

Aus dem Institut für Humangenetik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Funktionsanalyse von hSNM1B/Apollo im Netzwerk der frühen zellulären
DNA-Schadensantwort

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Marco Michael Anders
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. Digweed
2. Prof. Dr. rer. nat. L. Wiesmüller
3. Prof. Dr. M. Löbrich

Datum der Promotion: 18.09.2009

1. INHALTSVERZEICHNIS

1. Inhaltsverzeichnis	2
2. Zusammenfassung der Publikationspromotion	2
2.1. Titel	2
2.2. Autor	2
2.3. Abstract	3
2.4. Einleitung	4
2.5. Zielstellung	5
2.6. Methodik	6
2.7. Ergebnisse	7
2.8. Diskussion	11
2.9. Referenzen	15
3. Erklärung über den Anteil der beigefügten Publikationen	17
4. Publikationen	19
4.1 Publikation 1	19
4.2 Publikation 2	30
4.3 Publikation 3	39
5. Publikationsliste	49
6. Tabellarischer Lebenslauf	50
7. Selbständigkeitserklärung	52
8. Danksagung	52

2. ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATIONSPROMOTION

2.1 TITEL

Funktionsanalyse von hSNM1B/Apollo im Netzwerk der frühen zellulären DNA-Schadensantwort

2.2 AUTOR

Marco Michael Anders

2.3 ABSTRACT

Die DNA, Träger der genetischen Information, ist permanent Schädigungen ausgesetzt. Das humane SNM1B/Apollo-Protein ist in die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden, die durch ionisierende Strahlung (IR) und DNA-interstrangvernetzende (DIV) Zytostatika verursacht werden, involviert. Wir konnten zeigen, dass hSNM1B an TRF2 bindet. TRF2 ist eine Komponente des Shelterin-Komplexes und hat Funktionen beim Aufbau und Schutz der Telomere, sowie in der frühen Antwort auf röntgenstrahlen-induzierte DNA-Schäden. Letzteres ist unseren Befunden zur Folge eine Funktion, die hSNM1B und TRF2 wahrscheinlich in Kooperation ausführen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass endogenes hSNM1B mit TRF1 und TRF2 in Foci kolokalisiert. Zusätzliche Foci konnten nach IR-Behandlung nachgewiesen werden, die nicht an den Telomeren lokalisiert waren. Mit Hilfe von „live-cell-imaging“-Experimenten beobachteten wir die Akkumulation von hSNM1B an photo-induzierten Doppelstrangbrüchen bereits 10 Sekunden nach Induktion. Als weiteren Beleg für eine Beteiligung an der frühen DNA-Schadensantwort zeigten hSNM1B-depletierte Zellen nach IR-Behandlung eine reduzierte Autophosphorylierung von ATM, sowie eine reduzierte Phosphorylierung von ATM-Zielproteinen.

Über Tandem-Affinity-Purification (TAP) in Kombination mit massenspektrometrischen Analysen konnten wir HSC70, HSP72, HSP60 und β -Tubulin als potentielle Bindungspartner identifizieren. Die Bindung zwischen hSNM1B und HSP72 wurde in reziproken Ko-Immunopräzipitationen bestätigt und die Interaktion von hSNM1B und HSP72 auf die Substratbindungsdomäne des Hitzeschockproteins eingegrenzt. Induzierte DNA-Schäden beeinflussten nicht die Interaktion von HSP70 und hSNM1B. Versuche mit HSP72 depletierten Fibroblasten (siRNA), zeigten eine signifikante Reduktion von nukleären hSNM1B-Foci. Zudem fanden wir in hSNM1B-depletierten Zellen eine Reduktion in der Phosphorylierung des ATR-Zielproteins CHK1 als zelluläre Antwort auf UVC-Bestrahlung. hSNM1B-depletierte Zellen zeigen nach Behandlung mit IR einen zellulären Phänotyp, der dem von kultivierten Zellen von Patienten mit Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS) ähnelt. Das *NBN*-Gen ist bei NBS-Patienten mutiert und kodiert für das Protein Nibrin, welches an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt ist. In einem Teilprojekt dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines konditionalen Nbn-Maus-Modells untersucht, wie sich die Expression von Leberproteinen vor und nach der Induktion einer Nbn-Nullmutation unterscheidet. Verglichen wurden dabei insbesondere Leberproteine aus *Nbn*^(+/-)- und *Nbn*^(-/-)-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach IR-Exposition. Die Auftrennung der Leberproteine erfolgte mittels 2D Gelelektrophorese, die Identifizierung von Proteinen mit veränderter Expression erfolgte anschließend über Massenspektrometrie. Insgesamt konnten in den Lebern aus bestrahlten Mäusen mit homozygoter Nullmutation, 209 Proteine mit von den Kontrolltieren abweichender Expression identifiziert werden. Nach ontologischer Zuordnung dieser Proteine zeigte sich, dass die in den *Nbn*-Nullmutanten veränderte Genexpression vor allem Proteine betraf, deren Funktion im Zusammenhang mit oxidativem Stress und der Aufrechthaltung der zellulären Redox-Homöostase steht.

2.4 EINLEITUNG

Lebende Zellen sind permanent chemischem und physikalischem Stress ausgesetzt. Dabei können alle Bestandteile der Zelle geschädigt werden und somit auch die DNA. Zur Wahrung der genomischen Integrität ist es daher unabdingbar, über effiziente DNA-Reparaturmechanismen zu verfügen. Intensive Forschungen führten dazu, dass die Funktionsweisen verschiedener DNA-Reparaturmechanismen recht gut verstanden sind. Hierzu gehören z.B. die Nukleotid-Exzisionsreparatur, involviert in die Entfernung verschiedener DNA-Läsionen, wie etwa durch UV-Strahlung induzierte Pyrimidin Dimere oder die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB). Die Reparatur von DSBs ist besonders kritisch, da zwei getrennt vorliegende, offene DNA-Enden wieder zusammengeführt werden müssen. Die beiden wichtigsten Mechanismen zur Reparatur von DSBs sind die homologe Rekombination (HR) und das Verknüpfen nicht-homologer DNA-Enden (NHEJ) (Hopfner et al., 2002; Jackson et al. 2002).

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte das hSNM1B-Gen identifiziert und seine Beteiligung an der zellulären Antwort auf DNA-Schäden, wie DNA-Doppelstrangbrüche und DNA-Interstrangvernetzungen (DIV), gezeigt werden (Demuth et al., 2004).

hSNM1B-depletierte Zellen (siRNA) zeigen nach Behandlung mit IR (Induktion von DSBs) einen ähnlichen zellulären Phänotyp, wie man ihn bei kultivierten Zellen von Patienten mit Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS) beobachtet. Das Nijmegen-Breakage-Syndrom ist eine seltene Erkrankung mit autosomal, rezessiver Vererbung. Der Basisdefekt liegt in einer Störung der zellulären Antwort auf DNA-Schäden. In klinischer Hinsicht resultieren Symptome wie Wachstumsretardierung, Mikrozephalie, geistige Entwicklungsstörungen, Immundefekte und eine vermehrte Anfälligkeit gegenüber bösartigen Erkrankungen wie Leukämien und Lymphomen. Auf zellulärer Ebene zeichnet sich das NBS durch eine Überempfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen (IR) und einer erhöhten Chromosomenbrüchigkeit aus.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Nibrin eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des ATM-Proteins (Ataxia-Telangiectasia-Mutated) spielt (Cerosaletti et al., 2005, Uziel et al., 2003, Lee and Paull, 2005). ATM, eine Kinase, nimmt bei der zellulären Antwort auf DSBs, als übergeordnetes Molekül verschiedener Signalkaskaden, eine zentrale Rolle ein. ATM phosphoryliert als Reaktion auf DNA-Schädigung andere Proteine und aktiviert so Signalwege, die in Kontrolle des Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose involviert sind.

Werden hSNM1B-depletierte Zellen mit DIV-induzierenden Mutagenen behandelt ähnelt der zelluläre Phänotyp auch dem von Patienten mit dem Chromosomeninstabilitäts-Syndrom Fanconi-Anämie (FA). FA ist eine seltene, genetisch bedingte Krankheit, die rezessiv vererbt wird. In klinischer Hinsicht zeichnet sich FA durch eine progrediente Knochenmarksaplasie, angeborene Skelettfehlbildungen und ein bis zu 1000-fach erhöhtes Risiko an Leukämie, Schleimhautkarzinomen und anderen Krebsformen zu erkranken, aus. Erstmals wurde sie im Jahr 1927 von dem Schweizer Kinderarzt Prof. Guido Fanconi beschrieben (Lobitz and Velleuer, 2006). In zytogenetischer Hinsicht sind Zellen von FA-Patienten durch eine hohe

Chromosomeninstabilität und eine Hypersensitivität gegenüber DIV-induzierenden Agenzien charakterisiert (Sasaki et al., 1973).

Es ist bekannt, dass als Reaktion auf eine Behandlung mit solchen Stoffen in der Zelle nicht ATM, sondern die Kinase ATR (Ataxia-Telangiectasia-Related), aktiv wird (Dronkert und Kanaar, 2001). Das aktivierte ATR-Protein phosphoryliert verschiedene Zielproteine, von denen einige (nach DSB-Induktion) auch von ATM aktiviert und andere spezifisch nur von ATR modifiziert werden.

2.5 ZIELSTELLUNG

Unsere Arbeitsgruppe befasst sich mit Proteinen, die an der zellulären Antwort auf DNA-Schäden beteiligt sind. Ein Ausfall einer „passenden“ DNA-Schadensantwort führt zu Genmutationen oder genomischen Instabilitäten und solche genomischen Veränderungen sind wichtige Mechanismen der Krebsentstehung.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde das hSNM1B-Gen identifiziert und eine Beteiligung an der zellulären Antwort auf DNA-Schäden gezeigt. In dieser Arbeit wurden die begonnenen Untersuchungen zur Funktion von hSNM1B fortgeführt. Dies beinhaltete die Evaluierung von Proteinen mittels Yeast-Two-Hybrid und Tandem-Affinity-Purification als potentielle Interaktionspartner, sowie deren Validierung und Eingrenzung der Interaktionsdomänen über Ko-Immunopräzipitationsstudien.

Um die Funktion von hSNM1B im komplizierten Netzwerk der DNA-Schadensantwort zu ergründen, wurde der Phosphorylierungsstatus von einigen Proteinen, die bei der DNA-Schadensantwort involviert sind, in hSNM1B-depletierten Zellen nach DNA-Schädigung untersucht. Zudem wurden immunhistologische Untersuchungen zur Charakterisierung von hSNM1B-Foci durchgeführt. Dies beinhaltete die Kinetik der Foci-Bildung nach DNA-Schäden, sowie die Kollokalisierung mit anderen Proteinen.

Um die Pathologie des Nijmegen-Breakage-Syndroms (NBS) besser zu verstehen, wurden in einem Teilprojekt Proteomstudien durchgeführt. Mit Hilfe eines konditionalen NBS1-Nullmutanten Maus-Modells konnten abweichende Expressionsmuster in $Nbn^{+/del6}$ - und $Nbn^{ins6/del6}$ -Mäusen nach IR-Exposition evaluiert werden.

2.6 METHODIK

Zur Suche nach potentiellen hSNM1B-Interaktionspartnern und deren Validierung wurden folgende Methoden durchgeführt: Yeast-Two-Hybrid (Y2H)-System, Tandem-Affinity-Purification (TAP) in Verbindung mit Massenspektrometrie und Immunoblotting, sowie Ko-Immunopräzipitationsstudien (Ko-IPs) und Doppelfärbungen in Immunfluoreszenzanalysen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

Dafür wurden verschiedene Expressionsvektoren, die das *hSNM1B*- und *HSP72*-Gen fusioniert mit einem Tag enthielten, hergestellt. Die Generierung erfolgte in der Regel über RNA-Gewinnung aus menschlichen Fibroblasten, Umschreibung der RNA zur cDNA, Amplifikation mittels PCR, Klonierung mit Hilfe von Restriktionsverdau und Ligation und Transformation in einen geeigneten Bakterienstamm zur Vervielfältigung der Vektoren. Die Validierung der Konstrukte erfolgte über PCR, Restriktionsverdau und Sequenzierung.

Die Transfektion der Expressionskonstrukte, sowie die siRNA-vermittelte Reduktion von hSNM1B und HSP72 wurde in verschiedenen adhärennten humanen Zelllinien durchgeführt. DNA-Schäden konnten mittels UVC, IR oder Bleomycin in hSNM1B-depletierten menschlichen Zellen induziert werden. Eine anschließende Untersuchung des Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteine erfolgte über Immunoblotting, die Verifizierung des hSNM1B-Knockdowns über eine reduzierte Foci-Bildung in Immunfluoreszenzanalysen. Zudem wurden in photo-sensibilisierten (Hoechst 33258) menschlichen Fibroblasten mittels Micro-Laser primär DSB induziert. Die Akkumulation von transient exprimiertem hSNM1B-EGFP wurde mit „Live cell image“- Analysen verfolgt.

Die Bestimmung des Mitose-Index in markierten (phospho-H3) hSNM1B-depletierten- und Kontroll-Zellen erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

In einem Teilprojekt dieser Arbeit wurden Leberproteomanalysen von $Nbn^{(+/\text{del}6)}$ - und $Nbn^{(\text{ins}6/\text{del}6)}$ -Mäusen über 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie durchgeführt.

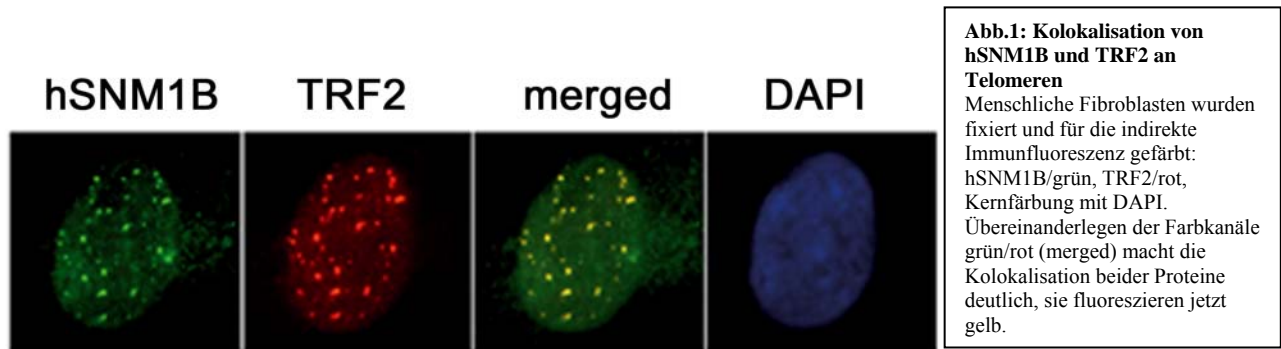
Über semi-quantitative PCR konnte die Deletion des loxP-flankierten Allels in den oben genannten Mäusen überprüft werden. Mit FACS-Analysen wurde der Status von reaktiven Sauerstoffspezies in kultivierten Zellen der oben genannten Mäuse bestimmt und der NAD^+/NADH -Gehalt in Leberproteinlysaten mit Hilfe eines NAD^+/NADH -Quantifikation-Kits evaluiert.

2.7 ERGEBNISSE

Identifizierung und Validierung von hSNM1B-Bindungspartnern

In mehreren Untersuchungen (TAP, Y2H) konnten wir zeigen, dass hSNM1B ein Bindungspartner des Telomer-Proteins TRF2 ist und in Ko-Immunopräzipitationversuchen die Interaktion für die beiden Proteine bestätigen (Demuth et al., 2008, Anders et al., 2009).

Mit Immunfluoreszenz-Analysen wurde in Doppelfärbungen gezeigt, dass endogenes hSNM1B mit TRF2 kolokalisiert (Abb. 1, Demuth et al., 2008).



Als Nächstes untersuchten wir die gegenseitige Abhängigkeit in der Foci-Bildung des jeweils anderen Proteins in Säugerfibroblasten. Die validierte siRNA-vermittelte Reduktion von hSNM1B hatte keinen signifikanten Unterschied in der TRF2 Foci-Bildung zur Folge. Dagegen führte die Reduktion von TRF2 in den Zellen zu einer signifikanten Verminderung der hSNM1B-Foci.

Wie in Anders et al. beschrieben wurde mit Hilfe der Tandem-Affinity-Purification das mit dem Tandem-Tag versehene hSNM1B und potentielle Interaktionspartner aus Zelllysaten aufgereinigt. Nach Separation im Polyacrylamidgel und Anfärbung mit Coomassie wurden individuelle Banden ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie (MS) indentifiziert. Dies führte zur Identifikation der potentiellen hSNM1B-Interaktionspartner HSC70 und HSP72. HSC70 und HSP72 gehören zur Familie der hoch-konservierten molekularen Chaperone. Während HSC70 konstitutiv in der Zelle exprimiert wird, ist HSP72 eines der stärksten stressinduzierten Proteine (Vos et al., 2008).

Als weitere potentielle Interaktionspartner wurden β -Tubulin und HSP60 mit hSNM1B aufgereinigt und über MS identifiziert. Tubuline sind die Hauptbestandteile der Mikrotubuli, welche im Spindelapparat während der Mitose, im Cytoplasma als Teil des Cytoskeletts und in Cilien zu finden sind (Cleveland et al., 1985). HSP60 ist zum größten Teil in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und hilft neu translatierten Proteinen bei der Faltung. Zudem findet sich HSP60 auch in anderen Kompartimenten der Zelle, wie z.B. im Nukleus (Gupta et al., 2008).

In reziproken Ko-Immunopräzipitationen konnte die Interaktion zwischen transient exprimiertem hSNM1B und HSP72 in HEK293T-Zellen bestätigt werden. Zudem wurde die Interaktionsdomäne auf den carboxy-terminalen Abschnitt (AS357-AS642) von HSP72 eingegrenzt, der die Substratbindungsdomäne des Proteins beinhaltet.

Die Induktion von DNA-Schäden durch Behandlung mit Bleomycin hatte keinen quantitativen Einfluss auf die hSNM1B-HSP72-Interaktion.

Rohde et al. konnte zeigen, dass die siRNA vermittelte Reduktion von konstitutiv exprimiertem HSC70 zu einem massiven Zellsterben in diversen menschlichen Zelllinien führte. Dagegen wird das induzierbare HSP70-Protein HSP72 auch in unbehandelten Zellen moderat exprimiert (Rohde et al., 2005). Aufgrund dieser Gegebenheiten wurde der hSNM1B-Status über den Nachweis von nuklearen hSNM1B-Foci in der indirekten Immunfluoreszenz von HSP72-depletierten Fibroblasten (siRNA) untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion von hSNM1B-Foci-positiven Nuklei nach Depletion von HSP72.

hSNM1B-Funktionen in der Aktivierung von ATM und ATR

Ataxia telangiectasia (AT) ist eine Erkrankung mit autosomal-rezessiven Erbgang. Kennzeichnend bei AT-Patienten sind eine zerebelläre Ataxie, Teleangiectasien vor allem auf der Bindehaut des Auges, aufgrund von T-Zell-Defekten eine verminderte Immunkompetenz, eine verstärkte Empfindlichkeit gegenüber IR und eine erhöhte Krebsrate (Übersicht in Mc Kinnon, 2004). Grundlage der Erkrankung sind Mutationen im ATM-Gen (Ataxia telangiectasia Mutated). Als übergeordnetes Molekül der DNA-Schadensantwort phosphoryliert das ATM-Protein eine Vielzahl von Effektorproteinen.

Karlseder et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression von TRF2 die Phosphorylierung von verschiedenen ATM-Zielproteinen (Nibrin, p53) nach IR-Bestrahlung inhibiert und die Autophosphorylierung von ATM selbst vermindert (Karlseder et al., 2004). Aufgrund der Interaktion von hSNM1B und TRF2 und der Kollokalisierung der beiden Proteine im Nukleus, war es naheliegend, die Rolle von hSNM1B bei der Aktivierung von ATM zu untersuchen. Tatsächlich führte der siRNA-vermittelte Knockdown von hSNM1B in Fibroblasten zu einer signifikant verminderten ATM-Autophosphorylierung (S1981) nach IR-Behandlung.

Die Untersuchung einiger ATM-Zielproteine deutete ebenfalls auf eine verringerte ATM-Aktivität nach IR. Der Tumorsuppressor p53 wird von der ATM-Kinase als Antwort auf DNA-Schädigung phosphoryliert (Lavin et al., 2006). p53 zeigte in hSNM1B-depletierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen eine Verminderung der Stabilität bzw. der Phosphorylierung an Serin 15, letzteres nach Behandlung mit hohen IR-Dosen. Die phosphorylierte Histon-Variante γ H2A.X zeigte eine Reduktion in depletierten hSNM1B-Zellen über das gesamte angewandte Spektrum von IR-Dosen gegenüber Kontrollzellen. Ebenso verhielt es sich mit phosphoryliertem SMC1 (S957), welches in Verbindung mit der Phosphorylierung an Serin 966 für die Aktivierung des S-Phase-Kontrollpunktes als Antwort auf IR involviert ist (Kim et al., 2002, Yazdi et al., 2002).

In Zellen von AT-Patienten und in Zellen mit Mutation in Genen, die Teil der ATM-kontrollierten Signalkaskade sind (z.B. *NBN*), ist die Aktivierung des G2/M-Zellzyklus-Kontrollpunktes gestört. (Shiloh et al., 2006, Difilippantonio et al., 2005). Unsere

Untersuchungen zeigten, dass hSNM1B in ganz ähnlicher Weise für die Aktivierung dieses Zellzyklus-Kontrollpunktes nach IR benötigt wird.

Die Tatsache, dass HSP72 für die reguläre Foci-Bildung von hSNM1B erforderlich ist, spricht für eine funktionelle Beziehung zwischen diesen beiden Proteinen. HSP72 depletierte Zellen zeigen eine reduzierte Phosphorylierung des ATR-Zielproteins CHK1 nach UVC-Bestrahlung (Gabai et al., 2008). Unsere Untersuchungen zeigten, dass hSNM1B ebenfalls den Phosphorylierungsstatus von CHK1 nach UVC-Bestrahlung beeinflusst. Dies ergab sich aus Analysen, in denen in menschlichen Fibroblasten hSNM1B depletiert (siRNA) und der CHK1-Phosphorylierungsgrad (S317) zu verschiedenen Zeitpunkten nach UVC-Behandlung evaluiert wurde. hSNM1B-siRNA behandelte Zellen zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen 30 min nach Bestrahlung keinen Unterschied in der Phosphorylierung von CHK1. Dagegen erfolgte zu späteren Zeitpunkten, eine deutliche Reduzierung der CHK1-Phosphorylierung in hSNM1B-depletierten Zellen.

hSNM1B ist an der frühen zellulären Antwort auf DNA-Schäden involviert

Bradshaw et al. konnten für TRF2 eine schnelle Akkumulation an DNA-Schäden zeigen (Bradshaw et al., 2005). Legt man die Interaktion von hSNM1B und TRF2 zugrunde, galt es nun zu prüfen, ob eine ähnliche Akkumulation an DNA-Schadensorten auch bei hSNM1B gegeben ist. Dafür wurden DNA-Brüche über einen Microlaser in photo-sensibilisierten (Hoechst 33258), menschlichen Fibroblasten induziert, und mittels indirekter Immunfluoreszenz über die Detektion von γ H2AX nachgewiesen. In ersten Versuchen zeigte sich, dass hSNM1B 10 min nach Bestrahlung an den Schadstellen akkumulierte. Anschließende „live-cell-imaging“-Experimente ergaben, dass transient exprimiertes GFP-hSNM1B bereits 10 s nach Bestrahlung an den Schadstellen akkumulierte. Das Intensitätsmaximum wurde nach 40 s erreicht und blieb über die weiteren gemessenen 1-5 min konstant. Entsprechende Untersuchungen mit ATM^(-/-)-Zellen zeigten, dass ATM keinen Einfluss auf die Anreicherung von hSNM1B an den DNA-Schadstellen hat.

Eine weitere Untersuchung ergab, dass menschliche Fibroblasten 15 min nach Bestrahlung mit 20 Gy signifikant mehr hSNM1B-Foci/Zellkern aufwiesen, als unbestrahlte Kontrollzellen. Die Anzahl der hSNM1B-Foci-positiven Zellen blieb dagegen konstant.

Erhöhter oxidativer Stress in *Nbn*-Nullmutanten Mäusen nach Bestrahlung (IR)

Das *NBN*-Gen kodiert für das Protein Nibrin, ist an der Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt und liegt bei NBS-Patienten mutiert vor. Über 90 % der NBS-Patienten sind homozygot für eine 5 bp Deletion (657del5) im *NBN*-Gen. In Patientenzellen mit dieser Mutation werden zwei Genprodukte gebildet; ein N-terminales 26 kDa-Fragment und ein über ein alternatives Startcodon gebildetes C-terminales 70 kDa-Fragment (Maser et al., 2001). Das 70 kDa-Fragment kann zum Teil Funktionen des vollständigen Nibrins übernehmen, was die Vereinbarkeit mit dem Leben bedingt (Demuth et al., 2004). Aufgrund

der hypomorphen Natur der *NBN*-Mutation ist es schwierig Nibrin-Funktionen ausschließlich in Patientenzellen zu untersuchen.

Knock-Out-Mäuse mit homozygoter Mutation im *Nbn*-Gen sind nicht lebensfähig und sterben während der frühen Embryoentwicklung (Zhu et al., 2001, Dumon-Jones et al., 2003).

In einem Teilprojekt dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines konditionalen *Nbn*-Maus-Modells untersucht, wie sich die Expression von Leberproteinen vor und nach der Induktion einer *Nbn*-Nullmutation im lebenden Tier unterscheidet. Verglichen wurden dabei insbesondere Leberproteine aus *Nbn*^(+/del6)- und *Nbn*^(ins6/del6)-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach IR-Exposition.

Für eine Proteomanalyse wurden Leberproteine aus jeweils zwei *Nbn*^(+/del6)- und *Nbn*^(ins6/del6)-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach IR-Exposition (4 Gy) extrahiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels 2D-Gelelektrophorese. Im Vergleich der Gele wurden Proteine mit veränderter Expression visuell über die Intensität der „Protein-Spots“ evaluiert. Die Identifizierung der Proteine erfolgte über Massenspektrometrie.

Nach IR-Exposition konnten im Vergleich zu Kontrolltieren in Mäusen mit homozygoter *Nbn*-Nullmutation, 209 Proteine mit abweichender Expression identifiziert werden. Mit der ProfCom-database (Antonov et al., 2008) erfolgte eine Einteilung dieser Proteine in ontologische Gruppen.

Es zeigte sich, dass die in den *Nbn*-Nullmutanten veränderte Genexpression vor allem Proteine betraf, deren Funktion im Zusammenhang mit oxidativem Stress und der Aufrechterhaltung der zellulären Redox-Homöostase steht. Proteine aus dieser Gruppe wurden nach Bestrahlung in den heterozygoten Kontrolltieren transient (0,5 h, 2 h nach IR) und in den Nullmutanten permanent in ihrer Expression verändert (0,5 h, 2 h, 24 h nach IR).

Zwei weitere Gruppen von Proteinen waren in homozygoten Lebergeweben nach Bestrahlung überrepräsentiert. Eine Gruppe betraf Proteine, die zu der Familie der Chaperone und Hitzeschockproteine gehören. In der anderen Gruppe wurden Proteine zusammengefasst, die in metabolische Prozesse (z.B. Citratzyklus, Glykolyse, usw.) involviert sind.

In FACS-Analysen zeigte sich nach Induktion von DSB's bei den Nullmutanten *Nbn*^(ins6/del6)-Zellen im Vergleich zu den heterozygoten *Nbn*^(+/del6)-Zellen eine vierfach erhöhte Menge an reaktiven Sauerstoffspezies.

Eine mögliche Erklärung für die permanent erhöhte Expression von Proteinen mit Funktion für die Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase im *Nbn*-Nullmutantem Lebergewebe, ist die Reduzierung des NAD⁺-Gehaltes als Konsequenz einer fortlaufenden Hyperaktivität der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) aufgrund des DSB-Reparaturdefektes. Die durch PARP katalysierte ADP-Ribosylierung von Chromatinproteinen (wie beispielsweise Histon H1) ist eine bei allen Eukaryoten vorkommende posttranslationale Modifikation, die insbesondere bei DNA-Brüchen in Gang kommt und eine Rolle bei der DNA-Reparatur und der Erholung der Zelle nach Schäden an der DNA spielt. Jeder einzelne Ribosylierungsschritt, von denen etwa 60 bis 80 an einem Akzeptor stattfinden, spaltet NAD⁺ zu Nikotinamiden und ADP-Ribose-Molekülen. Ein Mangel an NAD⁺ führt zu einem Mangel an NAD(P)H, einem Antioxidanz,

das direkt an der Beseitigung von toxischen, freien Radikalen beteiligt ist (Kirsch et al., 2001). Somit könnte die Folge ein verminderter Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies sein. Zur Prüfung dieser Hypothese erfolgte die Messung des NAD⁺-Gehaltes im Leberlysate aller für die Proteomanalyse eingesetzten 16 Versuchstiere. Dabei zeigte sich eine Reduzierung des NAD⁺-Gehaltes in bestrahlten im Gegensatz zu unbestrahlten Tieren. 30 min nach IR wurde in Leberlysaten von *Nbn*^(ins6/del6)-Mäusen im Vergleich zu *Nbn*^(+/del6)-Mäusen der NAD⁺-Gehalt deutlich vermindert. Zu späteren Zeitpunkten der Messung konnten keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Genotypen festgestellt werden.

2.8 DISKUSSION

HSP70 interagiert mit hSNM1B und wird für die Foci-Bildung von hSNM1B benötigt

HSC70 und HSP72 sind Mitglieder der HSP70-Proteinfamilie und interagieren mit hSNM1B. Interessanterweise existieren zu den gut beschriebenen Funktionen dieser Hitzeschockproteine bei der Proteinfaltung, Membrantransportprozessen und Proteinabbauprozessen, auch Hinweise auf eine Funktion bei der Wahrung der genomischen Integrität. Im Maus-Modell konnten Hunt et al. die homologen Hitzeschock-Gene ausschalten und zeigen, dass dies zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung führt (Hunt et al., 2004), ein Phänotyp der hSNM1B-depletierten Zellen ähnelt.

In Immunfluoreszenzstudien resultierte die Verminderung von HSP72 (siRNA) in einer signifikanten Reduzierung von telomerlokalisierten hSNM1B-Foci. Die gestörte Akkumulation von hSNM1B an den Telomeren könnte als Funktionsverlust von hSNM1B gedeutet werden. Interessanterweise spielen hSNM1B und Hsp70.1/Hsp70.3 eine Rolle beim Schutz der Telomere vor Fusionen (Lenain et al., 2006, van Overbeek et al., 2006, Hunt et al., 2004).

Die Vermutung liegt nahe, dass die Funktionen von HSP70 in der DNA-Schadensantwort über die Chaperonfunktion von HSP70 erklärbar sind. Infolge einer HSP70-Depletion, könnte vermehrt hSNM1B inkorrekt gefaltet vorliegen, was zum Teil zu einer Verminderung von funktionellem hSNM1B führt und somit den HSP70-defizienten Phänotyp erklärt. Weitere Forschungen sind erforderlich, um die Rolle von HSP70 in der DNA-Schadensantwort zu ergründen, da es sich nicht ausschließen lässt, dass andere Moleküle beteiligt sind oder HSP70 eine direktere Rolle an der Antwort auf DNA-Schäden einnimmt.

hSNM1B interagiert mit TRF2 und beeinflusst die Phosphorylierung von ATM und des ATR-Zielproteins CHK1

Die direkte Interaktion mit TRF2 ist die Grundlage für die hSNM1B-Lokalisation an den Telomeren. Die Interaktion erfolgt am C-Terminus von hSNM1B mit der TRF homologen Domäne von TRF2 (Freibaum and Counter, 2006, Demuth et al., 2008). Van Overbeek und de Lange vermuten, dass hSNM1B zum Schutz der Telomere während oder nach ihrer DNA-Replikation beiträgt, indem es das Signal „DNA-Schaden“ unterdrückt (van Overbeek und de Lange, 2006).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass hSNM1B für die vollständige Aktivierung von ATM als Antwort auf IR notwendig ist. hSNM1B ist an der frühen Antwort auf DSBs beteiligt, die in nicht-telomerischer DNA vorkommen. Dies konnte durch seine Rolle in der ATM-Aktivierung, der Formation von IR-induzierten Foci und die IR-Sensitivität von hSNM1B-siRNA behandelten „Knockdown“-Zellen gezeigt werden. Es lässt sich vermuten, dass der Schutz vor DNA-Reparatur an Chromosomenenden nicht eine Rolle von hSNM1B ist, sondern die Aufgabe von TRF2, das hSNM1B an den Telomeren bindet und es somit an der Aktivierung von ATM hindert (Demuth et al., 2008).

In Überlebensexperimenten und in Chromosomenbruch-Analysen zeigten hSNM1B depletierte Zellen eine Hypersensitivität gegen DNA-Interstrangvernetzende (DIVs) Agenzien, wie Mitomycin C und Cisplatin (Demuth et al., 2004). Es ist bekannt, dass als Reaktion auf eine Behandlung mit solchen Stoffen in der Zelle nicht ATM, sondern die Phosphatidylinositol 3-Kinase ATR, aktiv wird (Dronkert und Kanaar, 2001). Das aktivierte ATR-Protein phosphoryliert verschiedene Zielproteine, von denen einige (nach DSB-Induktion) auch von ATM aktiviert, während andere spezifisch nur von ATR modifiziert werden.

Einem Modell von McHugh und Mitarbeitern zur Folge bleiben durch DIV-induzierende Agenzien verursachte DNA-Schäden bis zur S-Phase der Zelle unerkannt und dementsprechend auch unrepariert (McHugh et al., 2001). Bei der Replikation stellt eine solche Vernetzung ein unüberwindliches Hindernis dar, was dazu führt, dass der DNA-Syntheseapparat an der Replikationsgabel zerfällt. Die Blockierung der Replikationsgabel hat die Aktivierung der ATR-Kinase zur Folge (Übersicht in Abraham, 2001).

Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von hSNM1B an der ATR-Aktivierung ist seine Rolle bei der CHK1-Phosphorylierung nach UVC-Bestrahlung. Interessanterweise zeigen HSP72 depletierte, menschliche Zellen ebenfalls eine reduzierte Phosphorylierung des ATR-Zielproteins CHK1 nach UVC-Behandlung (Gabai et al., 2008). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene direkte HSP70/hSNM1B-Interaktion und die Tatsache, dass HSP72 für eine vollständige Foci-Bildung von hSNM1B erforderlich ist, deutet auf ein funktionelles Zusammenwirken beider Proteine hin.

ATM und ATR zeigen eine gewisse Redundanz in der Phosphorylierung ihrer Zielproteine. Der Unterschied liegt in der Kinetik mit der sie auf verschiedene DNA-Schäden reagieren. ATM wird primär als Antwort auf DSBs (z.B. nach IR) aktiviert. Dagegen erfolgt die Aktivierung von ATR überwiegend als Folge einer blockierten Replikationsgabel. Weitere Studien sind nötig, um die Hinweise zur Funktion von hSNM1B bei der Aktivierung von ATR zu festigen.

hSNM1B als mögliches Zielprotein in der Krebstherapie

Einige Mitglieder der HSP70-Familie werden in Tumoren überexprimiert, um das Überleben der Zellen zu sichern (Calderwood et al., 2006). So führte zum Beispiel die erhöhte Expression von HSP72 in Zellen von Prostatakarzinomen zu einer Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika (Gabai et al., 2005). Somit wäre das gezielte Ausschalten von Hitzeschockproteinen ein vielversprechender Ansatz in der Krebstherapie. Ein solcher Ansatz könnte sich jedoch als schwierig darstellen, da die Chaperonfunktion der Hitzeschockproteine essentiell für das Zellüberleben ist. So konnten Rohde et al. zeigen, dass die siRNA vermittelte Reduktion von konstitutiv exprimiertem HSC70 zu einem massiven Zellsterben in Tumorzellen und „gesunden“ Zellen führt (Rohde et al., 2005). Aufgrund der bereits diskutierten Ähnlichkeiten im Phänotyp von hSNM1B- bzw. HSP70-depletierten Zellen, wäre das gezielte Ausschalten von hSNM1B eine denkbare Alternative.

Ein bereits gut etabliertes Ziel in der Chemotherapie ist der neu gefundene potentielle hSNM1B-Interaktionspartner β -Tubulin. Antimitotische Agenzien der Gruppe der Taxane können β -Tubulin binden und die Mikrotubuli während der Mitose stabilisieren, was zum Anhalten der Mitose und zum Sterben von schnell proliferierenden Zellen führt (Pasquier et al., 2008). Weitere Forschungen sind nötig um die β -Tubulin/hSNM1B-Interaktion zu validieren und die physiologische Relevanz einer potentiellen Interaktion zu klären.

Gestörte Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies im NBS

Nibrin als essentielles Protein ist in der Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt. Da über 90 % der NBS-Patienten eine hypomorphe Mutation im *NBN*-Gen tragen und die Menge des über ein alternatives Startcodon gebildeten C-terminalen 70 kDa-Fragmentes mit der Ausprägung des klinischen Krankheitsbildes korreliert (Krüger et al., 2007), wurde in diesem Teilprojekt statt Patientenzellen ein konditionales *Nbn*-Nullmutanten-Maus-Modell verwendet, um die Expression von Leberproteinen in Nullmutanten nach IR-Exposition zu untersuchen. In *Nbn*-Nullmutanten zeigte sich, dass die veränderte Genexpression vor allem Proteine betraf, deren Funktion im Zusammenhang mit oxidativem Stress und der Aufrechterhaltung der zellulären Redox-Homöostase steht. Da heterozygote und homozygote Mäuse identisch behandelt wurden, müssen die Unterschiede aufgrund des geänderten Genotyps zustande gekommen sein. Die Detoxifikation von freien Sauerstoffradikalen kann über direkte Interaktion mit Antioxidantien oder Radikalfängern, wie Vitamin E, Glutathion oder NAD(P)H erfolgen.

Interessanterweise zeigte sich der NAD^+ -Gehalt 30 min nach IR-Bestrahlung, einem Zeitpunkt in dem 60 % der DSB's normalerweise repariert werden, im *Nbn*-Nullmutantem Lebergewebe deutlich vermindert. Erklärbar ist dies durch eine anhaltende Aktivierung von PARP, als Konsequenz verbleibender, unreparierter DSB's.

Auch Enzyme wie Superoxid-Dismutase oder Glutathion-S-Transferase können reaktive Sauerstoffspezies inaktivieren. Die anhaltende Expression von mehreren Proteinen, wie Mangan-Superoxid-Dismutase und Peroxiredoxin 6 in Nullmutanten, spricht nicht für eine

Reduktion der Effizienz in der Beseitigung von freien Radikalen, sondern eher für eine permanent erforderliche und kontinuierliche Detoxifikation und damit für eine massive Störung der Redox-Homöostase.

Freie Radikale können zu generellen Zellschäden, Apoptose und Nekrose führen und haben eine mutagene Wirkung auf das Erbgut (Übersicht in Lipton, 1998) Die mutagene Wirkung von freien Radikalen in Kombination mit Defekten in der DSB-Reparatur könnten in Zusammenspiel das erhöhte Krebsrisiko in NBS-Patienten erklären.

Die Wachstumsretardierung in NBS-Patienten resultiert aus einer gestörter Zellproliferation und Seneszenz. Freie Radikale können zu Apoptose und Nekrose führen, was zum Teil diesen klinischen Phänotyp erklären kann.

Neuronen häufen in Folge ihres hohen metabolischen Umsatzes reaktive Sauerstoffspezies an und sind damit besonders durch zusätzlichen oxidativen Stress gefährdet (Barzilai et al., 2007). Dies könnte die Mikrozephalie, einem Merkmal nahezu aller NBS-Patienten, sowie die bei Knockout-Mäusen mit homozygoter *Nbn*-Mutation im Zentralen-Nervensystem beobachtete cerebelläre Ataxie erklären (Frappart et al., 2005).

2.9 REFERENZEN

1. Abraham R.T. (2001) Cell Cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases *Genes & Dev.* 2001 15:2177-2196.
2. Anders, M., Mattow, J., Digweed, M. and Demuth I. Evidence for hSNM1B/Apollo functioning in the HSP70 mediated DNA Damage Response. *Cell Cycle* 2009, 8:11 1-8 (article in press).
3. Antonov, A.V., Schmidt, T., Wang, Y., Mewes, H.W. (2008) ProfCom: a web tool for profiling the complex functionality of gene groups identified from high-throughput data. *Nucleic Acids Res.*
4. Barzilai, A. (2007) The contribution of the DNA damage response to neuronal viability. *Antioxid Redox Signal*, 9, 211-8.
5. Bradshaw, P. S., Stavropoulos, D. J., and Meyn, M. S. (2005) Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nat Genet*, 37: 193-197.
6. Calderwood, S. K., Khaleque, M. A., Sawyer, D. B., and Ciocca, D. R. (2006) Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci*, 31: 164-172.
7. Cerosaletti, K., Wright, J., Concannon, P. (2006) Active Role for Nibrin in the Kinetics of Atm Activation. *Mol Cell Biol.* 2006 March; 26(5): 1691–1699.
8. Cleveland, D. W. and Sullivan, K. F. (1985) Molecular biology and genetics of tubulin. *Annu Rev Biochem*, 54: 331-365.
9. Demuth, I., Bradshaw, P., Lindner, A., Anders, M., Heinrich, S., Kallenbach, J., Schmelz, K., Digweed, M., Meyn, S., and Concannon, P. (2008) hSNM1B/Apollo interacts with TRF2 and stimulates ATM activation in response to ionizing radiation. *DNA Repair (Amst)* 7(8):1192-201.
10. Demuth, I., Digweed, M., and Concannon, P. (2004) Human SNM1B is required for normal cellular response to both DNA interstrand crosslink-inducing agents and ionizing radiation. *Oncogene* 23(53):8611-8.
11. Demuth, I., Frappart, P.O., Hildebrand, G., Melchers, A., Lobitz, S., Stockl, L., Varon, R., Herceg, Z., Sperling, K., Wang, Z.Q. et al. (2004) An inducible null mutant murine model of Nijmegen breakage syndrome proves the essential function of NBS1 in chromosomal stability and cell viability. *Hum Mol Genet*, 13, 2385-97.
12. Difilippantonio, S., A. Celeste, O. Fernandez-Capetillo, H. T. Chen, B. Reina San Martin, F. Van Laethem, Y. P. Yang, G. V. Petukhova, M. Eckhaus, L. Feigenbaum, K. Manova, M. Kruhlak, R. D. Camerini-Otero, S. Sharan, M. Nussenzweig, and A. Nussenzweig. (2005) Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models. *Nat Cell Biol* 7:675-85.
13. Dronkert, M.L., Kanaar, R.. Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res.* 2001; 486(4):217-47. Review.
14. Dumon-Jones, V., Frappart, P.O., Tong, W.M., Sajithlal, G., Hulla, W., Schmid, G., Herceg, Z., Digweed, M. and Wang, Z.Q. (2003) Nbn heterozygosity renders mice susceptible to tumor formation and ionizing radiation-induced tumorigenesis. *Cancer Res*, 63, 7263-9.
15. Frappart, P.O., Tong, W.M., Demuth, I., Radovanovic, I., Herceg, Z., Aguzzi, A., Digweed, M., Wang, Z.Q. (2005) An essential function for NBS1 in the prevention of ataxia and cerebellar defects. *Nat Med.* 11(5):538-44.
16. Freibaum, B. D., and Counter, C. M. (2006) hSnm1B is a novel telomere-associated protein, *J Biol Chem* 281(22):15033-6.
17. Gabai, V. L., Budagova, K. R., and Sherman, M. Y. Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents. *Oncogene*, 24: 3328-3338, 2005.
18. Gabai, V. L., O'Callaghan-Sunol, C., Meng, L., Sherman, M. Y., and Yaglom, J. (2008) Triggering senescence programs suppresses Chk1 kinase and sensitizes cells to genotoxic stresses. *Cancer Res*, 68: 1834-1842.
19. Gupta, R. S., Ramachandra, N. B., Bowes, T., and Singh, B. (2008) Unusual cellular disposition of the mitochondrial molecular chaperones Hsp60, Hsp70 and Hsp10. *Novartis Found Symp*, 291: 59-68; discussion 69-73, 137-140.
20. Hopfner, K. P., Putnam, C. D., and Tainer, J. A. (2002) DNA double-strand break repair from head to tail, *Curr Opin Struct Biol* 12(1):115-22.
21. Hunt, C. R., Dix, D. J., Sharma, G. G., Pandita, R. K., Gupta, A., Funk, M., and Pandita, T. K. (2004) Genomic instability and enhanced radiosensitivity in Hsp70.1- and Hsp70.3-deficient mice. *Mol Cell Biol*, 24: 899-911.
22. Jackson, S. P. (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks, *Carcinogenesis* 23(5):687-96.
23. Karlseder, J., K. Hoke, O. K. Mirzoeva, C. Bakkenist, M. B. Kastan, J. H. Petrini, and T. de Lange. (2004) The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol* 2:E240.
24. Kim, S. T., Xu, B., and Kastan, M. B. (2002) Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev*, 16: 560-570.
25. Kirsch, M. and De Groot, H. (2001) NAD(P)H, a directly operating antioxidant? *Faseb J*, 15, 1569-74.
26. Krüger, L., Demuth, I., Neitzel, H., Varon, R., Sperling, K., Chrzanowska, K.H., Seemanova, E. and Digweed, M. (2007) Cancer incidence in Nijmegen breakage syndrome is modulated by the amount of a variant NBS protein. *Carcinogenesis*, 28, 107-11.

27. Lavin, M.F., Gueven, N. (2006) The complexity of p53 stabilization and activation, *Cell Death Differ.* 13, 941–950.
28. Lenain, C., Bauwens, S., Amiard, S., Brunori, M., Giraud-Panis, M. J., and Gilson, E. (2006) The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair. *Curr Biol*, 16: 1303-1310.
29. Lipton, S.A. (1998) Excitotoxicity, Free Radicals, Necrosis, and Apoptosis, *The Neuroscientist*, Vol.4, No.5, 345-352.
30. Lee, J.H., Paull, T.T. (2005) ATM activation by DNA doublestrand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308: 551-554.
31. Lobitz S., Velleuer E. (2006) Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. *Nat Rev Cancer.*, 893-8. Epub 2006 Oct 12.
32. Maser, R.S., Zinkel, R. and Petrini, J.H. (2001) An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. *Nat Genet*, 27, 417-21.
33. McHugh, P.J., Spanswick, V.J., Hartley, J.A. (2001) Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance, *Lancet Oncol* (8)483-90.
34. McKinnon, P.J. (2004) ATM and ataxia telangiectasia *EMBO reports* 5, 8, 772–776.
35. Melchers, A., Stöckl, L., Radszewski, J., Anders, M., Krenzlin, H., Kalischke, C., Scholz, R., Jordan, A., Nebrich, G., Klose, J., Sperling, K., Digweed, M. and Demuth, I. A Systematic Proteomic Study of Irradiated DNA Repair Deficient *Nbn*-Mice. *Plos One* 2009 (article in press).
36. Pasquier, E. and Kavallaris, M. (2008) Microtubules: a dynamic target in cancer therapy. *IUBMB Life*, 60: 165-170.
37. Rohde, M., Daugaard, M., Jensen, M. H., Helin, K., Nylandsted, J., and Jaattela, M. (2005) Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev*, 19: 570-582.
38. Sasaki, M.S. and Tonomura, A. (1973) A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross linking agents. *Cancer Res.*, 33, 1829–1836.
39. Shiloh, Y. (2006) The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* 31:402-10.
40. Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., Shiloh, Y., (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 22:5612-5621.
41. van Overbeek, M. and de Lange, T. (2006) Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase, *Curr Biol* 16(13):1295-302.
42. Vos, M. J., Hageman, J., Carra, S., and Kampinga, H. H. (2008) Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry*, 47: 7001-7011.
43. Yazdi, P. T., Wang, Y., Zhao, S., Patel, N., Lee, E. Y., and Qin, J. (2002) SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev*, 16: 571-582.
44. Zhu, J., Petersen, S., Tessarollo, L. and Nussenzweig, A. (2001) Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol*, 11, 105-9.

3. ERKLÄRUNG ÜBER ART UND UMFANG DER MITWIRKUNG DES PROMOVENDEN BEI DER BEARBEITUNG DES FORSCHUNGSTHEMAS UND BEI DER ERSTELLUNG DER PUBLIKATIONEN

3.1

Demuth, I., Bradshaw, P., Lindner, A., Anders, M., Heinrich, S., Kallenbach, J., Schmelz, K., Digweed, M., Meyn, S. and Concannon, P. hSNM1B/Apollo interacts with TRF2 and stimulates ATM activation in response to ionizing radiation. DNA Repair (Amst). 2008, 7(8): 1192-201.

Beitrag im Einzelnen:

- Die Validierung der hSNM1B/TRF2-Interaktion beinhaltete die Herstellung von Expressionsplasmiden, die Teilstücke der hSNM1B-cDNA enthielten, deren Expression in entsprechenden Hefezellen (inklusive Überprüfung der Expression auf Proteinniveau), dem Nachweis der Proteininteraktion im Yeast-Two-Hybrid-System, sowie die Auswertung und Interpretation.

Gesamtanteil 10%

3.2

Anders, M., Mattow, J., Digweed, M. and Demuth I. Evidence for hSNM1B/Apollo functioning in the HSP70 mediated DNA Damage Response. Cell Cycle 2009;8(11):1725-32.

Beitrag im Einzelnen:

- Die Evaluation neuer hSNM1B-Bindungspartner erfolgte über: Transfektion von pCTAP-hSNM1B in HEK293-Zellen, Durchführung der Tandem-Affinity-Purification (TAP), Auftrennung der Eluate über Proteingele, Färbung mit Coomassie. Zudem wurden potentielle Interaktionspartner über Immunoblots verifiziert.
- Zur weiteren Validierung der HSP72/hSNM1B-Interaktion wurden verschiedene Myc-HSP72-Expressionsvektoren hergestellt. Dies geschah über Primergenerierung, RNA-Gewinnung, Umschreibung der RNA zur cDNA, Amplifikation mittels PCR, Klonierung über Restriktionsverdau, Ligation, Transformation und Verifizierung der Plasmide mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung. Die generierten Plasmide wurden zusammen mit einem Flag-hSNM1B-Expressionsvektor in menschliche Fibroblasten Ko-transfeziert. Die Überprüfung der Interaktion erfolgte über reziproke Ko-IPs (IP: anti-Flag, Western Blot: anti-Myc, IP: anti-Myc, WesternBlot: anti-Flag).
- Überprüfung der DNA-Schadensabhängigkeit der hSNM1B/HSP70-Interaktion
- Generierung von HSP72 depletierten Zellen (siRNA), Überprüfung des Knockdowns im Western Blot, Nachweis von nuklearen hSNM1B- und TRF2-Foci in Immunfluoreszenzuntersuchungen.
- Datenauswertung, graphische Darstellung und Statistik aller oben beschriebenen Versuche. Mitarbeit am Manuskript.

Gesamtanteil 70%

3.3

Melchers, A., Stöckl, L., Radszewski, J., Anders, M., Krenzlin, H., Kalischke, C., Scholz, R., Jordan, A., Nebrich, G., Klose, J., Sperling, K., Digweed, M. and Demuth, I. A Systematic Proteomic Study of Irradiated DNA Repair Deficient *Nbn*-Mice. PLoS ONE (2009)4(5): e5423. doi:10.1371/journal.pone.0005423

Beitrag im Einzelnen:

- Bestimmung des NAD^+/NADH -Gehaltes in Leberlysaten von *Nbn*^(+/del6)- und *Nbn*^(ins6/del6)-Mäusen. Dies beinhaltet Testungen in Vorversuchen, die Herstellung und Filtration von Leberlysaten, die Durchführung der NAD^+/NADH -Quantifizierung, Auswertung in Form von Diagrammen, sowie deren Interpretation.

Gesamtanteil 10%

Berlin, den

Dipl. Biologe Marco Anders

Berlin, den

Prof. Dr. Martin Digweed

4. PUBLIKATIONEN

4.1 Publikation 1:

Demuth, I., Bradshaw, P., Lindner, A., Anders, M., Heinrich, S., Kallenbach, J., Schmelz, K., Digweed, M., Meyn, S. and Concannon, P. hSNM1B/Apollo interacts with TRF2 and stimulates ATM activation in response to ionizing radiation. *DNA Repair (Amst)*. 2008, 7(8):1192-201.

4.2 Publikation 2

Anders, M., Mattow, J., Digweed, M. and Demuth I. Evidence for hSNM1B/Apollo functioning in the HSP70 mediated DNA Damage Response. *Cell Cycle* 2009;8(11):1725-32.

4.3 Publikation 3

Melchers, A., Stöckl, L., Radszewski, J., Anders, M., Krenzlin, H., Kalischke, C., Scholz, R., Jordan, A., Nebrich, G., Klose, J., Sperling, K., Digweed, M. and Demuth, I. A Systematic Proteomic Study of Irradiated DNA Repair Deficient *Nbn*-Mice. PloS ONE (2009) 4(5): e5423. doi:10.1371/journal.pone.0005423

5. PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen:

Bernhardt, A., Lechner, E., Hano, P., Schade, V., Dieterle M., Anders, M., Dubin, M., Benvenuto, G., Bowler, C., Genschik, P., Hellmann, H. (2006) CUL4 associates with DDB1a and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* (2006) 47, 591–603.
Impact Factor: 6,751

Demuth, I., Bradshaw, P., Lindner, A., Anders, M., Heinrich, S., Kallenbach, J., Schmelz, K., Digweed, M., Meyn, S. and Concannon, P. hSNM1B/Apollo interacts with TRF2 and stimulates ATM activation in response to ionizing radiation. *DNA Repair (Amst)*. 2008, 7(8):1192-201.
Impact Factor: 4,018

Anders, M., Mattow, J., Digweed, M. and Demuth I. Evidence for hSNM1B/Apollo functioning in the HSP70 mediated DNA Damage Response. *Cell Cycle* 2009;8(11):1725-32.
Impact Factor: 3,314

Melchers, A., Stöckl, L., Radszewski, J., Anders, M., Krenzlin, H., Kalischke, C., Scholz, R., Jordan, A., Nebrich, G., Klose, J., Sperling, K., Digweed, M. and Demuth, I. A Systematic Proteomic Study of Irradiated DNA Repair Deficient *Nbn*-Mice. *PLoS ONE* (2009) 4(5): e5423. doi:10.1371/journal.pone.0005423
Impact Factor: noch nicht bekannt

Poster auf Tagungen und Kongressen:

hSNM1B and TRF2 cooperate in response to DNA-damage
M. Anders, S. Heinrich, A. Jost, I. Demuth
DNA Repair 2006, 9. Tagung der Deutschen Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung (DGDR), 12.– 15. September 2006, Universität Hamburg

HSP70 interacts with the DNA-damage response protein hSNM1B/Apollo
M. Anders, J. Mattow, M. Digweed, I. Demuth
DNA Repair 2008, 10. Tagung der Deutschen Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung (DGDR), September 2.–5. 2008, Charité – Universitätsmedizin Berlin

6. TABELLARISCHER LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

7. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

„Ich, Marco Michael Anders, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Funktionsanalyse von hSNM1B/Apollo im Netzwerk der frühen zellulären DNA-Schadensantwort“ selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.“

Berlin, den 12.05.2009

Marco Anders

8. DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich Herrn Dr. Ilja Demuth und Herrn Prof. Dr. Martin Digweed für die Ermöglichung dieser Dissertation, Ihre persönliche Unterstützung durch innovative Ideen, sowie für eine Betreuung, die besser nicht sein konnte.

Bei Prof. Dr. Karl Sperling bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Humangenetik anfertigen zu dürfen.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Humangenetik danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die sehr angenehme Atmosphäre.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Nicole und Chiara, die mich immer liebevoll unterstützt haben.