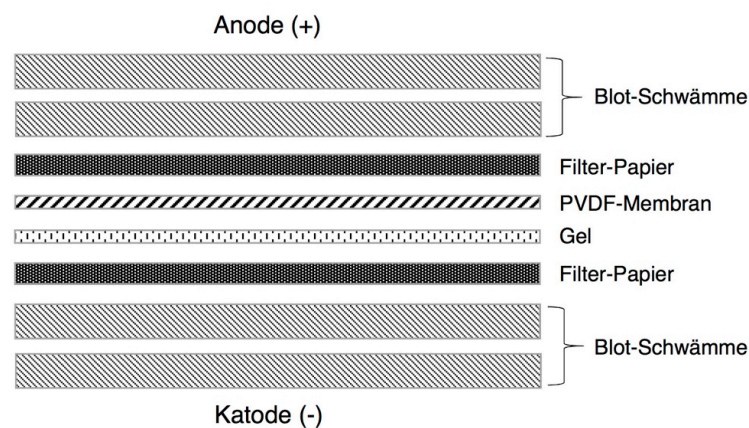


Abbildung 5 Schematischer Aufbau des Tank-Blotting-Verfahrens.

Der Transfer-Tank wurde mit dem Transferpuffer aufgefüllt und die Proteine für 1-2 h bei 40 mV transferiert. Große Proteine lassen sich oft schwieriger transferieren und profitieren von längeren Transferzeiten. Im Anschluss wurde der Proteintransfer durch eine reversible Färbung der Membran mit Ponceau S überprüft. Um bei der folgenden Proteindetektion unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurde die Membran mit 10 mL 10%-Magermilchpulver in TBST (Tris-Buffered Saline mit Tween 20) bei 4°C über Nacht abgesättigt.

6.2.5 Proteindetektion

Um die spezifisch bestimmte Proteine nachzuweisen, wurde die Membran mit den entsprechenden Antikörpern, verdünnt in 5%-Magermilchpulver in TBST, inkubiert. Je nach Antikörper fand die Inkubation entweder bei Raumtemperatur für 1 h oder bei 4°C über Nacht statt. Die Membran wurde anschließend drei Mal für je 10 min bei Raumtemperatur mit TBST gewaschen. Es folgte die Inkubation mit einem ebenfalls in 5%-Magermilchpulver in TBST verdünnten sekundären Antikörper, in der Regel für 1 h bei Raumtemperatur unter Rotation. Die Membran wurde dann fünf Mal mit TBST für je 10 min gewaschen. Bei den Sekundärantikörpern handelte es sich um Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Antikörper, was eine enzymatische Detektion mit einem Chemilumineszenz-Substrat ermöglichte. Die Nachweise der detektierten Proteine erfolgten durch Belichtung eines Röntgenfilms oder in einem Chemilumineszenz-Detektionsgerät mit verschiedenen Expositionszeiten.

6.2.5.1 Proteindetektion: Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur
Anti-Flag	Maus	1:2000	1 h	Raumtemperatur
Anti-Myc	Maus	1:2000	1 h	Raumtemperatur
Anti-FANCP A269	Kaninchen	1:2000	über Nacht	4°C
Anti-FANCP A270	Kaninchen	1:2000	über Nacht	4°C
Anti-Flag BioM2	Maus	1:2000	1 h	Raumtemperatur
Anti-Myc-Biotin	Maus	1:5000	1 h	Raumtemperatur
Anti-Actin	Maus	1:5000	1 h	Raumtemperatur
Anti-FANCD2	Kaninchen	1:500	1 h	Raumtemperatur
Anti-FANCA	Kaninchen	1:5000	1 h	Raumtemperatur
Anti-TRF1	Kaninchen	1:1000	1 h	Raumtemperatur
Anti-TRF2	Maus	1:500	1 h	Raumtemperatur

6.2.5.2 Proteindetektion: Sekundäre Nachweislösungen

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur
Anti-Maus-IgG-HRP	Schaf	1:1000- 1:5000	1 h	Raumtemperatur
Anti-Kaninchen-IgG-HRP	Esel	1:2000	1 h	Raumtemperatur
Streptavidin-HRP	-	1:200	1 h	Raumtemperatur

6.2.6 Quantifizierung von Proteinbanden

Im mittleren Sättigungsbereich verhält sich die Intensität einer Proteinbande im Western Blot proportional zur aufgetragenen Proteinmenge. Um die Menge eines detektierten Proteins zu quantifizieren, wurden mit Hilfe der ImageQuant Software (Version 5.2) auf den digitalisierten Western Blots identisch große Bereiche um die Proteinbanden markiert. Anschließend wurde das jeweilige Bandenvolumen gemessen, das als Summe der Pixelintensität abzüglich des Hintergrundrauschens innerhalb des markierten Bereichs definiert ist.

6.2.6.1 Quantifizierung der TRF1- und TRF2-Proteinmenge in U2OS-Zellen

Aus den zu untersuchenden U2OS-Zellen wurden Proteinlysate hergestellt und das jeweilige TRF1- bzw. TRF2- und Actin-Proteinbandenvolumen im Western Blot bestimmt. Die gemessenen TRF1- oder TRF2-Volumina wurden in Bezug zu dem Volumenwert der jeweiligen Actin-Proteinbande gesetzt, um Beladungsunterschiede rechnerisch auszugleichen und die bestimmten Volumenwerte innerhalb verschiedener Experimente zu standardisieren. Anschließend wurden die normalisierten Volumenwerte der siRNA-behandelten Proben in Bezug zu den normalisierten Volumenwerten der unbehandelten Proben gesetzt, um relative Proteinmengenunterschiede nach der siRNA-Behandlung zu quantifizieren. Das Experiment wurde zwei- oder dreimal durchgeführt und der Mittelwert dieser Ergebnisse gebildet. Anschließend wurde mit dem zweiseitigen Einstichproben-T-Test geprüft, ob es signifikante Abweichungen vom normalisierten Testwert 1 gab.

6.2.6.2 Quantifizierung der FANCD2-L-Menge in U2OS-Zellen nach Acetaldehyd-Behandlung

Aus den zu untersuchenden U2OS-Zellen wurden Proteinlysate hergestellt und sowohl das FANCD2-L-Bandenvolumen als auch das gemeinsame Bandenvolumen von FANCD2-L und FANCD2-S (FANCD2_{total}) im Western Blot bestimmt.

Die Berechnung der relativen FANCD2-L-Menge erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{relative FANCD2-L-Menge} = \frac{\text{Volumen FANCD2-L}}{\text{Volumen FANCD2 total}}$$

6.2.7 Strippen von Membranen

Zum Teil hatten untersuchte Proteine ähnliche Molekulargewichte und überlagerten sich daher nach der gelelektrophoretischen Auftrennung und Transfer auf der Membran. Um diese Proteine dennoch auf derselben Membran nachweisen zu können, erfolgte nach der ersten Detektion eine Ablösung der gebundenen Antikörper. Die Membran wurde dafür für 30 min bei 60°C im Wasserbad mit Stripping-Puffer inkubiert. Es folgten zwei 10-minütige Waschschrte mit Wasser und ein 10-minütiger Waschschrte mit TBST. Die Membran wurde anschließend für 30 min mit 10%-Magermilchpulver in TBST abgesättigt, danach konnten erneute Proteindetektionen wie oben beschrieben erfolgen.

6.2.8 Immunfluoreszenz

Etwa 5×10^4 U2OS-Zellen in 80 μL Zellkulturmedium wurden auf sterile Deckgläschen in 24-well-Zellkulturschalen gegeben und für 4 h im Brutschrank inkubiert, um das Absetzen der Zellen zu ermöglichen. Zur Unterstützung der Zelladhäsion auf den Deckgläschen wurde das für die drei anschließenden, 10-minütigen Waschschrte verwendete PBS mit Calcium- und Magnesiumchlorid (PBS^+) versetzt. Die gewaschenen Zellen wurden mit 0,1%-Triton X-100 in 10%-Formalinlösung für 10 min fixiert und permeabilisiert und über Nacht in 10%-fetalem Kälberserum in PBS abgesättigt. Anschließend folgten eine einstündige Inkubation mit einem Primärantikörper, drei 10-minütige Waschschrte mit PBS und eine einstündige Inkubation mit einem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Die zweite Inkubation fand hier aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Antikörpers im Dunklen statt. Nach einem weiteren Waschschrte mit PBS wurden die Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, 1:1000 in PBS) angefärbt und die Deckgläser mit einem Tropfen Glycerol auf Objektträgern fixiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop.

6.2.8.1 Immunfluoreszenz: Antikörper

Antikörper		Spezies	Verdünnung	Konjugation
Primärantikörper	Anti-hSNM1B/ Apollo (VMRC10)	Kaninchen	1:75	-
	Anti- γ H2AX	Maus	1:500	-
	Anti-TRF1	Ziege	1:250	-
Sekundärantikörper	Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	1:5000	Alexa Fluor 488
	Anti-Maus-IgG	Ziege	1:5000	Alexa Fluor 488
	Anti-Ziege-IgG	Esel	1:5000	Alexa Fluor 568

6.2.8.2 Immunfluoreszenz: Nachweis der hSNM1B/Apollo-Depletion in U2OS-Zellen

Da der Nachweis von hSNM1B/Apollo im Western Blot bisher technisch nicht gelang, wurde die Depletion des Proteins durch das Auszählen von hSNM1B/Apollo-Foci mit einem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Pro Objektträger wurden mindestens 500 Zellkerne ausgewertet. Zellkerne, die mindestens drei hSNM1B/Apollo-Foci aufwiesen, wurden als „Apollo-Foci-positiv“ gewertet.

6.2.8.3 Immunfluoreszenz: Nachweis von γ H2AX-Foci

Zur Evaluation der zellulären γ H2AX-Menge wurden pro Objektträger mindestens 500 Zellkerne ausgewertet. Zellkerne, die mindestens drei γ H2AX-Foci aufwiesen, wurden als „ γ H2AX-Foci-positiv“ gewertet.

6.2.8.4 Immunfluoreszenz: Nachweis von Telomerdysfunktion nach hSNM1B/Apollo-Depletion

Zur Untersuchung der Telomerdysfunktion von hSNM1B/Apollo-depletierten U2OS-Zellen wurden die Zellen wie oben beschrieben fixiert und permeabilisiert und anschließend mit Primärantikörpern gegen die Proteine TRF1 und γ H2AX inkubiert. TRF1 diente dabei der Markierung der Telomere, γ H2AX akkumuliert an DNA-Schadensstellen. Die verwendeten Primärantikörper kamen aus unterschiedlichen Spezies. Durch die anschließende Inkubation mit spezies-spezifischen Sekundärantikörpern, die mit Fluorochromen mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen konjugiert waren, konnten die beiden Proteine mithilfe der entsprechenden Filter des Fluoreszenzmikroskops in verschiedenen Farben dargestellt werden. Das Kamerasystem des Mikroskops erlaubte das Fotografieren der Bilder. Diese wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm Photoshop CS (Version 8.0.1) übereinandergelegt, somit wurden Ko-Lokalisationen der TRF1- und γ H2AX-Foci als so genannte „TIFs“ (Telomerdysfunktion-

induzierte Foci) erkennbar. Pro Objektträger wurden mindestens 100 Zellkerne ausgewertet. Zellkerne, die mindestens zwei TIFs aufwiesen, wurden als „TIF-positiv“ gewertet. Mit einem Chi-Quadrat-Test wurde überprüft, ob es signifikante Unterschiede zwischen den mit Kontroll-siRNA behandelten und den hSNM1B/Apollo-depletierten Zellen bezüglich der Anzahl von „TIF-positiven“-Zellen gab.

6.3 Molekularbiologische Methoden

6.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Analog zur Protein-Gelelektrophorese können in der Agarose-Gelelektrophorese Nukleinsäuren ihrer Größe nach aufgetrennt werden. An eine mit Elektrophoresepuffer (TBE-Laufpuffer) gefüllte Kammer, in der ein Agarose-Gel liegt, wird dazu ein Spannungsfeld angelegt. Die Nukleinsäuren wandern dann durch das Agarose-Gel, das vor dem Aushärten mit Ethidiumbromid versetzt wurde. Dieses interkaliert mit der DNA oder RNA und macht sie als Banden auf einem UV-Flächenstrahler sichtbar. Zum Vergleich der Größen wurde ein selbst hergestellter Längenstandard aufgetragen. In der Regel wurden 0,8%-Agarose-Gele verwendet, die Elektrophorese fand meistens bei 150 V statt.

6.3.2 Herstellung der hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-Expressionsplasmide

Die Untersuchung der Interaktion von hSNM1B/Apollo mit FANCP/SLX4 erfolgte über Ko-Immunopräzipitationsstudien, bei denen Teilstücke des einen Proteins nach der Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen das andere Protein aus HEK293-Zelllysaten nachgewiesen werden sollten. Dafür wurden die entsprechenden cDNAs zunächst in Vektoren kloniert, um eine ektopische Synthese der Proteine und ihrer Teilstücke in HEK293-Zellen zu ermöglichen. An das 5'-Ende aller hSNM1B/Apollo-Fragmente wurde die Flag-Nukleotidsequenz fusioniert, die FANCP/SLX4-Fragmente wurden 5'-terminal mit der Myc-Sequenz markiert. Somit kodierten alle eingesetzten Vektoren für Flag-hSNM1B/Apollo- bzw. Myc-FANCP/SLX4-Fusionsproteine, die mit Antikörpern gegen die Flag- bzw. Myc-Aminosäuresequenz spezifisch nachgewiesen und mitsamt ihren Interaktionspartnern präzipitiert werden konnten. Die Präparation dieser Expressionsplasmide wird im Folgenden beschrieben.

Verwendete Expressionsplasmide

Bezeichnung der inserierten cDNA	Vektor	Resistenz	Protein-Markierung
Apollo_FL (1-532, Wildtyp)	pCMV-Tag2B	Kanamycin	Flag
Apollo_FL (1-532, Wildtyp)	pCMV-Tag3B	Kanamycin	Myc
Apollo_1-150	pCMV-Tag2B	Kanamycin	Flag
Apollo_1-200	pCMV-Tag2B	Kanamycin	Flag
Apollo_151-299	pCMV-Tag2B	Kanamycin	Flag
Apollo_268-531	pCMV-Tag2B	Kanamycin	Flag
FANCP_FL (1-1832, Wildtyp)	pEF5/FRT/V5-DEST	Ampicillin	Myc
FANCP_801-1648	pDEST-Myc	Ampicillin	Myc
FANCP_684-1834	pDEST-Myc	Ampicillin	Myc
FANCP_1328-1648	pCMV-Tag3B	Kanamycin	Myc
FANCP_1649-1834	pCMV-Tag3B	Kanamycin	Myc
pCMV-Tag2B-leer	pCMV-Tag2B	Kanamycin	Flag
pCMV-Tag3B-leer	pCMV-Tag3B	Kanamycin	Myc

Die Zahlen entsprechen den repräsentierten Aminosäuren. FL: Volle Länge

Die oben stehende Tabelle gibt einen Überblick über alle verwendeten Expressionsplasmide. Diese lagen der Arbeitsgruppe bereits vor oder deren Synthese wurde bei der Firma Thermo Scientific in Auftrag gegeben. Die Plasmide pDEST-Myc-FANCP_801-1648 und pDEST-Myc-FANCP_684-1834 wurden großzügig von Prof. Wade Harper (Harvard Medical School, Boston) zur Verfügung gestellt. Verschiedene Vektorgerüste kamen zum Einsatz: Alle hSNM1B/Apollo-Teilstücke wurden in die PstI-Restriktionsstelle des pCMV-Tag-2B-Vektors kloniert, der für die N-terminale Flag-Markierung sowie für ein Resistenzgen gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin kodiert. Die FANCP/SLX-Teilstücke 1328-1648 und 1649-1834 wurden in die Sall-Restriktionsstelle des pCMV-Tag-3B-Vektors kloniert; dieser Vektor kodiert für eine N-terminale Myc-Markierung und ebenfalls für eine Resistenz gegenüber Kanamycin. Apollo 1-532 (Wildtyp) lag zusätzlich im pCMV-Tag-3B-Vektor vor.

Die FANCP/SLX4-Fragmente 1-1834 (Wildtyp), 801-1648 und 684-1834 wurden mithilfe des Gateway-Systems in den pEF5/FRT/V5-DEST- bzw. den pDEST-Myc-Vektor kloniert, die beide ein Resistenzgen gegenüber Ampicillin besitzen.

Transformation

Zur Amplifizierung der Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente E.coli DH5 α -Bakterien verwendet. Diese wurden zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden je 10 ng Plasmid-DNA zu je 200 μ L DH5 α -Zellen gegeben und der Ansatz für 1 h auf Eis inkubiert. Es folgten ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad und eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Nach

der Zugabe von je 800 μL SOC-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C unter Rotation inkubiert und anschließend auf LB-Agar Platten ausplattiert. Der Agar wurde zuvor zur Selektion der transformierten und daher Kanamycin- oder Ampicillin-resistenten Bakterien je nach Plasmid mit 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin oder 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin versetzt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden 3 mL SOB-Medium mit 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin oder 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin versetzt, mit isolierten Kolonien von den Platten angeimpft und bei 37°C über Nacht unter Rotation inkubiert.

DNA-Plasmid-Präparation und DNA-Restriktionsverdau

Die DNA-Plasmid-Präparation erfolgte nach dem 1979 von *Birnboim et Doly*⁹⁶ beschriebenen Protokoll. Aus der Übernacht-Kultur wurden 1,5 mL entnommen, für 10 min bei 6000 rpm in der Heraeus Biofuge Primo Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Die Bakterienpellets wurden in je 100 μL MPI-Puffer resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und nach der Zugabe von 200 μL MPII-Puffer und 150 μL MPIII-Puffer geschwenkt. Dann erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis für 15 min. Die Proben wurden anschließend für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 1 mL eiskaltem 100%-Ethanol gefällt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine erneute 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen, die Pellets in 200 μL MPIV-Puffer gelöst, eine erneute DNA-Fällung mit je 500 μL eiskaltem 100%-Ethanol und eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur durchgeführt. Es folgte eine letzte Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm, danach wurde der Überstand abgenommen und die Pellets in je 80 μL TE-Puffer gelöst.

Die erfolgreiche Isolierung des gewünschten Plasmids wurde durch einen DNA-Restriktionsverdau mit geeigneten Restriktionsenzymen, die das jeweilige Insert aus dem Vektor herauslösten, überprüft. Eine Ausnahme war pEF5/FRT/V5/DEST-FANCP_1-1834, bei dem Plasmid wurden zwei verschiedene Restriktionsenzyme zur Generierung eines charakteristischen Schnittmusters eingesetzt.

Folgender Ansatz wurde zusammengestellt:

Komponente	1x
10x Puffer	1 μ L
10x BSA (1mg/mL)	1 μ L
Restriktionsenzym(e)	6 Einheiten*
H ₂ O _{DEPC}	add 5 μ L

*Bei zwei Restriktionsenzymen: je 3 Einheiten

Je 5 μ L der Plasmid-DNA wurden mit 5 μ L des obengenannten Ansatzes und zur Kontrolle mit 5 μ L Wasser (H₂O_{DEPC}) über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde auf ein 1%-Agarose-Gel aufgetragen; anhand der Größe der DNA-Fragmente erfolgte die Überprüfung der präparierten Plasmide.

Waren die Plasmide anhand der Restriktionsanalyse verifiziert, so wurde die DNA-Plasmid-Präparation im größeren Stil mit dem QIAGEN Plasmid Purification Kit wiederholt: Hierfür wurden 0,5 mL aus der Übernacht-Kultur zu 100 mL SOB-Medium mit 25 μ g/mL Kanamycin oder 150 μ g/mL Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37°C unter Rotation inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben für 30 min bei 4°C und 3500 rpm in der Heraeus Varifuge 3.OR Zentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterienpellets in 10 mL gekühlten Puffer P1 gelöst. Anschließend wurden je 10 mL Puffer P2 und nach einer 5-minütigen Inkubation je 10 mL Puffer P3 hinzugegeben. Das Lysat wurde dann auf einem QIAfilter für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend filtriert. Nach der Äquilibration der QIAGEN-Tip-Säulen durch die Zugabe von QBT-Puffer und Verwerfen des Durchlaufs wurde das Filtrat auf die Säulen gegeben und der Durchlauf ebenfalls verworfen. Die Plasmid-DNA lag nun an der Säulenmatrix gebunden vor. Die Säulen wurden je zwei Mal mit QC-Puffer gewaschen und der Durchlauf ebenfalls verworfen. Die Elution der DNA von der Säulenmatrix erfolgte im Anschluss mit QF-Puffer. Anschließend wurde die DNA mit Isopropanol präzipitiert: Hierfür wurde je 0,7 Vol Isopropanol zu den Eluat gegeben, die Proben geschwenkt und für 30 min bei 4°C und 12500 rpm in der in der Heraeus Fresco 21 Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Isopropanol wurde vorsichtig abgenommen, die Pellets mit eiskaltem 80%-Ethanol gewaschen und für 15 min bei 12500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Ethanol abgenommen, die DNA in je 1mL TE-Puffer gelöst und die DNA-Menge photometrisch bestimmt. Wenn möglich wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von TE-Puffer auf eine Konzentration von 1 μ g/ μ L eingestellt, wenn weniger DNA vorhanden war, wurden Konzentrationen von 0,5 μ g/ μ L bzw. 0,4 μ g/ μ L gewählt.

6.3.3 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-Expressionsplasmiden zur Interaktionsanalyse

Zur Eingrenzung der Interaktionsdomäne von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 wurden HEK293-Zellen transient mit verschiedenen Kombinationen der hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-Expressionsplasmiden transfiziert. Dazu wurden je $1,5 \times 10^5$ Zellen in 2 mL Zellkulturmedium ohne Antibiotika in 6-well-Zellkulturschalen ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 21% O₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Transfektionsansätze A und B wie folgt zusammengestellt:

	Komponente	1x
A	DMEM ohne Zusätze	45 µL
	Lipofectamin 2000	5 µL

	Komponente	1x
B	DNA 1	1,5 µg
	ggf. DNA 2	1,5 µg
	DMEM ohne Zusätze	add 50 µL

Nach einer 5-minütigen Inkubation des Ansatzes A bei Raumtemperatur wurden die Ansätze A und B gemischt und erneut für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben und die Platten für 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet und für die Immunopräzipitation aufgearbeitet. Vor der Zugabe der Magnetbeads und des entsprechenden Antikörpers wurden je 20 µL Zelllysate für Western-Blot-Analysen entnommen.

Zur Eingrenzung der FANCP/SLX4-Bindungsstelle von hSNM1B/Apollo wurden HEK293-Zellen mit den Expressionsplasmiden transfiziert, die für Flag-markiertes hSNM1B/Apollo in voller Länge oder für Teilstücke des Proteins kodierten. Abbildung 6 gibt einen Überblick über die verwendeten Expressionsplasmide und die fünf verschiedenen Transfektionsansätze. Folgende Immunopräzipitationen und Western-Blot-Nachweise wurden durchgeführt:

Transfektion von HEK293-Zellen mit hSNM1B/Apollo-Expressionsplasmiden:

- a) IP: FANCP (A302-269A), WB: Flag (F9291), FANCP (A302-270A)
- b) IP: Flag (F3156), WB: FANCP (A302-270A), Flag (F9291)
- c) IP: Apollo (Ab-1, selbst-generiert), WB: FANCP (A302-270A), Flag (F9291)

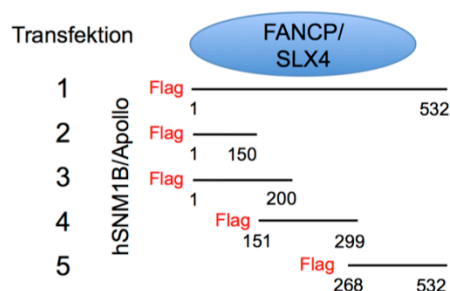


Abbildung 6 Methode zur Eingrenzung der FANCP/SLX4-Bindungsstelle von hSNM1B/Apollo. Schematische Darstellung der verwendeten hSNM1B/Apollo-Expressionsplasmide in den fünf Transfektionsansätzen dieses Experiments. Die zur Präzipitation und Detektion verwendete Flag-Markierung und die in den Teilstücken repräsentierten Aminosäuren sind als Zahlen angegeben. Das endogene FANCP/SLX4 der Zelllysate ist zum besseren Verständnis der Ko-Immunpräzipitation ebenfalls dargestellt.

Die Eingrenzung der hSNM1B/Apollo-Bindungsstelle von FANCP/SLX4 wurde dadurch erschwert, dass der Nachweis von endogenem hSNM1B/Apollo im Western Blot auch nach Anreicherung durch Immunpräzipitation uns und anderen Arbeitsgruppen nicht gelang.^{82 84 90} Daher erfolgten Doppeltransfektionen mit pCMV-Tag2B-Apollo_1-532 (Wildtyp) und verschiedenen FANCP/SLX4-Expressionsplasmiden. Abbildung 7 gibt einen Überblick über die verwendeten Expressionsplasmide und verschiedenen Transfektionansätze. Hier wurden folgende Immunpräzipitationen und Western-Blot-Nachweise durchgeführt:

Doppeltransfektion von HEK293-Zellen mit hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-Expressionsplasmiden:

- a) IP: Flag (F3156), WB: Myc (B7554), Flag (F9291)
- b) IP: Myc (M4439), WB: Flag (F9291), Myc (B7554)

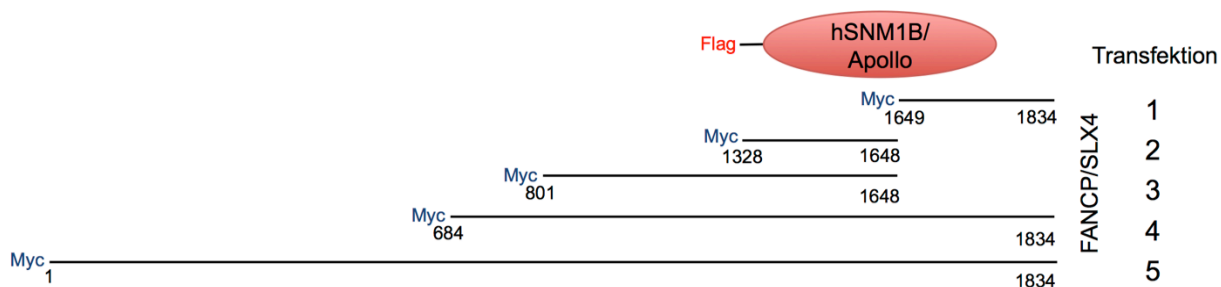


Abbildung 7 Methode zur Eingrenzung der hSNM1B/Apollo-Bindungsstelle von FANCP/SLX4. Schematische Darstellung der verwendeten hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-Expressionsplasmide in den fünf Transfektionsansätzen dieses Experiments. Die zur Präzipitation und Detektion verwendete Flag- oder Myc-Markierung und die in den Teilstücken repräsentierten Aminosäuren sind als Zahlen angegeben.

Zur Untersuchung der Interaktion von hSNM1B/Apollo mit einem oder mehreren anderen hSNM1B/Apollo-Molekülen wurden ebenfalls Doppeltransfektionen durchgeführt: HEK293-Zellen wurden mit pCMV-Tag3B-Apollo_1-532 (Wildtyp) und jeweils mit einem für ein Flag-hSNM1B/Apollo-Teilstück kodierenden Plasmid transfiziert (Abbildung 8). Folgende Immunopräzipitationen und Western-Blot-Nachweise wurden durchgeführt:

Doppeltransfektion von HEK293-Zellen mit hSNM1B/Apollo-Expressionsplasmiden:

1) IP: Myc (M4439), WB: Flag (F9291), Myc (B7554)

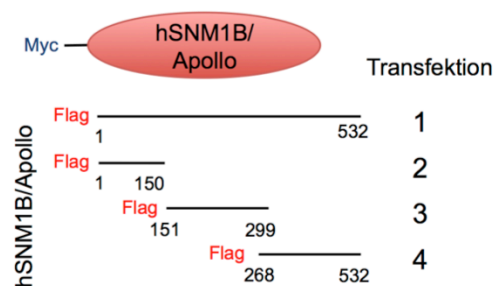


Abbildung 8 Methode zur Eingrenzung der Bindungsstelle von hSNM1B/Apollo an ein anderes hSNM1B/Apollo-Molekül. Schematische Darstellung der verwendeten hSNM1B/Apollo-Expressionsplasmide in den vier Transfektionsansätzen dieses Experiments. Die zur Präzipitation und Detektion verwendete Flag- oder Myc-Markierung und die in den Teilstücken repräsentierten Aminosäuren sind als Zahlen angegeben.

6.3.4 *In-vitro* Translation von hSNM1B/Apollo, FANCP/SLX4 und ihrer Teilstücke

Zur Untersuchung der Interaktion von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 in Abwesenheit endogener Proteine sollten beide Proteine in voller Länge und einige ihrer Teilstücke in einem zellfreien System hergestellt, gemeinsam inkubiert und weitere Ko-Immunopräzipitationsstudien durchgeführt werden. In der unten stehenden Tabelle sind alle Proteine aufgeführt, die für diese Untersuchungen angefertigt wurden. Die zur Präzipitation und Detektion verwendete Flag- oder Myc-Markierung sowie die durch die jeweiligen Vektoren kodierten RNA-Polymerase-Promotor sind ebenfalls vermerkt. Es wurden für die *in-vitro* Interaktionsstudien nur die hSNM1B/Apollo- oder FANCP/SLX4-Teilstücke verwendet, die nicht überlappen und auf die mögliche Bindungsstellen durch die Ergebnisse der im zellulären System durchgeführten Ko-Immunopräzipitationsstudien bereits eingegrenzt werden konnten.

Bezeichnung des Proteins	Protein-Markierung	RNA-Polymerase-Promotor
Apollo (FL: 1-532, Wildtyp)	Flag	T3
Apollo (FL: 1-532, Wildtyp)	Myc	T3
Apollo_1-150	Flag	T3
Apollo_151-299	Flag	T3
Apollo_268-531	Flag	T3
FANCP (FL: 1-1832, Wildtyp)	Myc	T7
FANCP_1328-1648	Myc	T3
FANCP_1649-1834	Myc	T3

Die Zahlen entsprechen den repräsentierten Aminosäuren. FL: Volle Länge

In-vitro Transkription

Zunächst wurden die entsprechenden für hSNM1B/Apollo- oder FANCP/SLX4-Proteine kodierenden Nukleotidsequenzen aus den oben genannten Expressionsplasmiden mit dem mMESSAGE mMACHINE T3 High Yield Capped RNA Transcription Kit (Ambion) in mRNA umgeschrieben. Mit diesem Kit kann mRNA hergestellt werden, die eine am 5'-Ende ein 7-Methyl-Guanosin-Nukleotid besitzt. Diese Struktur erhöht die Stabilität und damit die Translationseffizienz der mRNA drastisch. Die Plasmide wurden jeweils mit einem Restriktionsenzym, das die DNA hinter der zu transkribierenden Sequenz schneidet, linearisiert. Für FANCP/SLX4 (Wildtyp) wurde das Restriktionsenzym NdeI verwendet, bei allen anderen Plasmiden wurde HpaI eingesetzt. Die mRNA wurde auf ein 0,8%-Agarose-Gel aufgetragen und der Verdau anhand der Größe der mRNA-Banden kontrolliert. Es folgte eine Säulen-Aufreinigung der DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in je 30 µL Nuklease-freiem Wasser eluiert und auf eine Konzentration von 0,4 µg/µL eingestellt.

Für die eigentliche *in-vitro* Transkription aller DNA-Sequenzen mit einem T3-RNA-Polymerase-Promotor wurden die Reaktionskomponenten wie folgt zusammengestellt:

Komponente	Menge
Nuklease freies Wasser	3,5 µL
2X NTP/CAP	10 µL
10X Reaction Buffer	2 µL
linearisierte DNA (0,4 µg/µL)	2,5 µL
Enzyme Mix T3	2 µL

FANCP/SLX4 (FL: 1-1832, Wildtyp) wurde von einem Plasmid mit einem T7-RNA-Polymerase-Promotor kodiert, daher wurde der Enzyme Mix T3 durch T7-RNA-Polymerase und

RNase-Inhibitor ersetzt. Außerdem war die zu transkribierende DNA sehr lang, sodass zu dem Reaktionsansatz noch GTP als Energielieferant gegeben wurde, um die Effizienz der Transkription zu steigern.

Komponente	Menge
Nuklease freies Wasser	2,5 μL
2X NTP/CAP	10 μL
10X Reaction Buffer	2 μL
GTP (30 mM)	1 μL
linearisierte DNA (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	2,5 μL
T7 RNA Polymerase	1 μL
RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor	1 μL

Die Reaktionsansätze wurden für 2 h bei 37 °C im Thermoschüttler inkubiert, je 1 μL DNase (2 Einheiten/ μL) zu den Ansätzen gegeben und für weitere 15 min inkubiert.

Phenol-Chloroform (PCA)-Aufreinigung und Präzipitation der in-vitro transkribierten mRNA

Zur Aufreinigung der *in-vitro* transkribierten mRNA wurde 1 Vol PCA zu den Proben gegeben und für 15 sek durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Durch die PCA-Behandlung bildet sich ein zwei-Phasen-System: In der oberen, wässrigen Phase sind Nukleinsäuren gelöst, in der unteren, organischen Phase Proteine. Es folgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 6000 rpm und Raumtemperatur in der Heraeus Fresco 21 Tischzentrifuge. In dieser Zeit wurde in neuen Eppendorfgläsern 1 Vol PCA für den zweiten Extraktions-Schritt vorgelegt. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in das vorgelegte PCA überführt, die Proben wurden danach erneut gemischt und zentrifugiert. Anschließend wurde 1 Vol Chloroform in neue Eppendorfgläser vorgelegt und die wässrige Phase aus dem letzten PCA-Schritt überführt. Die Proben wurden erneut gemischt und zentrifugiert und die wässrige Phase in neue Eppendorfgläser gegeben. Zur Fällung der mRNA wurden 1/10 Vol 3 M NaAc und 1 Vol Isopropanol zu den Proben gegeben. Es folgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 6000 rpm und ein vorsichtiges Abnehmen des Überstands. Das mRNA-Pellet wurde anschließend mit 75%-Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, das Ethanol abgenommen und die mRNA mit Nuklease-freiem Wasser auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ eingestellt. Anhand der Größe der mRNA-Banden auf einem 2%-Agarose-Gel wurde der Erfolg der Transkription beurteilt.

In-vitro Translation

Die Translation der hergestellten mRNA erfolgte mit Weizenkeimextrakt. Zunächst wurden Optimierungsexperimente durchgeführt, um die optimale Konzentration für die jeweilige mRNA zu finden. Letztendlich wurde für Flag-hSNM1B/Apollo (Wildtyp) eine mRNA-Konzentration von 60 ng/μL eingesetzt, bei allen anderen mRNAs war die Translation mit einer mRNA-Konzentration von 30 ng/μL am effizientesten. Die Myc-FANCP/SLX4 (Wildtyp)-mRNA konnte trotz diversen Optimierungsversuchen nicht translatiert werden. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente	Menge
Weizenkeimextrakt	25 μL
Aminosäuren Mix ohne Leucin 1 mM	2 μL
Aminosäuren Mix ohne Methionin 1 mM	2 μL
RNase-Inhibitor	1 μL
mRNA (in Nuklease-freiem Wasser)	20 μL

Die Reaktionsansätze wurden für 2 h bei 25°C im Thermoschüttler inkubiert und die entstandenen Proteinsuspensionen entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

6.3.5 Ko-Immunopräzipitation *in-vitro* translatierter Proteine

Um die Interaktionsdomänen von *in-vitro* translatiertem hSNM1B/Apollo mit den FANCP/SLX4-Teilstücken zu untersuchen, wurden je 10 μL des hergestellten Flag-hSNM1B/Apollo-Wildtyp-Proteins mit 10 μL der jeweiligen Myc-FANCP/SLX4-Teilstücke für 1 h auf Eis inkubiert. Ebenso wurde die Bindungsstelle von *in-vitro* translatiertem hSNM1B/Apollo an andere hSNM1B/Apollo-Moleküle untersucht: Hier wurden 10 μL des Myc-fusionierten hSNM1B/Apollo-Wildtyp-Proteins mit jeweils 10 μL der Flag-fusionierten hSNM1B/Apollo-Teilstücke inkubiert. Anschließend wurden 480 μL IP-Lysepuffer zu den Proben gegeben; es folgten Immunopräzipitationen und Western Blot-Nachweise der (ko-)immunopräzipitierten Proteine analog zu den oben beschriebenen Interaktionsstudien.

Interaktion von in-vitro translatiertem hSNM1B/Apollo mit FANCP/SLX4-Teilstücken:

- a) IP: Myc (M4439), WB: Flag (F9291), Myc (B7554)
- b) IP: Apollo (Ab-1, selbst-generiert), WB: Flag (F9291), Myc (B7554)

Interaktion von in-vitro translatiertem hSNM1B/Apollo mit anderen hSNM1B/Apollo-Molekülen:

a) IP: Myc (M4439), WB: Flag (F9291), Myc (B7554)

6.3.6 Funktionsprüfung der *in-vitro* translatierten Proteine

Viele Protein-Protein-Interaktionen basieren auf post-translationalen Modifikationen, die im zellfreien System der *in-vitro* Translation nicht ausgebildet werden können. Daher wurde geprüft, ob die hier verwendeten *in-vitro* translatierten Proteine in der Lage sind, mit ihren bekannten endogen produzierten Bindungspartnern zu interagieren. Dazu wurden 10 µL des *in-vitro* translatierten Proteins mit 500 µL HEK293-Zelllysat gemischt, das entweder endogen oder durch eine Transfektion der Zellen mit einem entsprechenden Expressionsplasmid ein Protein enthielt, welches in vorherigen Experimenten als Bindungspartner des *in-vitro* translatierten Proteins identifiziert wurde. Anschließend wurden Immunopräzipitationen und Western Blot-Nachweise der (ko-)immunopräzipitierten Proteine durchgeführt. Wenn die *in-vitro* translatierten Proteine wie erwartet mit ihren Bindungspartnern interagieren, müssten beide Proteine im Western Blot nachweisbar sein. Die unten stehende Tabelle gibt einen Überblick zu den untersuchten Proteinen, den verwendeten Zelllysaten und den eingesetzten Antikörpern für die Immunopräzipitationen und die Western Blots.

<i>in-vitro</i> translatiertes Protein	Flag-Apollo_ FL	Myc-FANCP/ SLX4_ 1328-1648	Myc-FANCP/ SLX4_ 1649-1834	Flag-Apollo_ FL	Flag-Apollo_ 1-150	Flag-Apollo_ 151-299	Flag-Apollo_ 268-532
Bindungspartner aus HEK293-Lysat	Myc-FANCP/ SLX4_ 648-1834	Flag-hSNM1B/ Apollo	Flag-hSNM1B/ Apollo	FANCP/ SLX4	FANCP/ SLX4	FANCP/ SLX4	FANCP/ SLX4
IP	Myc	Myc	Myc	FANCP	FANCP	FANCP	FANCP
WB	Flag, Myc	Flag, Myc	Flag, Myc	Flag, FANCP	Flag, FANCP	Flag, FANCP	Flag, FANCP

Anti-Myc für IP: M4439, Anti-Myc für WB: B7554, Anti-FANCP/SLX4 für IP: A302-269A, Anti-FANCP/SLX4 für WB: A302-270A, Anti-Flag für WB: F9291. Die Zahlen entsprechen den repräsentierten Aminosäuren. FL: Volle Länge

6.3.7 Transiente Transfektion von U2OS-Zellen mit small interfering RNAs (siRNAs)

Zur transienten Reduktion der Synthese spezifischer Proteine wurden U2OS-Zellen mit siRNAs transfiziert. Der anti-sense Strang der siRNA bindet dabei an die entsprechende mRNA und verhindert deren Translation. Am Vortag der Transfektion wurden je $1,5 \times 10^5$ Zellen in 800 µL Zellkulturmedium ohne Antibiotika in 6-well-Zellkulturschalen ausplattiert und über Nacht im

Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Transfektionsansatz wie folgt zusammengesetzt:

	Komponenten	1x
A	Opti MEM	12 μ L
	Oligofectamin	3 μ L

	Komponenten	1x
B	siRNA 1 (20 μ M)	7,4 μ L
	ggf. siRNA 2 (20 μ M)	7,4 μ L
	DMEM ohne Zusätze	add 185 μ L

Ansatz A wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu Ansatz B gegeben. Es folgte eine weitere 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Der Transfektionsansatz wurde zu den Zellen gegeben und die Zellen für 6 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium mitsamt dem Transfektionsansatz abgesaugt und 800 μ L frisches Medium ohne Antibiotika zu den Zellen gegeben. Die Transfektion wurde am nächsten Tag wiederholt und die Ernte der Zellen für das jeweilige Experiment erfolgte 48 h nach der zweiten Transfektion. Die Effizienz der Depletion wurde je nach Protein im Western Blot oder mittels Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft.

6.4 Zellbiologische Methoden

6.4.1 Kolonienbildungsstudien

Zur Untersuchung der Überlebensfähigkeit von U2OS-Zellen nach siRNA-vermittelter Depletion von hSNM1B/Apollo, FANCP/SLX4 oder der Depletion beider Proteine und anschließender Acetaldehyd-Behandlung wurde zunächst die siRNA-Transfektion wie oben beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und gezählt, je 1000 Zellen in 5 mL Zellkulturmedium in Duplikaten oder Triplikaten in 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert und für vier Stunden im Brutschrank inkubiert, um ein Absetzen der Zellen zu ermöglichen. Die restlichen Zellen wurden zur Bestätigung der Depletion für Western Blot- (FANCP/SLX4) bzw. Immunfluoreszenz-Analysen (hSNM1B/Apollo) weiterverarbeitet. Anschließend wurde das Acetaldehyd in Zellkulturmedium auf die gewünschte Konzentration verdünnt und zu den Zellen gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank wurde das Zellkulturmedium abgenommen und alle Schalen zwei Mal mit je 10 mL PBS⁺ gewaschen. Dann wurden je 12 mL frisches Zellkulturmedium zu den Zellen gegeben und die Schalen für 14 Tage im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich aus den Zellen, die die Acetaldehyd-Behandlung überlebt

hatten, Kolonien. Nach den 14 Tagen folgten je zwei Waschschriffe PBS⁺ und eine Fixierung der Kolonien durch eine 8-minütige Behandlung mit je 8 mL eiskaltem Fixativ (Methanol: Eisessig, 3:1). Anschließend wurden die Kolonien mit 10%-Giemsa-Färbelösung angefärbt, luftgetrocknet und gezählt. Zur Bestimmung der prozentuellen Überlebensraten für die verschiedenen siRNA-Behandlungen wurde für jede untersuchte Acetaldehyd-Konzentration der Mittelwert der entstandenen Kolonien der Acetaldehyd-behandelten Zellen mit dem der unbehandelten Zellen ins Verhältnis gesetzt. Die Punkte wurden in ein Koordinatensystem eingetragen und mit Graden verbunden. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem One-way ANOVA Test und dem Tukey post-hoc Test in der Statistik-Software SPSS (Version 23).

6.4.2 Bestimmung der mittelten inhibitorischen Acetaldehyd-Konzentration (IC₅₀)

Die IC₅₀ ist die Konzentration eines Stoffes, bei der eine halbmaximale Wachstumsinhibition der behandelten Zellen beobachtet wird. Zur näherungsweisen Bestimmung der IC₅₀ der jeweiligen Zelllinie wurde hier eine lineare Interpolation durchgeführt. Zwischen den bekannten Messwerten der Überlebenskurven oberhalb und unterhalb von $f(x) = 50$ wurde mit einem linearen Gleichungssystem eine Funktion aufgestellt. Mit dieser linearen Funktion wurde die Funktionsstelle für den Funktionswert $f(x) = 50$ berechnet. Diese Stelle entspricht näherungsweise der IC₅₀.

6.5 Chromosomenbruchanalysen

6.5.1 Induzierte Chromosomenschädigung durch Acetaldehyd

Zur Untersuchung der Chromosomenbrüchigkeit nach siRNA-vermittelter Depletion von FANCP/SLX4, hSNM1B/Apollo oder der Depletion beider Proteine wurden je $1,5 \times 10^5$ Zellen pro 6-well-Zellkulturschale ausplattiert und die siRNA-Behandlung wie oben beschrieben durchgeführt. Am Tag vor der Chromosomenaufarbeitung wurde das Zellkulturmedium abgenommen, 1 mL frisches Medium zu den Zellen gegeben und Acetaldehyd mit Zellkulturmedium auf 2 mM verdünnt. Es wurde je 1 mL der Lösung zu den Zellen gegeben, um eine Endkonzentration von 1 mM zu erreichen. Die Zellkulturschalen wurden mit Parafilm umwickelt und für 24 h im Brutschrank inkubiert.

6.5.2 Chromosomenaufarbeitung

22 h nach der Zugabe von Acetaldehyd wurden je 30 μ L Colcemid zu den Zellen gegeben, um Metaphasezellen zu arretieren. Nach weiteren 2 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen geerntet, in 15 mL Spitzbodenröhrchen überführt und Teile der Zellsuspension für die

Durchführung von Western Blot- oder Immunfluoreszenz-Analysen zur Kontrolle der Depletion abgenommen. Die restlichen Zellen wurden für 10 min Heraeus Megafuge 2.0 Zentrifuge bei 1000 rpm pelletiert, in je 1 mL Zellkulturmedium resuspendiert und zu je 5 mL auf 37°C vorgewärmtes 0,4%-Kaliumchlorid gegeben. Diese hypotone Behandlung wurde für 20 min im Brutschrank durchgeführt und diente dem Anschwellen der Zellen durch osmotisch bedingte Wasseraufnahme. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand bis auf 1 mL abgenommen und die Zellen darin resuspendiert. Es folgte ein langsames Hinzutropfen von je 4 mL eiskaltem Fixativ. Die Zellen wurden dann erneut für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand bis auf 1 mL abgenommen und die Fixierung noch drei Mal wiederholt. Nach dem letzten Durchgang wurde der Überstand bis auf 0,5 mL abgenommen, die Zellen darin resuspendiert und 4-5 Tropfen der Zellsuspension auf gewaschene und gekühlte Objektträger getropft. Die Objektträger wurden sofort im Wasserdampf eines befeuchteten Handtuchs auf einem Heizblock getrocknet. Die Präparate wurden anschließend für 6 min in 10%-Giemsa-Färbelösung gefärbt, abgespült und luftgetrocknet. Es folgte ein Versiegeln der Objektträger mit einem Deckgläschen und einigen Tropfen Entellan. Die Präparatidentität wurde anschließend durch Mitarbeiter des Labors verschlüsselt und die Auswertung der Metaphasen mit einem Lichtmikroskop in 1000-facher Vergrößerung durchgeführt.

6.5.3 Chromosomenauswertung

Für die Auswertung der Chromosomen wurde die Anzahl der aberranten Metaphasen und der Brüche pro Zelle gezählt und der gewichtete Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten berechnet. Chromatid- und Chromosomenfragmente und -brüche wurden dabei als ein Bruchereignis, tri- und quadriradiale Austauschfiguren, Ringchromosomen und dizentrische Chromosomen mit gleichzeitig vorliegenden azentrischen Fragmenten als zwei Bruchereignisse gewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test und dem Kruskal-Wallis-Test in der Statistik-Software SPSS (Version 23).

7 Ergebnisse

7.1 Untersuchung der Interaktion von hSNM1B/Apollo mit FANCP/SLX4

7.1.1 Herstellung der hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-kodierenden Plasmide

Für die Untersuchung der Interaktion von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 wurden zunächst Expressionsplasmide hergestellt, die eine ektopische Synthese der Proteine und ihrer Teilstücke in HEK293-Zellen ermöglichen. Die erfolgreiche Ligation der hSNM1B/Apollo- bzw. FANCP/SLX4-Nukleotidsequenzen in die Vektoren wurde durch die Analyse der Bandengrößen nach Restriktionsenzymverdaulichkeit der Plasmide und elektrophoretischer Auftrennung der Proben bestätigt (Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11).

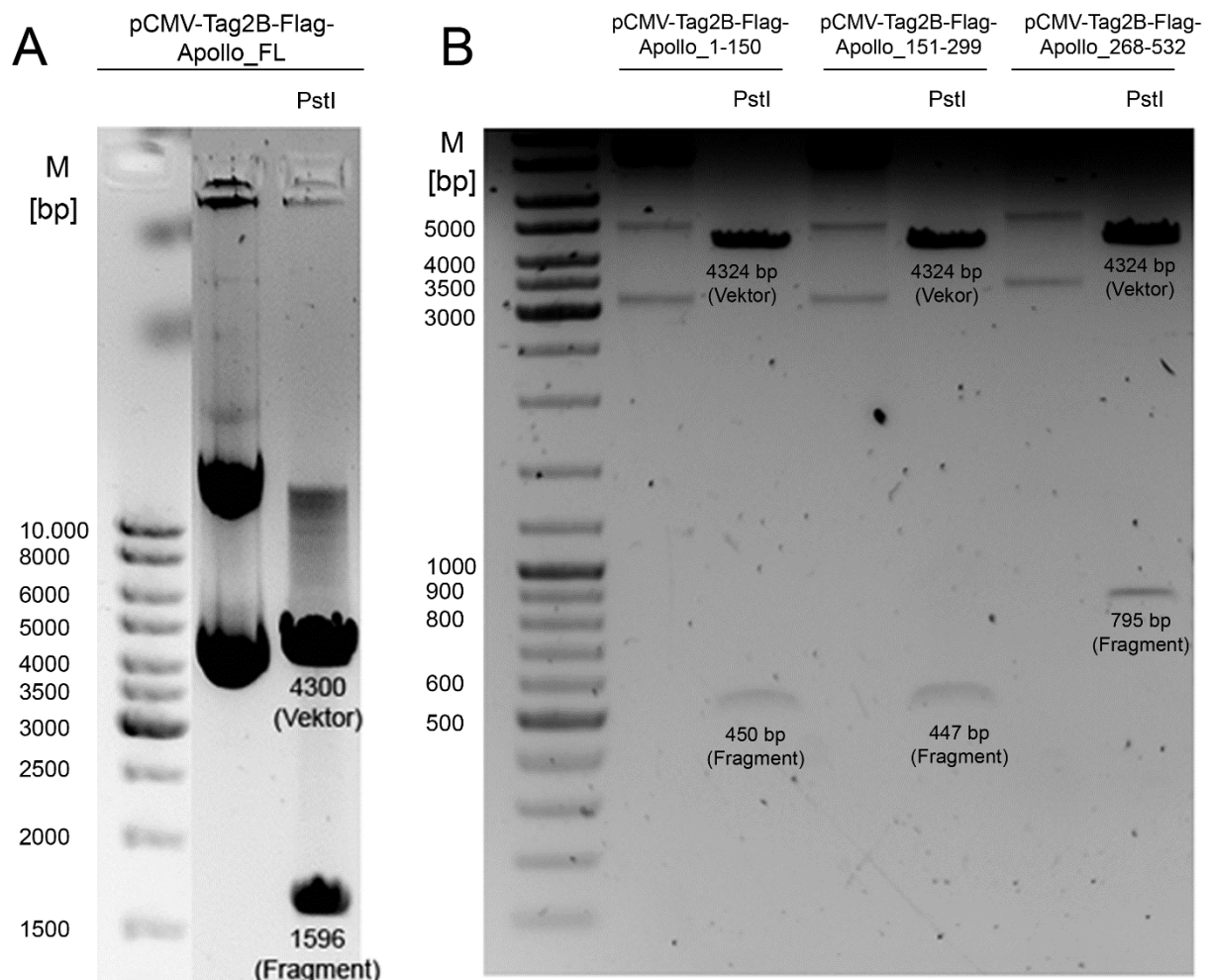


Abbildung 9 Restriktionsverdau von Flag-hSNM1B/Apollo-kodierenden pCMV-Tag2B-Plasmiden. A) PstI-Restriktionsverdau von pCMV-Tag2B-Flag-Apollo_FL im Vergleich zu unverdaulichem Plasmid. Die Bandengrößen in der rechten Spur entsprechen der Größe des verwendeten Vektors und des inserierten Fragments und bestätigen die erfolgreiche Ligation. FL: Volle Länge. B) PstI-Restriktionsverdau von pCMV-Tag2B-Flag-Apollo_1-150, _151-299 und _268-532 im Vergleich zu unverdaulichem Plasmiden. Die Bandengrößen in den rechten Spuren entsprechen der Größe des verwendeten Vektors und des inserierten Fragments und bestätigen die erfolgreiche Ligation.

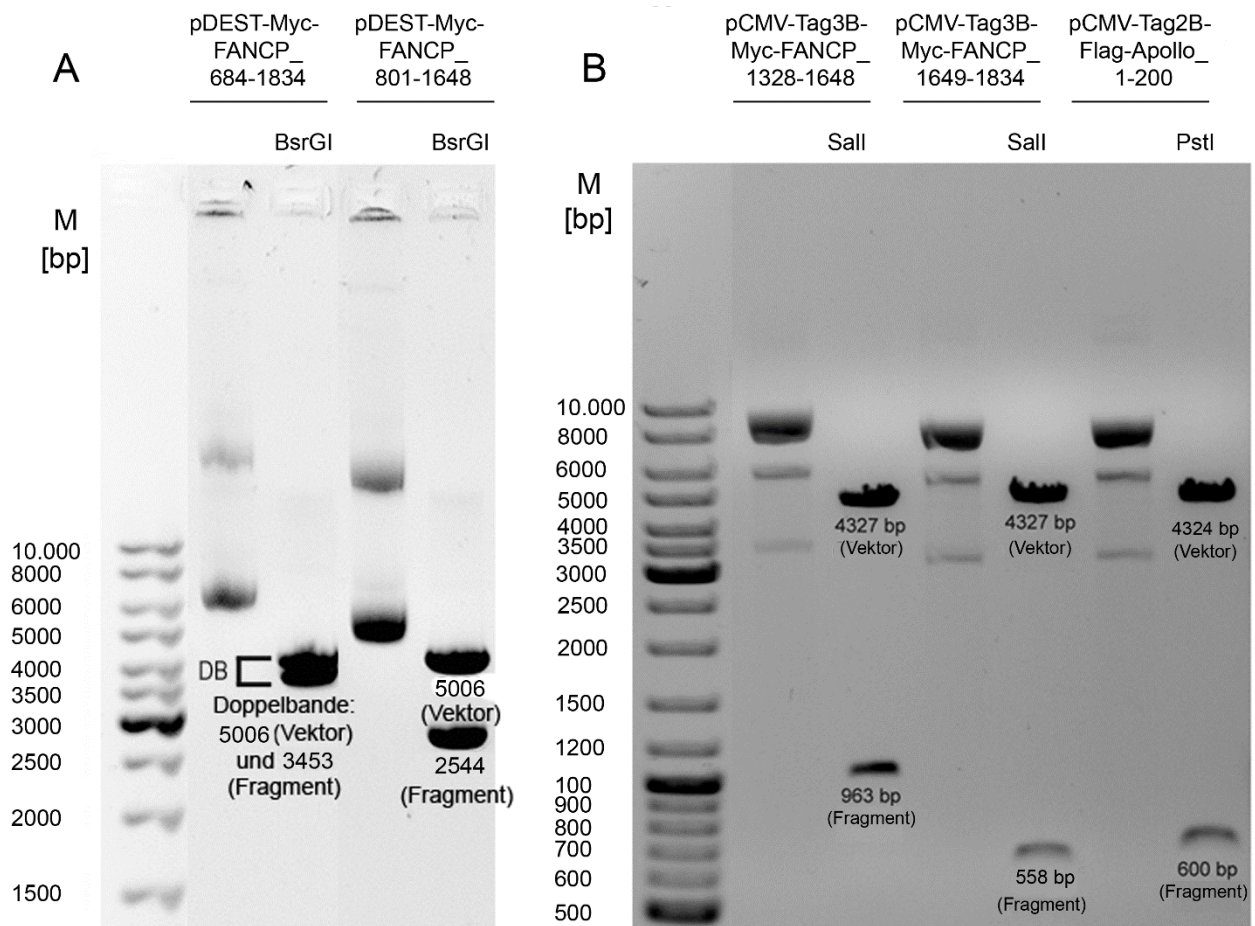


Abbildung 10 Restriktionsverdau von Myc-FANCP/SLX4- und Flag-hSNM1B/Apollo-kodierenden Plasmiden. A) BsrGI-Restriktionsverdau von pDEST-Myc-FANCP/SLX4_684-1834 und _801-1648 im Vergleich zu unverdauten Plasmiden. Die Bandengrößen in den rechten Spuren entsprechen der Größe des verwendeten Vektors und des inserierten Fragments und bestätigen die erfolgreiche Ligation. B) Sall-Restriktionsverdau von pCMV-Tag3B-Myc-FANCP/SLX4_1328-1648 und _1649-1843 im Vergleich zu unverdauten Plasmiden und PstI-Restriktionsverdau von pCMV-Tag2B-Flag-Apollo_1-200 im Vergleich zu unverdautem Plasmid. Die Bandengrößen in den rechten Spuren entsprechen der Größe des verwendeten Vektors und des inserierten Fragments und bestätigen die erfolgreiche Klonierung.

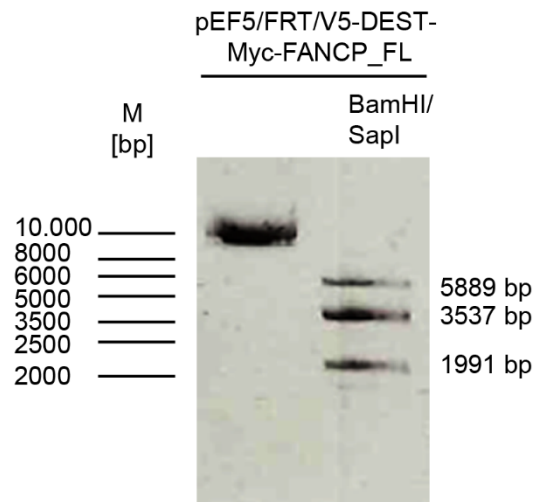


Abbildung 11 BamHI/SapI-Restriktionsverdau von pEF5/FRT/V5/DEST-Myc-FANCP im Vergleich zu unverdaulichem Plasmid. Die Bandengrößen in den rechten Spuren entsprechen den erwarteten Größen und bestätigen die erfolgreiche Ligation. FL: Volle Länge.

7.1.2 Ko-Immunopräzipitationsstudien mit ektopisch exprimiertem hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4

7.1.2.1 Synthese und Immunopräzipitation von Flag-hSNM1B/Apollo in HEK293-Zellen

Die Interaktion von hSNM1B/Apollo mit FANCP/SLX4 wurde mittels Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP) und anschließender Detektion der präzipitierten Proteine im Western Blot untersucht. Der Nachweis von endogenem hSNM1B/Apollo im Western Blot gelang uns und anderen nicht, vermutlich aufgrund des niedrigen Expressionslevels des Gens.^{82 84 90} Daher wurde ektopisch exprimiertes Flag-hSNM1B/Apollo für die Interaktionsstudien verwendet.

In einleitenden Experimenten wurden HEK293-Zellen mit dem pCMV-Tag2B-Flag-hSNM1B/Apollo-Plasmid transfiziert; als Negativ-Kontrolle dienten Zellen, die mit einem leeren Plasmid transfiziert wurden (pCMV-Tag2B-leer). Aus diesen Zellen wurde ein Proteinlysate hergestellt und anschließend eine IP mit Antikörpern gegen hSNM1B/Apollo durchgeführt. Abbildung 12 zeigt den Nachweis von Flag-hSNM1B/Apollo im Western Blot nach der IP und bestätigt somit die erfolgreiche Transfektion der Zellen, Synthese von Flag-hSNM1B/Apollo und Immunopräzipitation des Proteins mit dem verwendeten Antikörper. Das detektierte Protein hatte ein Molekulargewicht von etwa 65 kDa.

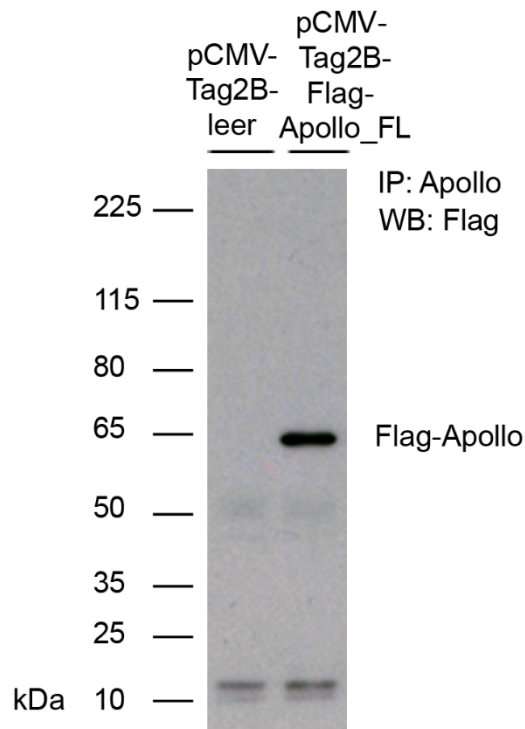


Abbildung 12 Western Blot zum Nachweis von Flag-hSNM1B/Apollo nach hSNM1B/Apollo-IP aus pCMV-Tag2B-Flag-Apollo_FL-transfizierten HEK293-Zellen im Vergleich mit pCMV-Tag2B-leer-transfizierten Zellen. Die IP wurde mit Anti-hSNM1B/Apollo- und der Western Blot mit Anti-Flag-Antikörpern durchgeführt. FL: Volle Länge.

7.1.2.2 Ko-Immunopräzipitation von hSNM1B/Apollo mit endogenem FANCP/SLX4

In den darauffolgenden Experimenten wurden HEK293-Zellen mit dem pCMV-Tag2B-leer- oder dem pCMV-Tag2B-Flag-hSNM1B/Apollo-Plasmid transfiziert und anschließend IPs mit Antikörpern gegen FANCP/SLX4 durchgeführt. Endogenes FANCP/SLX4 wurde aus beiden Lysaten nachgewiesen (Abbildung 13 A), die Eignung des verwendeten Antikörpers für die FANCP/SLX4-IP konnte somit bestätigt werden. Das detektierte endogene FANCP/SLX4 wies bei diesen Untersuchungen ein Molekulargewicht von etwa 230 kDa auf. Aus dem Lysat der Zellen, die ektopisch Flag-hSNM1B/Apollo exprimierten, konnte nach der FANCP/SLX4-IP auch Flag-hSNM1B/Apollo nachgewiesen werden. Bei den mit dem Kontrollplasmid transfizierten Zellen gab es wie erwartet kein hSNM1B/Apollo-Signal (Abbildung 13 B). Diese Ko-Immunopräzipitation von hSNM1B/Apollo mit FANCP/SLX4 zeigt, dass die beiden Proteine miteinander interagieren.

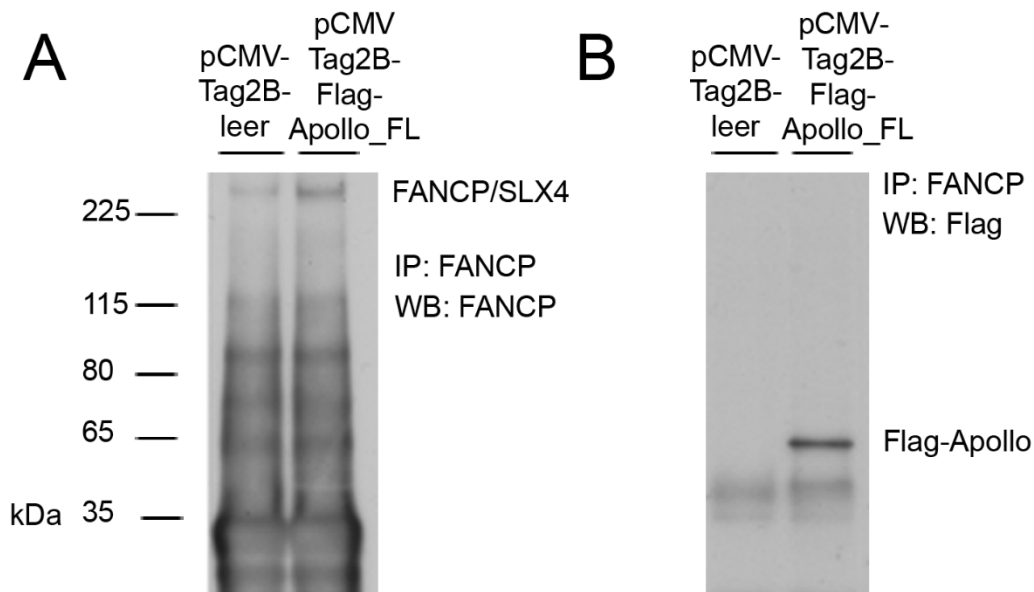


Abbildung 13 Western Blots zum Nachweis der Ko-Immunopräzipitation von Flag-hSNM1B/Apollo mit FANCP/SLX4. A) Nachweis der Immunopräzipitation von FANCP/SLX4. Die IP und der Western Blot wurden mit Anti-FANCP/SLX4-Antikörpern durchgeführt. B) Nachweis der Ko-Immunopräzipitation von hSNM1B/Apollo mit FANCP/SLX4. Die IP wurde mit Anti-FANCP/SLX4- und der Western Blot mit Anti-Flag-Antikörpern durchgeführt. FL: Volle Länge.

Bei der umgekehrten IP mit Antikörpern gegen den Flag-Anteil des Flag-hSNM1B/Apollo-Fusionsproteins oder gegen hSNM1B/Apollo konnte kein FANCP/SLX4 präzipitiert werden (nicht abgebildet).

7.1.2.3 Eingrenzung der FANCP/SLX4-Bindungsstelle von hSNM1B/Apollo

Die Eingrenzung der FANCP/SLX4-Bindungsstelle von hSNM1B/Apollo erfolgte ebenfalls mittels Ko-Immunopräzipitationsstudien. HEK293-Zellen wurden dafür zunächst mit pCMV-Tag2B-Plasmiden, die für verschiedene Flag-fusionierte hSNM1B/Apollo-Teilstücke kodierten, transfiziert. Anschließend wurde eine IP mit Antikörpern gegen FANCP/SLX4 durchgeführt. Nur die Flag-hSNM1B/Apollo-Teilstücke, die an FANCP/SLX4 binden und daher ko-immunopräzipitiert werden, lassen sich mit diesem Versuchsaufbau im Western Blot detektieren.

Aus den Zelllysaten wurden zunächst alle hSNM1B/Apollo-Teilstücke über ihre Flag-Sequenz nachgewiesen, womit die erfolgreiche Transfektion der Zellen und Synthese der Proteine gezeigt werden konnte (Abbildung 14 B). Interessanterweise wurden auch nach FANCP/SLX4-IP alle hSNM1B/Apollo-Teilstücke detektiert (Abbildung 14 A).

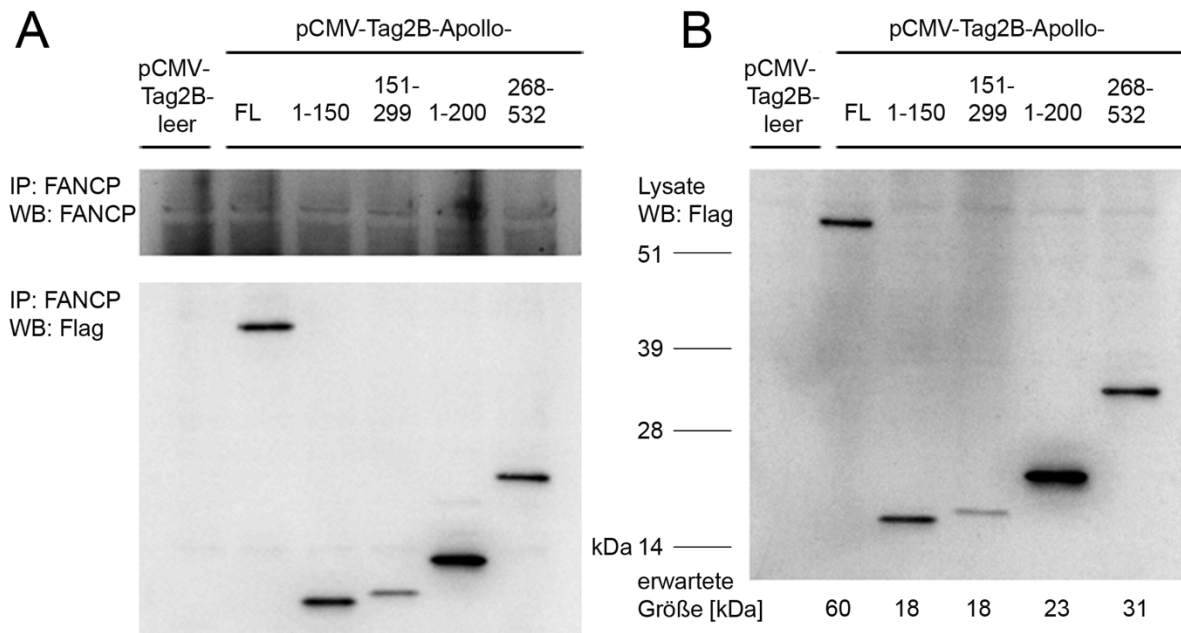


Abbildung 14 Western Blots zur Eingrenzung der FANCP/SLX4-Interaktionsdomäne von hSNM1B/Apollo.

A) Nachweis von immunopräzipitiertem endogenem FANCP/SLX4 (oben) und von den ko-immunopräzipitierten Flag-hSNM1B/Apollo-Teilstücken (unten). Die IP wurde mit Anti-FANCP/SLX4-Antikörpern durchgeführt, für die Western Blots wurden Anti-FANCP/SLX4- bzw. Anti-Flag-Antikörper verwendet. B) Nachweis der Synthese der Flag-hSNM1B/Apollo-Teilstücke aus den Zelllysaten. Der Western Blot wurde mit Anti-Flag-Antikörpern durchgeführt. FL: Volle Länge.

7.1.2.4 Eingrenzung der hSNM1B/Apollo-Bindungsstelle von FANCP/SLX4

Als nächstes sollte die Bindungsstelle von FANCP/SLX4 an hSNM1B/Apollo eingegrenzt werden. Dafür wurden Doppeltransfektionen durchgeführt: HEK293-Zellen wurden zunächst mit dem pCMV-Tag2B-Flag-hSNM1B/Apollo_FL-Plasmid transfiziert. Zusätzlich wurde je ein Plasmid in die Zellen eingebracht, das für Myc-FANCP/SLX4 in voller Länge oder für Myc-fusionierte Teilstücke des Proteins kodierte. Nach einer IP mit Antikörpern gegen die Myc-Sequenz konnte aus allen Lysaten hSNM1B/Apollo ko-immunopräzipitiert und über die Flag-Sequenz nachgewiesen werden (Abbildung 15 A). Aus den korrespondierenden Zelllysaten konnte Flag-hSNM1B/Apollo im Western Blot nachgewiesen und somit die erfolgreiche Transfektion und Protein-Synthese bestätigt werden. Die Myc-FANCP/SLX4-Teilstücke konnten ebenfalls detektiert werden, Myc-FANCP/SLX4 in voller Länge ließ sich erst nach IP mit Antikörpern gegen die Myc-Sequenz nachweisen (Abbildung 15 B).

Bei der umgekehrten IP mit Antikörpern gegen die Flag-Sequenz der hSNM1B/Apollo-Teilstücke konnten die FANCP/SLX4-Teilstücke und FANCP/SLX4 in voller Länge nicht verlässlich präzipitiert werden (nicht abgebildet).

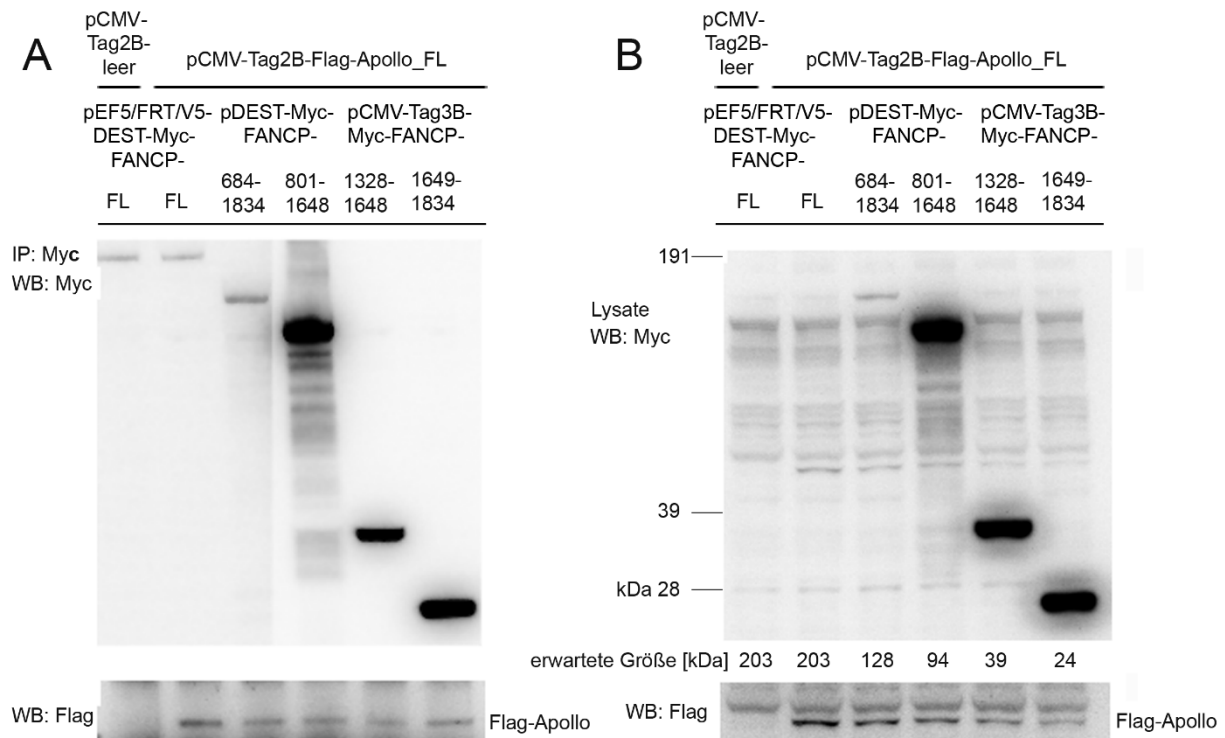


Abbildung 15 Western Blots zur Eingrenzung der hSNM1B/Apollo-Interaktionsdomäne von FANCP/SLX4.
 A) Nachweis von immunopräzipitierten Myc-FANCP/SLX4-Teilstücken und ko-immunopräzipitiertem Flag-hSNM1B/Apollo. Die IP wurde mit Anti-Myc-Antikörpern durchgeführt, für die Western Blots wurden Anti-Myc- bzw. Anti-Flag-Antikörper verwendet. B) Nachweis der Synthese der Myc-FANCP/SLX4-Teilstücke und Flag-hSNM1B/Apollo vor der Immunopräzipitation. Die Western Blots wurden mit Anti-Myc- bzw. Anti-Flag-Antikörpern durchgeführt. FL: Volle Länge.

7.1.3 Ko-Immunopräzipitationsstudien mit *in-vitro* translatiertem hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4

7.1.3.1 *In-vitro* Translation von hSNM1B/Apollo, FANCP/SLX4 und ihrer Teilstücke

Die bisherigen Ergebnisse legten eine komplexe Interaktion von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 mit mehreren Bindungsstellen nahe. Unklar blieb, ob die Proteine direkt oder indirekt über weitere Proteine miteinander interagieren, da die durchgeführten Ko-Immunopräzipitation diesbezüglich keine Differenzierung erlauben. Um zu untersuchen, ob Flag-hSNM1B/Apollo und Myc-FANCP/SLX4 auch in Abwesenheit endogener Proteine interagieren, wurde versucht, beide Proteine in voller Länge sowie die Teilstücke, auf die die Bindungsstellen bereits eingegrenzt werden konnten, in einem zellfreien System für weitere Ko-Immunopräzipitationsstudien herzustellen. Zunächst wurden dafür mittels *in-vitro* Transkription die benötigten mRNAs hergestellt (Abbildung 16). Auffällig war, dass sich Banden der Kontroll-mRNA und der mRNA von Flag-hSNM1B/Apollo in voller Länge im Agarose-Gel kleiner als erwartet darstellten. Ein möglicher Grund für diese Abweichung ist, dass die mRNAs auf ein natives Agarose-Gel aufgetragen wurden, in dem die Nukleinsäuren Sekundärstrukturen ausbilden können. Diese können die Auftrennung der mRNA nach Molekülgröße verfälschen.

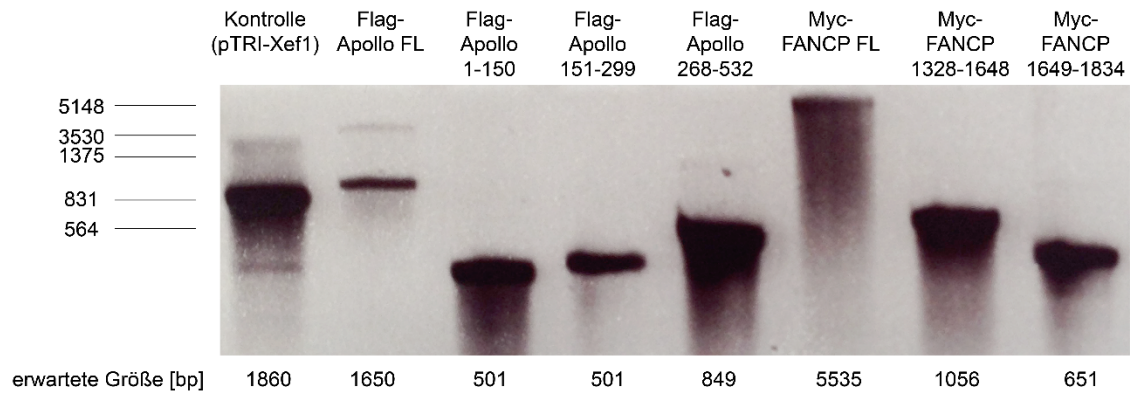


Abbildung 16 Agarose-Gelelektrophorese zur Kontrolle der *in-vitro* Transkription von Flag-hSNM1B/Apollo, Myc-FANCP/SLX4 und ihrer Teilstücke. Als Marker wurde ein selbst-generierter λ EcoRI/HindIII DNA-Marker verwendet. Angegeben ist jeweils die erwartete Größe der entstandenen mRNAs. FL: Volle Länge.

Anschließend wurden die generierten mRNAs verwendet, um mittels *in-vitro* Translation die von ihnen kodierten Proteine herzustellen. Dies gelang bei allen Proteinen mit der Ausnahme von Myc-FANCP/SLX4 in voller Länge (nicht abgebildet). Abbildung 17 bestätigt die erfolgreiche Translation der anderen Proteine über ihre Detektion im Western Blot.

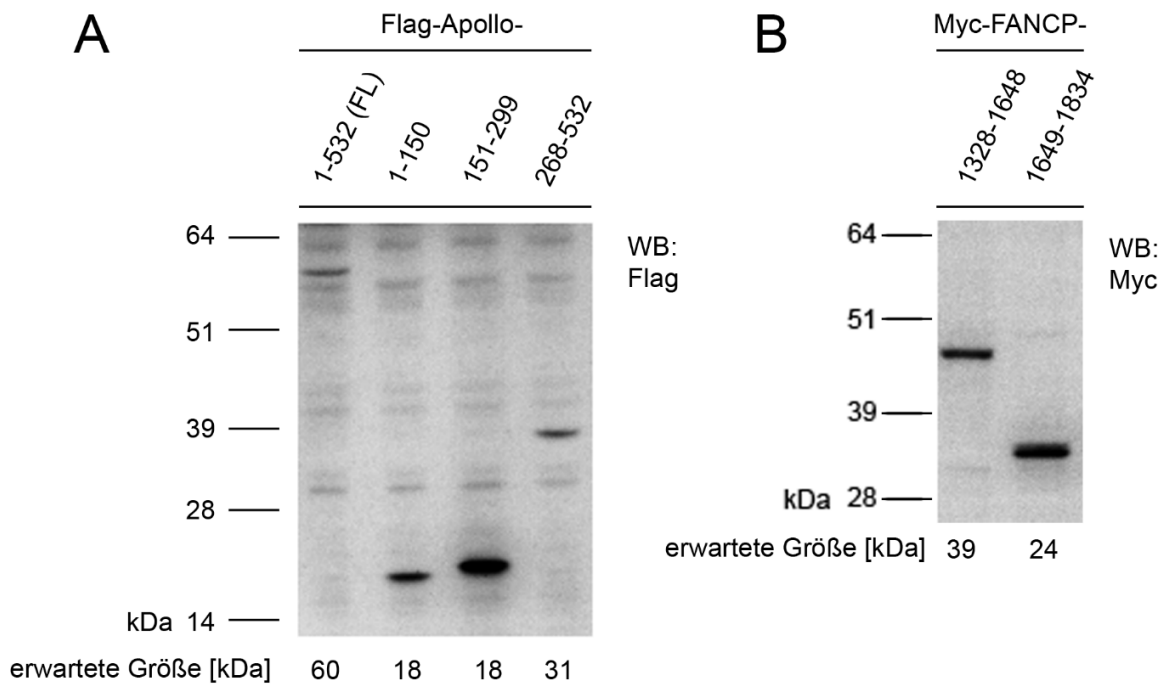


Abbildung 17 Western Blots zur Kontrolle der *in-vitro* Translation von Flag-hSNM1B/Apollo und seinen Teilstücken und Myc-FANCP/SLX4_1328-1648 und _1649-1834. A) Western Blot zum Nachweis von *in-vitro* translatiertem Flag-hSNM1B/Apollo und seinen Teilstücken. Der Western Blot wurde mit Anti-Flag-Antikörpern durchgeführt. B) Western Blot zum Nachweis der *in-vitro* translatierten FANCP/SLX4-Teilstücke. Der Western Blot wurde mit Anti-Myc-Antikörpern durchgeführt. FL: Volle Länge.

7.1.3.2 Ko-Immunopräzipitationsstudien mit *in-vitro* translatiertem hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4-Teilstücken

Da sich Myc-FANCP/SLX4 in voller Länge in der *in-vitro* Translation nicht herstellen ließ, konnten die Ko-Immunopräzipitationsstudien im zellfreien System nur zur Eingrenzung der hSNM1B/Apollo-Bindungsstelle von FANCP/SLX4 durchgeführt werden. Dazu wurde Flag-hSNM1B/Apollo_FL jeweils mit einem Myc-FANCP/SLX4-Teilstück inkubiert und eine IP mit Antikörpern gegen die Myc-Sequenz durchgeführt. Im zellfreien System gelang keine Ko-IP von hSNM1B/Apollo (Abbildung 18). Auch die umgekehrte IP mit Antikörpern gegen hSNM1B/Apollo führte nicht zu einer Präzipitation der FANCP/SLX4-Teilstücke (Abbildung 19). Im zellfreien System konnte somit keine Interaktion von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 nachgewiesen werden.

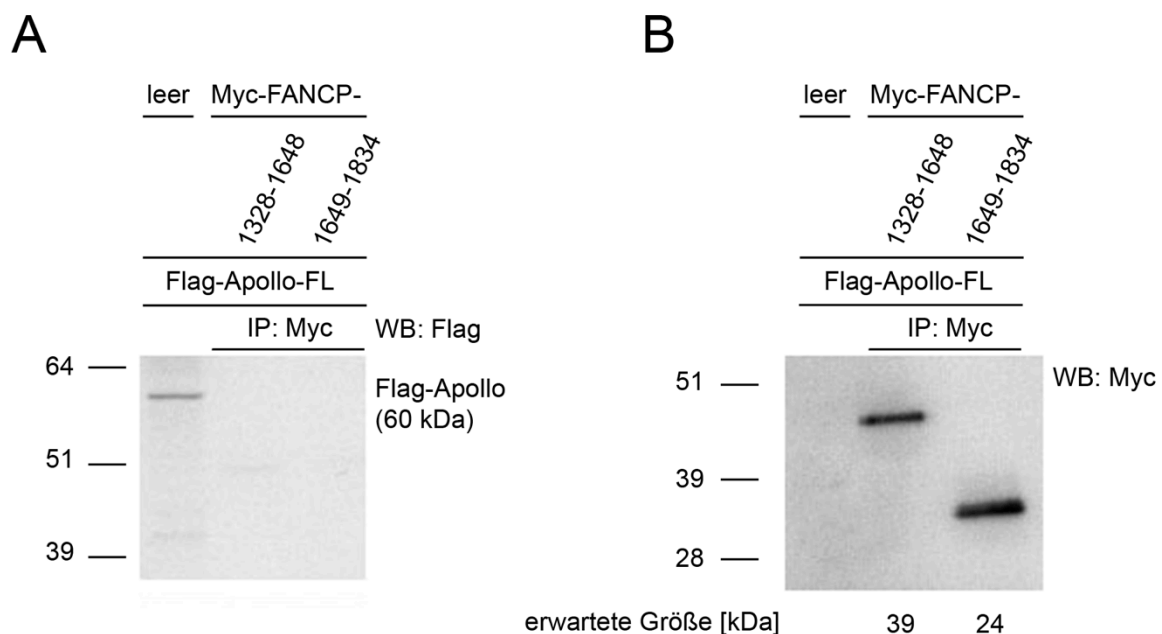


Abbildung 18 Western Blots zur Eingrenzung der hSNM1B/Apollo-Interaktionsdomäne von *in-vitro* translatiertem FANCP/SLX4, IP: Anti-Myc. A) Spur 1: Nachweis der *in-vitro* Translation von Flag-hSNM1B/Apollo. Spur 2 und 3: Flag-hSNM1B/Apollo konnte nicht mit den *in-vitro* translatierten Myc-FANCP/SLX4-Teilstücken ko-immunopräzipitiert werden. Die IP wurde mit Anti-Myc-Antikörpern, der Western Blot mit Anti-Flag-Antikörpern durchgeführt. B) Spur 1: Negativ-Kontrolle, kein Nachweis von Flag-hSNM1B/Apollo mit Anti-Myc-Antikörpern. Spur 2 und 3: Nachweis der *in-vitro* Translation und Immunopräzipitation der Myc-FANCP/SLX4-Teilstücke. Die IP und der Western Blot wurden mit Anti-Myc-Antikörpern durchgeführt. FL: Volle Länge.

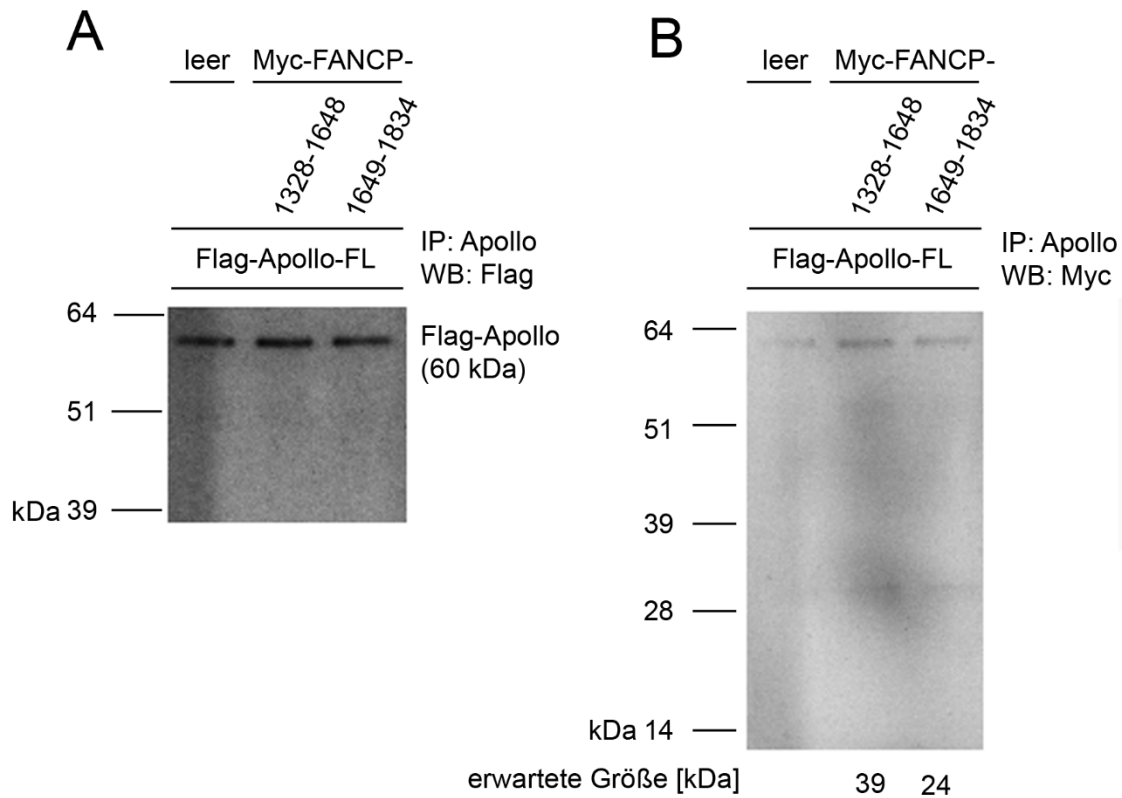


Abbildung 19 Western Blots zur Eingrenzung der hSNM1B/Apollo-Interaktionsdomäne von *in-vitro* translatiertem FANCP/SLX4, IP: Anti-Apollo. A) Nachweis der *in-vitro* Translation und Immunopräzipitation von Flag-hSNM1B/Apollo. Die IP wurde mit Anti-hSNM1B/Apollo-Antikörpern, der Western Blot mit Anti-Flag-Antikörpern durchgeführt. B) Die FANCP/SLX4-Teilstücke konnten nicht mit hSNM1B/Apollo ko-immunopräzipitiert werden. Die IP wurde mit Anti-hSNM1B/Apollo-Antikörpern, der Western Blot mit Anti-Myc-Antikörpern durchgeführt.

7.1.3.3 Funktionsprüfung der *in-vitro* translatierten Proteine für die hSNM1B/Apollo-FANCP/SLX4-Interaktionsanalyse

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Interaktion von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 aus Untersuchungen mit Zelllysaten gegenüber Untersuchungen im zellfreien System wurde die Funktionalität der *in-vitro* translatierten Proteine überprüft. Dabei wurde untersucht, ob die hier hergestellten Proteine mit endogen produzierten Proteinen, die in vorherigen Versuchen bereits als Bindungspartner identifiziert wurden, interagieren. *In-vitro* translatiertes Flag-hSNM1B/Apollo wurde mit einem HEK293-Zelllysate, das Myc-FANCP/SLX4_648-1834 enthielt, inkubiert. *In-vitro* translatiertes Myc-FANCP/SLX4_1328-1648 und Myc-FANCP/SLX4_1649-1834 wurde mit Lysaten aus HEK293-Zellen, die Flag-hSNM1B/Apollo enthielten, inkubiert. Nach einer IP mit Antikörpern gegen die Myc-Sequenz müsste bei voller Funktionalität der *in-vitro* translatierten Proteine aus allen Proben Flag-hSNM1B/Apollo nachweisbar sein. Dies war jedoch bei keiner der Proben der Fall (Abbildung 20).

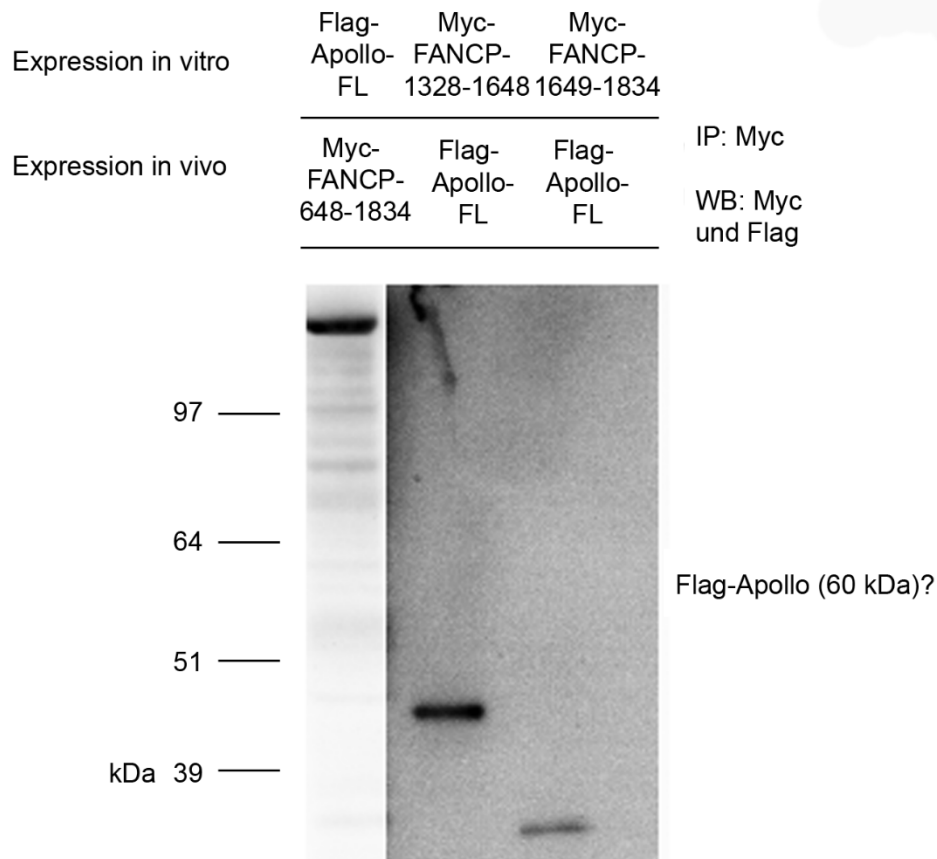


Abbildung 20 Western Blot zur Funktionsprüfung von *in-vitro* translatiertem hSNM1B/Apollo und *in-vitro* translatierten FANCP/SLX4-Teilstücken. Die IP wurde mit Anti-Myc-Antikörpern, der Western Blot mit Anti-Myc und Anti-Flag-Antikörpern durchgeführt. Flag-hSNM1B/Apollo konnte aus keiner Probe ko-immunopräzipitiert werden. FL: Volle Länge.

7.2 Untersuchung der Bindung von hSNM1B/Apollo an andere hSNM1B/Apollo-Moleküle

7.2.1 Ko-Immunopräzipitation von Myc-hSNM1B/Apollo mit Flag-hSNM1B/Apollo und Eingrenzung der Bindungsstelle

Van Overbeek und de Lange beschrieben, dass hSNM1B/Apollo in der Lage ist, andere hSNM1B/Apollo-Moleküle zu binden.⁹⁰ In darauf aufbauenden Untersuchungen wurde hier versucht, diese Bindungsstelle einzugrenzen. HEK293-Zellen wurden dafür mit einem pCMV-Tag3B-Plasmid, das für Myc-hSNM1B/Apollo kodierte, und je einem der pCMV-Tag2B-Plasmide, die für die Flag-hSNM1B/Apollo-Teilstücke kodierten, ko-transfiziert. Nach einer IP mit Antikörpern gegen die Myc-Sequenz von Myc-hSNM1B/Apollo konnten Flag-hSNM1B/Apollo in voller Länge und alle untersuchten Teilstücke im Western Blot detektiert werden (Abbildung 21 A). Abbildung 21 B bestätigt die erfolgreiche Synthese der Proteine.

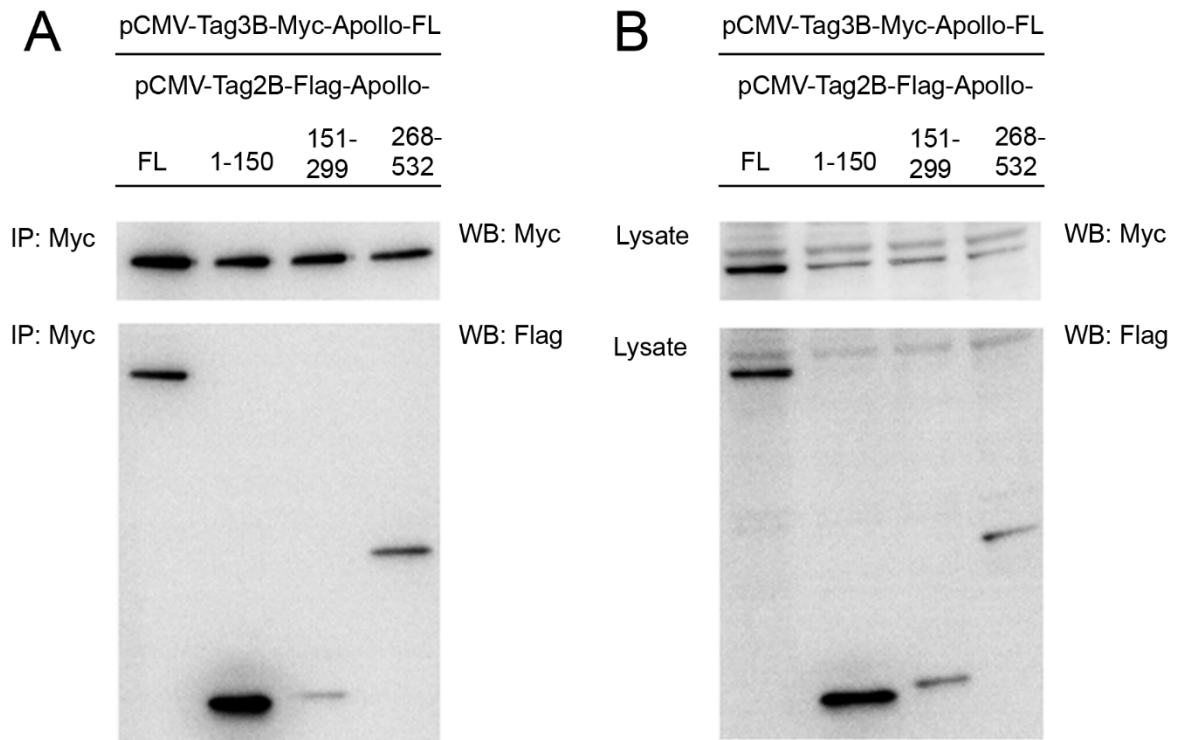


Abbildung 21 Western Blots zur Eingrenzung der Interaktionsdomäne von hSNM1B/Apollo an andere hSNM1B/Apollo-Moleküle. A) Nachweis von immunopräzipitiertem Myc-hSNM1B/Apollo und koimmunopräzipitiertem Flag-hSNM1B/Apollo sowie dessen Teilstücke. Die IP wurde mit Anti-Myc-Antikörpern durchgeführt, für die Western Blots wurden Anti-Myc- bzw. Anti-Flag-Antikörper verwendet. B) Nachweis der Synthese von Myc- und Flag-fusioniertem hSNM1B/Apollo und den Flag-hSNM1B/Apollo-Teilstücken. Die Western Blots wurden mit Anti-Myc- bzw. Anti-Flag-Antikörpern durchgeführt. FL: Volle Länge.

7.2.2 Ko-Immunopräzipitationsstudien mit *in-vitro* translatiertem Myc-hSNM1B/Apollo und Flag-hSNM1B/Apollo

Auch die Interaktion von hSNM1B/Apollo mit weiteren hSNM1B/Apollo-Molekülen wurde zusätzlich im zellfreien System überprüft. Zunächst wurde dafür Myc-hSNM1B/Apollo mittels *in-vitro* Translation hergestellt. In Abbildung 22 ist das Ergebnis der Kontroll-Gelelektrophorese zum Nachweis der mRNA dargestellt. Auch hier wurde vermutlich aufgrund der Sekundärstruktur der Nukleinsäure im nativen Agarose-Gel eine Bandengröße beobachtet, die von der Erwartung abweicht. Abbildung 23 zeigt den Nachweis von Myc-hSNM1B/Apollo im Western Blot. Das Protein hatte die erwartete Größe, die *in-vitro* Translation war somit erfolgreich.

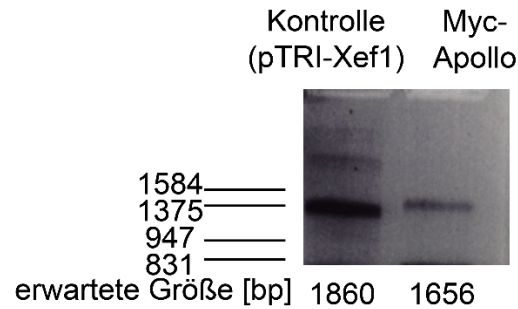


Abbildung 22 Gelelektrophorese zur Kontrolle der *in-vitro* Transkription von Myc-hSNM1B/Apollo. Als Kontrolle wurde pTRI-Xef1-mRNA aufgetragen, als Marker wurde ein selbst-generierter λ /EcoRI/HindIII DNA-Marker verwendet. Angegeben ist jeweils die erwartete Größe der entstandenen mRNA.

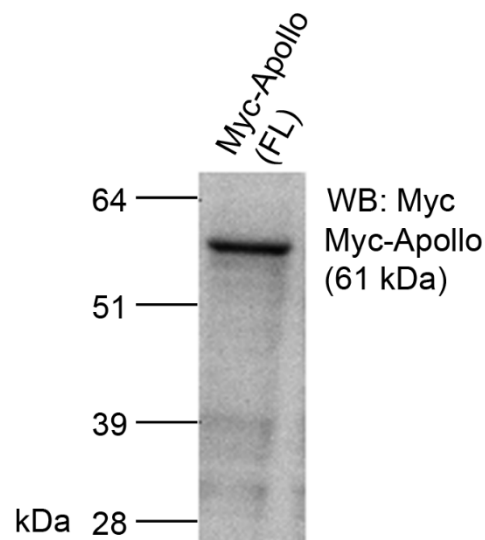


Abbildung 23 Western Blot zum Nachweis von *in-vitro* translatiertem Myc-hSNM1B/Apollo. Der Western Blot wurde mit Anti-Myc-Antikörpern durchgeführt. FL: Volle Länge.

Zur Interaktionsanalyse wurden *in-vitro* translatierte Flag-hSNM1B/Apollo-Teilstücke mit *in-vitro* translatiertem Myc-hSNM1B/Apollo inkubiert und nach einer IP mit Antikörpern gegen die Myc-Sequenz versucht, die Flag-hSNM1B/Apollo-Teilstücke nachzuweisen. Abbildung 24 zeigt, dass diese Ko-IP im zellfreien System nicht gelang.

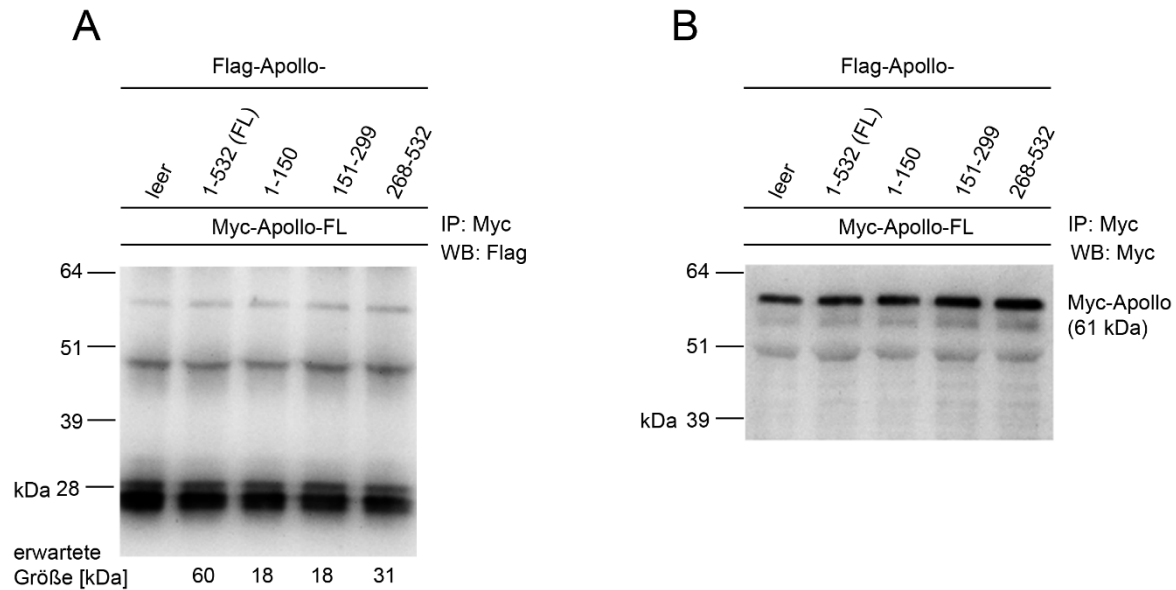


Abbildung 24 Western Blots zur Eingrenzung der Interaktionsdomäne von *in-vitro* translatiertem hSNM1B/Apollo an andere hSNM1B/Apollo-Moleküle. A) Die Flag-hSNM1B/Apollo-Teilstücke konnten nicht mit Myc-hSNM1B/Apollo ko-immunopräzipitiert werden. Die IP wurde mit Anti-Myc-Antikörpern, der Western Blot mit Anti-Flag-Antikörpern durchgeführt. B) Nachweis der *in-vitro* Translation und Immunopräzipitation von Myc-hSNM1B/Apollo. IP und Western Blot wurden mit Anti-Myc-Antikörpern durchgeführt. FL: Volle Länge.

7.2.3 Funktionsprüfung der *in-vitro* translatierten Proteine für die hSNM1B/Apollo-hSNM1B/Apollo-Interaktionsanalyse

Analog zu den Untersuchungen bezüglich der Funktionalität der *in-vitro* translatierten Proteine, die für die Analyse der hSNM1B/Apollo-FANCP/SLX4-Interaktion verwendet wurden, wurde auch die Funktionalität der für die hSNM1B/Apollo-hSNM1B/Apollo-Interaktionsanalyse verwendeten *in-vitro* translatierten hSNM1B/Apollo-Teilstücke evaluiert. Dafür wurden alle eingesetzten Proteine mit HEK293-Zelllysaten inkubiert und eine IP mit Antikörpern gegen FANCP/SLX4 durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse der Ko-Immunopräzipitationsstudien mit endogenen Proteinen wurde erwartet, dass alle *in-vitro* translatierten Proteine mit FANCP/SLX4 ko-immunopräzipitiert werden können. Abbildung 25 zeigt, dass dies bei keiner der Proben der Fall war.

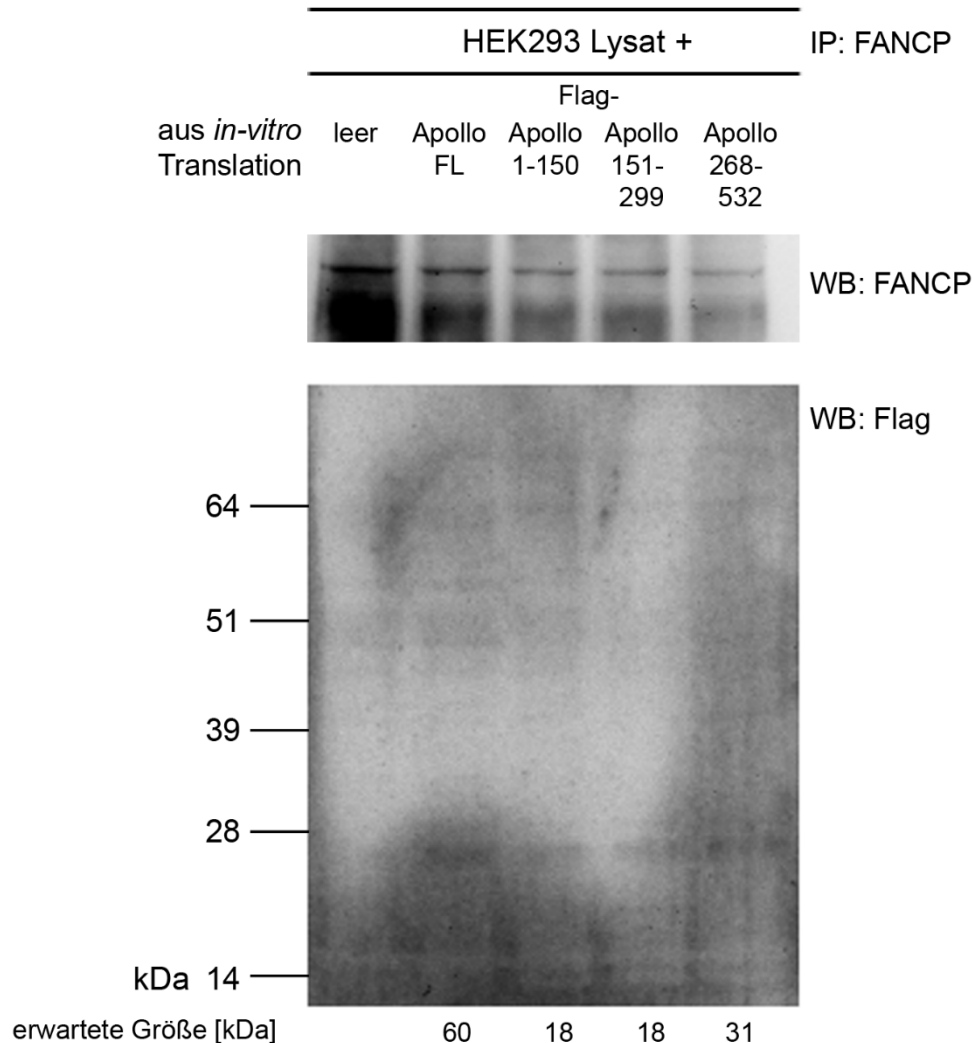


Abbildung 25 Western Blot zur Funktionsprüfung von *in-vitro* translatiertem hSNM1B/Apollo seinen Teilstücken. Die IP wurde mit Anti-FANCP/SLX4-Antikörpern, die Western Blots mit Anti-FANCP/SLX4- und Anti-Flag-Antikörpern durchgeführt. Endogenes FANCP/SLX4 wurde in allen Proben nachgewiesen. Flag-hSNM1B/Apollo oder seine Teilstücke konnten aus keiner Probe ko-immunopräzipitiert werden. FL: Volle Länge.

7.3 Quantifizierung von Telomer-assoziierten Proteinen nach FANCP/SLX4-, FANCA- oder FANCD2-Depletion

In dieser Arbeit vorausgehenden Versuchen konnten wir zeigen, dass eine siRNA-vermittelte Depletion von FANCP/SLX4 zu einer Reduktion der Menge des Shelterin-Proteins TRF2 in U2OS-Zellen führt.⁹⁷ In darauf aufbauenden Versuchen wurde hier untersucht, inwiefern die Depletion von FANCP/SLX4 die TRF1-Menge in U2OS-Zellen beeinflusst. Zusätzlich wurde geprüft, ob eine Depletion der Fanconi-Proteine FANCA oder FANCD2 die Proteinmengen von TRF1 und TRF2 verändert.

7.3.1 Quantifizierung der TRF1-Menge

Abbildung 26 zeigt repräsentativ Western Blots zum Nachweis der erfolgreichen FANCP/SLX4-, FANCA- oder FANCD2-Depletion sowie die TRF1- und Actin-Proteinbanden, die zur Quantifizierung genutzt wurden. In Tabelle 2 sind die in drei unabhängigen Experimenten bestimmten relativen TRF1-Proteinmengen bezogen auf die TRF1-Proteinmenge von mit Kontroll-siRNA behandelten U2OS-Zellen sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen aufgeführt. Keine der untersuchten siRNAs konnte die zelluläre TRF1-Menge signifikant beeinflussen (T-Test, FANCP/SLX4-siRNA: p-Wert 0,197; FANCA-siRNA p-Wert: 0,466; FANCD2-siRNA p-Wert: 0,6).

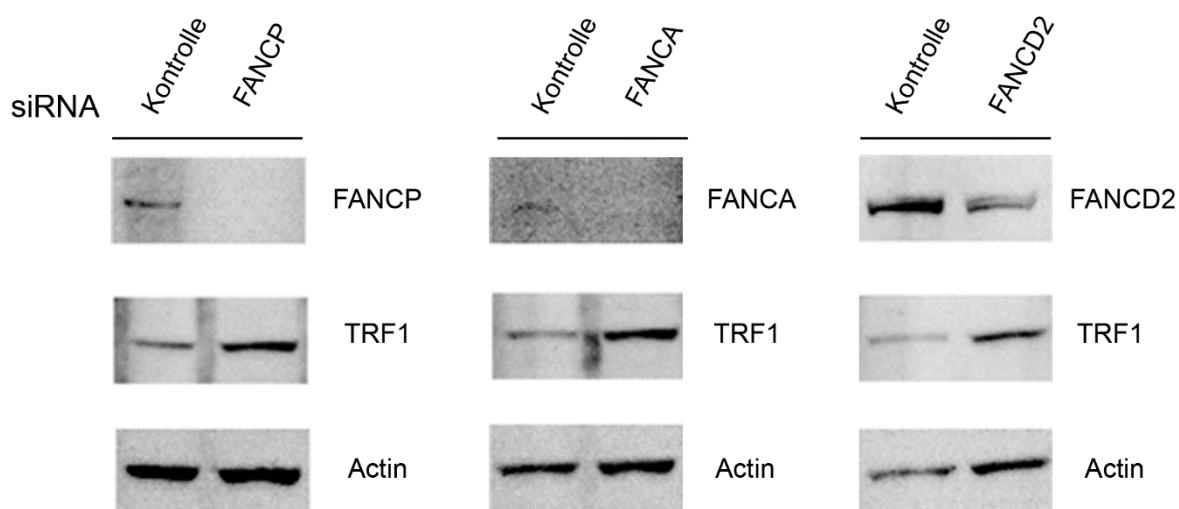


Abbildung 26 Zelluläre TRF1-Menge nach FANCP/SLX4-, FANCA- oder FANCD2-Depletion in U2OS-Zellen. Repräsentative Western Blots zum Nachweis der Zielprotein-Depletion (obere Reihe), von TRF1 (mittlere Reihe) und von Actin (untere Reihe). Die Western Blots wurden mit Anti-FANCP/SLX4-, Anti-FANCA-, Anti-FANCD2-, Anti-TRF1- und Anti-Actin-Antikörpern durchgeführt.

Tabelle 2 Relative TRF1-Proteinmengen nach FANCP/SLX4-, FANCA- oder FANCD2-Depletion bezogen auf die TRF1-Proteinmenge von mit Kontroll-siRNA behandelten U2OS-Zellen. Zur Normalisierung der TRF1-Menge wurde die jeweilige Actin-Menge herangezogen. Die berechneten relativen TRF1-Mengen aus drei unabhängigen Experimenten sowie der jeweilige Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (STABW) für die drei verschiedenen siRNA-Behandlungen sind aufgeführt.

siRNA	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	MW	STABW
FANCP/SLX4	1,61	1,05	1,27	1,31	0,28
FANCA	1,17	0,81	1,74	1,24	0,47
FANCD2	1,22	0,80	1,24	1,09	0,25

7.3.2 Quantifizierung der TRF2-Menge

Neben der Bestimmung der relativen zellulären TRF1-Menge wurde nach FANCA- und FANCD2-Depletion auch geprüft, ob es zu Änderungen der TRF2-Proteinmenge in U2OS-

Zellen kommt. Die relative TRF2-Menge von FANCP/SLX4-depletierten U2OS-Zellen wurde ebenfalls erneut untersucht und als positiv-Kontrolle verwendet. In Tabelle 3 sind die relativen TRF2-Proteinmengen bezogen auf die TRF2-Proteinmenge von mit Kontroll-siRNA behandelten U2OS-Zellen aus den zwei bzw. drei durchgeführten unabhängigen Experimenten sowie die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen aufgeführt. Wie erwartet führte eine Depletion von FANCP/SLX4 zu einer signifikanten Reduktion der relativen zellulären TRF2-Menge von dem normalisierten Testwert 1 auf 0,51 (T-Test, p-Wert: 0,037). Nach Behandlung mit FANCA- oder FANCD2-siRNA kam es nicht zu einer signifikanten Änderung der TRF2-Mengen. (T-Test, FANCA-siRNA p-Wert: 0,626; FANCD2-siRNA p-Wert: 0,447). In Abbildung 27 sind repräsentativ Western Blots zum Nachweis der erfolgreichen Depletion von FANCP/SLX4, FANCA oder FANCD2 sowie von den zur Quantifizierung verwendeten Proteinbanden von TRF2 und Actin dargestellt.

Tabelle 3 Relative TRF2-Proteinmengen nach FANCP/SLX4-, FANCA- oder FANCD2-Depletion bezogen auf die TRF2-Proteinmenge von mit Kontroll-siRNA behandelten U2OS-Zellen. Zur Normalisierung der TRF2-Menge wurde die jeweilige Actin-Menge herangezogen. Die berechneten relativen TRF2-Mengen aus zwei bzw. drei unabhängigen Experimenten sowie der jeweilige Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (STABW) für die drei verschiedenen siRNA-Behandlungen sind aufgeführt.

siRNA	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	MW	STABW
FANCP/SLX4	0,36	0,69	0,48	0,51	0,16
FANCA	-	1,20	0,96	1,08	0,17
FANCD2	-	1,12	1,01	1,06	0,08

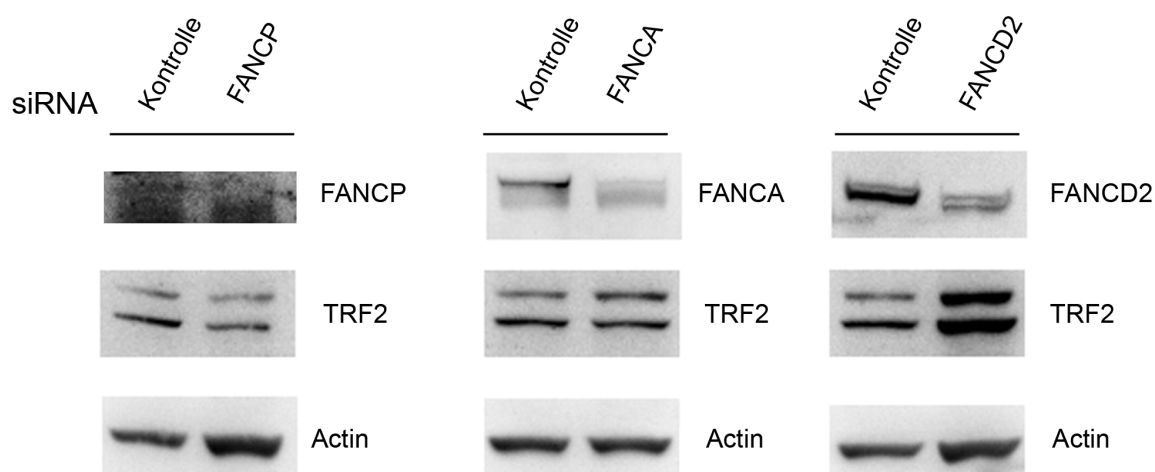


Abbildung 27 Relative zelluläre TRF2-Menge nach FANCP/SLX4-, FANCA- oder FANCD2-Depletion in U2OS-Zellen. Repräsentative Western Blots zum Nachweis der Zielprotein-Depletion (obere Reihe), von TRF2 (mittlere Reihe) und von Actin (untere Reihe). Die Western Blots wurden mit Anti-SLX4/FANCP-, Anti-FANCA-, Anti-FANCD2-, Anti-TRF2- und Anti-Actin-Antikörpern durchgeführt.

7.4 Untersuchung der Acetaldehyd-Sensitivität von hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-depletierten Zellen

Seit einigen Jahren weiß man, dass der FA/BRCA-Reparaturweg durch reaktive Aldehyde wie Formaldehyd und Acetaldehyd aktiviert wird und an der Neutralisierung derer genotoxischen Effekte maßgeblich beteiligt ist.^{74 75} Bei einigen FA-Zelllinien konnte bereits gezeigt werden, dass sie auf eine Behandlung mit reaktiven Aldehyden sensibler reagieren als gesunde Zellen.^{76 98 99} In den folgenden Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, ob auch hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-depletierte U2OS-Zellen eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Acetaldehyd aufweisen.

7.4.1 FANCD2-Monoubiquitinierung

Im Rahmen der Aktivierung des FA/BRCA-Reparaturwegs bei der zellulären Antwort auf DNA-Schäden kommt es zur Monoubiquitinierung des FA-Proteins FANCD2. Im Western Blot können dann zwei Isoformen unterschieden werden: das nicht-ubiquitinierte FANCD2-S (S für „short“) mit einem molekularen Gewicht von etwa 155 kDa und das ubiquitinierte FANCD2-L (L für „long“) mit einem molekularen Gewicht von etwa 162 kDa.¹⁰⁰ Im folgenden Versuch wurde bei U2OS-Zellen die Synthese von hSNM1B/Apollo, FANCP/SLX4- oder FANCA mittels siRNA-Behandlungen herunterreguliert. Anschließend wurden die Zellen über einen Zeitraum von 24 h mit 1 mM Acetaldehyd behandelt und die Monoubiquitinierung von FANCD2 im Western Blot begutachtet.

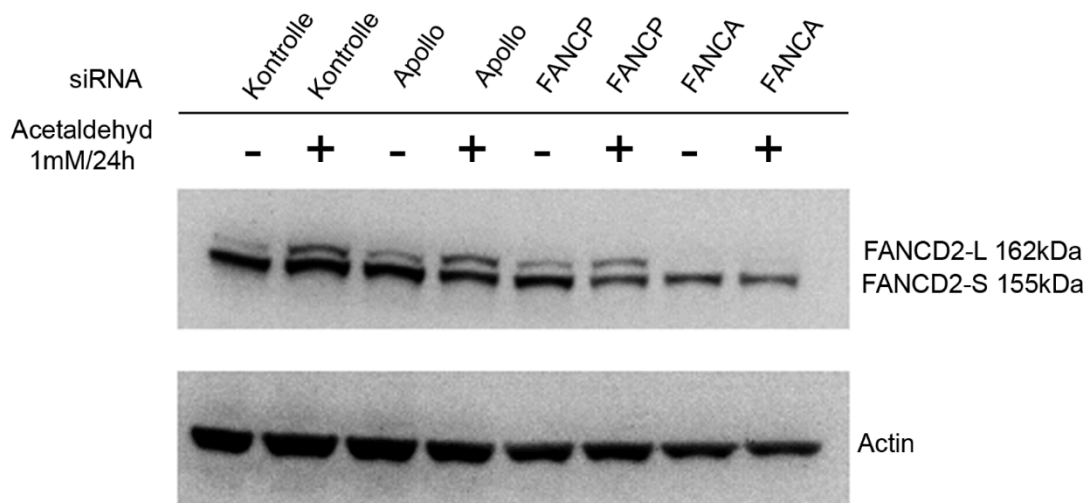


Abbildung 28 Western Blot zur Untersuchung der Monoubiquitinierung von FANCD2 nach hSNM1B/Apollo-, FANCP/SLX4- oder FANCA-Depletion und Acetaldehyd-Behandlung. Oben: Nachweis der monoubiquitinierten FANCD2-L- und der nicht-monoubiquitinierten FANCD2-S-Isoform. Unten: Ladekontrolle mit Actin. Die Western Blots wurden mit Anti-FANCD2- und Anti-Actin-Antikörpern durchgeführt.

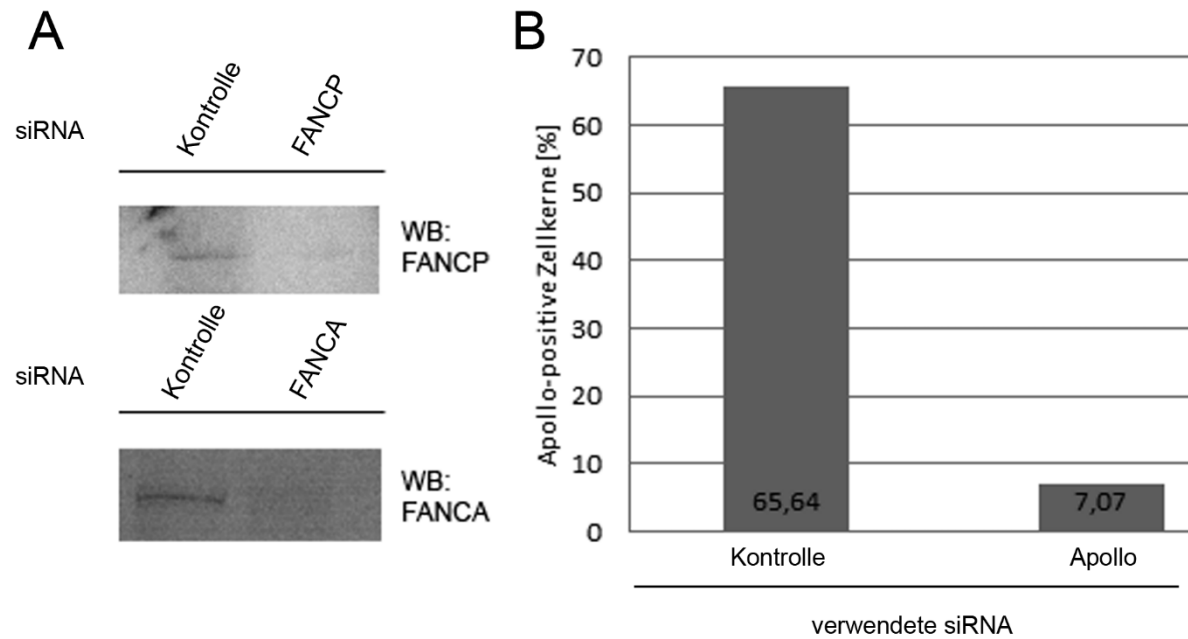


Abbildung 29 Bestätigung der FANCP/SLX4-, FANCA- oder hSNM1B/Apollo-Depletion in U2OS-Zellen für die Untersuchung der Monoubiquitinierung von FANCD2 nach entsprechender Protein-Depletion und Acetaldehyd-Behandlung. A) Nachweis der FANCP/SLX4- oder FANCA-Depletion im Western Blot. Die Western Blots wurden mit Anti-FANCP/SLX4- bzw. Anti-FANCA-Antikörpern durchgeführt. B) Nachweis der hSNM1B/Apollo-Depletion in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Es wurden mindestens 500 Zellen untersucht und als „Apollo-Foci-positiv“ gewertet, wenn mindestens 3 nukleäre Foci vorlagen.

Abbildung 28 zeigt die FANCD2-Monoubiquitinierung der verschiedenen Proben im Western Blot und Abbildung 29 bestätigt die erfolgreiche Depletion der untersuchten Proteine. Nach Kontroll-siRNA-Behandlung, hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-Depletion konnte sowohl in den unbehandelten als auch in den Acetaldehyd-behandelten Zellen monoubiquitiniertes FANCD2-L nachgewiesen werden. Die Monoubiquitinierung nahm nach Acetaldehyd-Behandlung deutlich zu, erkennbar an der jeweils stärkeren FANCD2-L-Bande in der „+“-Spur. Die FANCA-Depletion diente in diesen Untersuchungen als Negativ-Kontrolle, da FANCA im FA/BRCA-Reparaturweg stromaufwärts von FANCD2 agiert und dessen Monoubiquitinierung FANCA-unabhängig nicht möglich ist. Wie erwartet war nach FANCA-Depletion bei den unbehandelten und bei den Acetaldehyd-behandelten Zellen eine nur minimale FANCD2-Monoubiquitinierung erkennbar. Die sehr diskreten FANCD2-L-Banden lassen sich am ehesten durch eine nicht vollständige FANCA-Depletion erklären.

Zur Quantifizierung des Anstiegs der FANCD2-L-Menge nach Acetaldehyd-Behandlung wurde die relative FANCD2-L-Menge bezogen auf die jeweilige gesamte FANCD2-Menge bestimmt. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse dieser Berechnungen dargestellt.

Tabelle 4 Relative FANCD2-L-Menge nach Kontroll-, hSNM1B/Apollo-, FANCP/SLX4- oder FANCA-siRNA-Behandlung von U2OS-Zellen bezogen auf die gesamte FANCD2-Menge. Angegeben ist die berechnete relative FANCD2-L-Menge bezogen auf die jeweilige FANCD2-Menge für jede Probe.

siRNA	Acetaldehyd (1mM/24h)	Relative FANCD2-L-Menge [%]
Kontrolle	unbehandelt	6,4
	behandelt	19,1
Apollo	unbehandelt	14,6
	behandelt	24,5
FANCP	unbehandelt	13,9
	behandelt	23,7
FANCA	unbehandelt	1,5
	behandelt	2,7

7.4.2 Kolonienbildungsstudien

In weiteren Untersuchungen wurde die Fähigkeit zur Kolonienbildung von hSNM1B/Apollo- oder/und FANCP/SLX4-depletierten U2OS-Zellen nach einer einstündigen Acetaldehyd-Exposition geprüft. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Acetaldehyd behandelt. Da nur die Zellen Kolonien bilden konnten, die durch diese Behandlung nicht zugrunde gegangen sind, erlaubte das Auszählen der Kolonien Rückschlüsse auf die Überlebensfähigkeit der Zellen nach Acetaldehyd-Exposition. Die Abbildung 30 dient der Bestätigung der erfolgreichen Depletion von FANCP/SLX4 oder/und hSNM1B/Apollo.

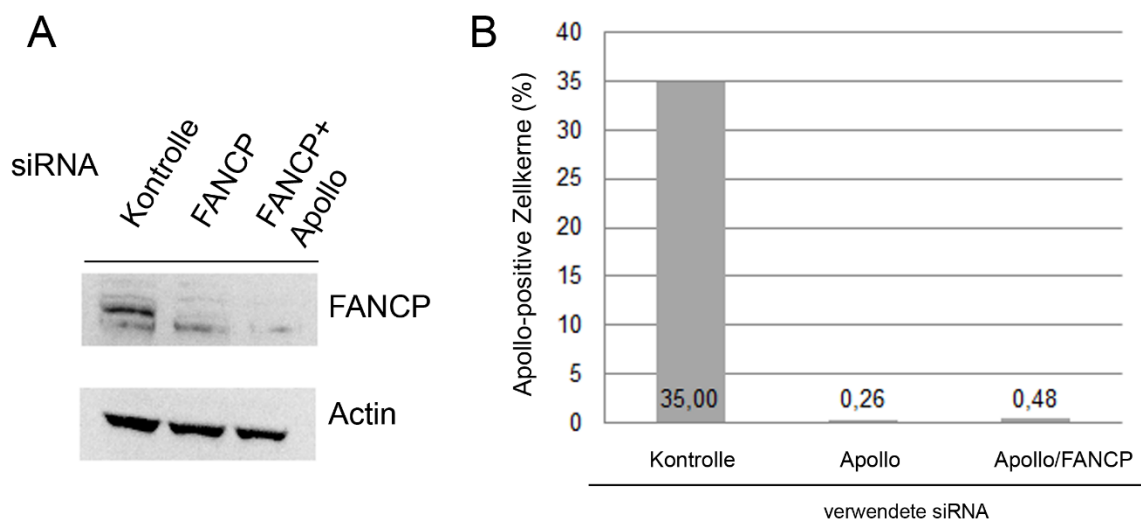


Abbildung 30 Bestätigung der FANCP/SLX4- und/oder hSNM1B/Apollo-Depletion in U2OS-Zellen für die Kolonienbildungsstudie nach Acetaldehyd-Behandlung. A) Nachweis der FANCP/SLX4-Depletion im Western Blot. Der Western Blot wurde mit Anti-FANCP/SLX4- bzw. Anti-Actin-Antikörpern durchgeführt. B) Nachweis der hSNM1B/Apollo-Depletion in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Es wurden mindestens 500 Zellen untersucht und als „Apollo-Foci-positiv“ gewertet, wenn mindestens 3 nukleäre Foci vorlagen.

In Abbildung 31 sind die Ergebnisse der Kolonienbildungsstudie dargestellt. Aus diesen Daten wurde die mittlere inhibitorische Acetaldehyd-Konzentration (IC_{50}) für alle untersuchten

Zelllinien näherungsweise berechnet. Die IC_{50} ist die Konzentration, bei der 50% der behandelten Zellen überleben. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5 Mittlere inhibitorische Acetaldehyd-Konzentrationen von Kontrollzellen, hSNM1B/Apollo- oder/und FANCP/SLX4-depletierten Zellen basierend auf den Ergebnissen aus Abbildung 31 (Angabe in mM). Die angegebene relative IC_{50} bezieht sich auf die IC_{50} der Kontrollzellen.

siRNA	IC_{50} [mM]	Relative IC_{50}
Kontrolle	29,7	1
Apollo	23,55	0,79
FANCP	23,96	0,81
Apollo/FANCP	17,9	0,6

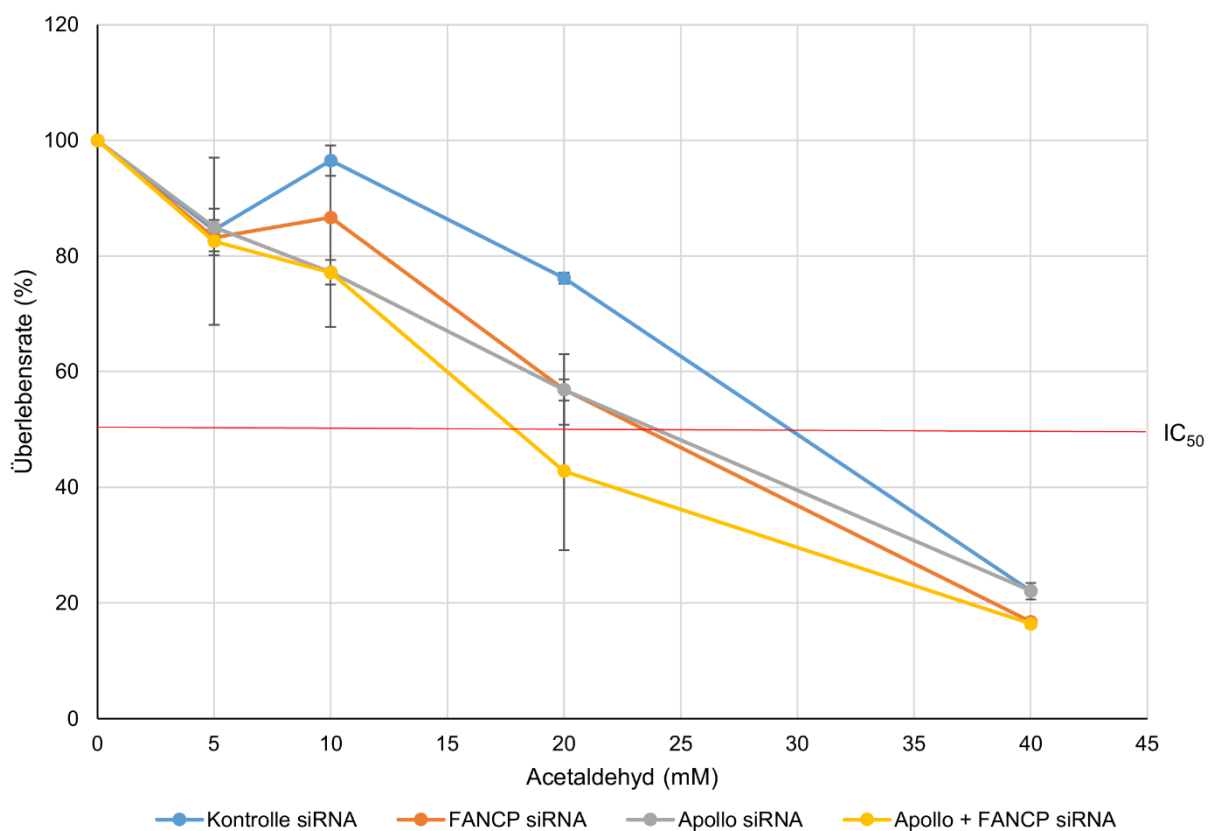


Abbildung 31 Kolonienbildungsstudie von U2OS-Zellen nach hSNM1B/Apollo- oder FANCP/SLX4-Depletion oder der Depletion beider Proteine und Acetaldehyd-Behandlung. Dargestellt sind die Überlebensraten der U2OS-Zellen nach siRNA-Behandlung und Acetaldehyd-Exposition. Das prozentuelle Überleben bezieht sich jeweils auf das Überleben von nicht exponierten Zellen, die derselben siRNA-Behandlung unterzogen wurden. Die Werte wurden in ein Koordinatensystem eingetragen und mit Graden verbunden. Die jeweiligen siRNAs und Acetaldehyd-Konzentrationen sind angegeben. Die Fehlerbalken stellen +/- eine Standardabweichung dar. Schnittpunkte mit der roten Linie entsprechen näherungsweise der mittleren inhibitorischen Acetaldehyd-Konzentration der jeweiligen Zelllinie.

Um eine definitive Aussage bezüglich der Acetaldehyd-Sensitivität der untersuchten Zellen treffen zu können, wurden die Kolonienbildungsstudien mit einer Acetaldehyd-Konzentration von 20 mM noch viermal wiederholt. Diese Konzentration wurde als Annäherung an den

mittleren IC_{50} -Wert der untersuchten Zellen gewählt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Überlebensraten wurden berechnet. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Kontroll-siRNA-behandelten Zellen zeigten nach Acetaldehyd-Exposition das beste Überleben (MW: 60,5%, STABW: 11,6), gefolgt von Apollo/hSNM1B-depletierten Zellen (MW: 53,1%, STABW: 7,9) und FANCP/SLX4-depletierten Zellen (MW: 47,4%, STABW: 6,1). Die schlechteste Überlebensrate wiesen die doppelt-depletierten Zellen auf (MW: 39,9%, STABW: 5,7).

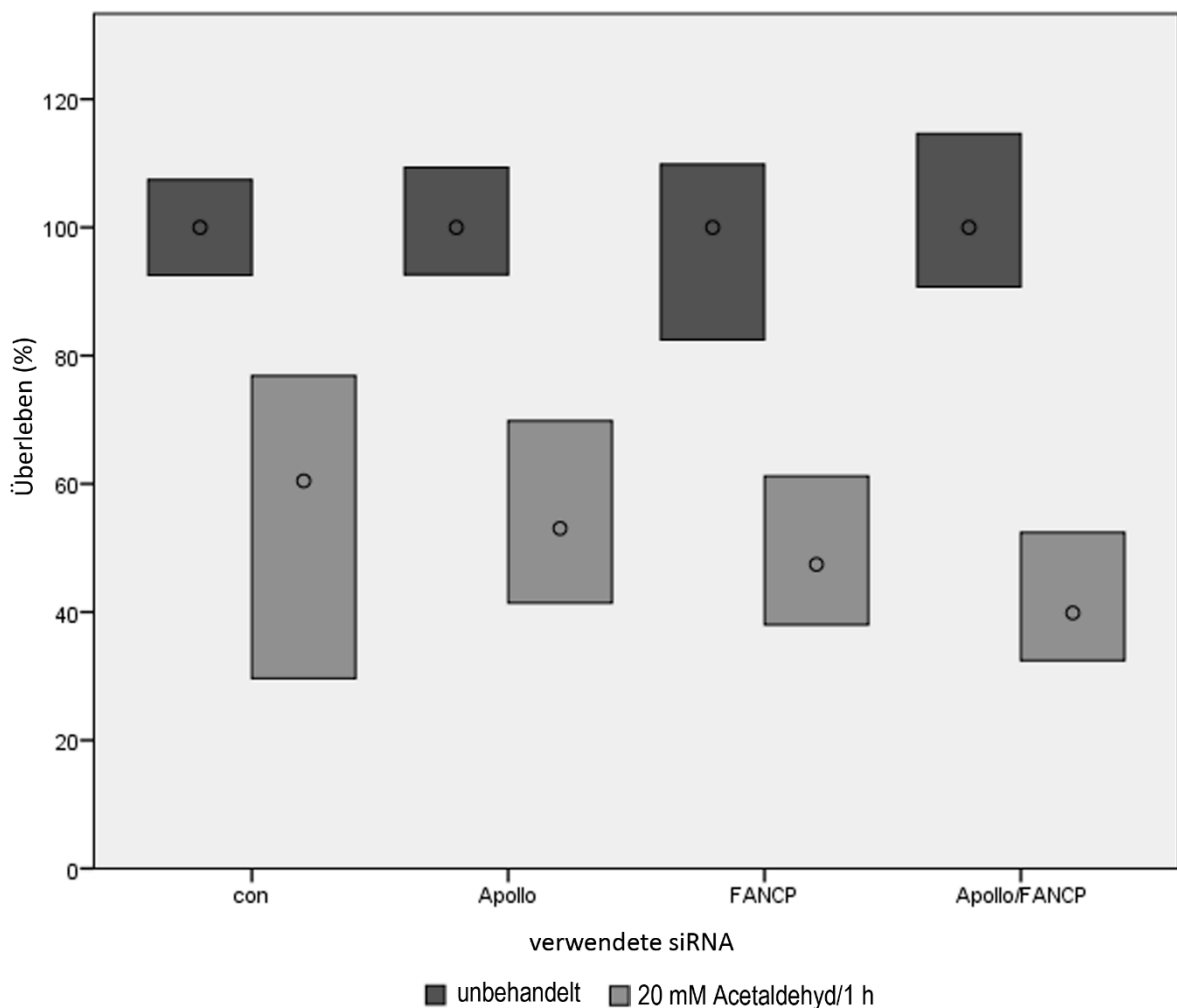


Abbildung 32 Kolonienbildungsstudien von U2OS-Zellen nach Acetaldehyd-Behandlung (20mM/1h) und hSNM1B/Apollo- oder FANCP/SLX4-Depletion oder Depletion beider Proteine. Dargestellt sind die höchsten bzw. tiefsten ermittelten Überlebensraten in Prozent als obere bzw. untere Begrenzungen der Balken. Der Kreis innerhalb der Balken gibt den Mittelwert der Überlebensraten aus fünf unabhängigen Experimenten an.

Für die statistische Auswertung dieser Daten wurde zunächst bestätigt, dass die Ergebnisse der Überlebensratenbestimmung bei den Acetaldehyd-behandelten Zellen die Voraussetzungen für eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) erfüllen. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft (Tabelle 6). Die Nullhypothese des Tests lautet

„Normalverteilung liegt vor“ und kann für alle Gruppen angenommen werden, da alle berechneten p-Werte $> 0,05$ sind.

Tabelle 6 Test auf Normalverteilung der Überlebensraten von Acetaldehyd-behandelten U2OS-Zellen (20mM/1h). Verglichen wurden mit Kontroll-siRNA behandelte Zellen, hSNM1B/Apollo- oder FANCP/SLX4-depletierte Zellen und Zellen nach der Depletion beider Proteine. Angegeben sind die Ergebnisse des Shapiro-Wilk-Tests. df: Freiheitsgrade.

Tests auf Normalverteilung^a

	siRNA	Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz
Überlebensrate	Kontrolle	,910	13	,185
	Apollo	,943	12	,543
	FANCP	,933	12	,409
	Apollo/FANCP	,874	12	,073

a. Acetaldehyd = 20mM Acetaldehyd/1h

Zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen wurde der Levene-Test verwendet (Tabelle 7). Hier lautet die Nullhypothese „Varianzhomogenität liegt vor“ und kann aufgrund der p-Werte $> 0,05$ ebenfalls angenommen werden.

Tabelle 7 Test auf Homogenität der Varianz der Überlebensraten von Acetaldehyd-behandelten U2OS-Zellen (20mM/1h). Verglichen wurden mit Kontroll-siRNA behandelte Zellen, hSNM1B/Apollo- oder FANCP/SLX4-depletierte Zellen und Zellen nach der Depletion beider Proteine. Angegeben sind die Ergebnisse des Levene-Tests. df: Freiheitsgrade.

Test auf Homogenität der Varianz^a

		Levene-Statistik	df1	df2	Signifikanz
Überlebensrate	Basiert auf dem Mittelwert	1,934	3	45	,138
	Basiert auf dem Median	1,145	3	45	,341
	Basierend auf dem Median und mit angepassten df	1,145	3	29,054	,348
	Basiert auf dem getrimmten Mittel	1,685	3	45	,184

a. Acetaldehyd = 20mM Acetaldehyd/1h

Anschließend wurde die eigentliche einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8 Einfaktorielle Varianzanalyse der Überlebensraten von Acetaldehyd-behandelten U2OS-Zellen (20mM/1h). Verglichen wurden mit Kontroll-siRNA behandelte Zellen, hSNM1B/Apollo- oder FANCP/SLX4-depletierte Zellen und Zellen nach der Depletion beider Proteine. df: Freiheitsgrade.

Einfaktorielle ANOVA^a

Überlebensrate

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	2837,660	3	945,887	12,339	,000
Innerhalb der Gruppen	3449,678	45	76,660		
Gesamt	6287,338	48			

a. Acetaldehyd = 20mM Acetaldehyd/1h

Der p-Wert beträgt 5×10^{-6} . Somit kann angenommen werden, dass die Unterschiede zwischen den Überlebensraten der verschiedenen Zellen nach Acetaldehyd-Behandlung signifikant sind. Um zu bestimmen, zwischen welchen Gruppen signifikante Unterschiede bestehen, wurde post-hoc der Tukey-Test angewendet (Tabelle 9).

Tabelle 9 Post-hoc Tukey-Test nach einfaktorieller Varianzanalyse der Überlebensraten von Acetaldehyd-behandelten U2OS-Zellen (20mM/1h). Verglichen wurden mit Kontroll-siRNA behandelte Zellen, hSNM1B/Apollo-oder FANCP/SLX4-depletierte Zellen und Zellen nach der Depletion beider Proteine.

Mehrfachvergleiche^a

Abhängige Variable: Überlebensrate

Tukey-HSD

(I) siRNA	(J) siRNA	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
Kontrolle	Apollo	7,40917	3,50502	,164	-1,9412	16,7595
	FANCP	13,01833*	3,50502	,003	3,6680	22,3687
	Apollo/FANCP	20,59833*	3,50502	,000	11,2480	29,9487
Apollo	Kontrolle	-7,40917	3,50502	,164	-16,7595	1,9412
	FANCP	5,60917	3,57444	,406	-3,9264	15,1447
	Apollo/FANCP	13,18917*	3,57444	,003	3,6536	22,7247
FANCP	Kontrolle	-13,01833*	3,50502	,003	-22,3687	-3,6680
	Apollo	-5,60917	3,57444	,406	-15,1447	3,9264
	Apollo/FANCP	7,58000	3,57444	,162	-1,9555	17,1155
Apollo/FANCP	Kontrolle	-20,59833*	3,50502	,000	-29,9487	-11,2480
	Apollo	-13,18917*	3,57444	,003	-22,7247	-3,6536
	FANCP	-7,58000	3,57444	,162	-17,1155	1,9555

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0.05 signifikant.

Acetaldehyd = 20mM Acetaldehyd/1h

Signifikante Unterschiede von der Überlebensrate der mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen wiesen die FANCP/SLX4-depletierten und die doppelt-depletierten Zellen auf (p-Wert: 0,003 bzw. 3×10^{-6}). Außerdem gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den hSNM1B/Apollo-depletierten und den doppelt-depletierten Zellen (p-Wert: 0,003). Alle anderen Gruppenvergleiche lieferten keine signifikanten Ergebnisse.

7.4.3 Chromosomenbrüchigkeit

U2OS-Zellen sind humane Osteosarkom-Zellen, bei denen in der Literatur ein hypertriploider Chromosomensatz beschrieben wird.¹⁰¹ Bei der hier verwendeten U2OS-Zelllinie wurde die Chromosomenzahl in 10 Metaphasen gezählt, im Mittel lagen 70,6 Chromosomen vor. Die Sensitivität von hSNM1B/Apollo- oder/und FANCP/SLX4-depletierten U2OS-Zellen gegenüber Acetaldehyd wurde anschließend mittels Chromosomenbrüchigkeitsstudien überprüft. U2OS-Zellen wurden dafür für 24 h mit 1 mM Acetaldehyd behandelt und ihre Metaphasen auf Aberrationen untersucht. Abbildung 33 (Vergrößerungen in Abbildung 34) und Abbildung 35 (Vergrößerungen in Abbildung 36) zeigen beispielhaft Metaphasen aus diesen Versuchen mit verschiedenen Bruchereignissen.

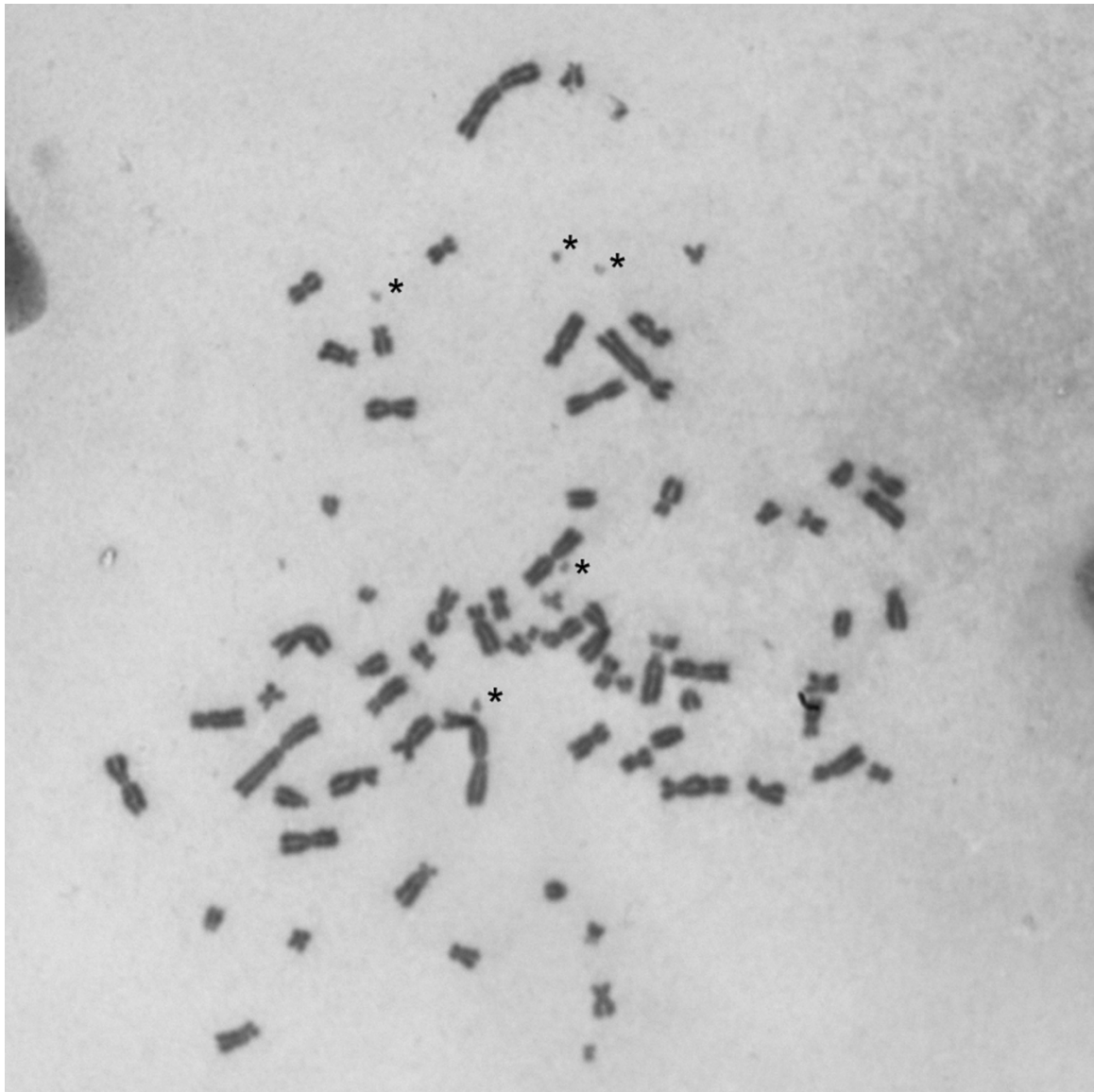


Abbildung 33 Metaphase einer mit Kontroll-siRNA behandelten U2OS-Zelle nach Acetaldehyd-Exposition (1mM/24h). Sterne: Chromatid-/Chromosomenfragmente.

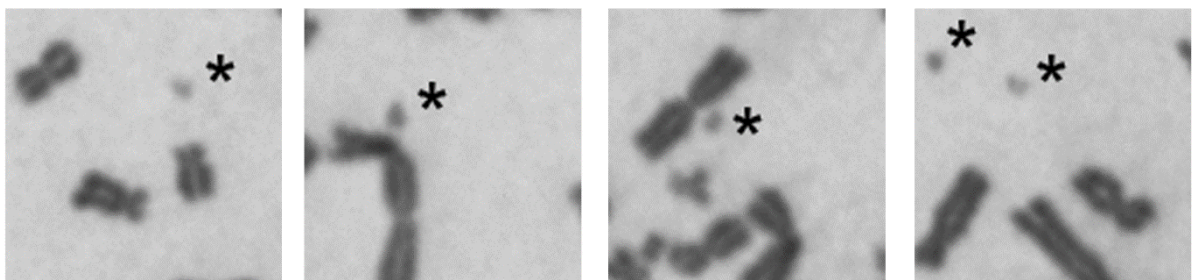


Abbildung 34 Vergrößerung der Bruchereignisse aus Abbildung 33 einer mit Kontroll-siRNA behandelten U2OS-Zelle nach Acetaldehyd-Exposition (1mM/24h). Sterne: Chromatid-/Chromosomenfragmente.

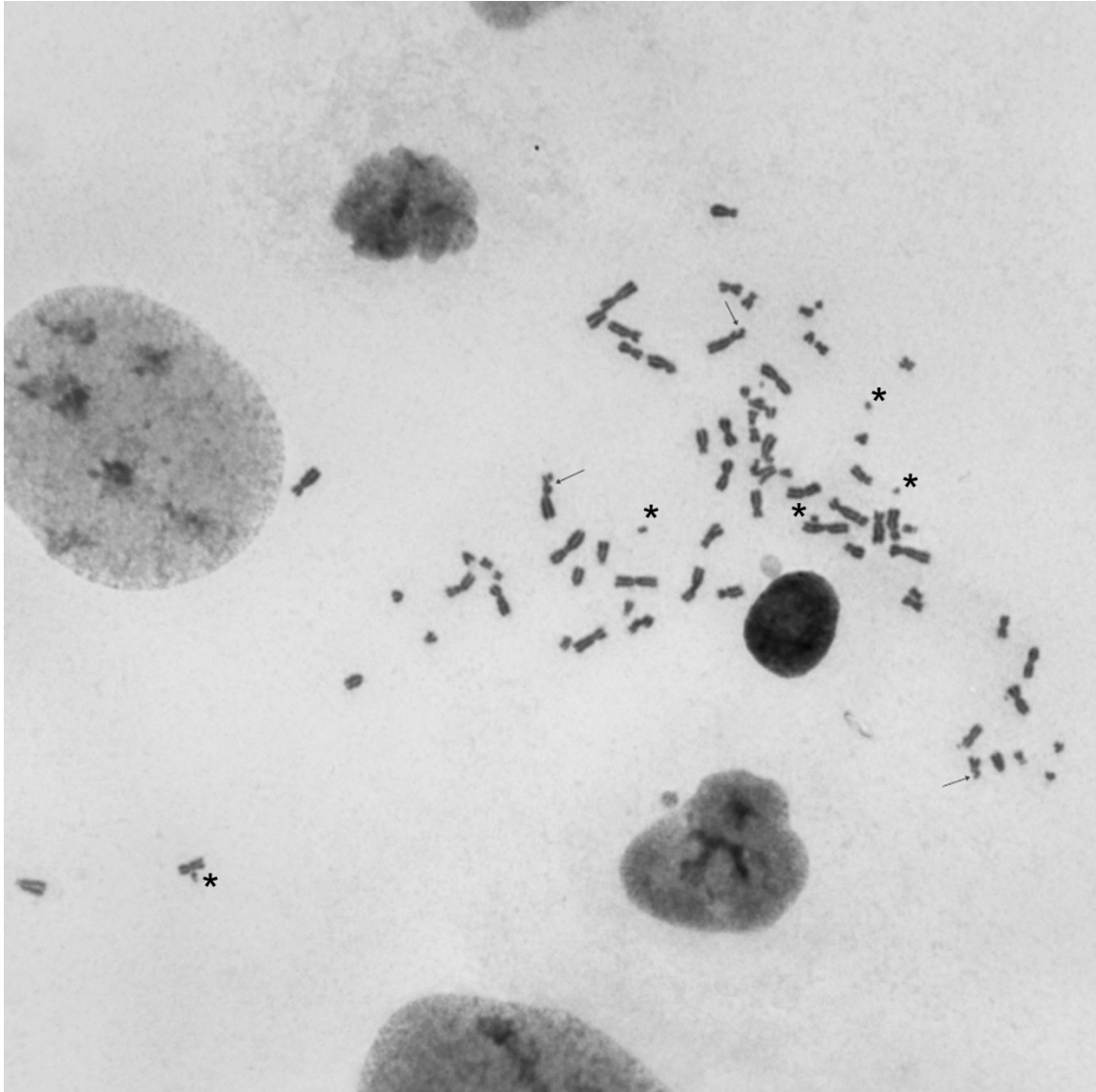


Abbildung 35 Metaphase einer mit hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-siRNA behandelten U2OS-Zelle nach Acetaldehyd-Exposition (1mM/24h). Sterne: Chromatid-/Chromosomenfragmente, dünne Pfeile: Chromatidbrüche.

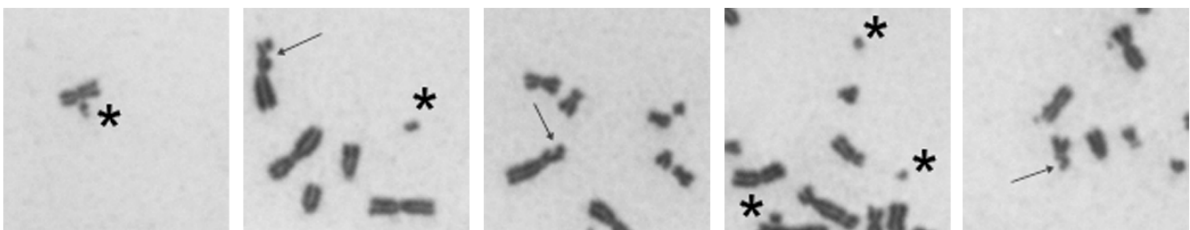


Abbildung 36 Vergrößerung der Bruchereignisse aus Abbildung 35 einer mit hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-siRNA behandelten U2OS-Zelle nach Acetaldehyd-Exposition (1mM/24h). Sterne: Chromatid-/Chromosomenfragmente, dünne Pfeile: Chromatidbrüche.

In Tabelle 10 sind die Anzahlen der ausgewerteten Metaphasen und die jeweiligen Anteile der aberranten Metaphasen aufgeführt. Bei den Raten an spontan aufgetretenen aberranten Metaphasen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Zellen (Chi-Quadrat-Test, p-Wert: 0,136). Nach der Acetaldehyd-Behandlung wurden in allen Zelllinien deutlich mehr aberrante Metaphasen beobachtet, entgegen der Erwartungen gab es jedoch auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien (Chi-Quadrat-Test, p-Wert: 0,774).

Tabelle 10 Auswertung der Chromosomenbrüchigkeitsstudien von U2OS-Zellen nach Acetaldehyd-Behandlung und hSNM1B/Apollo- oder FANCP/SLX4-Depletion oder der Depletion beider Proteine. Angegeben sind jeweils die Anzahl der ausgewerteten Metaphasen und die Anteile der aberranten Metaphasen in Prozent. Eine Metaphase wurde als aberrant gewertet, wenn mindestens ein Bruchereignis oder ein dizentrisches Chromosom ohne azentrisches Fragment vorlag.

siRNA	Acetaldehyd (1mM/24h)	Ausgewertete Metaphasen	Aberrante Metaphasen [%]
Kontrolle	unbehandelt	128	7,0
	behandelt	65	52,3
Apollo	unbehandelt	87	17,2
	behandelt	62	56,5
FANCP	unbehandelt	91	13,2
	behandelt	68	60,3
Apollo/FANCP	unbehandelt	125	11,2
	behandelt	57	52,6

Obwohl sich die Depletionszelllinien bezüglich ihrer Anteile an aberranten Metaphasen nicht von den Kontrollzellen unterschieden, wurde der Frage nachgegangen, ob sie womöglich mehr Bruchereignisse pro Zelle akkumulieren. In Abbildung 37 sind die Ergebnisse dieser Berechnungen dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde der bindungskorrigierte Kruskal-Wallis-H-Test gewählt. Der Test zeigte, dass die Unterschiede zwischen den Zelllinien bezüglich der Anzahl an spontanen Chromosomenbrüchen pro Zelle nicht signifikant sind (p-Wert: 0,541), ebenso wenig wie die Unterschiede bezüglich der Anzahl an Chromosomenbrüchen pro Zelle nach Acetaldehyd-Behandlung (p-Wert: 0,685).

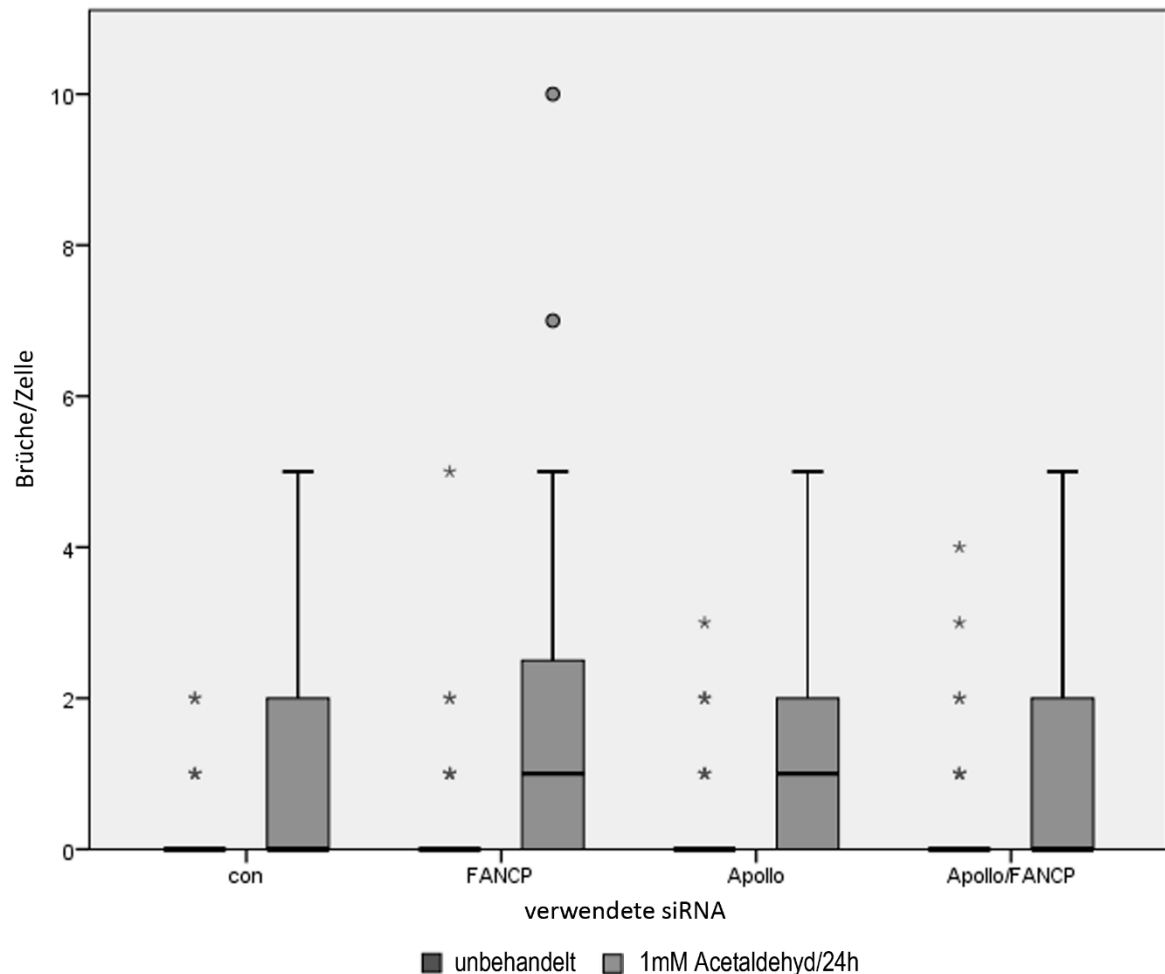


Abbildung 37 Chromosomenbrüchigkeit von U2OS-Zellen nach Acetaldehyd-Behandlung und hSNM1B/Apollo- oder FANCP/SLX4-Depletion oder der Depletion beider Proteine. Angegeben ist die Anzahl der Brüche pro Zelle. Die Balken geben den Interquartilsabstand (IQR) an, die schwarze Linie stellt den jeweiligen Median dar. Die Enden der Antennen markieren den höchsten Wert im 1,5-fachen IQR. Ausreißer sind definiert als die Werte, deren Abstand vom IQR das 1,5-3-fache des IQRs beträgt. Sie sind als Kreise markiert. Extreme Werte sind definiert als die Werte, deren Abstand vom IQR größer als das 3-fache des IQRs ist. Sie sind als Sterne markiert.

Nach der Acetaldehyd-Behandlung wurden hauptsächlich Aberrationen vom Chromatid-Typ, aber auch einige vom Chromosomen-Typ beobachtet. Erfasst wurden vor allem Chromatidbrüche und -fragmente, dizentrische Chromosomen ohne und seltener mit azentrischen Fragmenten, Chromosomenbrüche und -fragmente und Reunionsfiguren wie triradiale und quadriradiale Chromosomen. Dizentrische Chromosomen wurden nur dann als Bruchereignis gewertet, wenn in der Metaphase auch ein azentrisches Fragment vorlag. Wenn kein azentrisches Chromosom vorliegt, ist Veränderung ist am ehesten auf eine Fusion der Telomere zurückzuführen.

7.5 Dizentrische Chromosomen bei hSNM1B/Apollo-depletierten U2OS-Zellen

Bei der Auswertung der Metaphasen der unbehandelten U2OS-Zellen fiel eine Häufung von dizentrischen Chromosomen bei hSNM1B/Apollo-depletierten Zellen auf. In Abbildung 38 ist zur Veranschaulichung eine Metaphase entsprechender Zellen mit einem dizentrischen Chromosom abgebildet. Zusätzlich ist mindestens ein quadriradiales Chromosom zu erkennen.

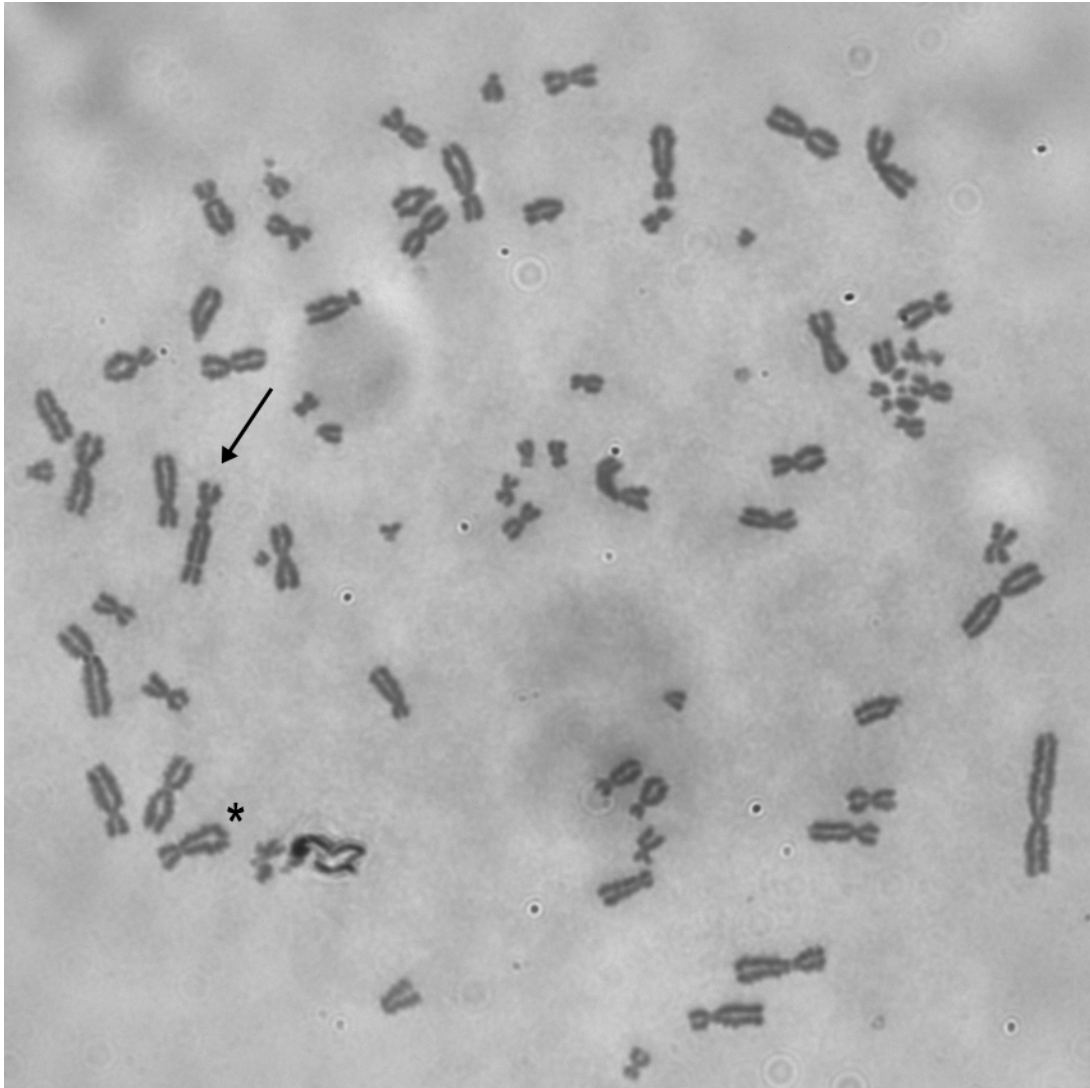


Abbildung 38 Metaphase einer mit Apollo-siRNA behandelten U2OS-Zelle. Pfeil: dizentrisches Chromosom, Stern: quadriradiales Chromosom.

Ein exakter Test nach Fischer zeigte, dass es innerhalb der untersuchten Zelllinien signifikante Unterschiede bezüglich der Anzahl der Zellen, die mindestens ein dizentrisches Chromosom aufwiesen, gab (p-Wert: 0,049). Die korrigierten Residuen wurden berechnet um beurteilen zu können, bei welcher Protein-Depletion es zu einem gehäuften Auftreten von dizentrischen Chromosomen kam. Hier zeigte sich nur bei hSNM1B/Apollo-depletierten Zellen ein Wert $\pm 1,96$, dieser deutet auf einen signifikanten Zusammenhang hin. Interessanterweise war dies

bei den Zellen nach gleichzeitiger hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-Depletion nicht der Fall. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11 Kreuztabelle zur Darstellung der Anzahl der U2OS-Zellen mit oder ohne mindestens einem dizentrischen Chromosom nach hSNM1B/Apollo- oder FANCP/SLX4-Depletion oder der Depletion beider Proteine. Angegeben sind die tatsächlichen Anzahlen, die erwarteten Anzahlen unter der Annahme der Gleichverteilung, die korrigierten Residuen sowie die prozentualen Anteile der untersuchten Zellreihen in den Kategorien „keine dizentrischen Chromosomen“ und „mindestens ein dizentrisches Chromosom“.

siRNA · Dizentrische Chromosomen Kreuztabelle^a

		Dizentrische Chromosomen		Gesamt	
		keine	mind. 1		
siRNA	Kontrolle	Anzahl	125	3	128
		Erwartete Anzahl	120,9	7,1	128,0
		% innerhalb von Dizentrische Chromosomen	30,7%	12,5%	29,7%
		Korrigierte Residuen	1,9	-1,9	
	FANCP	Anzahl	84	7	91
		Erwartete Anzahl	85,9	5,1	91,0
		% innerhalb von Dizentrische Chromosomen	20,6%	29,2%	21,1%
		Korrigierte Residuen	-1,0	1,0	
	Apollo	Anzahl	78	9	87
		Erwartete Anzahl	82,2	4,8	87,0
		% innerhalb von Dizentrische Chromosomen	19,2%	37,5%	20,2%
		Korrigierte Residuen	-2,2	2,2	
	Apollo/FANCP	Anzahl	120	5	125
		Erwartete Anzahl	118,0	7,0	125,0
		% innerhalb von Dizentrische Chromosomen	29,5%	20,8%	29,0%
		Korrigierte Residuen	,9	-,9	
Gesamt	Anzahl	407	24	431	
	Erwartete Anzahl	407,0	24,0	431,0	
	% innerhalb von Dizentrische Chromosomen	100,0%	100,0%	100,0%	

a. Acetaldehyd = nein

Nach Acetaldehyd-Behandlung gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Zelllinien bezüglich der Anzahl der Zellen mit dizentrischen Chromosomen (Chi-Quadrat-Test, p-Wert: 0,605).

7.6 Ko-Lokalisation von TRF1- und γ H2AX-Foci bei hSNM1B/Apollo-depletierten U2OS-Zellen

In weiteren Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, ob eine siRNA-vermittelte Depletion von hSNM1B/Apollo in U2OS-Zellen zu einer Telomerdysfunktion führt. Dazu

wurden in den Zellen Ko-Lokalisation von TRF1- und γ H2AX-Foci begutachtet, diese deuten auf eine Dysfunktion der Chromosomenenden hin. Zellen mit mindestens zwei Ko-Lokalisationen wurden als „Telomerdysfunktion-induzierte Foci (TIF)-positiv“ gewertet.

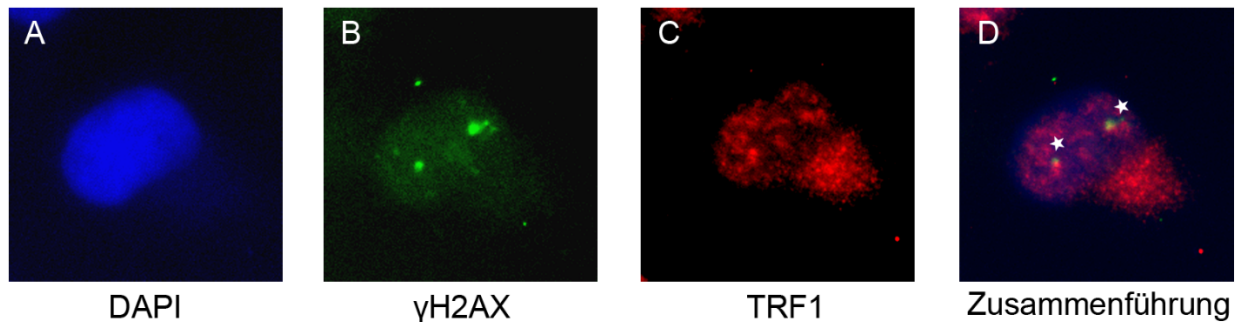


Abbildung 39 Immunfluoreszenzmikroskopie einer hSNM1B/Apollo-depletierten U2OS-Zelle zur Darstellung von TIFs. A) DAPI-Färbung zur Darstellung des Zellkerns. B) γ H2AX wurde grün angefärbt und ist ein Markerprotein für DNA-Schäden. C) TRF1 wurde rot angefärbt und diente als Telomermarker. D) Durch das Zusammenführen der Bilder A und B wird die Ko-Lokalisation von γ H2AX- und TRF1-Foci („TIFs“) sichtbar. Diese sind hier mit Sternen markiert.

Abbildung 39 zeigt beispielhaft eine TIF-positive U2OS-Zelle nach hSNM1B/Apollo-Depletion. Ein Chi-Quadrat-Test zeigte, dass hSNM1B/Apollo-depletierte U2OS-Zellen signifikant häufiger TIF-positiv waren als die Kontrollzellen (p-Wert: 0,03). Die dieser Berechnung zugrundeliegenden Daten sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12 Kreuztabelle zur Darstellung der Anzahl der TIF-positiven U2OS-Zellen nach hSNM1B/Apollo-Depletion im Vergleich zu Kontrollzellen. Angegeben sind die tatsächlichen Anzahlen und die erwarteten Anzahlen unter der Annahme der Gleichverteilung sowie die prozentualen Anteile der untersuchten Zellen in den Kategorien „TIF-negativ“ und „TIF-positiv“.

siRNA · TIF Kreuztabelle

			TIF \geq 2		Gesamt
			negativ	positiv	
siRNA	Kontrolle	Anzahl	108	4	112
		Erwartete Anzahl	103,4	8,6	112,0
		% innerhalb von TIF	45,0%	20,0%	43,1%
	Apollo	Anzahl	132	16	148
		Erwartete Anzahl	136,6	11,4	148,0
		% innerhalb von TIF	55,0%	80,0%	56,9%
Gesamt	Anzahl	240	20	260	
	Erwartete Anzahl	240,0	20,0	260,0	
	% innerhalb von TIF	100,0%	100,0%	100,0%	

Bei der Auswertung der γ H2AX-Foci fiel außerdem auf, dass signifikant weniger hSNM1B/Apollo-depletierte Zellen als γ H2AX-Foci-positiv gewertet wurden als die Kontroll-

siRNA-behandelten Zellen ($p < 0,0001$, Chi-Quadrat-Test). In Tabelle 13 sind die dieser Berechnung zugrundeliegenden Daten aufgeführt.

Tabelle 13 Kreuztabelle zur Darstellung der Anzahl der γ H2AX-Foci-positiven U2OS-Zellen nach hSNM1B/Apollo-Depletion im Vergleich zu Kontrollzellen. Angegeben sind die tatsächlichen Anzahlen und die erwarteten Anzahlen unter der Annahme der Gleichverteilung sowie die prozentualen Anteile der untersuchten Zellen in den Kategorien „ γ H2AX-Foci-positiv“ und „ γ H2AX-Foci-negativ“.

siRNA · γ H2AX-Foci Kreuztabelle

			γ H2AX-Foci ≥ 3		Gesamt
			negativ	positiv	
siRNA	Kontrolle	Anzahl	142	374	516
		Erwartete Anzahl	227,3	288,7	516,0
		% innerhalb von γ H2AX-Foci	31,7%	65,7%	50,7%
	Apollo	Anzahl	306	195	501
		Erwartete Anzahl	220,7	280,3	501,0
		% innerhalb von γ H2AX-Foci	68,3%	34,3%	49,3%
Gesamt	Gesamt	448	569	1017	
	Erwartete Anzahl	448,0	569,0	1017,0	
	% innerhalb von γ H2AX-Foci	100,0%	100,0%	100,0%	

8 Diskussion

Der FA/BRCA-Reparaturweg ist maßgeblich an den komplexen Abläufen der ICL-Reparatur von Zellen beteiligt; diese Komplexität spiegelt sich auch in der genetischen Heterogenität der Fanconi-Anämie wieder. Neben den derzeit bekannten 19 FA-Genen werden immer mehr Gene identifiziert, deren Proteine am FA/BRCA-Reparaturweg mitwirken, bisher jedoch noch nicht in mutierter Form bei FA-Patienten gefunden wurden. Zu diesen Proteinen zählen unter anderem die Fanconi-Anämie-assoziierten Proteine (FAAP) FAAP 10, FAAP 16, FAAP 20, FAAP 24 und FAAP 100 sowie die Nukleasen MUS81 und SLX1.¹⁹ Im Jahr 2004 wurde hSNM1B/Apollo als weiteres potentielles Mitglied dieser Gruppe identifiziert. Seitdem häufen sich die Hinweise dafür, dass das Protein neben seiner Funktion beim Schutz der Telomere tatsächlich auch Teil des FA/BRCA-Reparaturwegs ist.^{53 82 84 97} Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit tragen zur Charakterisierung der genauen Mechanismen dieser Beteiligung bei. Die Schwerpunkte wurden auf die Untersuchung der Bindung von hSNM1B/Apollo an FANCP/SLX4, der Funktionen von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 an den Telomeren und der Acetaldehyd-Sensitivität von hSNM1B/Apollo-depletierten Zellen gelegt.

8.1 hSNM1B/Apollo bindet an FANCP/SLX4

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob hSNM1B/Apollo physisch an FANCP/SLX4, ein zentrales Protein des FA/BRCA-Reparaturwegs, bindet. Zur Untersuchung der Interaktion der Proteine wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Zunächst wurde mit FANCP/SLX4-Antikörpern versucht, ektopisch exprimiertes Flag-hSNM1B/Apollo aus menschlichen HEK293-Zellen zu präzipitieren. Diese Ko-Immunopräzipitation gelang und beweist, dass hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 aneinander binden. Allerdings war die Ko-Immunopräzipitation nur dann erfolgreich, wenn hSNM1B/Apollo ektopisch exprimiert wurde, endogenes hSNM1B/Apollo ko-immunopräzipitierte nicht mit FANCP/SLX4.⁹⁷ Vermutlich ist diese Beobachtung dem niedrigen Expressionsniveau von *hSNM1B/Apollo* geschuldet. Dieses wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen wegen Problemen beim Nachweis von endogenem hSNM1B/Apollo im Western Blot, selbst nach einer Anreicherung des Proteins durch IP, beschrieben.^{82 84 90} Interessanterweise war die Ko-Immunopräzipitation auch nur dann erfolgreich, wenn FANCP/SLX4-Antikörper eingesetzt wurden; bei der umgekehrten IP mit Anti-hSNM1B/Apollo-Antikörpern oder Antikörpern gegen die Flag-Sequenz des ektopisch exprimierten Flag-hSNM1B/Apollo-Fusionsproteins konnte kein FANCP/SLX4 präzipitiert werden.⁹⁷ Ähnliche Beobachtungen wurden bei Untersuchungen der Interaktion von

hSNM1B/Apollo und TRF2 gemacht, hier gelang die Ko-IP nur in eine Richtung mit Antikörpern gegen hSNM1B/Apollo.⁸⁵ TRF2 ist als hSNM1B/Apollo-Bindungspartner von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben worden⁸⁸⁻⁹⁰, eine erfolglose Ko-IP in eine Richtung steht also nicht im Widerspruch zu einer Protein-Protein-Interaktion. Da hSNM1B/Apollo hier mit den verwendeten Antikörpern präzipitiert werden konnte, liegt die Überlegung nahe, dass die zur IP eingesetzten Antikörper die Bindung der Proteine stören und die Ko-IP von FANCP/SLX4 verhindern. Zusammenfassend stellt die gefundene Interaktion von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 eine weitere Verbindung von hSNM1B/Apollo zum FA/BRCA-Reparaturweg dar. FANCP/SLX4 gehört zu den Proteinen, die im Rahmen der ICL-Reparatur nach der Monoubiquitinierung von FANCD2 aktiviert werden. Da hSNM1B/Apollo nicht an der Monoubiquitinierung von FANCD2 beteiligt ist, wurde dem Protein ebenfalls eine Rolle stromabwärts dieses Aktivierungsschritts des FA/BRCA-Reparaturwegs zugesprochen.^{53 82} Diese Annahme wird durch die Interaktion mit FANCP/SLX4 bestärkt.

8.1.1 Komplexe Interaktion von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4

Im nächsten Schritt sollte mittels weiterer Ko-Immunopräzipitationsstudien die FANCP/SLX4-Bindungsdomäne von hSNM1B/Apollo kartiert werden. In einem dieser Arbeit vorausgehenden, ähnlichen Experiment haben wir bereits den Bereich der FANCP/SLX4-Bindungsstelle auf den N-Terminus von hSNM1B/Apollo lokalisiert, da das hSNM1B/Apollo-Teilstück bestehend aus den C-terminalen Aminosäuren 268-532 nicht mit FANCP/SLX4-Antikörpern aus dem HEK293-Zelllysat isoliert werden konnte.⁹⁷ Nun wurden weitere, Flag-fusionierte Teilstücke von hSNM1B/Apollo verwendet, um die Interaktionsdomäne genauer einzugrenzen.

Überraschenderweise präzipitierten in diesem Versuch reproduzierbar alle Flag-hSNM1B/Apollo-Teilstücke mit FANCP/SLX4, auch das aus den C-terminalen Aminosäuren 268-532 bestehende Protein. Diese Beobachtung lässt sich am ehesten auf eine Beeinflussung der Protein-Protein-Interaktion durch das im vorausgehenden Experiment als GFP-Fusionsprotein synthetisierte hSNM1B/Apollo-Teilstück zurückführen. Die GFP-Sequenz wurde wie die hier verwendeten Flag- oder Myc-Sequenzen an die ektopisch zu exprimierenden Proteine fusioniert, um den Nachweis der Proteinteilstücke zu ermöglichen. In dem vorausgehenden Experiment waren alle hSNM1B/Apollo-Teilstücke, denen C-terminale Aminosäuren fehlten, N-terminal mit dem Flag-Markerprotein versehen. Nur die N-terminale Deletionsmutante besaß eine C-terminale GFP-Markierung. Im Gegensatz dazu waren alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten hSNM1B/Apollo-Teilstücke N-terminal mit dem Flag-Protein markiert. GFP ist ein relativ großes Protein, das aus 220 Aminosäuren besteht und ein

Molekulargewicht von etwa 24,2 kDa aufweist. Das Flag-Protein hingegen besteht aus nur acht Aminosäuren.¹⁰² Es ist also durchaus denkbar, dass der GFP-Anteil die Bindung von hSNM1B/Apollo_268-532-GFP und FANCP/SLX4 stört, während sie bei Flag-hSNM1B/Apollo_268-532 und FANCP/SLX4 nicht beeinträchtigt wird. In Abbildung 40 sind die Ergebnisse der Ko-Immunopräzipitationsstudien der vorliegenden Arbeit denen der vorausgehenden Untersuchungen gegenübergestellt. Anhaltspunkte dafür, dass der GFP-Anteil im Fusionsprotein Proteinbindungen beeinflusst, finden sich auch in der Literatur.¹⁰³

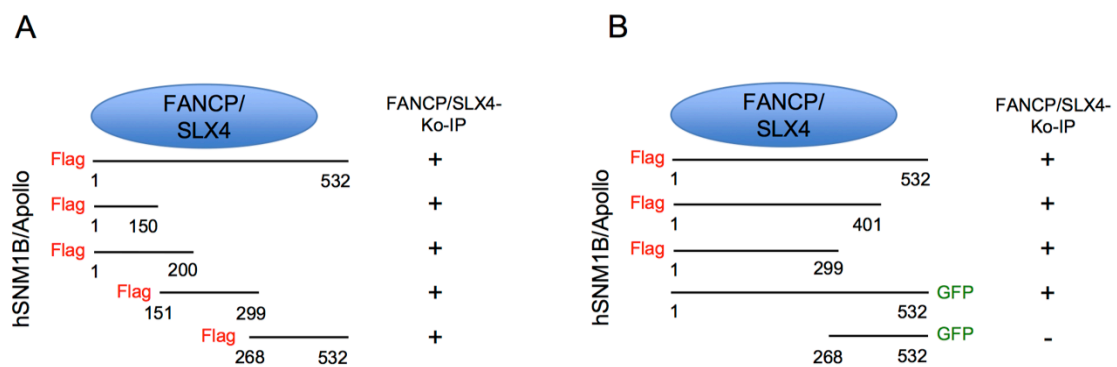


Abbildung 40 Vergleich der Ergebnisse der Ko-Immunopräzipitationsstudien der vorliegenden Arbeit (A) mit denen der vorausgehenden Experimenten (B).⁹⁷ Gezeigt sind die verwendeten Flag- bzw. GFP-hSNM1B/Apollo-Teilstücke. Die repräsentierten Aminosäuren sind als Zahlen angegeben und die jeweils verwendete Flag- oder GFP-Markierung der Proteine ist vermerkt. Außerdem ist angegeben, welche der eingesetzten Teilstücke mit FANCP/SLX4 ko-immunopräzipitiert werden konnten.

Die Beobachtung, dass alle hier untersuchten hSNM1B/Apollo-Teilstücke mit FANCP/SLX4 ko-immunopräzipitieren, deutet auf eine komplexe Interaktion der Proteine hin. Die eingesetzten Teilstücke überlagern sich nur teilweise. Aus diesen Strukturhomologien kann geschlossen werden, dass es mindestens zwei separate Interaktionsdomänen geben muss. Denkbar sind jedoch auch drei oder mehr Bindungsstellen an anderen hSNM1B/Apollo-Domänen (Abbildung 41).

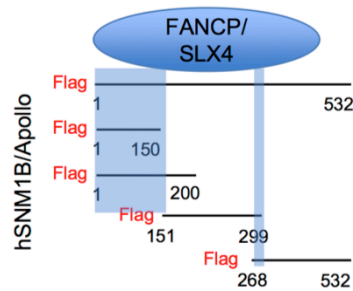


Abbildung 41 Arbeitsmodell zur Darstellung der möglichen FANCP/SLX4-Bindungsstellen von hSNM1B/Apollo. Gezeigt sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Flag-hSNM1B/Apollo-Teilstücke, die jeweils repräsentierten Aminosäuren sind als Zahlen angegeben. Blau schattiert sind hSNM1B/Apollo-Domänen, die mit FANCP/SLX4 interagieren müssen, um die beobachtete Ko-Immunopräzipitation aller Flag-hSNM1B/Apollo-Teilstücke zu gewährleisten. Hierbei handelt es sich nur um die Mindestanforderung und die Lokalisation der Bindungsstellen ist nicht gesichert. Deutlich wird, dass es mindestens zwei Interaktionsdomänen geben muss.

Der Versuch einer Kartierung der hSNM1B/Apollo-Bindungsdomäne von FANCP/SLX4 wurde ebenfalls vorgenommen. Dafür wurden in HEK293-Zellen Flag-hSNM1B/Apollo- und Myc-FANCP/SLX4-Teilstücke synthetisiert und die Interaktion der Proteine mittels Ko-IP-Studien untersucht. Wieder gelang die Ko-IP nur in eine Richtung unter Verwendung von Anti-Myc-Antikörpern. Flag-hSNM1B/Apollo konnte mit allen Myc-FANCP/SLX4-Teilstücken ko-immunopräzipitiert werden. Die Strukturhomologien der eingesetzten Teilstücke lassen hier ebenfalls die Schlussfolgerung zu, dass mindestens zwei Bindungsstellen von FANCP/SLX4 an hSNM1B/Apollo existieren, wobei auch hier mehr Interaktionsdomänen an anderen Stellen von FANCP/SLX4 möglich sind (Abbildung 42).

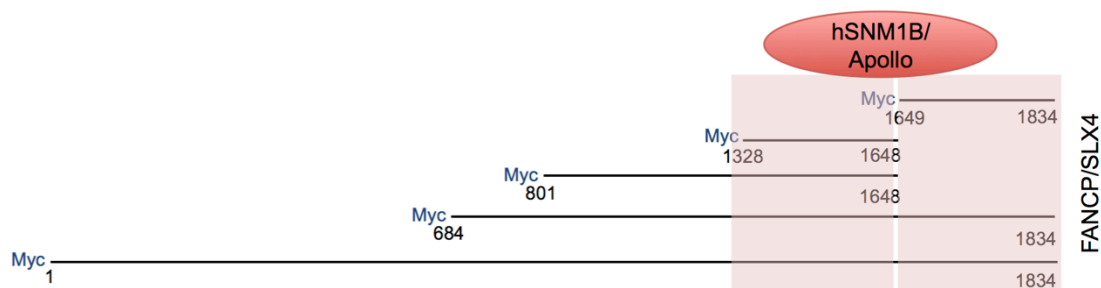


Abbildung 42 Arbeitsmodell zur Darstellung der möglichen hSNM1B/Apollo-Bindungsstellen von FANCP/SLX4. Gezeigt sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Myc-FANCP/SLX4-Teilstücke, die jeweils repräsentierten Aminosäuren sind als Zahlen angegeben. Rot schattiert sind FANCP/SLX4-Domänen, die mit hSNM1B/Apollo interagieren müssen, um die beobachtete Ko-Immunopräzipitation von hSNM1B/Apollo mit allen Myc-FANCP/SLX4-Teilstücken zu gewährleisten. Hierbei handelt es sich nur um die Mindestanforderung und die Lokalisation der Bindungsstellen ist nicht gesichert. Deutlich wird, dass es mindestens zwei Interaktionsdomänen geben muss.

An dieser Stelle sei auch darauf hingewiesen, dass mittels Ko-Immunopräzipitationsstudien nicht zwischen direkten und indirekten Proteininteraktionen unterschieden werden kann. Mit TRF2 und MUS81 sind zwei gemeinsame Bindungspartner von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 bekannt.^{53-56 85 88-90} hSNM1B/Apollo bindet außerdem an FANCD2 und den MRN-Proteinkomplex.⁵³ Seit längerem wird spekuliert, ob FANCP/SLX4 mit seinen Ubiquitinbindenden Motiven (UBZ) monoubiquitiniertes FANCD2 bindet, wobei neuere Untersuchungen dagegen sprechen.^{58 104 105} Dennoch gibt es in der Literatur eine Quelle, in der eine Ko-IP von FANCD2 mit FANCP/SLX4 beschrieben wird.¹⁰⁶ Außerdem wurde vor kurzem dargestellt, dass FANCP/SLX4 mit dem MRN-Proteinkomplex interagieren kann und dass diese Bindung offenbar sowohl über seine UBZs als auch über die jüngst entdeckten SUMO-bindenden Domänen (SIMs) vermittelt wird. Eine genaue Kartierung der Bindungsstelle wurde noch nicht vorgenommen.¹⁰⁷ Somit sind bis zu vier Proteine bekannt, über die hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 indirekt miteinander interagieren könnten. In Abbildung 43 sind die gemeinsamen Bindungspartner von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 schematisch dargestellt. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die gegenseitige Ko-Immunopräzipitation aller hier untersuchten Teilstücke durch indirekte Proteininteraktionen erklärt werden könnte, wobei im Besonderen für das C-terminale FANCP/SLX4-Teilstück (Aminosäuren 1649-1834) bisher keine sichere Interaktion mit einem gemeinsamen Bindungspartner beschrieben ist. Eine direkte Bindung von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 ist also nicht auszuschließen.

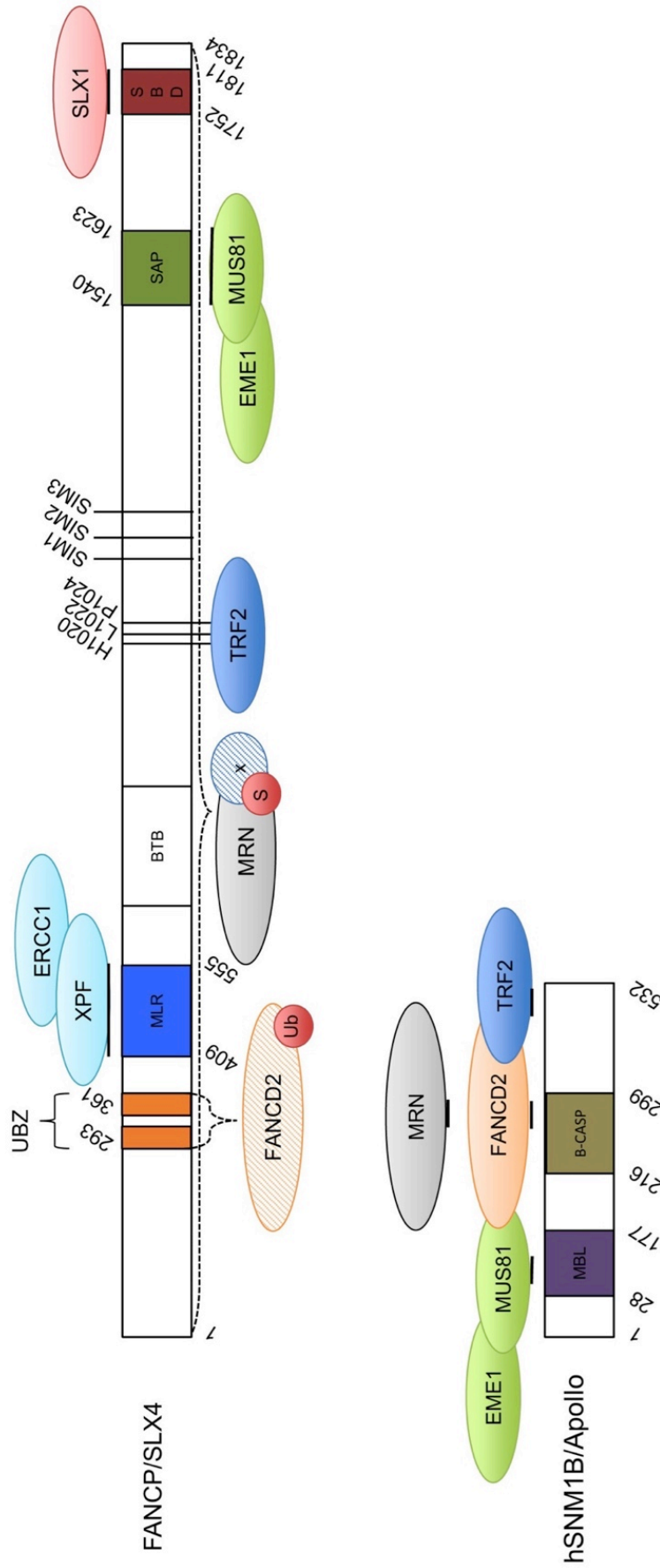


Abbildung 43 Schematische Darstellung wichtiger Proteinindomänen und Bindungspartner von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4.^{53, 59 108-110} Konservierte Proteinindomänen sind eingezeichnet, mit ihren Abkürzungen beschriftet und die begrenzenden Aminosäuren angegeben. Dicke Linien stellen die für die dargestellten Proteininteraktionen relevanten Bereiche dar, bei der Bindung von TRF2 an FANCP/SLX4 sind die genauen Aminosäuren bekannt und im Einbuchstabencode angegeben. Gestrichelte Linien wurden zur Kennzeichnung umstrittener Proteininteraktionen verwendet. Das mit „x“ markierte Protein am MRN-Komplex soll verdeutlichen, dass die Bindung von MRN an FANCP/SLX4 möglicherweise über ein weiteres, SUMOyliertes Protein vermittelt wird. SIM: SUMO-bindende Domäne. S: SUMO. Ub: Ubiquitin.

8.1.2 hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4-Teilstücke interagieren nicht im zellfreien System

Um zu überprüfen, ob die Interaktion von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 in Abwesenheit endogener Proteine besteht, wurden die Ko-IP-Studien im zellfreien System wiederholt. Verwendet wurden dafür alle hSNM1B/Apollo-Teilstücke und die FANCP/SLX4-Teilstücke, auf die die Bindungsstellen aufgrund der bisherigen Ergebnisse bereits eingegrenzt werden konnten (siehe Abbildung 42). Als problematisch stellte sich dar, dass sich Myc-FANCP/SLX4 in voller Länge trotz diverser Optimierungsversuche in der *in-vitro* Translation nicht herstellen ließ. Am ehesten ist dies auf die Größe von Myc-FANCP/SLX4 zurückzuführen: Mit einem Molekulargewicht von etwa 200 kDa liegt das Protein an der oberen Produktionsgrenze des hier verwendeten Weizenextraktsystems.¹¹¹ Daher musste das Experiment umstrukturiert werden: Es konnte nur untersucht werden, ob eine Interaktion zwischen *in-vitro* translatiertem Flag-hSNM1B/Apollo und Myc-FANCP/SLX4_1328-1648 oder Myc-FANCP/SLX4_1649-1834 besteht. Überraschenderweise gelang die Ko-IP hier weder mit Anti-Apollo- noch mit Anti-Myc-Antikörpern. Dies steht im klaren Gegensatz zu den Ergebnissen der Ko-IP-Studien aus den HEK293-Zelllysaten und lässt mehrere Erklärungen zu: Eine Möglichkeit ist, dass die Ergebnisse der endogenen Ko-IP-Studien verfälscht wurden, da kontaminierende Nukleinsäuren an die Oberflächen von Proteinen binden können und somit artifizielle Protein-Protein-Interaktionen induzieren.¹¹² Dagegen spricht, dass alle Zelllysate vor der Aufbereitung zur IP sonifiziert wurden. Diese Ultraschallbehandlung dient dem Aufbrechen der genomischen DNA und soll verhindern, dass diese die Protein-Protein-Bindungen beeinflusst. Somit bleiben zwei Erklärungsansätze für die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen: Entweder binden hSNM1B/Apollo und die FANCP/SLX4-Teilstücke tatsächlich nur indirekt aneinander, oder die *in-vitro* translatierten Proteine weisen eine andere Konformation als ihre endogenen Gegenstücke auf, sodass ihre Interaktionen gestört werden. In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass die *in-vitro* produzierten Proteine nicht mit endogen produzierten Protein-Teilstücken aus HEK293-Zelllysaten interagieren, die in den vorherigen Ko-IP-Experimenten bereits als ihre Bindungspartner identifiziert wurden. Da in den HEK293-Lysaten auch andere endogene Proteine enthalten sind, müsste eine indirekte Interaktion über gemeinsame Bindungspartner bei diesem Versuchsaufbau möglich sein. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die *in-vitro* translatierten Proteine anders konformiert sind als ihre Gegenstücke, die in einem Zellsystem gebildet werden. Ein möglicher Grund dafür ist, dass im Weizenextraktsystem nur bedingt Säugerzellen-typische post-translationale Modifikationen (PTMs) von Proteinen ausgebildet werden können.¹¹³ PTMs sind Veränderungen von Proteinen, die nach der

abgeschlossenen Translation stattfinden. Diese Modifikationen regulieren maßgeblich die Struktur und Funktion von Proteinen und sind somit auch für viele Protein-Protein-Interaktionen notwendig.¹¹⁴ Da im Weizenextraktsystem viele wichtige Faktoren für PTMs nicht vorliegen, können unter anderem Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Ubiquitinierungen und SUMOylierungen der translatierten Proteine nicht oder nur im geringen Maß ausgebildet werden.^{111 115} Eventuell basiert die Interaktion von hSNM1B/Apollo und Myc-FANCP/SLX4_1328-1648 oder Myc-FANCP/SLX4_1649-1834 also auf PTMs und kann daher im zellfreien System nicht reproduziert werden. Interessant wäre hier eine Wiederholung der *in-vitro* Translation mit einem Expressionssystem aus menschlichen Zellen, in dem eventuelle PTMs entstehen könnten. Die übergeordnete Frage, ob hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 direkt oder indirekt interagieren oder beide Bindungsformen aufweisen, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden.

8.2 hSNM1B/Apollo bindet weitere hSNM1B/Apollo-Moleküle

Mit Ko-Immunopräzipitationsstudien konnten *van Overbeek und de Lange* zeigen, dass hSNM1B/Apollo an ein oder an mehrere hSNM1B/Apollo-Moleküle binden kann.⁹⁰ Mit den vorhandenen hSNM1B/Apollo-Plasmiden sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine genauere Kartierung dieser Interaktion vorgenommen werden. In HEK293-Zellen wurde dafür Myc-fusioniertes hSNM1B/Apollo und jeweils eins von drei Flag-hSNM1B/Apollo-Teilstücken exprimiert und anschließend mit Myc-Antikörpern versucht, die eingesetzten Teilstücke zu ko-immunopräzipitieren. Interessanterweise konnten auch hier alle hSNM1B/Apollo-Teilstücke nach der IP detektiert werden. Dieses Ergebnis legt, analog zur Interaktion von hSNM1B/Apollo mit FANCP/SLX4, nahe, dass mehrere Bindungsstellen existieren (Abbildung 44) und dass hSNM1B/Apollo ein Homomultimer bildet.

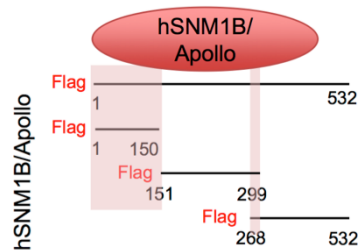


Abbildung 44 Arbeitsmodell zur Darstellung der möglichen Bindungsstellen von hSNM1B/Apollo an weitere hSNM1B/Apollo-Moleküle. Gezeigt sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Flag-hSNM1B/Apollo-Teilstücke, die jeweils repräsentierten Aminosäuren sind als Zahlen angegeben. Rot schattiert sind hSNM1B/Apollo-Domänen, die mit hSNM1B/Apollo interagieren müssen, um die beobachtete Ko-Immunopräzipitation aller Flag-hSNM1B/Apollo-Teilstücke zu gewährleisten. Hierbei handelt es sich nur um die Mindestanforderung und die Lokalisation der Bindungsstellen ist nicht gesichert. Deutlich wird, dass es mindestens zwei Interaktionsdomänen geben muss.

Das trunkierte hSNM1B/Apollo-Molekül, das bei einem Hoyeraal-Hreidarsson-Patienten gefunden wurde und dem die TRF2-Interaktionsdomäne fehlt, bindet Wildtyp-hSNM1B/Apollo.⁹⁵ Es kann also davon ausgegangen werden, dass TRF2 für die hSNM1B/Apollo-Multimerbildung nicht von Bedeutung ist. Ein Teil der Interaktion der hSNM1B/Apollo-Moleküle könnte über das Protein PSF2 vermittelt werden. PSF2 bildet mit drei weiteren Proteinen einen Komplex, der für die Replikation von DNA essenziell ist und eine Depletion von PSF2 führt zu einer gesteigerten zellulären Sensitivität gegenüber ICLs. hSNM1B/Apollo besitzt zwei separate Bindungsstellen für PSF2, eine im Bereich der Aminosäuren 221-364 und eine weitere im Bereich der Aminosäuren 496-532.¹¹⁶ Die Bindungsstellen von PSF2 an hSNM1B/Apollo sind noch nicht kartiert. Dennoch ist denkbar, dass ein PSF2-Molekül zwei hSNM1B/Apollo-Moleküle bindet, womit die Ko-IP der Teilstücke Flag-hSNM1B/Apollo_151-299 oder Flag-hSNM1B/Apollo_268-532 mit Myc-hSNM1B/Apollo erklärt werden könnte. Die Ergebnisse dieses Experiments legen jedoch auch eine Bindung im Bereich der Aminosäuren 1-150 nahe, die direkt oder indirekt sein könnte. Die Ko-Immunopräzipitationsstudien wurden ebenfalls im zellfreien System wiederholt und erneut ließ sich keine Interaktion der *in-vitro* translatierten Proteine nachweisen. Es kann also nur spekuliert werden, dass die hSNM1B/Apollo-Homomultimerbildung indirekt ist oder, wenn auch nur zum Teil, auf post-translationalen Modifikationen beruht.

8.3 Wechselwirkungen zwischen dem FA/BRCA-Reparaturweg und den telomerassoziierten Proteinen TRF1 und TRF2

Die funktionelle Verbindung von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 konnte in den dieser Arbeit vorrausgehenden Experimenten untermauert werden, da eine FANCP/SLX4-Depletion zu einer signifikanten Reduktion der hSNM1B/Apollo-Foci in der Immunfluoreszenz führt.⁹⁷ hSNM1B/Apollo-Foci ko-lokalisieren zum großen Teil mit den telomerassoziierten Proteinen TRF1 und TRF2 und ihre Formation wird durch TRF2-Depletion behindert.⁸⁵ Es wurde bereits gezeigt, dass eine experimentelle Reduktion der hSNM1B/Apollo-Proteinmenge mittels RNA-Interferenz die zelluläre Menge von TRF2 nicht beeinflusst^{89 90}, wohingegen uns der Nachweis gelang, dass eine FANCP/SLX4-Depletion die TRF2-Menge signifikant reduziert.⁹⁷ Die Reduktion der TRF2-Menge in FANCP/SLX4-depletierten Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden.

Dieses Ergebnis unterstreicht zum einem die Bedeutung von TRF2 für die Stabilität von hSNM1B/Apollo. hSNM1B/Apollo wird schnell abgebaut, wenn es nicht an TRF2 gebunden vorliegt.⁸⁸ Die Reduktion der hSNM1B/Apollo-Foci nach FANCP/SLX4-Depletion könnte demnach durch eine indirekte TRF2-Depletion erklärt werden. TRF2 ist neben seiner Schutzfunktion an den Telomeren auch an der Reparatur von DSB beteiligt¹¹⁷⁻¹¹⁹ und es ist durchaus denkbar, dass ein Teil des TRF2-Mangel-Phänotyps durch eine reduzierte Stabilität von hSNM1B/Apollo ausgelöst wird.

Auch bei Untersuchungen zur Bedeutung von TRF2 beim Schutz der Telomere in FA-Zellen ist dieses Ergebnis von Relevanz. FA-Zellen weisen eine beschleunigte Telomerverkürzung und vermehrte Telomerfusionen auf.¹²⁰⁻¹²² Die beobachtete TRF2-Reduktion durch FANCP/SLX4-Depletion wirft die Frage auf, ob Telomerfusionen bei allen FA-Komplementationsgruppen auf einen TRF2-Mangel zurückzuführen sind. Um dem nachzugehen, wurden FANCA und FANCD2 als Repräsentanten des FA/BRCA-Reparaturwegs ausgewählt und die zelluläre TRF2-Menge nach deren Depletionen gemessen, wobei es nicht zu signifikanten Veränderungen kam. Diese Beobachtung spricht gegen eine allgemeingültige TRF2-abhängige Telomerschädigung bei FA-Zellen. In Übereinstimmung damit wurde beschrieben, dass sowohl Wildtyp- als auch FANCA- oder FANCD2-defiziente Zellen reguläre TRF2-Foci an den Telomeren in Immunfluoreszenzuntersuchungen aufweisen.¹²² Angemerkt sei jedoch, dass in unserer Arbeitsgruppe auch bei einer Reduktion von TRF2 auf < 20% noch kein signifikanter Abfall der Foci-Anzahl beobachtet wurde, demnach könnte in diesen Zellen trotz der regulären Foci ein TRF2-Mangel vorliegen.⁸⁵ Interessant wäre hier eine detaillierte Analyse von FA-Patientenzellen

verschiedener Komplementationsgruppen bezüglich ihrer zellulären TRF2-Menge und ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von TRF2-Foci an den Telomeren.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von FANCP/SLX4 nicht mit einer Veränderung der zellulären TRF1-Menge einhergeht. *Sarkar et al.*¹²³ haben beschrieben, dass sowohl TRF1 als auch TRF2 die nukleolytische Aktivität des FANCP/SLX4-Komplexes an den Telomeren negativ regulieren, vermutlich um eine kritische Verkürzung der Telomere zu verhindern. Das Ausmaß der Regulation ist dabei von der telomerständigen TRF1- bzw. TRF2-Menge abhängig. Insofern ist es hochinteressant, dass eine FANCP/SLX4-Depletion die zelluläre Menge von TRF2, aber nicht von TRF1, reduziert. Im Gegensatz zu TRF1 interagiert TRF2 direkt mit FANCP/SLX4. Eventuell bedingt diese Interaktion eine Stabilisierung von TRF2, die bei einer FANCP/SLX4-Depletion wegfällt, sodass es zu einem vermehrten Abbau von TRF2 kommt. Die weitere Erforschung der genauen Regulationsmechanismen der zellulären TRF2-Menge und der Beteiligung von FANCP/SLX4 an dieser Regulation wird mit Sicherheit tiefere Einblicke in die Funktion beider Proteine an den Chromosomenenden liefern.

Auch eine FANCA- oder FANCD2-Depletion konnte die zelluläre TRF1-Menge nicht beeinflussen, auch wenn für FANCD2-mutierte Fibroblasten eine reduzierte *TRF1*-Expression auf mRNA-Level beschrieben wurde.¹²⁴ Eventuell kann diese Diskrepanz auf die nicht vollständige FANCD2-Depletion der hier untersuchten Zellen zurückgeführt werden, da nach einer siRNA-Behandlung eine gewisse Restmenge des Zielproteins bestehen bleibt.

Als Ganzes unterstreichen diese Ergebnisse die Bedeutung von FANCP/SLX4 in der Aufrechterhaltung der Telomerintegrität. Aktuelle Studien bestätigen diese Funktion des FANCP/SLX4-Komplexes und heben die Relevanz der FANCP/SLX4-TRF2-Interaktion hervor.^{60 123 125} Während FANCA vermutlich keine Rolle im TRF1/TRF2-vermitteltem Schutz der Chromosomenenden spielt, kann die bisher vermutete Rolle von FANCD2 hier nicht bestätigt werden.

8.4 Bedeutung von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 für die zelluläre Acetaldehyd-Sensitivität

8.4.1 Acetaldehyd aktiviert den FA-BRCA-Reparaturweg nach Depletion von hSNM1B/Apollo oder FANCP/SLX4

Reaktive Aldehyde sind potente Karzinogene, die ohne einen adäquaten enzymatischen Abbau im menschlichen Körper akkumulieren und DNA-Schäden bedingen. Eines dieser Aldehyde ist

Acetaldehyd. Es entsteht unter anderem beim Abbau von Ethanol und kann eine Reihe von DNA-Addukten ausbilden, die auch zur Bildung von ICLs führen.¹²⁶⁻¹²⁸ Die Auswirkungen von Acetaldehyd auf FA-Zellen ist für diese Arbeit von besonderem Interesse, da sich seit einiger Zeit die Hinweise dafür häufen, dass das Aldehyd der wichtigste auslösende Faktor für die bei FA-Patienten besonders genotoxischen ICLs sein könnte.^{16 19 29} Die Bedeutung von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 für die zelluläre Acetaldehyd-Sensitivität war bisher unklar. Im Rahmen dieser Arbeit konnte einleitend gezeigt werden, dass eine Acetaldehyd-Behandlung die Monoubiquitinierung von FANCD2 induziert, was als wichtiger Aktivierungsschritt des FA/BRCA-Reparaturwegs angesehen wird. Wird zugleich die zelluläre hSNM1B/Apollo- oder FANCP/SLX4-Menge mittels RNA-Interferenz herunterreguliert, so fällt die Monoubiquitinierung stärker aus. In der Literatur findet sich bereits eine Beschreibung einer gesteigerten FANCD2-Monoubiquitinierung in gesunden lymphoblastoiden Zellen nach Acetaldehyd-Behandlung.⁷⁵ Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivierung des FA/BRCA-Reparaturwegs nach Depletion von hSNM1B/Apollo oder FANCP/SLX4 stärker ausfällt als in FA-Wildtyp-Zellen. Dies könnte durch eine vermehrte Anhäufung von DNA-Schäden und folgender Aktivierung des FR/BRCA-Reparaturwegs als Resultat einer defizienten DNA-Reparatur erklärt werden. Zudem werfen die Ergebnisse die Frage auf, ob hSNM1B/Apollo- oder FANCP/SLX4-depletierte Zellen auch eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Acetaldehyd aufweisen.

8.4.2 hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 agieren nicht epistatisch in der zellulären Antwort auf Acetaldehyd-induzierte DNA-Schäden

In den dieser Arbeit vorrausgehenden Untersuchungen wurde bereits mittels Kolonienbildungsstudien gezeigt, dass sowohl ein Mangel an FANCP/SLX4 als auch an hSNM1B/Apollo bei U2OS-Zellen ihre Empfindlichkeit gegenüber einer Behandlung mit der DNA-Interstragvernetzenden Substanz MMC steigert. Die gleichzeitige Depletion beider Proteine führte nicht zu einer weiteren Zunahme der Sensitivität, sodass von einer epistatischen Funktion von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 bei der zellulären Antwort auf MMC-induzierte DNA-Schäden ausgegangen wird.⁹⁷ Diese Epistase deutet auf eine Funktion der Proteine im selben Signalweg hin und stellt ein weiteres Indiz für die Beteiligung von hSNM1B/Apollo am FA/BRCA-Reparaturweg dar. Darauf aufbauend wurden im Rahmen dieser Arbeit Kolonienbildungsstudien mit hSNM1B/Apollo- oder/und FANCP/SLX4-depletierten U2OS-Zellen nach Acetaldehyd-Behandlung durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Protein-depletierten Zelllinien im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen nach der Acetaldehyd-Behandlung weniger Kolonien ausbilden, was auf ein gesteigertes Zugrundegehen der Zellen

zurückzuführen ist. Mit diesen Daten wurden die jeweiligen Überlebenskurven der Zelllinien näherungsweise berechnet. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der Depletionszelllinien betrug das 1,24-1,66-fache der Kontrollzellen. Es bestand also ein moderater, aber messbarer Sensitivitätsunterschied; Aussagen bezüglich einer möglichen Epistase konnten anhand dieses einen Experiments noch nicht gemacht werden. Die Kolonienbildungsstudien wurden anschließend mehrmals mit einer der IC_{50} angenäherten Acetaldehydkonzentration von 20 mM wiederholt. Überraschenderweise zeigte die statistische Auswertung der Ergebnisse nur eine signifikante Sensitivitätssteigerung bei den FANCP/SLX4- und den FANCP/SLX4-hSNM1B/Apollo-depletierten Zellen, aber nicht bei alleiniger hSNM1B/Apollo-Depletion. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass FANCP/SLX4 an der Vermittlung einer zellulären Hypersensitivität gegenüber Acetaldehyd beteiligt ist, hSNM1B/Apollo hingegen nicht. Die gesteigerte Acetaldehyd-Sensitivität der doppelt-depletierten Zellen lässt sich alleinig auf den FANCP/SLX4-Mangel zurückführen, da es keinen signifikanten Unterschied zwischen ihrer Überlebensrate und der der FANCP/SLX4-depletierten Zellen gab. Dies Ergebnis ist in mehrerer Hinsicht spannend.

Zunächst sollen kurz die eingesetzten Acetaldehyd-Konzentrationen thematisiert werden. Die IC_{50} der Depletionszelllinien lagen um 20 mM. Das ist eine deutlich höhere Konzentration als sie unter physiologischen Bedingungen im menschlichen Blut gemessen werden kann. Diese erreicht selbst nach der Einnahme von hohen Ethanol Dosen nur Werte zwischen 1-5 μ M, im Speichel können nach Ethanol Aufnahme Werte bis zu 450 μ M gemessen werden. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass bei einem bereits induzierten Acetaldehyd-metabolisierendem Enzymsystem auch deutlich höhere Konzentrationen entstehen können.¹²⁹ Außerdem ist zu bedenken, dass die Zellen hier nur für eine Stunde mit Acetaldehyd behandelt wurden. Die Langzeiteffekte einer chronischen Acetaldehyd-Exposition deutlich unterhalb der hier bestimmten IC_{50} könnten also in FA-Zellen schwerwiegend sein.

Beim Betrachten der Ergebnisse fällt auf, dass sich die IC_{50} der Depletionszelllinien nur wenig von denen der Kontrollzellen unterscheiden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von *Langevin et al.*⁷⁴ gemacht. Hier konnten maximal 5-fache Sensitivitätssteigerungen von DT40-B-Zellen (Huhn) mit Nullmutationen in *FANCB*, *FANCC*, *FANCI*, *FANCL* oder *FANCO* durch Behandlungen mit Acetaldehydkonzentrationen bis 8 mM hervorgerufen werden. Vor kurzem wiesen *Ghosh et al.*⁹⁹ beachtenswerterweise nach, dass nicht alle FA-Zellen gleichermaßen sensibel auf eine Behandlung mit Acetaldehyd reagieren. Ziel ihrer Studie war es, große Unterschiede im Ansprechen auf Medikamente bei verschiedenen FANC-Mutationen, die

bei heterozygoten Trägern für die Ausbildung solider Tumoren von Bedeutung sind, im Vergleich zu nicht-mutierten Zellen zu finden. Solche Unterschiede sind oft Grundlagen von zielgerichteten Therapien; beispielsweise beruhte die Entwicklung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie auf der Beobachtung, dass *BCR-ABL*-positive Krebszellen 10-20-fach sensitiver gegenüber der Substanz sind als entsprechend negative Zellen.¹³⁰ Ghosh *et al.*⁹⁹ zeigten zunächst, dass sich *FANCG*-, *FANCC*-, *FANCD1*- und *FANCN*-mutierte Krebszellen in ihrer Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen DNA-Interstragvernetzenden Substanzen ähneln. *FANCD1*- und *FANCN*-Mutanten wiesen jedoch eine deutlich gesteigerte Sensitivität gegenüber Acetaldehyd auf (19-22-fach), die in *FANCC*- und *FANCG*-Mutanten wesentlich geringer ausfiel (2-3-fach). Diese Unterschiede könnten einerseits auf eine klonale Variation zurückzuführen sein. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass nicht alle FA-Proteine gleichermaßen für die zelluläre Antwort auf Acetaldehyd-induzierte DNA-Schäden benötigt werden. Die hier beobachtete moderate Sensitivität bei *FANCP/SLX4*-depletierten Zellen wäre mit letzterer Theorie gut vereinbar. Beim direkten Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse mit denen der Literatur muss beachtet werden, dass hier die *hSNM1B/Apollo*- bzw. *FANCP/SLX4*-Depletion mittels siRNA vorgenommen wurde und somit nicht vollständig ist. Die Acetaldehyd-Sensitivität von Nullmutanten könnte also durchaus stärker ausfallen als hier beobachtet. Außerdem wurden unterschiedliche Zelllinien verwendet, was die zelluläre Antwort auf Acetaldehyd-induzierte DNA-Schäden ebenfalls beeinflussen könnte. Im Ganzen festigen diese Ergebnisse jedoch die Annahme, dass Acetaldehyd auf FA-Zellen besonders genotoxisch wirkt. Diese Erkenntnis ist mit Blick auf Präventions- und Therapiemaßnahmen bei FA-Patienten von großer klinischer Relevanz. Eventuell könnte das Risiko der Entwicklung von malignen Erkrankungen sowohl bei FA-Patienten als auch bei heterozygoten Mutationsträgern durch eine Abstinenz von Ethanol und sonstigen Acetaldehyd-Quellen gesenkt werden. Auch eine medikamentöse Prävention mit Aldehyd-Antagonisten oder Aldehyd-Dehydrogenase-Agonisten wird diskutiert.⁹⁹ In zukünftigen Untersuchungen könnte der Frage nachgegangen werden, ob das Ausmaß der Acetaldehyd-Hypersensitivität von FA-Zellen tatsächlich von der jeweiligen Komplementationsgruppe abhängt. Sollte sich diese Annahme bestätigen, würde sich hier ein Ansatzpunkt für eine personalisierte Therapie sowohl für FA- als auch für Krebs-Patienten mit Mutationen in FA-Genen bieten.

Bemerkenswerterweise deuten die Ergebnisse der Kolonienbildungsstudien darauf hin, dass *hSNM1B/Apollo* an der zellulären Antwort auf Acetaldehyd-bedingte DNA-Schäden nicht

beteiligt ist. Bei der Antwort auf MMC-vermittelte ICLs ist die Nuklease jedoch essentiell.⁹⁷ Einerseits könnte dies auf eine milde Acetaldehyd-Empfindlichkeit von hSMN1B/Apollo-depletierten Zellen zurückgeführt werden, die sich durch die Resttranslation des Proteins bei siRNA-vermittelter Depletion hier nicht als signifikant manifestiert. Dann wäre der hier verwendete Assay nicht sensitiv genug, um eine solch geringe Sensitivitätssteigerung zu erfassen. Andererseits gibt dieses Ergebnis auch Anlass, den primären Schädigungsmechanismus von Acetaldehyd zu hinterfragen. Zusammen mit der Beschreibung, dass *FANCG*-, *FANCC*-, *FANCD1*- und *FANCN*-mutierte Krebszellen zwar ähnlich empfindlich gegenüber DNA-Interstragvernetzenden Substanzen wie Melphalan, Cisplatin und MMC sind, sich die Sensitivität gegenüber Acetaldehyd jedoch deutlich zwischen den Zelllinien unterscheidet⁹⁹, stellt sich die Frage, ob ICLs hier tatsächlich die primären schädigenden DNA-Läsionen sind. Wenn dem so wäre, müssten FA-Zellen gleichermaßen sensibel gegenüber Acetaldehyd und anderen DNA-Interstragvernetzenden Substanzen sein. Der genaue DNA-schädigende Mechanismus von Acetaldehyd ist Gegenstand aktueller Forschung. Acetaldehyd kann, hauptsächlich über die Reaktion mit Guaninen, ICLs ausbilden. Unter anderem können aber auch DNA-Protein-Vernetzungen (DNA-protein crosslinks, DPCs) entstehen, die ähnlich wie ICLs Replikationsgabeln blockieren.^{19 131} Im Gegensatz zur ICL-Reparatur ist der klassische FA/BRCA-Reparaturweg bei der Entfernung von DPCs vermutlich nicht beteiligt¹³², wobei einigen Berichten zufolge spezifische FA-Proteine für die Reparatur von DPCs essenziell sind.¹³³⁻¹³⁵ Möglicherweise ist dies ein erneuter Ausdruck der Überschneidung von Funktionen der FA-Proteine in verschiedenen DNA-Reparaturwegen. Die multiplen Schädigungsmechanismen von Acetaldehyd machen ihre genaue Untersuchung äußerst schwierig, dennoch wird ihre weitere Erforschung zu einem besseren Verständnis der zugrundeliegenden Ursache der FA führen.

8.4.3 Acetaldehyd induziert chromosomale Aberrationen unabhängig von hSMN1B/Apollo und FANCP/SLX4

Aufbauend auf den Kolonienbildungsstudien wurde als Nächstes untersucht, ob hSMN1B/Apollo- oder/und FANCP/SLX4-depletierte U2OS-Zellen gesteigerte Raten an chromosomalen Aberrationen nach Acetaldehyd-Behandlung aufweisen. Wie bei der Untersuchung der Monoubiquitinierung von FANCD2 wurden die Zellen dafür über einen Zeitraum von 24 h mit 1 mM Acetaldehyd behandelt. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen zunächst eindeutig, dass Acetaldehyd die Anzahl der Chromosomenbrüche und der aberranten Metaphasen steigert. Übereinstimmend damit gibt es in der Literatur Beschreibungen darüber,

dass Acetaldehyd in verschiedenen Zelllinien chromosomale Aberrationen induziert.¹³⁶⁻¹³⁹ Acetaldehyd wird in der Regel als „S-Phase-abhängiges“ DNA-schädigendes Agens eingestuft^{138 139}: Verursachte chromosomale Aberrationen sind erst sichtbar, nachdem die betroffenen Zellen eine S-Phase mit Replikation ihrer DNA durchlaufen haben. Dies ist darauf zurückzuführen, dass S-Phase-abhängige Agenzien im Gegensatz zu S-Phase-unabhängigen Agenzien keine direkten strukturellen Veränderungen am Chromatin, wohl aber diverse DNA-Läsionen, verursachen. Durch eine fehlerhafte Replikation der geschädigten DNA kommt es zur Ausbildung von Veränderungen, die nur ein Schwesterchromatid betreffen (Chromatidaberrationen). Im Gegensatz dazu können S-Phase-unabhängige Agenzien strukturelle Veränderungen der DNA induzieren, die durch eine fehlerhafte Reparatur je nach Zellzyklusphase Chromatidaberrationen oder Chromosomenaberrationen hervorrufen.^{140 141} Im hier durchgeführten Experiment wurden in den U2OS-Zellen nach Acetaldehyd-Behandlung hauptsächlich Chromatidaberrationen beobachtet, jedoch kamen auch Chromosomenaberrationen wie dizentrische Chromosomen, Chromosomenfragmente und Chromosomenbrüche vor. Möglicherweise ist dies auf bereits vorliegende chromosomale Veränderungen der U2OS-Zellen zurückzuführen, denn bei der Krebszelllinie sind anormale Chromosomen bekannt.¹⁴² Allerdings können primäre Chromatidaberrationen auch beim Durchlaufen der nächsten Replikation in sekundäre Chromosomenaberrationen umgewandelt werden, wodurch unter anderem dizentrische Chromosomen entstehen.^{140 143} Zudem gibt es auch in der Literatur Beschreibungen von Chromosomenaberrationen, die auf Acetaldehyd-bedingte DNA-Schäden zurückgeführt werden.^{99 137} Die hier beobachteten Chromosomenaberrationen und der bekannte S-Phase-abhängige DNA-Schädigungsmechanismus von Acetaldehyd schließen sich also nicht gegenseitig aus.

Überraschenderweise stieg die Anzahl der Bruchereignisse und der aberranten Metaphasen nach Acetaldehyd-Behandlung bei den Kontrollzellen und bei den hSNM1B/Apollo- oder/und FANCP/SLX4-depletierten Zellen gleichermaßen an, es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden. In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen gehen Störungen des FA/BRCA-Reparaturwegs in der Regel mit vermehrten chromosomalen Aberrationen nach Acetaldehyd-Exposition einher, in Tabelle 14 sind die Ergebnisse dieser Studien und die der vorliegenden Arbeit zusammengefasst.

Tabelle 14 Zusammenfassung von Untersuchungen zur chromosomalen Instabilität von verschiedenen FA-Protein- und hSNM1B/Apollo-defizienten Zelllinien nach Acetaldehyd-Behandlung. Angegeben sind die verwendete Zelllinie, das mutierte oder in der Expression gestörte Gen und das Vorliegen von chromosomaler Instabilität. +: Instabilität, -: keine Instabilität.

Zelllinie	Gen	Chromosomale Instabilität	Quelle
Menschliche FA-Lymphozyten	Keine Angabe	+	<i>Obe et al.</i> ¹³⁶
Menschliche Fibroblasten	<i>FANCA</i>	+	<i>Marietta et al.</i> ⁷⁵
CHO	<i>FANCG</i>	+	<i>Mechilli et al.</i> ¹³⁸
DLD1	<i>FANCN</i>	+	<i>Ghosh et al.</i> ⁹⁹
DLD1	<i>FANCD1</i>	+	<i>Ghosh et al.</i> ⁹⁹
U2OS	<i>FANCP/SLX4</i>	-	vorliegende Arbeit
U2OS	<i>hSNM1B/Apollo</i>	-	vorliegende Arbeit

CHO: Chinesische Hamster-Ovarienzellen, DLD1: Menschliche Kolon-Adenokarzinomzellen, U2OS: Menschliche Osteosarkomzellen.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeiten und dem Ergebnis der Kolonienbildungsstudien, in denen sich eine signifikante Acetaldehyd-Hypersensitivität für FANCP/SLX4-depletierte Zellen zeigte, wurde bei der Analyse der chromosomalen Aberrationen erwartet, dass sich auch hier die FANCP/SLX4-depletierten Zellen signifikant von den Kontrollzellen unterscheiden würden. Es gibt mehrere Erklärungsansätze, warum das nicht der Fall ist: Das eigentlich Überraschende an den Resultaten besteht darin, dass die Kontrollzellen eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber Acetaldehyd aufweisen. Möglicherweise liegt die Ursache dessen in der verwendeten Konzentration des Aldehyds. *Obe et al.* und *Marietta et al.*^{75 136} behandelten ihre zu untersuchenden Zellen nur mit 0,18 mM Acetaldehyd über einen Zeitraum von 24 h, *Mechilli et al.*¹³⁸ verwendeten Konzentrationen zwischen 0,3-3,6 mM über 2 h. Eventuell wirkt das hier eingesetzte 1 mM Acetaldehyd über 24 h bereits so toxisch, dass auch die gesunden Kontrollzellen massiv geschädigt werden und keine Unterschiede zwischen ihnen und den Depletionszellen gemessen werden können. Dagegen spricht, dass *Ghosh et al.*⁹⁹ eine Behandlung mit 1 mM Acetaldehyd über 72 h durchgeführt haben und trotzdem eine entsprechende Differenzierung bei der Analyse der Chromosomenaberrationen vornehmen konnten. Auch hier muss allerdings wieder bedacht werden, dass diese Experimente mit unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt wurden und demnach nur eingeschränkt vergleichbar sind; eventuell weisen U2OS-Zellen schon eine inerte Acetaldehyd-Sensitivität auf, die die gewonnenen Ergebnisse verzerrt. Die Wahl der Zellreihe in diesem Experiment muss kritisch betrachtet werden. Da sowohl für die FANCD2-Monoubiquitinierungsstudien als auch für die Kolonienbildungsstudien nach Acetaldehyd-Behandlung U2OS-Zellen verwendet wurden, wurden diese Zellen auch für die Chromosomenbrüchigkeitssanalysen eingesetzt. Wie bereits erläutert sind U2OS-Zellen Osteosarkom-Zellen und weisen schon vor der Behandlung mit

Mutagenen anormale Chromosomen auf.¹⁴² Zwar kam es nach Acetaldehyd-Exposition der Zellen zu einer Steigerung der Anzahl der aberranten Metaphasen, eventuell wurden jedoch die Ergebnisse dieser Untersuchungen durch ein Hintergrundrauschen an chromosomalen Aberrationen verfälscht. Außerdem muss auch bei diesem Versuchsaufbau angemerkt werden, dass die *hSNM1B/Apollo*- oder/und *FANCP/SLX4*-Depletion über RNA-Interferenz vorgenommen wurde und somit nicht ganz vollständig ist. Aufgrund der vergleichsweise milden Acetaldehyd-Sensitivität der *FANCP/SLX4*-depletierten Zellen kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine vollständige Protein-Depletion eine signifikante Steigerung von aberranten Metaphasen bei *FANCP/SLX4*-Nullmutanten - und womöglich sogar bei *hSNM1B/Apollo*-Nullmutanten - nach Acetaldehyd-Behandlung bedingen könnte. Es besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass die Sensitivität der untersuchten Depletionszellen gegenüber Acetaldehyd so moderat ist, dass es tatsächlich nicht zu einer signifikant gesteigerten chromosomalen Brüchigkeit nach einer Exposition kommt. Eine Wiederholung dieses Versuchs mit *hSNM1B/Apollo*- und *FANCP/SLX4*-Nullmutanten unter Verwendung verschiedener Acetaldehyd-Konzentrationen und anderen Zelllinien ist in jedem Fall sinnvoll.

8.5 Dizentrische Chromosomen bei *hSNM1B/Apollo*-depletierten U2OS-Zellen

Bei den oben im Detail besprochenen Chromosomenbrüchigkeitsanalysen fiel als Nebenfund auf, dass *hSNM1B/Apollo*-depletierte U2OS-Zellen vermehrt dizentrische Chromosomen aufwiesen. Die statistische Auswertung zeigte, dass es sich dabei tatsächlich um eine signifikante Erhöhung handelt – interessanterweise jedoch nur nach *hSNM1B/Apollo*-Depletion, nicht nach gleichzeitiger *hSNM1B/Apollo*- und *FANCP/SLX4*-Depletion.

Generell können dizentrische Chromosomen in zwei Gruppen eingeteilt werden. Bei der einen Gruppe liegt in der analysierten Metaphase zusätzlich ein azentrisches Chromosom vor. Hier besteht die Ursache in einem Bruchereignis an bei zwei nah beieinander liegenden Ein-Chromatid-Chromosomen während der G1-Phase des Zellzyklus. Diese Chromatidbrüche resultieren in zwei Chromatidfragmenten und zwei verkürzten Chromosomen mit jeweils einem Zentromer. Im Verlauf der DNA-Reparatur kann es zu Translokationsereignissen dieser Bruchstücke kommen. So können entweder die Chromatidfragmente mit dem jeweils anderen verkürzten Fragment fusionieren oder ein Zwei-Zentromer-Chromatid und ein Fusionsprodukt der Chromatidfragmente entstehen. Durchlaufen die Produkte des zweiten Falls die S-Phase, so entsteht ein dizentrisches Chromosom und ein azentrisches Fragment. Dizentrische Chromosomen können auch durch die Fusion der Telomere entstehen. Dies ist auf eine

Dysfunktion der Chromosomenenden zurückzuführen, die eine Verknüpfung zweier Telomere ermöglicht. In diesem Fall entsteht nach dem Durchlaufen der S-Phase nur ein dizentrisches Chromosom, ein azentrisches Fragment ist nicht zu finden.⁴ Da in den hier untersuchten Zellen keine azentrischen Fragmente gefunden wurden, ist die Entstehung der dizentrischen Chromosomen nach hSNM1B/Apollo-Depletion am ehesten auf Telomerfusionen zurückzuführen.

Die Telomere von Wirbeltieren bestehen aus einer hochrepetitiven 5'-TTAGGG-3'-Sequenz, die in einem einzelsträngigen Überhang dieser Wiederholungssequenz am 3'-Ende endet. Dieser 3'-Überhang ist maßgeblich am Schutz der Telomere beteiligt. Dies ist notwendig, da Telomere aufgrund ihrer Struktur fälschlicherweise als DNA-Schäden erkannt und durch die zellulären Reparaturprozesse geschädigt werden können. Durch eine Invasion des 3'-Einzelstrangüberhangs in die doppelsträngige DNA der Telomere kommt es zur Ausbildung einer sogenannten „t-loop“-Struktur. Telomere binden außerdem den Shelterin-Proteinkomplex, zu dem unter anderem der hSNM1B/Apollo-Bindungspartner TRF2 gehört. Gemeinsam verhindern diese Strukturen das Binden verschiedener NHEJ-Proteine und die Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoints.¹⁴⁴ hSNM1B/Apollo ist maßgeblich an der Bereitstellung des 3'-Eizelstrangüberhangs von neu-synthetisierten Leitstrang-Telomeren beteiligt.^{92 93}

Vermehrte Telomerfusionen sind bei Zellen, deren TRF2-Protein nicht funktionsfähig ist, bekannt.¹⁴⁵ *Lenain et al.*⁸⁹ zeigten, dass eine Depletion von hSNM1B/Apollo mittels siRNA in gesunden Zellen zu einer milden Destabilisierung der Telomere führt. In TRF2-defizienten Zellen führt eine hSNM1B/Apollo-Depletion jedoch zu einer signifikanten Zunahme an Telomerfusionen. *Wu et al.* und *Lam et al.*^{92 93} beschrieben einen starken Anstieg von Telomerfusionen in embryonalen *mSnm1b/Apollo*^{-/-} Fibroblasten der Maus auch bei intaktem TRF2. Zudem gelang der Nachweis, dass eine hSNM1B/Apollo-Depletion spezifisch Fusionen der Leitstrang-Telomere hervorruft, die Telomere des Folgestrangs bleiben weitestgehend unbeschädigt. Diese Beobachtung stimmt mit der Beschreibung überein, dass hSNM1B/Apollo an der Bereitstellung des 3'-Einzelstrangüberhangs von Leitstrang-Telomeren beteiligt ist und speziell ihren Schutz gewährleistet, während die Folgestrang-Telomere andere Schutzmechanismen besitzen.^{92 93} Die hier beobachteten dizentrischen Chromosomen in hSNM1B/Apollo-depletierten Zellen sind demnach am ehesten sekundär durch die Duplikation von Chromatidfusionen dysfunktionaler Leitstrang-Telomere entstanden. Ihre Inzidenz hängt somit nur teilweise von dem Ausmaß der hSNM1B/Apollo-Depletion ab, ein weiterer wichtiger Faktor ist die Teilungsrate der Zellen. Eventuell liegt darin der Grund, warum die Zellen nach

gleichzeitiger hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-Depletion keine signifikant erhöhte Anzahl von dizentrischen Chromosomen aufwiesen: Die Proliferation dieser Zellen wurde lichtmikroskopisch als deutlich schlechter eingeschätzt, was vermutlich auf den Mangel zweier wichtiger DNA-Reparaturproteine zurückzuführen ist. Eventuell kam es hier also zu einem Anstieg an Chromatidfusionen, aufgrund der niedrigen Teilungsrate der Zellen entstanden jedoch weniger dizentrische Chromosomen.

Der Nachweis von Telomerfusionen erfolgt normalerweise mittels der molekularzytogenetischen Methode FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung). Hierbei wird eine Telomer-spezifische Sonde eingesetzt, um die Chromosomenenden in fixierten Metaphasen sichtbar zu machen. Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analyse von Giemsa-gefärbten Metaphasen können Telomerfusionen bei weitem nicht so sicher nachgewiesen werden. Die hier gefundene Häufung von dizentrischen Chromosomen in hSNM1B/Apollo-depletierten U2OS-Zellen kann also nur als Hinweis auf mögliche Fusionsereignisse gewertet werden, der mit den Beschreibungen aus der Literatur gut vereinbar wäre. Eine Wiederholung dieser Untersuchung mittels FISH würde genauere Aussagen bezüglich der Fusionsereignisse in hSNM1B/Apollo- und FANCP/SLX4-depletierten U2OS-Zellen erlauben.

8.6 Telomerdysfunktion bei hSNM1B/Apollo-depletierten U2OS-Zellen

Um zu überprüfen, ob eine hSNM1B/Apollo-Depletion in U2OS-Zellen tatsächlich zu einer Destabilisierung der Telomere führt, durch die Telomerfusionen entstehen könnten, wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie auf Telomerdysfunktion-induzierte Foci (TIFs) untersucht. Diese Foci entstehen durch eine Ansammlung von DNA-Schadensreparaturfaktoren wie 53BP1, γ H2AX, Rad17, ATM oder Mre11 an den Telomeren.¹⁴⁶ In der vorliegenden Arbeit wurden TIFs als Ko-Lokalisation von γ H2AX- und TRF1-Foci definiert, wobei TRF1 als Telomermarker diente. γ H2AX entsteht durch die ATM-bedingte Phosphorylierung von H2AX und ist eins der frühesten nachweisbaren Ereignisse der zellulären DNA-Schadensantwort.¹⁴⁷ Tatsächlich führte die hSNM1B/Apollo-Depletion zu einem signifikanten Anstieg der Zellen, die zwei oder mehr TIFs aufweisen. Diese Beobachtung stimmt mit ähnlichen Beschreibungen in der Literatur überein^{89 90 93 148} und bestätigt, dass ein Mangel an hSNM1B/Apollo in U2OS-Zellen eine Destabilisierung der Telomere bedingt. Die oben beschriebenen dizentrischen Chromosomen in hSNM1B/Apollo-depletierten U2OS-Zellen könnten also durchaus durch Telomerfusionen entstanden sein. Zusätzlich konnte hier gezeigt werden, dass die Depletion von hSNM1B/Apollo trotz der Zunahme der TRF1-assoziierten γ H2AX-Foci zu einer signifikanten

Abnahme von γ H2AX-Foci führte. Auch im Western Blot wurde eine Reduktion von γ H2AX nach hSNM1B/Apollo-Depletion sowohl in unbehandelten als auch in mit ionisierender Strahlung behandelten Zellen beobachtet, was auf eine verminderte Aktivierung von ATM bei hSNM1B/Apollo-Mangel zurückgeführt wurde. Daraus wurde geschlossen, dass hSNM1B/Apollo im Rahmen der DNA-Reparatur die Aktivierung von ATM stimuliert.⁸⁵ Interessanterweise wies eine andere Arbeitsgruppe nach, dass hSNM1B/Apollo in der frühen S-Phase des Zellzyklus an der Unterdrückung einer ATM-vermittelten DNA-Schadensantwort an den Telomeren beteiligt ist. Zugleich konnte gezeigt werden, dass Zellen mit einer Mutation in *TRF2*, die eine Interaktion des entsprechenden Proteins mit hSNM1B/Apollo verhindert, bezüglich der TIFs einen ähnlichen Phänotyp aufweisen wie hSNM1B/Apollo-depletierte Zellen.⁹³ Womöglich lassen sich diese widersprüchlichen Beschreibungen der Bedeutung von hSNM1B/Apollo für die ATM-Aktivierung mit der dualen Rolle des Proteins in der DNA-Reparatur und dem Schutz der Telomere begründen: Während hSNM1B/Apollo bei der DNA-Reparatur an der Aktivierung von ATM beteiligt ist, wird eben diese an den Telomeren durch die Bindung des Proteins an TRF2 verhindert.

9 Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse liefern Anstöße für Untersuchungen, die zur weiterführenden Beantwortung der hier bearbeiteten Fragestellungen sowie zur Erweiterung des Wissens über die Funktion von hSNM1B/Apollo im FA/BRCA-Reparaturweg beitragen können.

Die Eingrenzung der Domänen von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4, die für die gegenseitige Bindung notwendig sind, gestaltete sich hier aufgrund der sehr komplexen Interaktion der Proteine schwierig. Wie oben erläutert ist es wahrscheinlich, dass zumindest ein Teil der Bindung auf post-translationalen Modifikationen basiert, die bei der *in-vitro* Translation im Weizenextraktsystem nicht reproduziert werden konnten. Eine Wiederholung der Ko-Immunopräzipitationsstudien mit *in-vitro* translatierten Proteinen unter Verwendung eines Expressionssystem aus menschlichen Zellen wäre von großem Interesse, da so eventuelle PTMs adäquat erfolgen würden. Des Weiteren könnte eine gezielte Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System vorgenommen werden. Dieses System macht sich einen Hefe-Transkriptionsfaktor zunutze, der aus zwei Domänen besteht: einer DNA-bindenden Domäne und einer Aktivierungsdomäne. Jeweils eine dieser Domänen wird an eines der zu untersuchenden Proteine fusioniert und die Bildung der Fusionsproteine in

Hefezellen induziert. Kommen die Domänen aufgrund einer direkten Interaktion der Proteine in enge räumliche Nähe, so ist der Transkriptionsfaktor funktionsfähig und erlaubt die Transkription verschiedener Reportergene.^{149 150} Eine Bestätigung der Interaktion von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 im Hefe-Zwei-Hybrid-System würde also auf eine direkte Interaktion der Proteine hinweisen. Durch die Verwendung der hier eingesetzten Protein-Teilstücke könnte diese zudem kartiert werden. Eine weitere Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen ist der Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET). Hierbei wird an eines der zu untersuchenden Proteine ein Fluoreszenzfarbstoff und an das andere Protein eine Biolumineszenzquelle fusioniert. Kommen die Proteine in enge räumliche Nähe, wird Biolumineszenz-Energie auf den Fluoreszenzfarbstoff übertragen. Die entstandene Fluoreszenz kann anschließend gemessen werden.^{151 152} Ein Vorteil der BRET-Methode ist, dass es sich um einen Lebendzellen-Assay handelt und die Protein-Protein-Interaktion in menschlichen Zellen untersucht werden kann. Auch diese Methode könnte zur Bestätigung einer direkten Bindung und zur Kartierung der Interaktionsdomänen von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4 eingesetzt werden.

Die Untersuchungen zur Acetaldehyd-Sensitivität von hSNM1B/Apollo-depletierten U2OS-Zellen lieferten hier überraschenderweise das Ergebnis, dass eine Depletion des Proteins nicht zu einer gesteigerten Empfindlichkeit der Zellen führt. Um sicherzugehen, dass die nach RNA-Interferenz vorhandene Restmenge von hSNM1B/Apollo nicht ausreicht, um eine gesteigerte Acetaldehyd-Sensitivität zu verhindern, könnten die Untersuchungen mit *hSNM1B/Apollo*-Nullmutanten wiederholt werden. Embryonale Fibroblasten der Maus mit Nullmutationen in dem entsprechenden Gen wurden bereits erfolgreich hergestellt^{92 93}, diese könnten für eine solche Untersuchung verwendet werden. Allerdings wäre es noch aussagekräftiger, die Analysen an menschlichen Zellen durchzuführen. Zur Erzeugung entsprechender Nullmutanten könnte die CRISPER/Cas-Technologie eingesetzt werden. Diese bahnbrechende neue Methode erlaubt es, DNA hochspezifisch zu verändern.¹⁵³ Sollten menschliche *hSNM1B/Apollo*-Nullmutanten lebensfähig sein, würden sie eine Grundlage für viele weitere Untersuchungen zur Funktion des Proteins bieten und somit zur weiteren Erforschung der Mechanismen der DNA-Reparatur und der Aufrechterhaltung der Telomerintegrität beitragen.

10 Literaturverzeichnis

1. Lindahl T, Barnes DE. Repair of endogenous DNA damage. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology 2000;**65**:127-33.
2. Hoeijmakers JHJ. DNA Damage, Aging, and Cancer. New England Journal of Medicine 2009;**361**(15):1475-85.
3. Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. Nat Rev Mol Cell Biol 2008;**9**(4):297-308.
4. Morgan DO. *The Cell Cycle: Principles of Control*. London: New Science Press Ltd, 2007.
5. Lodish H BA, Zipursky SL, et al. . *Molecular Cell Biology. 4th edition*. New York: W. H. Freeman, 2000.
6. Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. Nat Rev Mol Cell Biol 2008;**9**(8):616-27.
7. Wang H, Zhang X, Teng L, et al. DNA damage checkpoint recovery and cancer development. Experimental Cell Research 2015;**334**(2):350-58.
8. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature 2009;**461**(7267):1071-8.
9. Riley T, Sontag E, Chen P, et al. Transcriptional control of human p53-regulated genes. Nat Rev Mol Cell Biol 2008;**9**(5):402-12.
10. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. Nat Rev Cancer 2003;**3**(3):155-68.
11. Helleday T, Eshtad S, Nik-Zainal S. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. Nat Rev Genet 2014;**15**(9):585-98.
12. Sasaki MS, Tonomura A. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. Cancer Res 1973;**33**(8):1829-36.
13. Williams HL, Gottesman ME, Gautier J. The differences between ICL repair during and outside of S phase. Trends in Biochemical Sciences 2013;**38**(8):386-93.
14. Zhang J, Dewar JM, Budzowska M, et al. DNA interstrand cross-link repair requires replication-fork convergence. Nat Struct Mol Biol 2015;**22**(3):242-47.
15. Huang J, Liu S, Bellani MA, et al. The DNA translocase FANCM/MHF promotes replication traverse of DNA interstrand crosslinks. Molecular cell 2013;**52**(3):434-46.
16. Kottemann MC, Smogorzewska A. Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. Nature 2013;**493**(7432):356-63.
17. Sengerova B, Wang AT, McHugh PJ. Orchestrating the nucleases involved in DNA interstrand cross-link (ICL) repair. Cell cycle 2011;**10**(23):3999-4008.
18. Clauson C, Schärer OD, Niedernhofer L. Advances in Understanding the Complex Mechanisms of DNA Interstrand Cross-Link Repair. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2013;**5**(10):a012732.
19. Duxin JP, Walter JC. What is the DNA repair defect underlying Fanconi anemia? Current Opinion in Cell Biology 2015;**37**:49-60.
20. Haynes B. Crosstalk between Translesion Synthesis, Fanconi Anemia Network, and Homologous Recombination Repair Pathways in Interstrand DNA Crosslink Repair and Development of Chemoresistance. 2015;**763**:258-66.
21. Schärer OD. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2013;**5**(10):a012609.
22. Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, et al. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. Nat Rev Mol Cell Biol 2014;**15**(7):465-81.
23. Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. Trends in Cell Biology 2016;**26**(1):52-64.

24. Heyer W-D, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual review of genetics* 2010;**44**:113-39.
25. Schwartz EK, Heyer W-D. Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma* 2011;**120**(2):109-27.
26. Aparicio T, Baer R, Gautier J. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA repair* 2014;**19**:169-75.
27. Fanconi G. Familiäre infantile perniziösartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). 1927.
28. Dong H, Nebert DW, Bruford EA, et al. Update of the human and mouse Fanconi anemia genes. *Human Genomics* 2015;**9**(1):1-10.
29. Longerich S, Li J, Xiong Y, et al. Stress and DNA repair biology of the Fanconi anemia pathway. *Blood* 2014;**124**(18):2812-9.
30. Alter BP KG. Fanconi Anemia. GeneReviews [Internet]. 2002 Feb 14 [Updated 2013 Feb 7] ed. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 2013.
31. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 2003;**101**(4):1249-56.
32. Tamary H, Nishri D, Yacobovich J, et al. Frequency and natural history of inherited bone marrow failure syndromes: the Israeli Inherited Bone Marrow Failure Registry. *Haematologica* 2010;**95**(8):1300-07.
33. Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood* 2003;**101**(3):822-26.
34. Rosenberg PS, Alter BP, Ebell W. Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry. *Haematologica* 2008;**93**(4):511-17.
35. Rosenberg PS, Socié G, Alter BP, et al. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood* 2005;**105**.
36. Alter BP, Giri N, Savage SA, et al. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. *British journal of haematology* 2010;**150**(2):179-88.
37. Risitano AM, Marotta S, Calzone R, et al. Twenty years of the Italian Fanconi Anemia Registry: where we stand and what remains to be learned. *Haematologica* 2015.
38. Chao MM, Ebell W, Bader P, et al. Consensus of German Transplant Centers on Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Fanconi Anemia. *Klin Padiatr* 2015;**227**(03):157-65.
39. Shukla P, Ghosh K, Vundinti BR. Current and emerging therapeutic strategies for Fanconi anemia. *The HUGO Journal* 2012;**6**(1):1-8.
40. Alan D, D'Andrea MD. The Fanconi Anemia and Breast Cancer Susceptibility Pathways. *The New England journal of medicine* 2010;**362**(20):1909-19.
41. Huang M, Kim JM, Shiotani B, et al. The FANCM/FAAP24 Complex Is Required for the DNA Interstrand Crosslink-Induced Checkpoint Response. *Molecular cell* 2010;**39**(2):259-68.
42. Wang Y, Leung Justin W, Jiang Y, et al. FANCM and FAAP24 Maintain Genome Stability via Cooperative as Well as Unique Functions. *Molecular cell* 2013;**49**(5):997-1009.
43. Pichierri P, Rosselli F. The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR–CHK1 and ATR–NBS1–FANCD2 pathways. *The EMBO journal* 2004;**23**(5):1178-87.
44. Sato K, Ishiai M, Toda K, et al. Histone chaperone activity of Fanconi anemia proteins, FANCD2 and FANCI, is required for DNA crosslink repair. *The EMBO journal* 2012;**31**(17):3524-36.

45. Nijman SMB, Huang TT, Dirac AMG, et al. The Deubiquitinating Enzyme USP1 Regulates the Fanconi Anemia Pathway. *Molecular cell* 2005;**17**(3):331-39.
46. Vare D, Groth P, Carlsson R, et al. DNA interstrand crosslinks induce a potent replication block followed by formation and repair of double strand breaks in intact mammalian cells. *DNA repair* 2012;**11**(12):976-85.
47. Wang AT, Smogorzewska A. SnapShot: Fanconi Anemia and Associated Proteins. *Cell* 2015;**160**(1-2):354-54.e1.
48. Hodskinson Michael RG, Silhan J, Crossan Gerry P, et al. Mouse SLX4 Is a Tumor Suppressor that Stimulates the Activity of the Nuclease XPF-ERCC1 in DNA Crosslink Repair. *Molecular cell* 2014;**54**(3):472-84.
49. Kashiyama K, Nakazawa Y, Pilz Daniela T, et al. Malfunction of Nuclease ERCC1-XPF Results in Diverse Clinical Manifestations and Causes Cockayne Syndrome, Xeroderma Pigmentosum, and Fanconi Anemia. *The American Journal of Human Genetics* 2013;**92**(5):807-19.
50. Bogliolo M, Schuster B, Stoepker C, et al. Mutations in *ERCC4*, Encoding the DNA-Repair Endonuclease XPF, Cause Fanconi Anemia. *The American Journal of Human Genetics* 2013;**92**(5):800-06.
51. Larin M, Gallo D, Tamblyn L, et al. Fanconi anemia signaling and Mus81 cooperate to safeguard development and crosslink repair. *Nucleic Acids Research* 2014;**42**(15):9807-20.
52. Castor D, Nair N, Déclais A-C, et al. Cooperative Control of Holliday Junction Resolution and DNA Repair by the SLX1 and MUS81-EME1 Nucleases. *Molecular cell* 2013;**52**(2):221-33.
53. Bae JB, Mukhopadhyay SS, Liu L, et al. Snm1B/Apollo mediates replication fork collapse and S Phase checkpoint activation in response to DNA interstrand cross-links. *Oncogene* 2008;**27**(37):5045-56.
54. Svendsen JM, Smogorzewska A, Sowa ME, et al. Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell* 2009;**138**(1):63-77.
55. Fekairi S, Scaglione S, Chahwan C, et al. Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. *Cell* 2009;**138**(1):78-89.
56. Muñoz IM, Hain K, Déclais A-C, et al. Coordination of Structure-Specific Nucleases by Human SLX4/BTBD12 Is Required for DNA Repair. *Molecular cell* 2009;**35**(1):116-27.
57. Stoepker C, Hain K, Schuster B, et al. SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nature genetics* 2011;**43**(2):138-41.
58. Cybulski KE, Howlett NG. FANCP/SLX4: A Swiss army knife of DNA interstrand crosslink repair. *Cell cycle* 2011;**10**(11):1757-63.
59. Kim Y. Nuclease Delivery: Versatile Functions of SLX4/FANCP in Genome Maintenance. *Molecules and Cells* 2014;**37**(8):569-74.
60. Wan B, Yin J, Horvath K, et al. SLX4 assembles a telomere maintenance toolkit by bridging multiple endonucleases with telomeres. *Cell reports* 2013;**4**(5):861-9.
61. Wang AT, Sengerová B, Cattell E, et al. Human SNM1A and XPF-ERCC1 collaborate to initiate DNA interstrand cross-link repair. *Genes & development* 2011;**25**(17):1859-70.
62. Adamo A, Collis SJ, Adelman CA, et al. Preventing Nonhomologous End Joining Suppresses DNA Repair Defects of Fanconi Anemia. *Molecular cell* 2010;**39**(1):25-35.
63. Pace P, Mosedale G, Hodskinson MR, et al. Ku70 Corrupts DNA Repair in the Absence of the Fanconi Anemia Pathway. *Science* 2010;**329**(5988):219-23.

64. Houghtaling S, Newell A, Akkari Y, et al. Fancd2 functions in a double strand break repair pathway that is distinct from non-homologous end joining. *Human molecular genetics* 2005;**14**(20):3027-33.
65. Bunting Samuel F, Callén E, Kozak Marina L, et al. BRCA1 Functions Independently of Homologous Recombination in DNA Interstrand Crosslink Repair. *Molecular cell* 2012;**46**(2):125-35.
66. Nalepa G, Clapp DW. Fanconi anemia and the cell cycle: new perspectives on aneuploidy. *F1000Prime Reports* 2014;**6**:23.
67. Sala-Trepát M, Rouillard D, Escarceller M, et al. Arrest of S-Phase Progression Is Impaired in Fanconi Anemia Cells. *Experimental Cell Research* 2000;**260**(2):208-15.
68. Sobeck A, Stone S, Costanzo V, et al. Fanconi Anemia Proteins Are Required To Prevent Accumulation of Replication-Associated DNA Double-Strand Breaks. *Molecular and Cellular Biology* 2006;**26**(2):425-37.
69. Nalepa G, Enzor R, Sun Z, et al. Fanconi anemia signaling network regulates the spindle assembly checkpoint. *The Journal of Clinical Investigation* 2013;**123**(9):3839-47.
70. Tulpule A, Lensch MW, Miller JD, et al. Knockdown of Fanconi anemia genes in human embryonic stem cells reveals early developmental defects in the hematopoietic lineage. *Blood* 2010;**115**(17):3453-62.
71. Ceccaldi R, Parmar K, Mouly E, et al. Bone Marrow Failure in Fanconi Anemia Is Triggered by an Exacerbated p53/p21 DNA Damage Response that Impairs Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell* 2012;**11**(1):36-49.
72. Ruiz S, Fernandez-Capetillo O. The Maternal Side of Fanconi Anemia. *Molecular cell* 2014;**55**(6):803-04.
73. O'Brien PJ, Siraki AG, Shangari N. Aldehyde Sources, Metabolism, Molecular Toxicity Mechanisms, and Possible Effects on Human Health. *Critical Reviews in Toxicology* 2005;**35**(7):609-62.
74. Langevin F, Crossan GP, Rosado IV, et al. Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature* 2011;**475**(7354):53-58.
75. Marietta C, Thompson LH, Lamerdin JE, et al. Acetaldehyde stimulates FANCD2 monoubiquitination, H2AX phosphorylation, and BRCA1 phosphorylation in human cells in vitro: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Mutation research* 2009;**664**(1-2):77-83.
76. Garaycochea JI, Crossan GP, Langevin F, et al. Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function. *Nature* 2012;**489**(7417):571-5.
77. Pontel Lucas B, Rosado Ivan V, Burgos-Barragan G, et al. Endogenous Formaldehyde Is a Hematopoietic Stem Cell Genotoxin and Metabolic Carcinogen. *Molecular cell* 2015;**60**(1):177-88.
78. Hira A, Yabe H, Yoshida K, et al. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood* 2013;**122**(18):3206-09.
79. Henriques JAP, Moustacchi E. Isolation and characterization of pso mutants sensitive to photo-addition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1980;**95**(2):273-88.
80. Munari FM, Guecheva TN, Bonatto D, et al. New features on Pso2 protein family in DNA interstrand cross-link repair and in the maintenance of genomic integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genetics and Biology* 2013;**60**:122-32.
81. Yan Y, Akhter S, Zhang X, et al. The multifunctional SNM1 gene family: not just nucleases. *Future oncology (London, England)* 2010;**6**(6):1015-29.

82. Demuth I, Digweed M, Concannon P. Human SNM1B is required for normal cellular response to both DNA interstrand crosslink-inducing agents and ionizing radiation. *Oncogene* 2004;**23**(53):8611-8.
83. Liu L, Akhter S, Bae JB, et al. SNM1B/Apollo interacts with astrin and is required for the prophase cell cycle checkpoint. *Cell cycle* 2009;**8**(4):628-38.
84. Mason JM, Sekiguchi JM. Snm1B/Apollo functions in the Fanconi anemia pathway in response to DNA interstrand crosslinks. *Human molecular genetics* 2011;**20**(13):2549-59.
85. Demuth I, Bradshaw PS, Lindner A, et al. Endogenous hSNM1B/Apollo interacts with TRF2 and stimulates ATM in response to ionizing radiation. *DNA repair* 2008;**7**(8):1192-201.
86. Anders M, Mattow J, Digweed M, et al. Evidence for hSNM1B/Apollo functioning in the HSP70 mediated DNA damage response. *Cell cycle* 2009;**8**(11):1725-32.
87. Mason JM, Das I, Arlt M, et al. The SNM1B/APOLLO DNA nuclease functions in resolution of replication stress and maintenance of common fragile site stability. *Human molecular genetics* 2013;**22**(24):4901-13.
88. Freibaum BD, Counter CM. hSnm1B Is a Novel Telomere-associated Protein. *Journal of Biological Chemistry* 2006;**281**(22):15033-36.
89. Lenain C, Bauwens S, Amiard S, et al. The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair. *Current biology : CB* 2006;**16**(13):1303-10.
90. van Overbeek M, de Lange T. Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase. *Current biology : CB* 2006;**16**(13):1295-302.
91. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development* 2005;**19**(18):2100-10.
92. Lam YC, Akhter S, Gu P, et al. SNM1B/Apollo protects leading-strand telomeres against NHEJ-mediated repair. *The EMBO journal* 2010;**29**(13):2230-41.
93. Wu P, van Overbeek M, Rooney S, et al. Apollo contributes to G overhang maintenance and protects leading-end telomeres. *Molecular cell* 2010;**39**(4):606-17.
94. Akhter S, Lam YC, Chang S, et al. The telomeric protein SNM1B/Apollo is required for normal cell proliferation and embryonic development. *Aging cell* 2010;**9**(6):1047-56.
95. Touzot F, Callebaut I, Soulier J, et al. Function of Apollo (SNM1B) at telomere highlighted by a splice variant identified in a patient with Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;**107**(22):10097-102.
96. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 1979;**7**(6):1513-23.
97. Salewsky B, Schmiester M, Schindler D, et al. The nuclease hSNM1B/Apollo is linked to the Fanconi anemia pathway via its interaction with FANCP/SLX4. *Human molecular genetics* 2012;**21**(22):4948-56.
98. Gravells P, Hoh L, Solovieva S, et al. Reduced FANCD2 influences spontaneous SCE and RAD51 foci formation in uveal melanoma and Fanconi anaemia. *Oncogene* 2013;**32**(46):5338-46.
99. Ghosh S, Sur S, Yerram SR, et al. Hypersensitivities for acetaldehyde and other agents among cancer cells null for clinically relevant Fanconi anemia genes. *The American journal of pathology* 2014;**184**(1):260-70.
100. Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, et al. Interaction of the Fanconi Anemia Proteins and BRCA1 in a Common Pathway. *Molecular cell* 2001;**7**(2):249-62.
101. Ponten J, Saksela E. Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *International Journal of Cancer* 1967;**2**(5):434-47.
102. Kimple ME, Brill AL, Pasker RL. Overview of Affinity Tags for Protein Purification. *Current Protocols in Protein Science: John Wiley & Sons, Inc., 2001.*

103. Skube SB, Chaverri JM, Goodson HV. Effect of GFP tags on the localization of EB1 and EB1 fragments in vivo. *Cytoskeleton (Hoboken, Nj)* 2010;**67**(1):1-12.
104. Garner E, Smogorzewska A. Ubiquitylation and the Fanconi anemia pathway. *FEBS Letters* 2011;**585**(18):2853-60.
105. Lachaud C, Castor D, Hain K, et al. Distinct functional roles for the two SLX4 ubiquitin-binding UBZ domains mutated in Fanconi anemia. *Journal of Cell Science* 2014;**127**(13):2811-17.
106. Yamamoto KN, Kobayashi S, Tsuda M, et al. Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;**108**(16):6492-96.
107. Ouyang J, Garner E, Hallet A, et al. Noncovalent Interactions with SUMO and Ubiquitin Orchestrate Distinct Functions of the SLX4 Complex in Genome Maintenance. *Molecular cell* 2015;**57**(1):108-22.
108. Guervilly J-H, Takedachi A, Naim V, et al. The SLX4 Complex Is a SUMO E3 Ligase that Impacts on Replication Stress Outcome and Genome Stability. *Molecular cell* 2015;**57**(1):123-37.
109. Consortium TU. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research* 2015;**43**(D1):D204-D12.
110. Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 2007;**35**(suppl 1):D5-D12.
111. Harbers M. Wheat germ systems for cell-free protein expression. *FEBS Letters* 2014;**588**(17):2762-73.
112. Nguyen TN, Goodrich JA. Protein-protein interaction assays: eliminating false positive interactions. *Nature methods* 2006;**3**(2):135-9.
113. Zemella A, Thoring L, Hoffmeister C, et al. Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems. *ChemBioChem* 2015;**16**(17):2420-31.
114. Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;**7**(6):391-403.
115. Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, et al. Polymeric Chains of SUMO-2 and SUMO-3 Are Conjugated to Protein Substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *Journal of Biological Chemistry* 2001;**276**(38):35368-74.
116. Stringer JR, Counter CM. Snm1B interacts with PSF2. *PLoS One* 2012;**7**(11):e49626.
117. Bradshaw PS, Stavropoulos DJ, Meyn MS. Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nature genetics* 2005;**37**(2):193-97.
118. Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, et al. The Telomeric Protein TRF2 Binds the ATM Kinase and Can Inhibit the ATM-Dependent DNA Damage Response. *PLoS Biol* 2004;**2**(8):e240.
119. Mao Z, Seluanov A, Jiang Y, et al. TRF2 is required for repair of nontelomeric DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007;**104**(32):13068-73.
120. Leteurtre F, Li X, Guardiola P, et al. Accelerated telomere shortening and telomerase activation in Fanconi's anaemia. *British Journal of Haematology* 1999;**105**(4):883-93.
121. Hanson H, Mathew CG, Docherty Z, et al. Telomere shortening in Fanconi anaemia demonstrated by a direct FISH approach. *Cytogenetic and Genome Research* 2001;**93**(3-4):203-06.
122. Callén E, Samper E, Ramírez MJ, et al. Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia. *Human molecular genetics* 2002;**11**(4):439-44.

123. Sarkar J, Wan B, Yin J, et al. SLX4 contributes to telomere preservation and regulated processing of telomeric joint molecule intermediates. *Nucleic Acids Research* 2015;**43**(12):5912-23.
124. Joksic I, Vujic D, Guc-Scekic M, et al. Dysfunctional telomeres in primary cells from Fanconi anemia FANCD2 patients. *Genome integrity* 2012;**3**(1):6.
125. Wilson Jamie SJ, Tejera Agueda M, Castor D, et al. Localization-Dependent and -Independent Roles of SLX4 in Regulating Telomeres. *Cell reports* 2013;**4**(5):853-60.
126. Wang M, McIntee EJ, Cheng G, et al. Identification of DNA Adducts of Acetaldehyde. *Chemical Research in Toxicology* 2000;**13**(11):1149-57.
127. Brooks PJ, Theruvathu JA. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol* 2005;**35**(3):187-93.
128. Kurtz AJ, Lloyd RS. 1,N 2-Deoxyguanosine Adducts of Acrolein, Crotonaldehyde, and trans-4-Hydroxynonenal Cross-link to Peptides via Schiff Base Linkage. *Journal of Biological Chemistry* 2003;**278**(8):5970-76.
129. Homann N, Jousimies-Somer H, Jokelainen K, et al. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: methodological aspects and pathogenetic implications. *Carcinogenesis* 1997;**18**(9):1739-43.
130. Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, et al. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood* 1997;**90**(9):3691-8.
131. Stinglee J, Habermann B, Jentsch S. DNA & protein crosslink repair: proteases as DNA repair enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*; **40**(2):67-71.
132. Duxin Julien P, Dewar James M, Yardimci H, et al. Repair of a DNA-Protein Crosslink by Replication-Coupled Proteolysis. *Cell* 2014;**159**(2):346-57.
133. Nakano T, Katafuchi A, Matsubara M, et al. Homologous Recombination but Not Nucleotide Excision Repair Plays a Pivotal Role in Tolerance of DNA-Protein Crosslinks in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 2009;**284**(40):27065-76.
134. Orta ML, Calderón-Montaña JM, Domínguez I, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine causes replication lesions that require Fanconi anemia-dependent homologous recombination for repair. *Nucleic Acids Research* 2013;**41**(11):5827-36.
135. Ridpath JR, Nakamura A, Tano K, et al. Cells Deficient in the FANC/BRCA Pathway Are Hypersensitive to Plasma Levels of Formaldehyde. *Cancer Research* 2007;**67**(23):11117-22.
136. Obe G, Natarajan AT, Meyers M, et al. Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood in vitro, and of SCEs in bone-marrow cells of mice in vivo by ethanol and its metabolite acetaldehyde. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 1979;**68**(3):291-94.
137. Bird RP, Draper HH, Basrur PK. Effect of malonaldehyde and acetaldehyde on cultured mammalian cells: Production of micronuclei and chromosomal aberrations. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 1982;**101**(3):237-46.
138. Mechilli M, Schinoppi A, Kobos K, et al. DNA repair deficiency and acetaldehyde-induced chromosomal alterations in CHO cells. *Mutagenesis* 2008;**23**(1):51-56.
139. Lorenti Garcia C, Mechilli M, Proietti De Santis L, et al. Relationship between DNA lesions, DNA repair and chromosomal damage induced by acetaldehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2009;**662**(1-2):3-9.
140. Savage JR. An introduction to chromosomal aberrations. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 1999.
141. Cebulska-Wasilewska A, Osipov AN, Darroudi F. *Rapid Diagnosis in Populations at Risk from Radiation and Chemicals*: IOS Press, 2010.

142. U-2 OS (ATCC® HTB-96™) Manassas, VA: American Type Culture Collection; 2014 [Accessed on January 16 2016 at <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-96.aspx?slp=1> - generalinformation.]
143. Marshall R, Obe G. Application of chromosome painting to clastogenicity testing in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1998;**32**(3):212-22.
144. de Lange T. How Telomeres Solve the End-Protection Problem. *Science* 2009;**326**(5955):948-52.
145. van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 Protects Human Telomeres from End-to-End Fusions. *Cell* 1998;**92**(3):401-13.
146. Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres. *Current Biology* 2003;**13**(17):1549-56.
147. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *Journal of Biological Chemistry* 1998;**273**(10):5858-68.
148. Ye J, Lenain C, Bauwens S, et al. TRF2 and Apollo Cooperate with Topoisomerase 2 α to Protect Human Telomeres from Replicative Damage. *Cell* 2010;**142**(2):230-42.
149. Fields S, Song O-k. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989;**340**(6230):245-46.
150. Brückner A, Polge C, Lentze N, et al. Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology. *International Journal of Molecular Sciences* 2009;**10**(6):2763-88.
151. Bacart J, Corbel C, Jockers R, et al. The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnology journal* 2008;**3**(3):311-24.
152. Machleidt T, Woodroffe CC, Schwinn MK, et al. NanoBRET—A Novel BRET Platform for the Analysis of Protein-Protein Interactions. *ACS Chemical Biology* 2015;**10**(8):1797-804.
153. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014;**346**(6213).

11 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Maren Schmiester, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der Funktion von hSNM1B/Apollo im Fanconi-Anämie/BRCA-Reparaturweg“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Maren Schmiester hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Salewsky B, **Schmiester M**, Schindler D, et al. The nuclease hSNM1B/Apollo is linked to the Fanconi anemia pathway via its interaction with FANCP/SLX4. Human molecular genetics 2012;21(22):4948-56.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von Ko-Immunopräzipitationsstudien zur Untersuchung der Interaktion von hSNM1B/Apollo und FANCP/SLX4. Im Einzelnen: Zellkultur, Vorbereitung der Proteinlysate, Immunopräzipitation, Protein-Gelelektrophorese, Western Blot und Analyse der Ergebnisse. Zudem kritisches Lesen des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

12 **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

13 Publikationsliste

Paper

Salewsky B, **Schmiester M**, Schindler D, et al. The nuclease hSNM1B/Apollo is linked to the Fanconi anemia pathway via its interaction with FANCP/SLX4. *Human molecular genetics* 2012;21(22):4948-56.

Poster

Schmiester M, Salewsky B, Demuth I. Untersuchung der Funktion von hSNM1B/Apollo im Fanconi Anämie/BRCA-Reparaturweg. Poster auf der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie 2015 in Basel

Schmiester M, Salewsky B, Demuth I. hSNM1B/Apollo and FANCP/SLX4 do not function epistatically in the response to acetaldehyde-induced DNA damage. Poster auf der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Humangenetik 2016 in Lübeck

Salewsky B, **Schmiester M**, Demuth I. hSNM1B/Apollo editing by the CRISPR-Cas9 system. Poster auf der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Humangenetik 2016 in Lübeck

14 **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ilja Demuth für die Überlassung des Themas und für die fantastische wissenschaftliche Betreuung dieses Projekts. Seine Anregungen, sein kompetenter Rat und seine ständige Verfügbarkeit bei Fragen und Problemen bildeten das Fundament dieser Arbeit.

Besonders herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Dipl.-Ing. Bastian Salewsky bedanken. Mit großem Engagement stand er mir beim Erlernen der Methoden und bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente zur Seite. Seine wohlwollende, jahrelange Unterstützung in allen Phasen der Arbeit hat maßgeblich zu ihrem Gelingen beigetragen.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Susanne Rothe, Frau Gabriele Hildebrand, Frau Janina Radszewski und Frau Claire Schlack für ihre Hilfsbereitschaft und für die stets angenehme und freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für die liebevolle Unterstützung, die ich täglich von ihnen erfahre.