

Aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin,
Arbeitsbereich Lipidstoffwechsel und Ernährungswissenschaft,
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zelluläre Untersuchungen zur Funktion des hSNM1B/Apollo-
Proteins unter Berücksichtigung von DNA-Schadensantwort und
Telomerlänge

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carolin Albers

aus Hamburg

Datum der Promotion: 23.06.2019

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen eines Artikels publiziert:

Herwest S.; **Albers C.**; Schmiester M.; Salewsky B.; Hopfenmüller W.; Meyer A.; Bertram L.; Demuth I.
The hSNM1B/Apollo variant rs11552449 is associated with cellular sensitivity towards mitomycin C and ionizing radiation. *DNA Repair (Amst)*. **2018**, 72:93-98. doi: 10.1016/j.dnarep.2018.09.004.

Beitrag: Durchführung der Telomerlängenbestimmung aus LCLs durch qPCR, statistische Auswertung, Interpretation und Mitgestaltung der graphischen Darstellung der erhobenen Daten sowie der in der Datenbank vorhandenen Telomerlängen aus Leukozyten, Ausarbeitung des Methodenteils zur qPCR

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	6
Abstract	7
1 Einleitung	8
1.1 Zelluläre Schadensantwort	8
1.1.1 DNA-Reparaturmechanismen	9
1.1.2 Zellzyklus-Arrest.....	11
1.1.3 Apoptose.....	13
1.2 Aufbau und Integrität der Telomere	14
1.3 Einzelnukleotidpolymorphismen.....	15
1.4 hSNM1B/Apollo.....	16
1.4.1 hSNM1B/Apollo in der DNA-Schadensantwort.....	17
1.4.2 hSNM1B/Apollo im Telomerschutz	20
1.4.3 hSNM1B/Apollo in der Pathogenese	21
1.5 Zielsetzung der Arbeit	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Zellkultur.....	24
2.1.1.1 Berliner Altersstudie II (BASE-II).....	24
2.1.1.2 Zelllinien	24
2.1.1.3 Zellkulturlösungen und -medien	25
2.1.1.4 Zellkulturzubehör und -geräte.....	25
2.1.2 Mutagene Behandlung (ionisierende Bestrahlung).....	26
2.1.3 Western Blot.....	26
2.1.3.1 Proteinlysat	26
2.1.3.2 Puffer.....	26
2.1.3.3 Gele und Membran	27
2.1.3.4 Proteinmarker.....	27
2.1.3.5 Antikörper	27
2.1.3.6 Western-Blot-Lösungen	28
2.1.3.7 Western-Blot-Zubehör und -Geräte	28
2.1.4 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)	28
2.1.4.1 DNA.....	28

2.1.4.2	DNA-Extraktions-Kit.....	28
2.1.4.3	Primer.....	29
2.1.4.4	Mastermix	29
2.1.4.5	Referenzzelllinien	29
2.1.4.6	qPCR-Zubehör und -Geräte	29
2.1.5	Allgemeines Laborzubehör	30
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Zellkultur.....	31
2.2.1.1	Auftauen kryokonservierter Zelllinien.....	31
2.2.1.2	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	31
2.2.1.3	Zellernte	32
2.2.1.4	Kryokonservierung	32
2.2.2	γ -Bestrahlung	32
2.2.3	Herstellung des Proteinlysats	33
2.2.4	Western Blot, Chemilumineszenznachweis und Auswertung.....	33
2.2.5	DNA-Extraktion	34
2.2.6	Durchführung der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR)	34
2.2.7	Methodik der Statistik	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Phosphorylierungsstatus nach Exposition mit ionisierender Strahlung	36
3.1.1	Phosphorylierungsunterschiede zwischen den Bestrahlungsdosen.....	39
3.1.2	Reproduzierbarkeit in den drei Wiederholungen	40
3.1.3	Phosphorylierungsgrad und Genotyp des SNPs rs11552449.....	41
3.1.4	Phosphorylierungsgrad und Apollo-Expressionslevel	44
3.2	Telomerlängenbestimmung	46
3.2.1	Telomerlänge lymphoblastoider Zelllinien und SNP rs11552449.....	46
3.2.2	Relative Leukozytentelomerlänge und SNP rs11552449.....	50
3.2.3	Korrelation von Leukozyten- und LCL-Telomerlänge	51
4	Diskussion	52
4.1	Diskussion der Methoden	52
4.1.1	Telomerlänge in Leukozyten und lymphoblastoiden Zelllinien	52
4.1.2	Passage der lymphoblastoiden Zelllinien.....	52
4.1.3	Einfluss der Immortalisierung in lymphoblastoiden Zelllinien.....	53

4.1.4	γ -Bestrahlung	53
4.1.5	Western Blot und Densitometrie	55
4.1.6	Telomerlängenbestimmung durch quantitative Polymerasekettenreaktion	56
4.1.7	Statistische Auswertung	57
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	58
4.2.1	Phosphorylierungsstatus nach IR-Exposition im Bezug zum Genotyp	58
4.2.1.1	Apollo in der Schadensantwort auf ionisierende Strahlung.....	58
4.2.1.2	p53, SMC1 und ATM in der Schadensantwort auf ionisierende Strahlung	58
4.2.1.3	Funktionelle Bedeutung des SNPs rs11552449	59
4.2.1.4	Phosphorylierungsstatus und Überleben.....	59
4.2.2	Telomerlänge im Bezug zum Genotyp.....	60
4.2.2.1	Apollo und Telomerdefekte	61
4.2.2.2	rs11552449 und der modulare Aufbau Apollos.....	61
4.3	Abschließende Bemerkung und Ausblick	62
	Literaturverzeichnis	64
	Tabellenverzeichnis	79
	Abbildungsverzeichnis	79
	Abkürzungsverzeichnis	80
	Eidesstattliche Versicherung	83
	Lebenslauf	84
	Danksagung	85

Abstrakt

Einleitung: hSNM1B/Apollo ist ein Protein der MBL/ β -CASP-Familie, das in der DNA-Schadensantwort, insbesondere für die zelluläre Reaktion auf *interstrand-crosslinks*, bedeutsam ist. Apollo-depletierte Zellen weisen Hypersensitivitäten gegenüber alkylierenden Substanzen (z. B. Mitomycin C), aber auch ionisierender Strahlung auf. Daneben sind Funktionen Apollos in der Telomerprotektion bekannt. Ein einzelner Basenaustausch (C > T) im Apollo-Gen *DCLRE1B* wird durch *in-silico*-Prädiktionsprogramme als Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) eingestuft. Es besteht eine Assoziation des SNPs (rs11552449) mit erhöhtem Brustkrebsrisiko. Zur Untersuchung der Zusammenhänge des SNPs sowie des Apollo-Expressionslevels auf RNA-Ebene mit der Aktivierung einer DNA-Schadensantwort über ATM wurde in der vorliegenden Arbeit die Eignung des Western Blots mit anschließender Densitometrie überprüft. Zudem wurden Assoziationen des Polymorphismus mit der Telomerlänge untersucht.

Methoden: Zur Untersuchung der Proteinkaskade erfolgten Anzucht und γ -Bestrahlung lymphoblastoider Zelllinien (LCLs, n = 12), die von gesunden Probanden aus der Berliner Altersstudie II stammen. Über den Nachweis im Western Blot wurde der Phosphorylierungsstatus für drei in die ATM-vermittelte Schadensantwort involvierte Proteine (ATM, p53, SMC1) bestimmt, mit einer Software (*ImageQuant 5.2*) densitometrisch ausgewertet und im Kontext von rs11552449-Genotyp (Sequenzierung) und Apollo-Expressionsniveau (qPCR) analysiert. In der qPCR ermittelte relative Telomerlängen aus LCLs (n= 62) sowie vorhandene Daten aus der BASE-II-Studie (n = 1710) wurden zudem auf den rs11552449-Genotyp bezogen hinsichtlich ihrer Unterschiede untersucht.

Ergebnisse: Unterschiede zwischen den Phosphorylierungsgraden konnten für p53, ATM und SMC1 in Abhängigkeit von der Strahlendosis, nicht aber über den Kategorien des Genotyps (CC, CT, TT) oder für das Apollo-Expressionsniveau auf RNA-Ebene gezeigt werden. Genotyp-abhängige Unterschiede in der Telomerlänge (LCLs und Leukozyten) waren nicht nachweisbar.

Schlussfolgerung: Die Ausgangshypothese, dass die Telomerlänge und der untersuchte SNP korrelieren, konnte nicht bestätigt werden. Für die Untersuchung der Zusammenhänge von IR-induzierter DNA-Schadensantwort und SNP sollten weitere Methoden auf ihre Eignung überprüft werden. Untersuchungen mit größeren Fallzahlen sowie die Betrachtung zusätzlicher Endpunkte sind zum tieferen Verständnis der Rollen und Interaktionen Apollos und des SNPs rs11552449 anzustreben.

Abstract

Introduction: hSNM1B/Apollo is a protein of the MBL/ β -CASP-family that functions in DNA-damage-response, especially regarding the cellular response to interstrand-cross-links. Apollo-depleted cells show hypersensitivity towards alkylating substances (e. g. mitomycin C), but also ionizing radiation (IR). In addition to its roles in DNA damage response, Apollo is known to have functions in the protection of telomeres, for instance via interaction with proteins of the shelterin-complex such as TRF2. A single base exchange (C > T) in the Apollo gene, *DCLRE1B* has been identified as a single nucleotide polymorphism (SNP) by *in-silico*-prediction programs. An association of this SNP with an elevated risk of breast cancer has been shown. In this study, the suitability of Western Blot as a method for the investigation of the relationship between rs11552449 as well as the Apollo RNA-expression with the activation of the DNA-damage-response pathway via ATM have been tested. Moreover, this relationship as well as the correlation of the polymorphism with telomere length have been studied.

Methods: Investigation of the ATM pathway was performed through cultivation of lymphoblastoid cell lines (LCLs, n = 12) established from healthy subjects from the Berlin Aging Study II (BASE-II) and exposure to ionizing radiation. Western blotting and densitometry via the *ImageQuant* software were used to determine the changes in phosphorylation after exposure. The results were analyzed with respect to the genotype of the investigated SNP that had been determined via qPCR beforehand as well as the Apollo RNA-expression known from qPCR experiments. This was performed for three proteins involved in the ATM-pathway (ATM, p53, SMC1). Relative telomere length was identified through qPCR for LCLs (n = 62). The association of the obtained data as well as data from the Berlin Aging Study II (n = 1710) with the rs11552449 genotype was then tested.

Results: Significant differences were detected between the phosphorylation status of p53, ATM and SMC1 according to the different radiation dose, however, not regarding the categories of the SNP's genotype as well as the Apollo RNA expression level. As for telomere length, neither in LCLs nor in leukocytes significant differences were found in relation to the rs11552449 genotype.

Conclusion: The initial hypothesis that telomere length and SNP would correlate could not be confirmed. In order to investigate the associations of IR-induced DDR and the SNP further, other methods should be tested regarding their suitability. Also, future investigations with larger sample groups and additional endpoints will be needed for a deeper understanding of the roles and interactions of Apollo in the context of rs11552449 genotype.

1 Einleitung

1.1 Zelluläre Schadensantwort

DNA-Schäden sind exogen oder endogen verursachte, strukturelle Veränderungen der DNA, die eine Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR) mit Beteiligung verschiedener *pathways* hervorrufen können. Einzel- und Doppelstrangbrüche (*Single-strand-breakage*, SSB und *Double-strand-breakage*, DSB) sind nur Beispiele einer Vielzahl möglicher Schädigungsarten [1]. Es können endogene Schäden wie Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies von exogenen Mechanismen unterschieden werden [2]. So kann beispielsweise ionisierende Strahlung (IR, *ionizing radiation*) eine Reihe von DNA-Schäden hervorrufen, darunter SSBs, DSBs, und oxidative Schäden, welche häufig an Genorten mit räumlicher Nähe zueinander auftreten (*cluster*) [3]. Auch chemische Agenzien wie Mitomycin C (MMC) und Cyclophosphamid, die häufig in der Tumorthherapie eingesetzt werden, können durch Übertragung von Methyl- bzw. Ethylgruppen die DNA schädigen [4]. Durch solche exogenen, aber auch durch endogene Noxen (z.B. Acetaldehyde) kann eine besonders gefährliche Art von DNA-Schäden induziert werden: *interstrand-crosslinks* (ICLs) [5]. Dabei handelt es sich um eine kovalente Vernetzung beider physiologischerweise nur über Wasserstoffbrückenbindungen verbundener DNA-Stränge [6]. Transkription und Replikation der Zelle werden durch die ICLs unmöglich, sodass die betroffene Zelle ohne Reparatur den Zellzyklus nicht weiter durchlaufen kann. Weiterhin kann es zu Chromosomenbrüchen, *-rearrangements* und Zelltod kommen. Je nach Art und Lokalisation können unzureichend reparierte DNA-Schäden zu Mutationen und nachfolgender Entstehung dysfunktionaler Proteine mit übermäßiger oder verminderter Expression führen [7]. Treten derartige Mutationen in proliferierenden Zellen wie hämatopoetischen Stammzellen auf und kommt es zur Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, kann dies zur Tumorgenese beitragen [2,4,8]. Veränderungen in nicht-proliferierenden Zellen wie neuronalem Gewebe tragen u. a. zur vorzeitigen Zellalterung bei [8]. Epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierungen (CpG-Inseln) oder Histon-Seitenkettenacetylierung sind von Mutationen abzugrenzen, wenn auch ebenfalls funktionell relevant [4]. Sie werden als reversible, vererbare Modifikationen der DNA oder Histone definiert, welche die Transkription inhibieren oder fördern können und in verschiedenen Erkrankungen eine Rolle spielen [9].

1.1.1 DNA-Reparaturmechanismen

Um den Schäden an der DNA zu begegnen, verfügt der menschliche Organismus über spezifische Reparaturmechanismen [4,10,11]. Für die Reparatur von Einzelstrangschäden kommen Basenexzisionsreparatur- (BER) und Nukleotidexzisionsreparatur-Mechanismen (NER) sowie die *mismatch*-Reparatur in Frage [11–14]. Für Brüche, die beide DNA-Stränge betreffen, können vorrangig zwei Reparaturmechanismen unterschieden werden [15]. Beim nicht-homologen *end-joining* (NHEJ) werden die DNA-Enden an der Bruchstelle ligiert. Durch die wiederhergestellte Integrität kann der DNA-Strang wieder abgelesen und repliziert werden, möglicherweise jedoch unter Verlust oder Translokation von genetischer Information. Die homologe Rekombination (HR) kommt bei DSBs an DNA-Replikationsgabeln zum Einsatz [16]. Hierbei ist die Gefahr des Informationsverlustes geringer, da die Stränge unter Zuhilfenahme eines homologen Matrizenstranges (z. B. eines Schwesterchromatids) regeneriert werden. Es kann jedoch zu Genkonversionen kommen, also der nicht-reziproken Substitution eines DNA-Abschnitts durch eine homologe Sequenz aus einem anderen oder demselben Gen [17]. Können DNA-Schäden nicht unmittelbar behoben werden, so ist es für die Zelle u. U. relevant, die Information nichtsdestotrotz ablesen und über die Läsionen hinweg replizieren zu können [18,19]. *Translesion synthesis* (TLS) bezeichnet einen solchen Mechanismus, bei dem spezielle Polymerasen (*TLS Polymerasen*) zum Einsatz kommen. Diese sind in der Lage, die Läsion zu überbrücken und Nukleotide gegenüber des Defekts einzufügen, sodass der Defekt zwar im Strang verbleibt, die Replikation jedoch stattfinden und der Zellzyklus weiter durchlaufen werden kann [20].

Für die Reparatur der ICLs ist eine Kombination verschiedener Mechanismen beschrieben worden [6,8,21]. Ein essentieller Schritt ist dabei das *unhooking*, bei dem einer der DNA-Stränge beidseits der Vernetzung inzidiert wird [6]. In der Replikationsphase der Zelle kann dies durch Interaktion von Proteinen wie Mus81-Eme1 in einem DSB resultieren [22]. Die Serin/Threonin-Kinase ATM (*ataxia teleangiectasia mutated*) fungiert weit oben in der Signalkaskade und hat die Aktivierung weiterer Exonukleasen zur Folge. Diese eliminieren fehlerhafte Nukleotide am Schädigungsort. Anschließend erfolgt die Prozessierung mittels HR, NHEJ oder TLS.

Neben ATM sind zwei weitere Proteinkinasen zentral in der Koordination der DNA-Schadensantwort: ATR (*ataxia-Rad3-related*) und DNA-PK (*DNA-Proteinkinase*), die ebenso wie ATM zur PIKK-Familie (*phosphoinositol-3-kinase like kinase*) gehören [1,23] (Abbildung 1.1). ATM autophosphoryliert bei DSBs an Ser1981 und interagiert anschließend mit dem Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex (MRN) an den DNA-Enden. Es ist für die Phosphorylierung weiterer

Proteine verantwortlich, darunter SMC1 (*structural maintenance of chromosomes protein 1*) (Ser957 und Ser966), p53 (Ser15) und γ H2A.X (Ser139) (*Histon 2A.X*) [24–26]. Das ATM-Protein spielt damit eine wichtige Rolle für Zellzykluskontrolle, Apoptose, Seneszenz und DNA-Reparaturmechanismen, wie NHEJ im Zusammenspiel mit DNA-PK, MRN-Komplex und dem DSB/V(D)J-Rekombinationsprotein Artemis sowie untergeordnet auch für HR [27–32]. Auch eine Funktion in der Chromatinorganisation wird angenommen [33]. ATR wird über den Kofaktor ATRIP (*ATR-interacting protein*) zu verschiedenen Schäden von Einzelstrang-DNA (ssDNA) geführt, die mit dem ssDNA-Proteinkomplex RPA (*replication protein A*) überzogen sind [34]. Dort wird es durch Aktivatorproteine wie TopBP1 (*topoisomerase binding protein 1*) oder ETAA1 (*Ewing tumor associated antigen*) in Kombination mit einer ssDNA/dsDNA Schnittstelle aktiviert [35,36]. Über Proteine wie FANCI (*Fanconi anemia, complementation group I*) kann es in der DNA-Reparatur wirken [37]. Zudem agiert es am intra-S-Phase-Kontrollpunkt [38,39]. ATR wird daneben eine Rolle in der Stabilität der Replikationsgabel zugeordnet [40]. In dieser Funktion unterscheidet sich ATR von ATM und zeigt zudem Interaktion mit dem *Fanconi anemia/breast cancer* (FA/BRCA)-pathway [41]. Die DNA-PK wird über das Ku70/80 Heterodimer an DSBs platziert und ist an der folgenden NHEJ beteiligt [42,43].

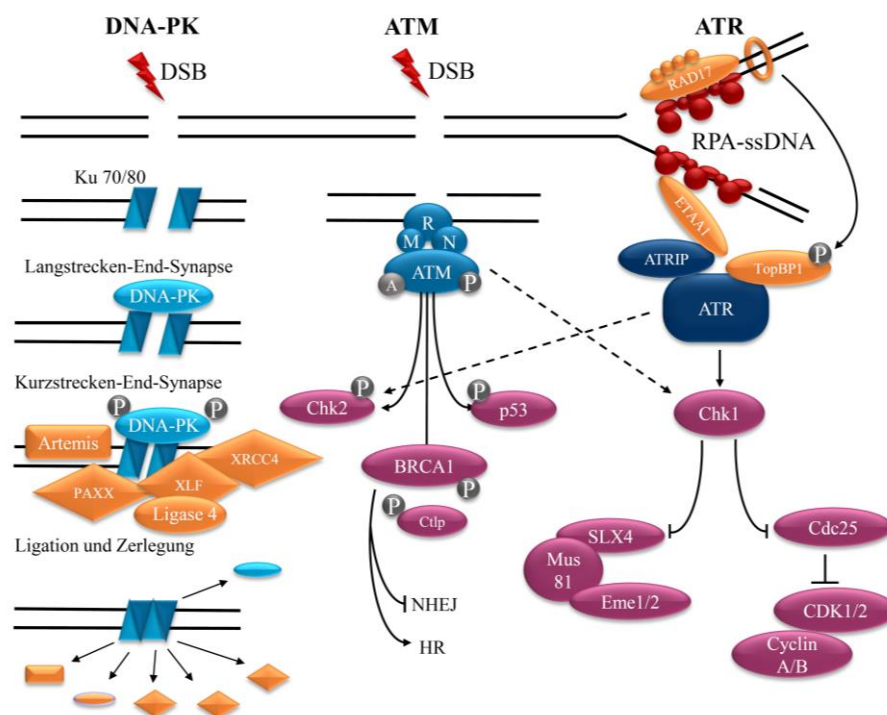


Abbildung 1.1: Darstellung ausgewählter Signalkaskaden (magenta) mit Beteiligung von ATM, ATR und DNA-PK. Kofaktoren sind hellblau, Koaktivatoren orange dargestellt. P bezeichnet Phosphatgruppen. Eigene Abbildung in Anlehnung an [23].

Endogen bedingte Schäden können größtenteils durch das Reparatursystem ausgebessert werden. Da das System jedoch nicht zu hundert Prozent effektiv ist, herrscht immer ein *steady-state* nicht reparierten Erbguts [44]. Insbesondere durch zusätzliche exogene Noxen besteht die Gefahr der kapazitären Überlastung des Reparatursystems [4]. Treten zudem neuartige Schädigungsformen aufgrund externer Einflussfaktoren auf, so können nicht reparierte Zellen akkumulieren.

Dies ist auch der Fall, wenn das Reparatursystem nicht vollständig funktionsfähig ist. Infolgedessen entstehen Erkrankungen, die neben teils schwerwiegenden Fehlbildungen auch mit einer erhöhten Tumorzinzidenz oder beschleunigter Zellalterung einhergehen können [45]. Ein Beispiel für eine Erkrankung mit einem Defekt des DNA-Reparatursystems ist Ataxia teleangiectasia [46]. Die hier auftretende Mutation im ATM-Gen zieht dessen Funktionsverlust nach sich. Die Betroffenen weisen eine Reihe von Symptomen wie Teleangiektasien, progressive zerebelläre Atrophie, Ataxie und Immundefizienz auf [47]. Daneben wurde bei diesen Patienten eine erhöhte Inzidenz von Leukämien und Hodgkin-Lymphomen sowie eine gesteigerte Sensitivität für Röntgenstrahlung und einige Alkylanzien festgestellt. Für die Entstehung der Fanconi-Anämie werden biallelische Mutationen in einem von 20 bisher bekannten autosomalen oder einem x-chromosomalen Gen des FA/BRCA-*pathways* verantwortlich gemacht. Die FA-Proteine spielen vermutlich eine Rolle in der Reparatur von ICLs, welche bei FA-Gen-Mutation entsprechend fehlerhaft ablaufen kann [48]. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine therapierefraktäre Anämie, Organfehlbildungen und eine deutliche Prädisposition für Leukämien und solide Tumoren [49].

1.1.2 Zellzyklus-Arrest

Während irreparable DNA-Schäden in nicht-proliferierenden Zellen akkumulieren und zur Zellalterung beitragen, kann in proliferierenden Zellen durch ein Zusammenspiel periodisch auf- und abgebauter Cycline sowie konstitutiv vorhandener Cyclin-abhängiger Kinasen der Ablauf des Zellzyklus reguliert und gegebenenfalls ein Arrest herbeigeführt werden [8,50]. Angriffspunkte dieser Regulation sind die Übergänge zwischen den vier Phasen des Zellzyklus (G₁-, M-, G₂- und S-Phase), die sog. *Checkpoints* [51] (Abbildung 1.2), darunter der Eintrittspunkt ruhender Zellen (G₀-Phase) in den Zellzyklus, G₁/S- und G₂/M-Übergang sowie Prophasekontrollpunkt nach Abschluss der S-Phase und Anaphasekontrollpunkt nach Spindelformation in der Metaphase [52].

Auch an der Regulation dieser Kontrollpunkte sind die drei zentralen DDR-Proteine beteiligt. Der G₂/M-Übergang wird vom CDK1/CyclinA- bzw. CDK1/CyclinB-Komplex gesteuert, welcher der

Regulation durch den CDK7/Cyclin-H/MAT-1-Komplex (MAT-1: *menage a trois* homologe 1) und Cdc25 unterliegt [53]. Aktivierung und Wirkung dieser Phosphatase sind vielfältig. Mögliche Aktivierungswege führen beispielsweise über die Serin-Threonin-Kinasen Chk1 und Chk2 [38,54,55]. Chk1 kann dabei durch ATR, insbesondere nach IR-Exposition aber auch durch ATM phosphoryliert werden und verursacht daraufhin die Phosphorylierung von Cdc25A. Dieses ist essentiell für den Übergang von G₂- in M- sowie G₁- in S-Phase [23,56,57]. Neben der Dephosphorylierung des CDK1/CyclinB-Komplexes löst es Signale für die eigene Degradierung durch das Proteasom und damit die Inaktivierung des CDK2/CyclinE-Komplexes aus, und kann so einen Zellzyklus-Arrest am G₁/S-Übergang herbeiführen [58]. Chk2 ist eines der Effektorproteine von ATM, das bei DSB zum Beispiel durch ionisierende Strahlung aktiviert wird. Über die Phosphorylierung von Cdc25A und folglich CDK2 kommt es zum Stopp am G₁/S-Übergang, über die gehemmte Aktivierung des CDK1/CyclinB-Komplexes zu einem Stopp am G₂/M-Übergang und über die Phosphorylierung von p53 und die folgende Induktion von p21 waf1 (CDK-Inhibitor) werden G₁/S- und G₂/M-Arrest unterstützt [31,59,60].

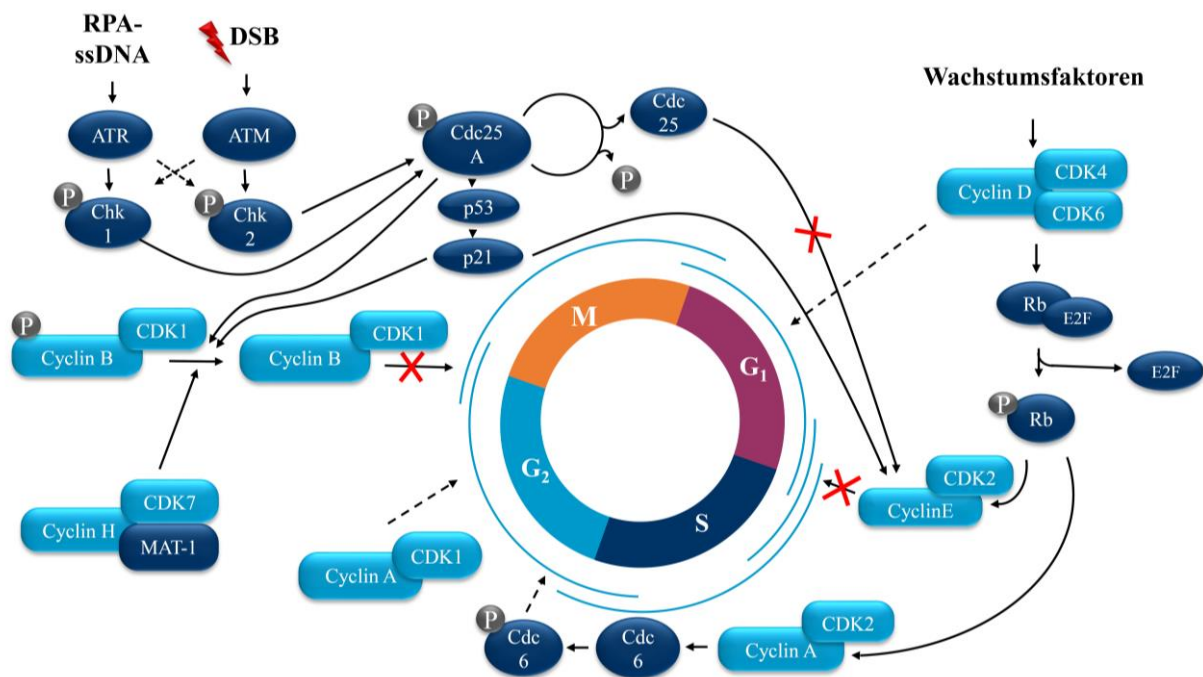


Abbildung 1.2: Darstellung des Zellzyklus und ausgewählter für die Regulation der Kontrollpunkte relevanter Kaskaden. Kreisbogen (hellblau) stellen vom jeweiligen CDK/Cyclin-Komplex regulierte Phasen dar. P bezeichnet Phosphatgruppen. Eigene Abbildung in Anlehnung an [23,31,52,59,61,62].

1.1.3 Apoptose

Können aufgetretene DNA-Schäden nicht behoben werden, so kann die Zelle in die Apoptose oder die Seneszenz überführt werden, sodass die Weitergabe mutagener Sequenzen verhindert wird [1]. Unter Seneszenz wird ein Zustand verstanden, in dem die Zelle keine weiteren mitotischen Teilungen durchläuft [63]. Apoptose beschreibt den programmierten Zelltod [64]. Hierfür entscheidend sind vorrangig zwei Wege, an denen als Proenzyme vorliegende Cystein-Proteasen (Caspasen) essentiell beteiligt sind [65] (Abbildung 1.3). Hauptakteur im Todesrezeptor-*pathway* ist Caspase-8, deren Aktivierung aus der Procaspase über *induced proximity* erfolgt: Über Ligandenbindung am Todesrezeptor (FAS) und das Adapterprotein FADD (*FAS-associated protein with death domain*) akkumulieren Procaspase-8-Moleküle, deren geringe proteolytische Aktivität in der Summe für die gegenseitige Aktivierung der Caspasen ausreicht. Der zweite Weg führt über die Mitochondrien. Zentraler Spieler ist Caspase-9, die mehrere Komponenten zur Aktivierung benötigt: während Proteolyse nur untergeordnet an der Aktivierung beteiligt ist, hat das Zusammenspiel verschiedener Proteine unter Bildung des *Apoptosoms* eine tragende Rolle [66]. Dieses wird aus Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*), dem spezifischen Kofaktor der Caspase-9, und Cytochrom c gebildet [67]. Die genannten *upstream* Caspasen aktivieren anschließend weitere Caspasen, die proteolytisch auf ihre Substrate wirken und je nach abgespaltener Gruppe die Funktion ihrer zahllosen Zielproteine beeinflussen können [68].

Anhand von ATM und p53 lässt sich der Grat zwischen DNA-Reparatur und Apoptose aufzeigen [69]. ATM hat neben Zellzyklus und DNA-Schadensantwort auch Funktionen in Apoptose und Seneszenz. Es phosphoryliert p53 an Ser15, welches selbst an DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Apoptose beteiligt ist [25]. Seine Phosphorylierung resultiert in reduzierter Interaktion mit einem p53-negativ-Regulator, dem Onkogen Mdm2 (*mouse double minute 2 homolog*) sowie der schnelleren Stabilisierung und Aktivierung von p53 [70]. Daneben kann beispielsweise über Chk2 und p53 ein verzögerter Weg zur Apoptose eingeschlagen werden [71]. Darüber, welcher *pathway* anschließend ausgelöst wird, entscheiden nach aktuellem Wissensstand Zell- und Schädigungstyp [72].

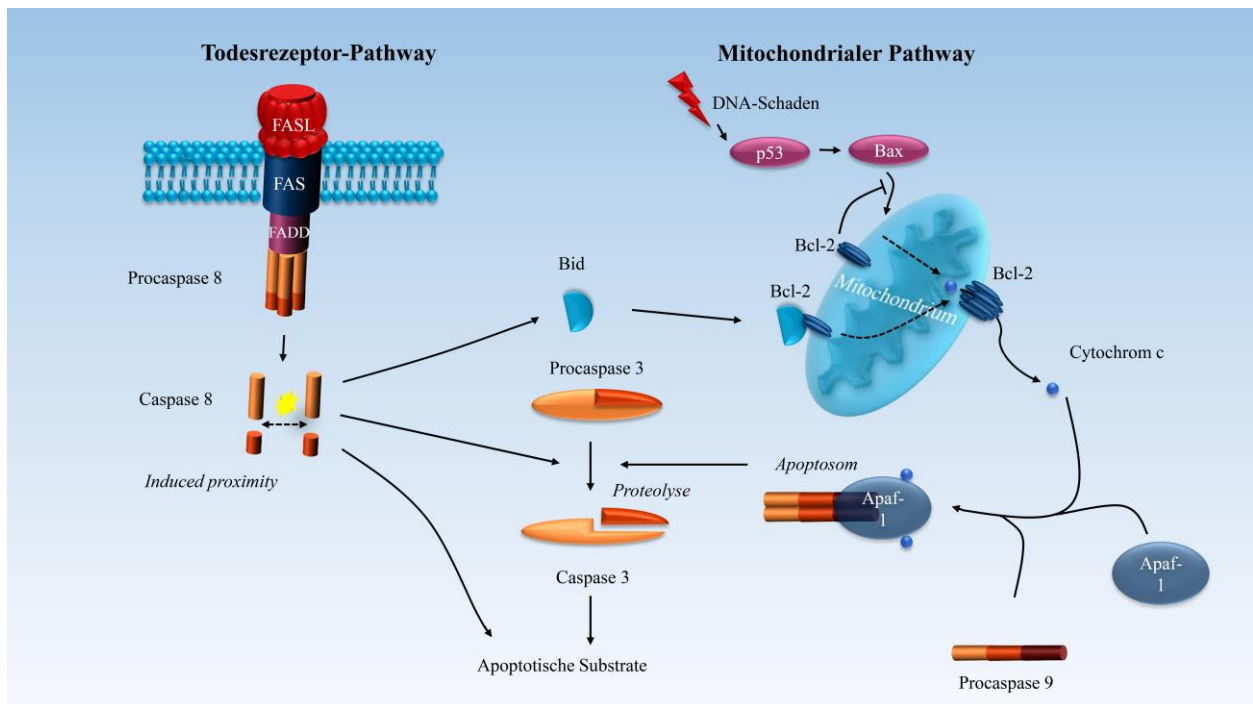


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der beiden hauptsächlichen Apoptosewege anhand ausgewählter Beispiele. Kursive Beschriftung stellt die Aktivierungsmechanismen der Caspasen (orange) heraus. Eigene Abbildung in Anlehnung an [65].

1.2 Aufbau und Integrität der Telomere

Die DNA-Replikation ist für jede Zellteilung notwendig, und spielt beim Alterungsprozess, aber auch bei Wachstum, Regeneration und Heilungsvorgängen eine wichtige Rolle [50]. Der komplexe Vorgang wirft jedoch das DNA-End-Replikations-Problem auf, also die Verkürzung der Strangenden während des Vorgangs [73]. Der Grund hierfür ist, dass nach Entfernen des RNA-Primers am 5'-Ende kein freies 3'-OH-Ende existiert, an dem die Polymerase ansetzen und das letzte Nukleotid anbauen könnte [73,74].

Wären diese Genabschnitte kodierend, würde mit jeder Replikation etwas Erbinformation verloren gehen. Tatsächlich aber konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Grenzbereichen um repetitive Sequenzen (*Minisatelliten-DNA*, *short tandem repeats*) handelt, die das Erbgut vor Verlusten bei der Replikation schützen [75]. Diese Sequenzen bestehen beim Menschen aus den Nukleinbasen TTAGGG (Thymin, Adenin, Guanin) und enden in einem G-reichen Einzelstrang, dem sogenannten G-Überhang [76]. Dieser bildet eine Struktur, die verhindert, dass das 3'-Ende als Doppelstrangbruch erkannt wird, den sogenannten *T-Loop*. Für die Stabilisierung dieser Formation ist der Shelterin-Komplex von zentraler Bedeutung [77]. Er setzt sich aus sechs

Proteinen zusammen: POT1 (*protector of telomeres*), TRF1 (*telomere repeat factor1*), TRF2 (*telomere repeat factor2*), TIN2 (*TRF1 interacting nuclear factor 2*), TPP1 (*TINT1, PTOP, PIP1 — POT1-TIN2 organizing protein*) und RAP1 (*repressor/activator protein 1*). Interessanterweise kommen auch C-Überhänge des komplementären Stranges (*lagging strand*) vor, sodass der zusätzliche Telomerabbau durch Nukleasen angenommen wird [78]. Im Zuge der Replikation kommt es nicht nur zur Verkürzung der Telomersequenzen, sondern auch zum Verlust von Shelterinkomponenten sowie folglich der der *T-Loop*-Struktur [79]. Infolgedessen werden die Telomere als DNA-Schäden erkannt und können eine DDR auslösen [80].

Die Länge der Telomere ist bedeutsam für die Anzahl der verbleibenden Replikationszyklen. Dieser Zusammenhang wird als *mitotic clock* bezeichnet und mit der physiologischen Zellalterung in Zusammenhang gebracht [81]. Verschiedene Erkrankungen wie beispielsweise Atherosklerose korrelieren ebenso wie bestimmte Umgebungsfaktoren, Lebensstil und Körperkonstitution invers mit der Telomerlänge [82–84].

Die Telomerase besitzt im Sinne einer reversen Transkriptase die Fähigkeit, die Telomere durch Addition der TTAGGG-Nukleotidsequenz zu verlängern [85]. Eine Aktivität des Ribonukleoproteins konnte beim Menschen lediglich in den Keimzellen und Stammzellen des Knochenmarks sowie in Tumorzellen nachgewiesen werden [86,87]. Ob in allen anderen Körperzellen tatsächlich ausschließlich mit jeder Replikation eine Verkürzung der Telomere stattfindet oder ob es doch auch Telomerverlängerung geben kann, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.3 Einzelnukleotidpolymorphismen

Einzelnukleotidpolymorphismen (*single-nucleotide-polymorphism*, SNP) sind häufig auftretende Variationen einzelner Basenpaare der DNA [88]. Die meisten dieser Variationen liegen in nicht kodierenden Bereichen. In der Medizin sind sie vor allem als Marker interessant [89]. Für einige der selteneren, in kodierenden Bereichen vorkommenden SNPs konnten Zusammenhänge mit der Funktion des Gens sowie der Prädisposition für verschiedene Erkrankungen gezeigt werden. Bedeutsame SNPs sind im Zusammenhang mit einer Vielzahl an Krankheiten identifiziert worden, darunter auch solche, die im Zusammenhang mit der DNA-Schadensantwort stehen. Ein solcher Polymorphismus konnte beispielsweise im MDC1-Gen (*mediator of DNA-damage control protein 1*) identifiziert werden, dessen Genprodukt an der ATM-vermittelten Schadensantwort auf DSBs

beteiligt ist [90]. Der identifizierte SNP rs4713354 (A>C) ist signifikant mit der Suszeptibilität für Lungenkarzinome assoziiert.

1.4 hSNM1B/Apollo

Im Rahmen der Forschungen am Reparaturmechanismus für ICLs wurden *Saccharomyces cerevisiae* Mutanten identifiziert, die eine spezifische Hypersensitivität gegenüber ICLs zeigten [91]. Es ließen sich diesen Mutationen Allele zuordnen, die entsprechend ihrer Sensitivitäten (Pso: Psoralen, SNM: *nitrogen mustard*) benannt und durchnummeriert wurden (Pso1-10) [92]. Das Genprodukt von Pso2p fungiert als 5'-Exonuklease spezifisch bei der Reparatur von durch ICL-Schadensantwort entstandenen DSBs [93]. Das aktive Zentrum besteht aus einer Metallo-beta-Lactamase (MBL) und der beta-CASP-Domäne (benannt nach den repräsentativen Mitgliedern CPSF (*cleavage and polyadenylation specificity factor*), Artemis, SNM1 und Pso2), welche eine Untergruppe der MBL-Familie ist [94]. In Säugetieren wurden fünf strukturell ähnliche Proteine identifiziert [95]. Drei davon, SNM1A, SNM1B/Apollo und SNM1C/Artemis (Gene: *DCLRE1A* (*DNA-crosslink repair protein 1A*), *DCLRE1B* und *DCLRE1C*) sind sowohl in die DNA-Schadensantwort als auch in die Zellzykluskontrolle involviert. Für das gut untersuchte hSNM1A wird eine Rolle in der Reparatur IR-induzierter DNA-Schäden, insbesondere ICLs angenommen [96]. Auch an der Kontrolle des G₁- und der mitotischen Checkpoints ist es beteiligt [97]. hSNM1C/Artemis hat eine Rolle in der V(D)J-Rekombination des adaptiven Immunsystems sowie in der Schadensantwort auf DSB, insbesondere nach IR sowie für die Zellzyklusregulation als Reaktion auf verschiedene Stressoren [98,99]. Für die ICL-Reparatur scheint es nicht essenziell zu sein [100]. hSNM1B/Apollo ist eine weniger erforschte 5'-Exonuklease mit einer Präferenz für einzelsträngige Substrate, welche ebenfalls eine Doppelrolle in DNA-Schadensantwort sowie Erhalt der Telomerintegrität innehat [101–103]. Das hSNM1B-Protein wird von vier Exonen auf Chromosom 1p13.1-13.3 kodiert und setzt sich aus 532 Aminosäuren zusammen [5] (Abbildung 1.4). Im N-terminalen Bereich des hSNM1B/Apollo-Proteins befindet sich eine Sequenz mit 33%iger Homologie zu Pso mit einer MBL- und einer beta-CASP-Domäne [102].

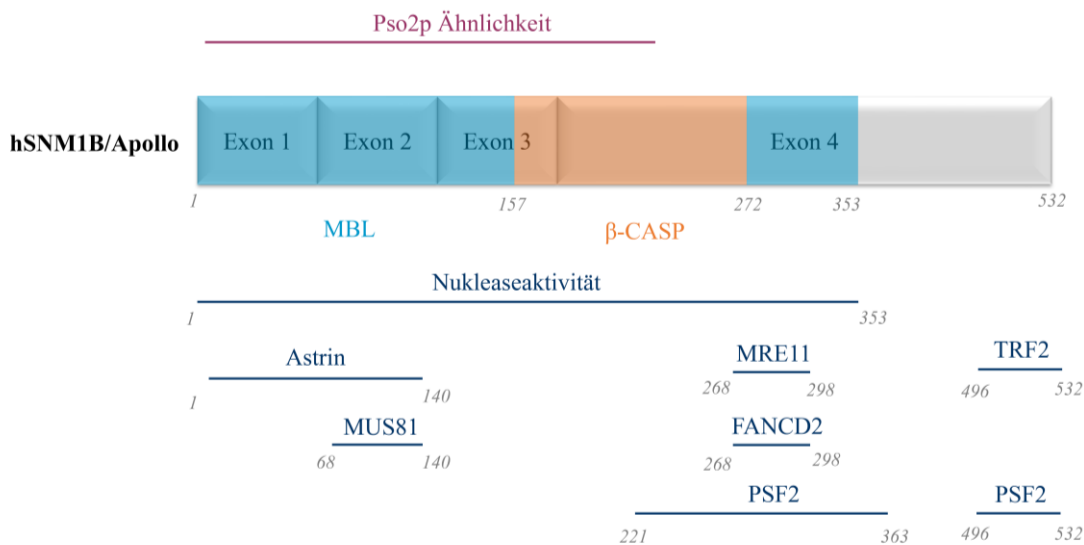


Abbildung 1.4: Darstellung der genomischen Struktur und funktioneller Domänen von hSNM1B/Apollo; Index-Zahlen (hellgrau) stellen Aminosäurepositionen dar, die farbigen Flächen zeigen MBL- und β-CASP-Domänen, horizontale Linien (dunkelblau) zeigen Interaktionspartner an den jeweiligen Domänen. Eigene Abbildung in Anlehnung an [5].

1.4.1 hSNM1B/Apollo in der DNA-Schadensantwort

In der Kontrolle mehrerer *Checkpoints* konnten auch hSNM1B/Apollo verschiedene Funktionen zugewiesen werden. Bae et al. zeigten die Beteiligung von hSNM1B/Apollo an der Aktivierung des S-Phase-Kontrollpunktes nach Schädigung durch Mitomycin C [101]. Der Nachweis einer Interaktion mit dem MRN-Komplex und FANCD2 ist ein weiteres Indiz für diese Rolle. Auch scheint Apollo über Interaktion seiner MBL-Domäne mit dem Mikrotubulin-bindenden Astrin den Prophase-Kontrollpunkt bei Spindelstress zu verstärken [104]. Ein Verlust dieser Funktion führt zur Verzögerung der Mitose. hSNM1B-depletierte humane GM00637 Fibroblasten (*Simian-virus-40* (SV40) transformiert) zeigten zudem einen unvollständigen G₂/M-Arrest bei IR-induzierten DSBs [101,105]. Bei genauerer Untersuchung waren Zusammenhänge mit den durch Chk1 und Chk2 vermittelten *pathways* ersichtlich. So zeigten Apollo-depletierte GM00637-Zellen nach UVC-Exposition eine verminderte Chk1-Phosphorylierung, während nach MMC-Behandlung Apollo-depletierter HEK293T-Zellen (*human embryonic kidney cells*) Defekte des ATM-vermittelten Chk2-Signalwegs zu beobachten waren [101,106].

Interessanterweise ähneln die Charakteristika Apollo-depletierter Zellen, wie Hypersensitivität gegenüber ICL-induzierenden Agenzien, erhöhte IR-Sensitivität und Defekte der Zellzykluskontrolle, den Merkmalen von FA-Zellen, sodass eine Rolle im FA-*pathway* erwogen wurde [107]. Drei wesentliche Schritte bestimmen die ICL-Reparatur über den FA-*pathway*: *upstream*-Proteine akkumulieren an DNA-Schadensorten im *FA-core-Komplex*, welcher anschließend die Monoubiquitinierung von FANCD2 und FANCI katalysiert [5]. Der Komplex ist schließlich am Chromatin lokalisiert und *downstream* Reparaturproteine werden rekrutiert. Tatsächlich konnte eine direkte Interaktion von hSNM1B mit FANCD2 und FANCP/SLX4 gezeigt werden [101,102].

Auch für die Reduktion des Replikationsstress ist Apollo relevant. hSNM1B-Depletion in humanen Fibroblasten, HeLa- und HCT116-Zellen führt zu Hypersensitivität gegenüber dem DNA-Polymerase- α - und - δ -Inhibitor Aphidicolin [108]. Für die Reparatur Aphidicolin-induzierter Schäden werden u. a. FANCD2 und BRCA1 benötigt. Diese können bei Apollo-Defizienz nicht suffizient rekrutiert und der resultierende Replikationsstress nicht adäquat umgangen werden. Über direkte Interaktion mit der Endonuklease Mus81-Eme1 sowie unter Beteiligung weiterer Enzyme (MRE11, FANCP/SLX4) ist Apollo zudem nach der Entstehung von ICLs an der Generierung von DSBs und der Prozessierung folglich arretierter Replikationsgabeln beteiligt [101]. Daneben konnte eine Interaktion mit PSF2 (*partner of SLD five 2*), einem Protein des GINS-Komplexes (bestehend aus SLD5, PSF1, PSF2, und PSF3) gezeigt werden, der als Teil des Replisoms für die Replikationsinitiation relevant ist [109]. PSF2-Depletion in HeLa-Zellen (*Henrietta-Lacks-Zervix-Karzinom-Zellen*) führte ebenfalls zu Hypersensibilisierung für ICLs [110]. Während die These, dass Apollo an der der Reparatur von ICLs beteiligt ist durch diverse Beobachtungen gestützt wird, ist seine Funktion in der IR-Schadensantwort noch nicht hinreichend erklärt, sodass es weiterer Untersuchungen bedarf, um diese Rolle zu eruieren.

Demuth et al. konnten zeigen, dass hSNM1B mit TRF1 und TRF2 an den Telomeren kolokalisiert ist [105]. Nach Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Laser-Mikro-UVA-Bestrahlung in humanen Fibroblasten ließen sich zudem vermehrte hSNM1B-Foci nachweisen. Die Interaktion mit dem an der frühen DDR nach IR beteiligten TRF2 sowie die Beobachtung, dass Apollo *in vivo* innerhalb von 10 Sekunden nach Induktion an DSB lokalisiert ist, weisen auf eine Rolle Apollos in der frühen DNA-Schadensantwort hin. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass sowohl die ATM-Autophosphorylierung, als auch die Phosphorylierung mehrerer *downstream* Proteine in hSNM1B-depletierten SV40-transformierten Fibroblasten und HEK293T-

Zellen nach IR verzögert war. In einer anderen Studie resultierte Apollo-Depletion von B-Zellen aus Hühnern (DT40) in erhöhter Sensitivität gegenüber MMC und Cisplatin [111]. Auch in menschlichen Apollo-depletierten HeLa-Zellen konnten verringerte Überlebensraten und vermehrt chromosomale Aberrationen nach MMC-/Cisplatin-Behandlung beobachtet werden [102].

Nach ionisierender Strahlung zeigten mittels siRNA hSNM1B-depletierte GM00637-Zellen im Immunoblot eine geringere Autophosphorylierung von ATM an Ser1981 als die Kontrollzelllinie [105]. Diese auf qualitativ-deskriptiven Ergebnissen beruhende Beobachtung wurde in der Immunopräzipitation bestätigt. Auch für weitere Proteine des *ATM-pathways* konnte eine reduzierte Phosphorylierung gezeigt werden, darunter p53 (Ser15), γ H2A.X und SMC1 (Ser957).

In den genannten Studien kamen für die Untersuchung der Proteinkaskaden vorrangig Durchflusszytometrie, Western Blot, Immunopräzipitation und *live-cell-imaging* zum Einsatz. Es wurden Apollo-depletierte bzw. Apollo-*knockdown*-Zellen verwendet. Zusammenhänge einer natürlich auftretenden Mutation mit Veränderungen in der Aktivierung der ATM-vermittelten DNA-Reparaturkaskade untersuchten dagegen beispielsweise Jiang et al. an Zelllinien von Probanden mit chronisch lymphatischer Leukämie [112]. Bei der Mutation handelte es sich um eine Deletion mit Verlust eines Teils der für ATM kodierenden Sequenz. Als Aktivierungsparameter wurden hier die Phosphorylierungsgrade von ATM und einigen *downstream*-Proteinen unter Verwendung des Western Blot mit anschließender Densitometrie betrachtet. Ein Zusammenhang zwischen Mutation und Funktion konnte nicht eindeutig gezeigt werden, Unterschiede in der ATM-Aktivierung dagegen wurden beschrieben und das Aktivitätsassay als Diagnostikum von den Autoren empfohlen.

Im Falle der SNPs handelt es sich nicht um Deletionen von Sequenzen, sondern um den Austausch eines einzelnen Nukleotids. Denkbar ist, dass die daraus folgenden funktionellen Veränderungen weniger stark ausgeprägt sein könnten als die durch natürlich auftretende Deletionen oder artifiziell herbeigeführten Apollo-*knockdown* hervorgerufenen. Es stellt sich also die Frage, ob der Western Blot als eine primär qualitative Methode auch für die Detektion dieser Unterschiede eine adäquate Methode ist, wenn sie mit Hilfe der Densitometrie quasi-quantitativ genutzt wird.

1.4.2 hSNM1B/Apollo im Telomerschutz

Die Beobachtung, dass hSNM1B und hSNM1C an Telomere assoziieren, ließen auch eine Rolle beider im Telomerschutz vermuten [113].

Tatsächlich ließ sich eine Beteiligung Apollos an der Reduktion des Replikationsstress in Bezug auf die Telomere zeigen [108]. Klassischerweise sind in der DNA-Replikation die Topoisomerasen für die Reduktion von topologischem Stress zuständig. In der Telomerreplikation stellte sich ein *pathway* über TRF2 und Apollo als komplementär hierzu heraus [114]. So führte die Überexpression von TRF2 und Apollo in HT-1080-Zellen (Fibrosarkom-Zelllinie) zu einer verminderten Rekrutierung von Topoisomerase II α , wohingegen die Beimpfung mit dem Topoisomerase-II-Inhibitor ICRF-193 zu einer vermehrten TRF2-Apollo-Assoziation an den Telomerenden führte. In Apollo-depletierten humanen BJ-hTERT-Zellen wurden hier DNA-Schadenssignale sowie Telomer*doublets* gefunden, die als Ausdruck gestörter Telomerreplikation verstanden werden können [103].

Demuth et al. konnten mittels Immunfluoreszenz darstellen, dass die Mehrheit der hSNM1B-Foci an Telomeren lokalisiert sind [105]. In U2OS und GM00637 konnte weiterhin gezeigt werden, dass siRNA-vermittelter TRF2-*knockdown* auch zu einer Reduktion der hSNM1B-Foci führt. Auch in anderen Studien fanden sich Hinweise darauf, dass TRF2 benötigt wird, damit hSNM1B an Telomeren lokalisiert sein kann: hSNM1B/Apollo-depletierte humane COS7-Zellen (*CV-1* (Nierenzelllinie aus der grünen Meerkatze) *in origin, carrying SV40*) wiesen vermehrte Telomerfusionen auf, während das TRF2-Level konstant blieb [115]. Über Interaktion mit weiteren Proteinen des Shelterinkomplexes fungiert mSNM1b/Apollo direkt nach der Replikation an den *leading-strand*-Enden und generiert den 3'-Überhang als Schutz vor inkorrekturer NHEJ-Reparatur [116]. POT1b ist ein negativ-Regulator von Apollo [117]. Um Apollo inhibieren zu können muss es sowohl an den TRF1/TIN2/TRF2-Komplex, als auch an die TTAGGG-Sequenz binden. Am einzelsträngigen *lagging* Ende ist dies sofort möglich, wohingegen am *leading* Ende erst eine Bindungsstelle durch die Apollo-vermittelte Resektion entstehen muss. Die Interaktionen mit POT1b bedingen also wahrscheinlich Apollos protektiven Einfluss auf die Länge der Telomere kurz nach der Replikation [15].

Darüber hinaus wurden stärkere DNA-Schadensantwortsignale in hSNM1B-depletierten humanen Fibroblasten nach Puromycin-Exposition an Telomeren in der S-Phase detektiert [103]. Es konnte gezeigt werden, dass die Nukleasendomäne von Apollo die Aktivierung einer starken

Schadensantwort an den Telomerenden verhindert [114]. In MEF-Null-Mutanten für SNM1B wurden gegenüber Zelllinien mit erhaltener Apollo-Sequenz vermehrt Defekte in der Generierung der protektiven 3' ss-Überhänge sowie häufige *leading strand*-Telomerfusionen beobachtet [116] (Abbildung 1.5).

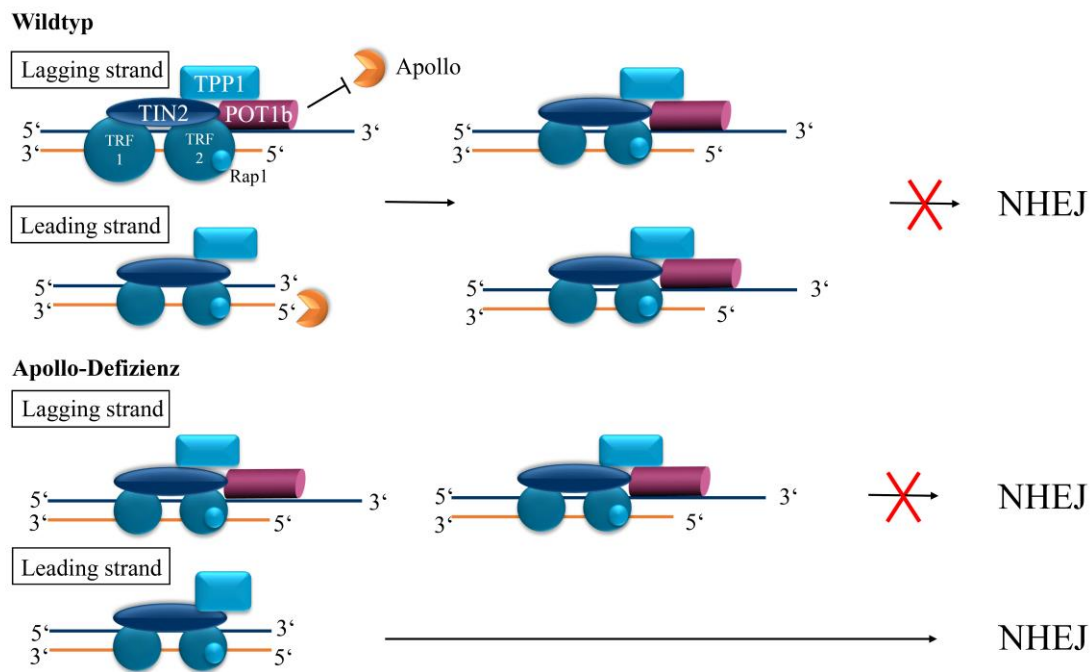


Abbildung 1.5: Darstellung der Interaktion von hSNM1B/Apollo mit dem Shelterinkomplex im Wildtyp sowie fehlender Interaktion und nachfolgender, fehlerhafter Reparatur der Telomere durch NHEJ am leading strand bei Apollo-Defizienz. Eigene Abbildung in Anlehnung an [116].

1.4.3 hSNM1B/Apollo in der Pathogenese

Die vielzähligen Interaktionen Apollos lassen in Zusammenschau mit der Tatsache, dass im Menschen bislang keine Null-Mutationen identifiziert werden konnten, seine Notwendigkeit für das Überleben vermuten [5]. Diese Annahme wäre auch mit der bei hSNM1B-*knockout*-Mäusen beobachteten perinatalen Letalität kohärent [118].

Eine relevante hSNM1B/Apollo-*splice*-Variante wurde bei einem Patienten mit dem Hoyeraal-Hreidarsson-Syndrom gefunden, welches zum Formenkreis der Dyskeratosis congenita gehört und mit einem ausgeprägten Phänotyp einhergeht [119]. Das klinische Bild ist v. a. charakterisiert durch Knochenmarkinsuffizienz, Immundefizienz und zerebelläre Hypoplasie. Die Apollo-Proteinanalyse zeigte ein an Position 416 geschnittenes Apollo-Molekül mit folglich fehlender

TRF2-Bindungsdomäne. Die Auswirkungen waren entsprechend auf die Telomere beschränkt: es zeigten sich vermehrte Telomerfusionen und *-doublets* sowie eine beschleunigte Telomerverkürzung bei Kontrollzellen vergleichbarer ICL-Sensitivität.

Ausgehend von den multiplen Funktionen Apollos in DNA-Reparatur und Telomerschutz sowie von den bekannten Auswirkungen von Mutationen in Genen mit ähnlichen Funktionen, liegt die Vermutung nahe, dass auch SNPs im Apollo-Gen funktionell bedeutsam sind [5]. Tatsächlich wurden verschiedene SNPs im DCLRE1B-Gen mit klinischen Daten in Zusammenhang gebracht. So zeigte sich eine Assoziation zwischen dem SNP rs12046289 und dem Auftreten maligner Melanome [120]. rs974494 und rs12144215 dagegen korrelieren invers mit kolorektalem, Prostata- und Lungenkarzinom [121]. In diesem Fall erwies sich also das Auftreten eines ganz bestimmten Genotyps als protektiv gegenüber dem Erkrankungsrisiko. Der SNP rs11552449 tritt mit einer Allelfrequenz von 0,2118 auf und wurde in zwei verschiedenen Studien mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko in Zusammenhang gebracht [122–124]. Unter anderem wird diesbezüglich die Relevanz von differentiellem Spleißen an Exon2 diskutiert. Unklar ist jedoch, ob hier Apollo das relevante Gen ist oder aber das benachbarte Gen PHTF1 (*putative homeodomain transcription factor 1*). Eine Möglichkeit der Risikoabschätzung hinsichtlich aufgetretener SNPs bieten Prädiktionsprogramme wie *Mutationtaster* [125] und *Poly-Phen-2* [126], die mittels Bayes-Klassifikator die potentielle Bedeutsamkeit einer Mutation anhand von bekannten, pathogenen Mutationen und Polymorphismen berechnen. Bei Überprüfung des SNPs rs11552449 (cDNA-Position 181, Proteinposition H61Y) mit dem *Mutationtaster* werden Veränderungen der Aminosäuresequenz sowie der Proteinfunktionen als möglicherweise mit dem hier stattfindenden Basenaustausch (C > T) zusammenhängend bewertet.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Um der Bedeutung des SNPs rs11552449 für die Pathogenese nachzugehen, ist die Untersuchung seiner Auswirkungen von großem Interesse. In Anbetracht der bisher bekannten Rollen Apollos sind Einflüsse auf Telomerlänge und Aktivierung der Enzyme der DDR zu vermuten. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Apollo vor allem in der Schadensantwort auf ICL-induzierte Agenzien eine Rolle spielt [101]. In Apollo-depletierten HeLa-Zellen konnten daneben auch Defizite in der Antwort auf IR festgestellt werden, die jedoch in einer anderen Arbeitsgruppe in HEK293-Zellen nicht beobachtet wurden [102]. In beiden Untersuchungen wurde als Sensitivitätsparameter das Überleben betrachtet. Aus Apollo-depletierten Zellen wurden daneben einzelne Proteine des *pathways* im Immunoblot untersucht und qualitativ anhand der

Phosphorylierungsunterschiede zur Kontrolle beschrieben [105]. Im Zuge der Betrachtung des genannten SNPs stellt sich nun die Frage, ob der Western Blot für die Untersuchung solcher Unterschiede ebenfalls geeignet ist. Da zu erwarten ist, dass diese Unterschiede geringer ausfallen als die in Apollo-depletierten Zellen gegenüber der Kontrolle, würde eine rein deskriptive Methode diese feinen Unterschiede gegebenenfalls unentdeckt lassen. Die densitometrische Auswertung der im Western Blot erhobenen Bilddaten bietet eine Möglichkeit, über Verhältnisbildung aus phosphoryliertem und Gesamtprotein semi-quantitativ Vergleiche durchzuführen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung des Western Blots als Methode zur Untersuchung von vor allem Genotyp-bezogenen Unterschieden im Phosphorylierungsgrad ausgewählter Proteine der ATM-vermittelten DNA-Schadensantwort (p53, ATM, SMC1) nach ionisierender Strahlung erprobt. Dabei wurden Zusammenhänge mit dem Genotyp des SNPs rs11552449 an zufällig ausgewählten lymphoblastoiden Zelllinien diskutiert. Nachdem in der Arbeitsgruppe (AG Demuth) im Rahmen eines anderen Projektes Daten zum Apollo-Expressionslevel auf RNA-Ebene erhoben wurden, sollten schließlich auch etwaige Zusammenhänge des Expressionslevels mit der DNA-Schadensantwort untersucht werden. Auf diese Weise sollten einerseits die Zusammenhänge zwischen der Schadensantwort und zwei verschiedenen Variablen betrachtet werden, andererseits aber auch die Methode auf zwei unabhängig voneinander erhobene Parameter bezogen analysiert werden. Die Fragen, die an dieser Stelle beantwortet werden sollten, sind im Einzelnen:

1. Können durch Nachweis im Western Blot und anschließende Densitometrie signifikante Unterschiede in der Phosphorylierung der Proteine ATM, p53 und SMC1 nach IR-Exposition mit 5 Gy gegenüber 20 Gy nachgewiesen werden?
2. Sind die Ergebnisse reproduzierbar?
3. Können etwaige Phosphorylierungsunterschiede nach beiden Bestrahlungsdosen dem Genotyp des SNPs rs11552449 zugeordnet werden?
4. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Apollo-Expressionslevel auf RNA-Ebene und Unterschieden im Phosphorylierungsgrad nach 5 bzw. 20 Gy Bestrahlung?

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Zusammenhang von Telomerlänge und SNP rs11552449. Mit der qPCR kam hier eine für diese Fragestellung etablierte Methode zum Einsatz. Ziel dieses zweiten Teils ist die Überprüfung folgender Haupthypothese:

[H] Der mit erhöhtem Brustkrebsrisiko assoziierte SNP rs11552449 korreliert mit der Telomerfunktion von Apollo.

Im Zuge dessen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

5. Gibt es signifikante Unterschiede in der relativen Telomerlänge aus den LCLs, die dem Genotyp des SNPs rs11552449 zugeordnet werden können?
6. Gibt es signifikante Unterschiede in der relativen Telomerlänge aus den Leukozyten, die dem Genotyp des SNPs rs11552449 zugeordnet werden können?
7. Unterscheiden sich die aus LCLs ermittelten Telomerlängen von den aus Leukozyten gewonnenen Daten?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

2.1.1.1 Berliner Altersstudie II (BASE-II)

Die verwendeten Zelllinien und DNA stammen aus dem Pool der Berliner Altersstudie II (BASE-II), einem interdisziplinären Projekt zur Untersuchung des Alterungsprozesses durch Analyse medizinischer, kognitiver und sozialer Parameter (Studienübersicht: [127]).

Eingeschlossen wurden etwa 600 Probanden zwischen 20 und 35 Jahren

(Mittelwert $28,05 \pm 3,04$ Jahre; 50 % weiblich) sowie ca. 1600 Probanden zwischen 60 und 80 Jahren (Mittelwert $67,69 \pm 3,65$ Jahre; 50 % weiblich). Zelllinien existieren von etwa 25 % der Probanden. Ein positives Ethikvotum zu dieser Studie liegt vor (EA2/029/09).

2.1.1.2 Zelllinien

Für die Bestrahlungsversuche wurden lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) verwendet. Die Hälfte der 12 verwendeten Zelllinien wurde zufällig ausgewählt, während die andere Hälfte aus einer Gruppe stammte, die in vorherigen Versuchen besonders hohe oder niedrige Apollo-Expressionslevels auf RNA-Ebene aufwies [Demuth et al., unveröffentlichte Ergebnisse]. Die Gruppe setzte sich aus 100% männlichen Teilnehmern mit einem mittleren Alter von 69 ($\pm 3,3$) Jahren zusammen.

2.1.1.3 Zellkulturlösungen und -medien

Bezeichnung	Hersteller
<i>Advanced RPMI Medium 1640</i>	Gibco
FBS Good, <i>fetal bovine serum</i>	Pan Biotech
Penicillin/Streptomycin	Lonza
Dulbeccos <i>phosphate buffered saline</i>	Gibco
Dimethylsulfoxid	Carl Roth
Fermacidal D2	IC Products SA
RBS 50	Carl Roth
Ethanol 80 %	Chemsolute (Th.Geyer)
Trypanblau 0,4 %	Gibco

Tabelle 1: Lösungen und Medien (Zellkultur)

2.1.1.4 Zellkulturzubehör und -geräte

Bezeichnung	Hersteller
<i>Serological pipets (25 ml, 10 ml, 5 ml)</i>	Falcon
Transferpipette (3,5 ml)	Sarsted
Pipettierhilfen	Pipetboy 2
<i>Tissue culture flasks (75 cm²/250 ml, 25 cm²/50 ml)</i>	Falcon
<i>Cryo vials</i>	Greiner Labortechnik
Mikroskop	Zeiss
Zählkammer Neubauer Bright Line (0,0025 mm ² x 100 mm)	Optik Labor
Deckgläser (18 mm x 18 mm)	Marienfeld
Brutschränke	Binder, Heraeus instruments
LaminAir HBB 2448	Heraeus instruments

Tabelle 2: Laborzubehör und Geräte (Zellkultur)

2.1.2 Mutagene Behandlung (ionisierende Bestrahlung)

Bezeichnung	Hersteller
¹³⁷ Cs Strahlungsquelle GSR-D1	Gamma Services Medical
Wärmeelemente:	
<i>Advanced cooling solution</i>	Icecatch
<i>Cryosafe coldbox</i>	Scienceware
Stratacooler Kühlelement	Stratagene

Tabelle 3: Mutagene Behandlung (ionisierende Bestrahlung)

2.1.3 Western Blot

2.1.3.1 Proteinlysate

Bezeichnung	Hersteller
NuPAGE [®] LDS Sample Buffer (4 x)	Invitrogen
PhosSTOP [™]	Roche

Tabelle 4: Proteinlysate

2.1.3.2 Puffer

Bezeichnung	Hersteller
NuPAGE [®] 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm x 12 wells	Invitrogen Thermo Fisher
NuPAGE [®] 3-8% Tris-Acetate Gel 1.0 mm x 12 wells	Invitrogen Thermo Fisher
MES SDS <i>running buffer</i> (20 x)	Novex
MOPS SDS <i>running buffer</i> (20 x)	Novex
Tris-Acetate SDS <i>running buffer</i> (20 x)	Novex
<i>transfer buffer</i> (20 x)	Novex
TBS-T-Puffer:	
Tris-HCl, pH 7,5 (20 mM)	
NaCl (137 mM)	
Tween20 (0,2 %)	Sigma-Aldrich
Methanol EMSURE [®] (≥ 99,9 %)	MerckMilipore

Tabelle 5: Puffer

2.1.3.3 Gele und Membran

Bezeichnung	Hersteller
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen
NuPAGE® Sample Reducing Agent	Invitrogen
PVDF Membran	Invitrogen

Tabelle 6: Gele und Membran

2.1.3.4 Proteinmarker

Bezeichnung	Hersteller
SeeBlue Plus™	Invitrogen
HiMark Prestained™ HMW Protein Standard	Invitrogen

Tabelle 7: Proteinmarker

2.1.3.5 Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
H2A.X	Kaninchen	Bethyl Labs
H2A.X-p Ser139 [JBW 301]	Maus	Upstate
p53 [DO-1]	Maus	Santa Cruz
p53-p Ser15	Kaninchen	Cell Signaling
Chk1	Ziege	Abcam
Chk1-p Ser317	Kaninchen	Novus Biologicals
Chk1-p Ser345	Kaninchen	Abcam
ATM [2C1(1A1)]	Maus	Abcam
ATM-p Ser1981[10H11.E12]	Maus	Rockland
SMC1	Kaninchen	Cell Signaling
SMC1-p Ser957	Kaninchen	Bethyl Labs
SMC1-p Ser957 [5D11G5]	Maus	Cell Signaling
SMC1-p Ser957	Kaninchen	Abcam
Anti-rabbit	Esel	GE Healthacre
Anti-mouse	Esel	GE Healthacre
Anti-goat	Esel	Abcam

Tabelle 8: Antikörper

2.1.3.6 Western-Blot-Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Western Lightning Enhanced Luminol Reagent Plus ECL™	Perkin Elmer
Western Lightning Oxidizing Reagent™	Perkin Elmer
Signaling fire™ ECL Reagent A + B	Perkin Elmer
<i>Blotting grade, pulv. fettarm</i>	Carl Roth

Tabelle 9: Lösungen (Western Blot)

2.1.3.7 Western-Blot-Zubehör und -Geräte

Bezeichnung	Hersteller
ECL-Detektor Chemi Smart 5000	Vilber Lourmat
Chemi Capt 5000 Detektionssoftware (15.01)	Vilber Lourmat
Electrophoresis Power Supply EPS 600	Pharmacia Biotech

Tabelle 10: Laborzubehör und Geräte (Western Blot)

2.1.4 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

2.1.4.1 DNA

Die verwendete DNA stammt ebenfalls von Zelllinien, die von Probanden der BASE-II im Rahmen eines anderen Projektes angelegt wurden. Die Gruppe enthält 4,9 % Material von weiblichen Probanden, das mittlere Alter lag bei 69,5 ($\pm 7,3$) Jahren. Für die bereits ermittelten Telomerlängen stammten die Daten zu 50,4 % von weiblichen Probanden, das mittlere Alter betrug 59,9 ($\pm 16,9$) Jahre.

2.1.4.2 DNA-Extraktions-Kit

Bezeichnung	Hersteller
ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System:	Promega
Dulbecco's PBS	
Proteinkinase K	
<i>cell lysis buffer</i>	
<i>RNase A solution</i>	
<i>binding buffer (BBA)</i>	
ReliaPrep™ Binding Column	

column washing solution

H₂O nuclease free

Tabelle 11: DNA-Extraktion

2.1.4.3 Primer

Primer wurden als Auftragssynthese von der Firma Biomers hergestellt.

Bezeichnung	Sequenz
Telomere F	5'-CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT-3'
Telomere R	5'-GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT-3'
36B4 F	5'-CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC-3'
36B4 R	5'-CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A-3'

Tabelle 12: Primer

2.1.4.4 Mastermix

Es wurde der Power SYBR Green Mastermix der Firma Applied Biosystems Thermofisher verwendet.

2.1.4.5 Referenzzelllinien

Als Referenzen wurden Gemische aus 10 randomisiert ausgewählten Proben aus dem Pool der Berliner Altersstudie II verwendet.

2.1.4.6 qPCR-Zubehör und -Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Nanophotometer	IMPLEN
Folie	Applied Biosystems Thermofisher
Parafilm	BEMIS
ABI Fast Realtime PCR System 7900 HT	Applied Biosystems
ABI 7900 HT Sequence Detection System 2.4	Applied Biosystems

Tabelle 13: Laborzubehör und Geräte (qPCR)

2.1.5 Allgemeines Laborzubehör

Bezeichnung	Hersteller
<i>Zentrifugen</i>	
Heraeus Sepatech Megafuge 2.0	Heraeus
Heraeus Instruments Megafuge 2.0R	Heraeus
Heraeus Fresco 21 Centrifuge Thermo Scientific	Heraeus
Heraeus Insturments Biofuge Primo	Heraeus
Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf
Micro Centrifuge	Carl Roth
<i>Pipetten</i>	
Eppendorf Reference	Eppendorf
Eppendorf Research	Eppendorf
Gilson Pipetman	Gilson
Eppendorf Research pro	Eppendorf
<i>Pipettenspitzen</i>	
Combitips <i>advanced</i> 0,5 ml	Eppendorf
<i>Tubes</i>	
<i>Polypropylene conical tube</i> (15; 50 ml)	Falcon
<i>Polystyrene round-bottom-tube</i> (5; 13; 14 ml)	TRP, Sarstedt, Falcon
<i>Safe-lock tubes</i> (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf
<i>Weitere Geräte</i>	
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Roller	RM5 Assistent
Wasserbad	GFL
Thermomixer compact	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Mili-Q-H ₂ O	MerckMillipor

HPLC-H ₂ O <i>gradient grade</i> 4218	J.T. Baker
Eis-Maschine MF 36	Scotsman
<i>Disposable scalpel No.15</i>	Feather
Messzylinder (1000 ml, 500 ml)	Vitri

Tabelle 14: Allgemeines Laborzubehör

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Grundsatz der Arbeitsweise in allen Formen der Zellkultur war das aseptische Arbeiten. Es wurde stets mit Handschuhen und unter der Sicherheitsbank gearbeitet, um mikrobielle Kontamination der Kulturen mit Mykoplasmen oder anderen Mikroorganismen zu verhindern. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Als Medium wurden 5 ml Penicillin/Streptomycin und 80 ml FBS zu 500 ml RPMI gegeben und unter Schwenken gemischt. Die Zellsuspension wurde durch Auf- und Abpipettieren (15 Mal) homogenisiert und 8 bis 12 ml abgenommen. Etwa die gleiche Menge an Medium wurde anschließend hinzugegeben. Die Mengen wurden dem Zustand der Zellen angepasst (Farbe, Zellcluster).

2.2.1.1 Auftauen kryokonservierter Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien lagen tiefgefroren in flüssigem Stickstoff vor und mussten für die kulturelle Anzucht aufgetaut werden. Zu diesem Zweck wurde das Medium im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Zelllinien wurden dann aus dem Stickstofftank geholt und aufgetaut. Anschließend wurde pro Zelllinie ein Spitzbodenröhrchen mit 9 ml Medium gefüllt. Mittels einer Transfer-Pipette wurde 1 ml angewärmtes Medium aus dem Spitzbodenröhrchen entnommen und damit das Zellpellet darin aufgenommen. Es folgte der Transfer in das Spitzbodenröhren. Bei 110 x g (*gravitational force*) wurde das Röhrchen für 12 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, anschließend der Überstand abpipettiert und das verbleibende Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert. Schließlich wurde die Suspension in ein Zellkultur-Fläschchen (25 cm²) überführt.

2.2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Zu diesem Zweck wurden 20 µl zuvor gründlich homogenisierter Suspension aus der Zellkulturflasche entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau versetzt. 10 µl der mit Farbstoff versetzten Suspension wurden auf

die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Unter dem Mikroskop erfolgte die Differenzierung toter, sich blau darstellender Zellen von vitalen, ungefärbten Zellen, jeweils in 4 Quadranten der Zählkammer.

2.2.1.3 Zellernte

Für die Versuche wurden 1×10^6 Zellen pro Bestrahlungsdosis und Zelllinie verwendet. Mit Hilfe des Mittelwerts der in den 4 Quadranten der Zählkammer gezählten Zellen konnte auf die Zellzahl pro Milliliter ($\times 10^4$) geschlossen und die zu erntende Menge errechnet werden. Anschließend wurde die benötigte Menge der entsprechenden Zelllinie entnommen.

2.2.1.4 Kryokonservierung

Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Zellen kryokonserviert. Dies konnte geschehen, sobald die Zellen ein Äquilibrium erreicht hatten. Als Indikator dienten dabei die Farbe des Mediums (gelb) und das Vorhandensein erkennbarer, vitaler *Zellcluster*. Nach gründlichem Homogenisieren der Suspension wurden 15 ml aus der Kultur abgenommen, 10 Minuten bei $173 \times g$ zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Um Zellschädigungen bei der Überführung in den gefrorenen Zustand zu vermeiden, wurde dem Einfriermedium DMSO (*Dimethylsulfoxid*) zugesetzt, dessen Schmelzpunkt bei 18°C liegt und das so zur frühen Kristallisation der Zellen beitragen kann. Die Zellpellets wurden in 3 ml Einfriermedium (RPMI 1640-Medium mit 15 % FBS, Pen/Strep und 10 % DMSO) resuspendiert und auf 3 Kryoröhrchen á 1 ml verteilt. Anschließend wurden die Röhrchen für mindestens 48 Stunden in Styroporboxen bei -80°C gelagert, bevor sie in die Stickstofftanks (-196°C) überführt wurden.

2.2.2 γ -Bestrahlung

Für die Bestrahlung wurde eine Cäsium-137 Strahlungsquelle verwendet. In Vorversuchen wurden aus vier Bestrahlungsdosen (2,5; 5; 10 und 20 Gy) zwei ermittelt (5 und 20 Gy), nach deren Exposition sich eindeutige Unterschiede im Phosphorylierungsgrad der untersuchten Proteine zueinander und zur unbestrahlten Zelllinie feststellen ließen. Zur Auswahl der Bestrahlungsdosen für die Versuche wurde das optische Chemilumineszenzsignal herangezogen. Die Testung erfolgte bei einer exemplarischen Auswahl der später auch für die Versuche verwendeten Zelllinien.

2.2.3 Herstellung des Proteinlysats

Nach der Bestrahlung wurden die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor sie für den Transport auf einem Kühlelement eingefroren wurden. Mit der unbestrahlten Probe wurde analog verfahren. Aus den bestrahlten und unbestrahlten Proben erfolgte dann die Herstellung des Proteinlysats. Zur Lyse der Zellen und Denaturierung der Proteine wurde der *LDS-sample-buffer* zugegeben und die Proben anschließend für fünf Minuten gekocht. Zur Scherung der DNA wurden alle Proben für 30 Sekunden (*output control level 4, duty cycle 70 %*) sonifiziert. Um den Überstand vom Sediment zu trennen wurden die *tubes* zentrifugiert (10 min, 4 °C, 13.800 x g) und das saubere Lysat schließlich bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.4 Western Blot, Chemilumineszenznachweis und Auswertung

Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Western Blot. Die Proteine wurden dabei mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei in der vorliegenden Arbeit Bis-Tris- und Tris-Acetat-haltige SDS-Gele zum Einsatz kamen [128]. Marker und Proteinlysate wurden auf das Gel aufgetragen und anschließend eine elektrische Spannung angelegt (80 V für 30 min, 130 V für 30 min beim Bis-Tris-Gel bzw. für eine Stunde beim Tris-Acetat-Gel). Dann erfolgte der Transfer auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran). Der Gesamtproteintransfer wurde mittels Proteinfärbung mit Ponceau S kontrolliert [129]. Vor dem spezifischen Proteinnachweis wurde die Membran blockiert, um die unspezifische Antikörper-Bindung im nachfolgenden Schritt zu reduzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür ein Konzentrat aus 10% Magermilchpulver und TBS-T (*Tris-buffered saline with Tween20*) verwendet. Zum Nachweis wurde die Membran nacheinander mit zwei Antikörpern inkubiert. Nach dem primären Antikörper gegen das zu untersuchende Protein wurde ein enzymgekoppelter sekundärer Antikörper dazugegeben, der gegen die Wirtsspezies (F_c-Teil) des primären Antikörpers gerichtet war. Die Sichtbarmachung erfolgte mittels eines Substrats, welches durch Katalyse zu einer Chemilumineszenz-Reaktion führt. Das resultierende Signal wurde digital aufgenommen und mit der *Chemi Capt 5000* Software ausgewertet. Für die Betrachtung der Kaskade sollten die Signalstärken der phosphorylierten Formen mit dem Gesamtprotein jeder Bestrahlungsdosis und jeder Zelllinie verglichen werden. Neben der Aufnahmequalität musste auch die Auflösung beider Aufnahmen (phosphoryliertes und Gesamtprotein) identisch sein. Da der Zählalgorithmus auf der Anzahl der Bildpunkte basiert, wurde die höchst mögliche Auflösung (*full resolution, 12 bit per pixel, 72 dots per inch*) für alle

Aufnahmen gewählt. Für die quantitative Auswertung wurde das optische Signal des jeweils untersuchten Proteins mittels eines Programms (*ImageQuant 5.2*) zur Densitometrie in einen numerischen Wert umgerechnet und zur ebenfalls quantifizierten Kontrolle ins Verhältnis gesetzt [130].

2.2.5 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde mittels ReliaPrep[®] Kit der Firma Promega den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt. Die Elution erfolgte in Nuklease-freiem Wasser.

2.2.6 Durchführung der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Amplifikation von DNA [131]. Ziel der qPCR ist die Beobachtung der Reaktion in Echtzeit und der Rückschluss auf die relative Ausgangsmenge [132,133]. Dies gelingt durch den Einsatz eines Farbstoffs (SYBR Green I), der an doppelsträngige DNA bindet und ein Fluoreszenzsignal emittiert.

Der Ablauf der Polymerasekettenreaktion gliedert sich in drei Phasen [131]. Alle drei Phasen laufen bei unterschiedlichen, für die verwendeten Primer und Polymerase spezifischen Temperaturen ab und werden 20-50 Mal wiederholt. Im ersten Schritt, der Denaturierung, erfolgt die Trennung der DNA-Stränge durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen. Für diesen Schritt wurde eine Temperatur von 95 °C gewählt. Die Primerhybridisierung (*Annealing*) erfolgte bei 60°C. Die Temperatur bei diesem Schritt ist abhängig von Länge und Sequenz der Primer und entscheidend für eine optimale Anlagerung der Primer an die DNA. Das Arbeitsoptimum der Polymerase bedingt die Temperatur, die für den Elongationsschritt (*Polymerisation*) gewählt wird (hier 60 °C). Die Einzelstränge werden ausgehend von den angelagerten Primern durch die Polymerase komplementär zum Template in 5'→3' Richtung ergänzt.

Die Quantifizierung der qPCR gelingt über die Reaktionskinetik [133]. Nach einer nicht-exponentiellen Anfangskurve, zeigt sich im Reaktionsverlauf eine exponentielle Vermehrung. Wenn das Produkt akkumuliert, führen die Abnahme der zur Verfügung stehenden Primer und Nukleotide und die Verlagerung des Reaktionsgleichgewichts auf die Seite der Produkte zu einer Verlangsamung der Reaktion.

Aufgrund der exponentiellen Replikation können in diesem Bereich Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge an DNA gezogen werden. Hierfür wird der *cycle threshold* (ct) Wert genutzt,

welcher die Zykluszahl angibt, nach der das Fluoreszenzsignal gegen das Hintergrundsignal detektiert werden kann. Ein hoher ct-Wert bedeutet also eine niedrige Ausgangskonzentration, während bei hohen Ausgangskonzentrationen der ct-Wert niedrig ist.

Die Auswertung erfolgte mittels der $\Delta\Delta ct$ -Methode. Um unterschiedliche PCR-Effizienzen der beiden Amplikons (Telomer und 36B4) berücksichtigen zu können, wurde die Methode nach Pfaffl gewählt [134]. Dazu war es erforderlich einen Standard mit definierten DNA-Mengen auf jeder der Platten mitzuführen, um aus der Steigung der Regressionsgeraden der Standardkurve die PCR-Effizienz E zu berechnen. Die Berechnung der relativen Telomerlänge erfolgte in folgenden Schritten mit den entsprechenden Formeln:

Normalisierung gegen das *single-copy*- bzw. Haushaltsgen:

$$\Delta ct = \Delta ct_{Telomer} - \Delta ct_{36B4}$$

Normalisierung der Referenzprobe gegen die Probanden-DNA:

$$\Delta\Delta ct = \Delta ct_{Probanden} - \Delta ct_{Referenz-DNA-Pool}$$

Angabe der *ratio* R:

$$R = 2^{-\Delta\Delta ct}$$

Bestimmung der PCR-Effizienzen:

$$E = 10^{\frac{1}{-m}}$$

Modifizierte $\Delta\Delta ct$ -Methode nach Pfaffl unter Berücksichtigung von E:

$$R = \frac{(E_{Telomer})^{\Delta ct_{Telomer}(ctMW_{Referenz-DNA-Pool} - ctMW_{Probanden})}}{(E_{36B4})^{\Delta ct_{36B4}(ctMW_{Referenz-DNA-Pool} - ctMW_{Probanden})}}$$

2.2.7 Methodik der Statistik

Für die statistische Auswertung wurden neben der graphischen Darstellung und Beschreibung der Daten Signifikanztests und Korrelationsanalysen herangezogen. Aufgrund der geringen Fallzahlen und der ungleich großen Gruppen wurden nicht-parametrische Tests verwendet. Für den Vergleich der Mediane wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Unterschiede in den Phosphorylierungsgraden nach den unterschiedlichen Bestrahlungsdosen wurden mit dem

Wilcoxon-Rangsummen-Test berechnet. Ergebnisse mit $p > 0,05$ wurden als nicht-signifikant eingeordnet. Die Untersuchung der Korrelationen zwischen den Ergebnissen der Wiederholungen sowie zwischen den Ergebnissen der Telomerlängenbestimmung in den beiden Stichproben (LCLs und Leukozyten) wurde über die Spearman-Korrelation durchgeführt, wobei Korrelationskoeffizienten mit Werten von $\pm 0,9$ bis $\pm 1,0$ als sehr starke, von $\pm 0,7$ bis $\pm 0,9$ als starke, von $\pm 0,5$ bis $\pm 0,7$ als moderate, von $\pm 0,3$ bis $\pm 0,5$ als schwache und von $\pm 0,3$ bis $0,0$ als vernachlässigbare Korrelation interpretiert wurden [135]. Die statistische Auswertung erfolgte in Rücksprache mit dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin.

3 Ergebnisse

3.1 Phosphorylierungsstatus nach Exposition mit ionisierender Strahlung

Für die Beantwortung der Fragen nach den Zusammenhängen der DNA-Schadensantwort nach IR und dem SNP rs11552449 wurden phosphorylierte und native Form von ATM und zwei *downstream* Proteinen der Signalkaskade, SMC1 und p53, in lymphoblastoiden Zelllinien nach IR-Exposition in ansteigenden Dosierungen im Western Blot nachgewiesen. Unterschiede in der Signalintensität konnten bereits optisch festgestellt werden: für p53 zeigten sich über den unbestrahlten und bestrahlten Proben jeweils einer Zelllinie ähnliche Signalintensitäten, während in der phosphorylierten Variante (p53-p) die unbestrahlten Proben deutlich schwächere Banden zeigten als die bestrahlten (Abbildung 3.1). Zwischen den beiden bestrahlten Proben konnten keine visuell eindeutigen, für alle Zelllinien konstanten Unterschiede der Signalintensität festgestellt werden. Sowohl für SMC1 als auch für SMC1-p zeigten sich ansteigende Signalintensitäten mit zunehmender Bestrahlungsdosis. Insgesamt erschienen die Banden für SMC1 jedoch signalintensiver als bei der phosphorylierten Variante (Abbildung 3.2). Der ATM-Antikörper wies vermehrt unspezifische Banden auf (Abbildung 3.3) Die ATM-Bande war dabei oft weniger signalintensiv als einige der Unspezifitäten, jedoch über allen drei Proben einer Zelllinie konstant. Für ATM-p zeigte sich für die unbestrahlte Probe der jeweiligen Zelllinie ein schwächeres Signal als für die dazugehörigen bestrahlten Proben. Eine eindeutige und über alle Zelllinien konstante Unterscheidung der Signalintensitäten zwischen den beiden Bestrahlungsdosen konnte nicht getroffen werden.

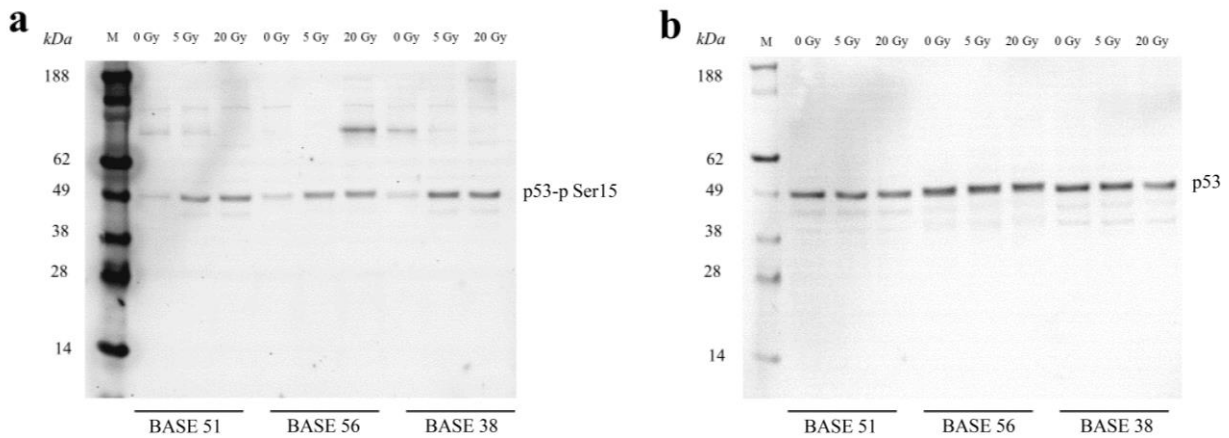


Abbildung 3.1: Beispielhafte Darstellung der Nachweise von p53-p Ser15 (a) und p53_{ges} (b) im Western Blot unbestrahlt, nach 5 und 20 Gy γ -Bestrahlung. Horizontale Linien unterhalb markieren die drei zur jeweiligen Zelllinie gehörenden Spuren. Links der Markerbande sind Molekulargewichte der Markerproteine angegeben. Innerhalb einer Gruppe ist von links nach rechts Proteinlysate aus unbestrahlten, mit 5 Gy und mit 20 Gy bestrahlten Zellen der jeweiligen Zelllinie aufgetragen.

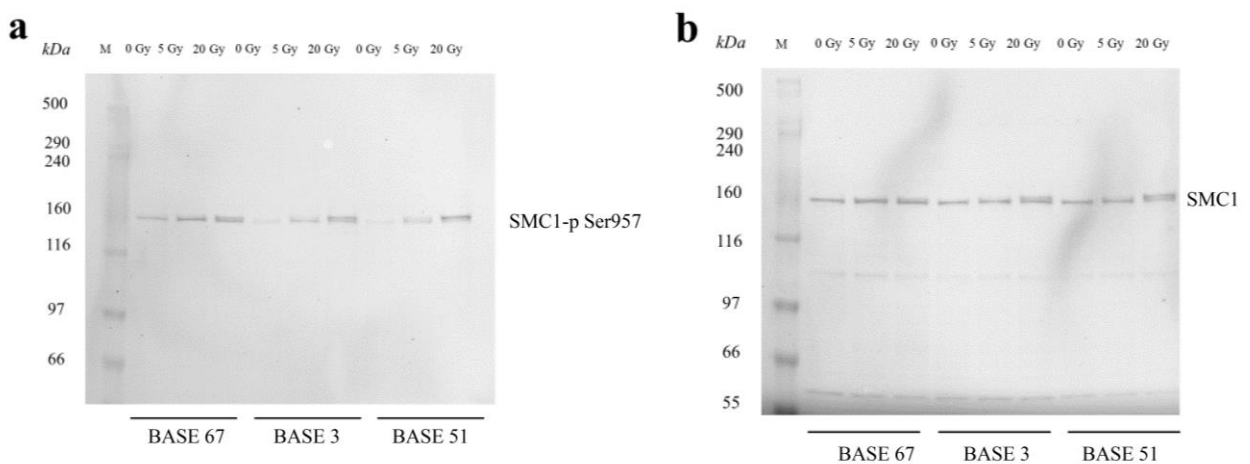


Abbildung 3.2: Beispielhafte Darstellung der Nachweise von SMC1-p Ser957 (a) und SMC1_{ges} (b) im Western Blot. Die Beschriftung erfolgte entsprechend Abbildung 3.1.

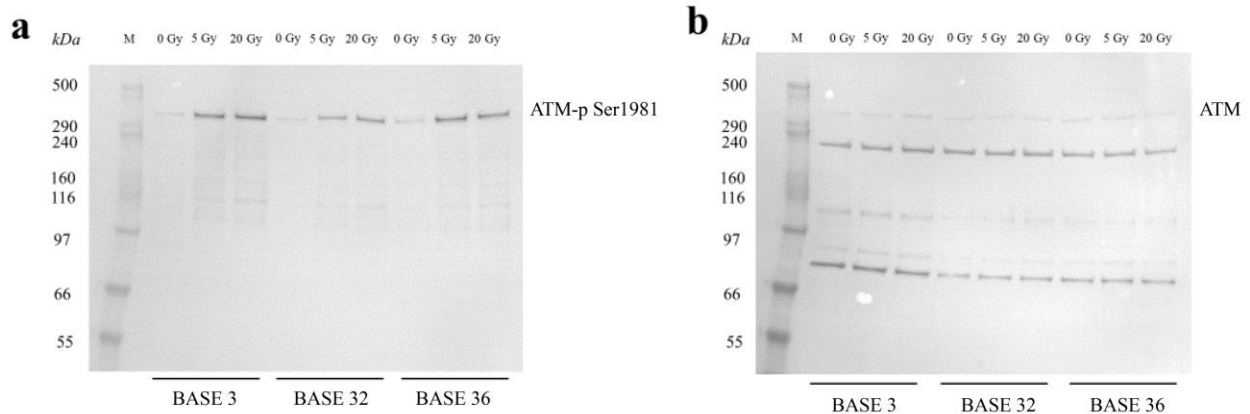


Abbildung 3.3: Beispielhafte Darstellung der Nachweise von ATM-p Ser1981 (a) und ATM_{ges} (b) im Western Blot. Die Beschriftung erfolgte entsprechend Abbildung 3.1. Die Zuordnung der korrespondierenden Bande bei 350 kDa erfolgte mit Hilfe des Markers. Für die Berechnung mittels ImageQuant-Software wurde ausschließlich die in der Abbildung als ATM gekennzeichnete Bande eingeschlossen.

Um diese visuellen und rein deskriptiven Beobachtungen weitergehend fundiert und so objektivierbar wie möglich zu überprüfen, erfolgte die semi-quantitative Auswertung über eine Software zur Densitometrie (*ImageQuant 5.2*). Über Verhältnisbildung aus Gesamt- und phosphoryliertem Protein sowie der Grundphosphorylierung in der unbestrahlten Kontrolle wurden die Unterschiede im Phosphorylierungsstatus verglichen und in Bezug zum Genotyp des betrachteten SNP gesetzt. Da beide Nachweise nacheinander auf derselben Membran durchgeführt wurden, konnten die ermittelten Werte direkt miteinander verrechnet werden, ohne dass eine zusätzliche Kontrolle zur Standardisierung verwendet werden musste. Aus den für das phosphorylierte Protein densitometrisch ermittelten Werten und den entsprechenden, für das korrespondierende Gesamtprotein ermittelten Werten wurde der Quotient gebildet (*Ratio (p/ges)*). Pro Zelllinie und Bestrahlungsdosis wurden auf diese Weise drei Werte generiert (1. Durchlauf, 1. Wiederholung, 2. Wiederholung), mit denen sich die Unterschiede der Phosphorylierung bei zunehmenden Bestrahlungsdosen nachvollziehen ließ. Um diese Werte in ein Verhältnis zur Grundphosphorylierung zu setzen, wurden daraus anschließend Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet (Abbildung 3.4). Übereinstimmend mit den optisch sichtbaren Ergebnissen der Western Blots zeigten sich auch in der graphischen Darstellung der semi-quantitativen Auswertung für alle drei Proteine in der überwiegenden Anzahl der Zelllinien höhere Phosphorylierungsgrade bei größerer Bestrahlungsdosis ($P_{0\text{ Gy}} < P_{5\text{ Gy}} < P_{20\text{ Gy}}$). Mittelwerte und

Standardabweichungen der relativen Phosphorylierung unterschieden sich innerhalb der drei Gruppen (p53, SMC1, ATM) deutlich.

Im Fall der Zelllinie BASE 54 war die Anzucht schwierig, sodass nach der ersten Bestrahlung nur eine Wiederholung mit anschließendem Nachweis von p53 und ATM möglich war. Auf den Nachweis von SMC1 in der 1. Wiederholung sowie den Nachweis aller drei Proteine nach einer zweiten Wiederholung der Bestrahlung musste verzichtet werden.

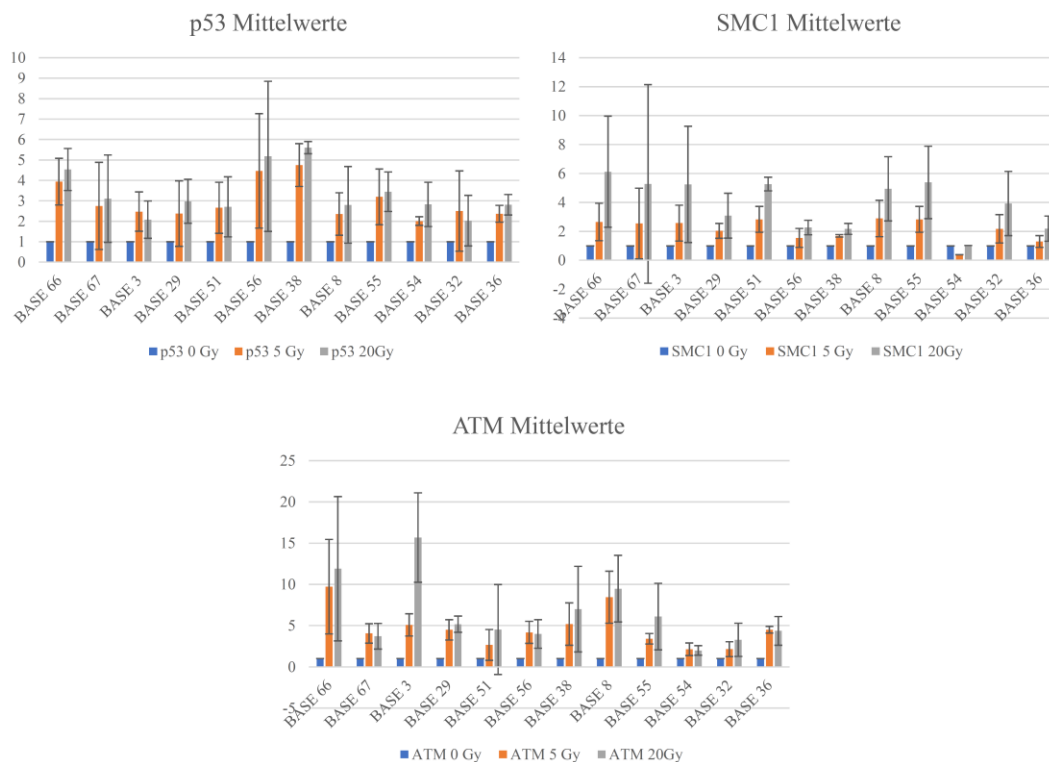


Abbildung 3.4: Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Ratio ($x/0Gy$). Auf der y-Achse sind diese Ratios aufgetragen. Blaue Balken stellen die unbestrahlte Probe dar, orange markiert die mit 5 Gy bestrahlte und grau die mit 20 Gy bestrahlte Zelllinie.

3.1.1 Phosphorylierungsunterschiede zwischen den Bestrahlungsdosen

Die Unterschiede in den Phosphorylierungsgraden der Bestrahlungsdosen wurden für alle drei Proteine im Streudiagramm betrachtet. Hier lagen die Ergebnisse nicht auf der Geraden mit $f(x) = x$, sondern mehrheitlich unterhalb (Abbildung 3.5). Die relative Phosphorylierung nach Bestrahlung mit 20 Gy war also für diese Werte größer als nach Bestrahlung mit 5 Gy.

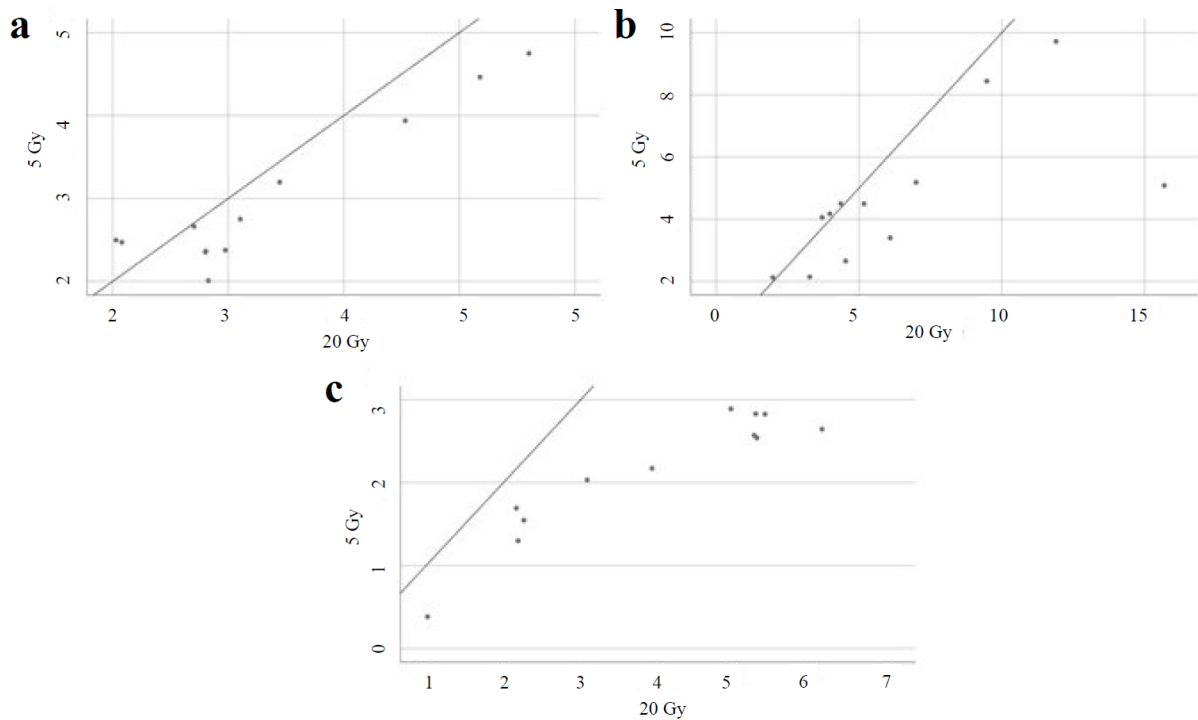


Abbildung 3.5: Streudiagramme zur Darstellung der Unterschiede der relativen Phosphorylierung ($x/0Gy$) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Die Ergebnisse nach 20 Gy IR sind auf der x-Achse aufgetragen, die nach 5 Gy auf der y-Achse. a stellt die Ergebnisse aus den p53-, b aus den ATM- und c- aus den SMC1-Nachweisen dar

Die Unterschiede der relativen Phosphorylierung nach beiden Bestrahlungsdosen wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verglichen. Dabei konnte für p53 ($Z = -2,197$; $p = 0,028$), ATM ($Z = -2,275$; $p = 0,023$) und SMC1 ($Z = -3,059$; $p = 0,002$) gezeigt werden, dass sich die relativen Phosphorylierungen nach Exposition mit 5 Gy signifikant von denen nach 20 Gy ionisierender Strahlung unterschieden. Dabei war der mediane Phosphorylierungsgrad für alle drei Proteine nach 5 Gy mit $\bar{x}_{p53} = 2,62$, $\bar{x}_{ATM} = 4,17$ und $\bar{x}_{SMC1} = 1,95$ niedriger als nach 20 Gy mit $\bar{x}_{p53} = 3,12$, $\bar{x}_{ATM} = 5,20$ und $\bar{x}_{SMC1} = 2,85$.

3.1.2 Reproduzierbarkeit in den drei Wiederholungen

Mittels Reliabilitätsanalyse wurde die Korrelation zwischen den Ergebnissen der einzelnen Versuchsdurchläufe bestimmt (Tabelle 15). Für alle ermittelten Korrelationskoeffizienten war $r \leq 0,7$. Bis auf drei Ergebnisse waren diese nicht signifikant ($p > 0,05$). Insgesamt sprachen die Ergebnisse für eine schwache bis moderate Korrelation der Ergebnisse der drei Wiederholungen.

		5Gy		20Gy	
		r	p	r	p
<i>ATM</i>	D-W1	0,175	0,59	-0,035	0,91
	D-W2	0,373	0,26	0,191	0,57
	W1-W2	0,636*	0,04	0,700*	0,02
<i>SMC1</i>	D-W1	-0,209	0,54	0,082	0,81
	D-W2	-0,400	0,22	-0,455	0,16
	W1-W2	0,691*	0,02	0,509	0,11
<i>p53</i>	D-W1	-0,028	0,93	0,042	0,90
	D-W2	0,018	0,96	0,218	0,52
	W1-W2	0,355	0,29	0,436	0,18

Tabelle 15: Auflistung der ermittelten Korrelationskoeffizienten (*r*) und der Signifikanz (*p*) für die Phosphorylierungsgrade der drei Durchläufe. *D* bezeichnet den ersten Versuchsdurchlauf, *W1* und *W2* die erste und zweite Wiederholung. Signifikante Ergebnisse sind mit Asterisk kennzeichnet.

3.1.3 Phosphorylierungsgrad und Genotyp des SNPs rs11552449

Um die Assoziation des Genotyps am SNP rs11552449 mit der Stärke der Phosphorylierung nach ionisierender Bestrahlung bestimmen zu können, wurden die Zelllinien, die aus den Ergebnissen des Western Blots ermittelten Werte und der Genotyp einander zugeordnet. Bei einer Gruppengröße von $n = 12$ ergaben sich für die drei Genotypen verschieden große Untergruppen mit $n_{CC} = 9$, $n_{CT} = 2$ und $n_{TT} = 1$.

Bei Betrachtung der Ergebnisse im Streudiagramm fielen sehr unterschiedliche Wertebereiche auf (Abbildung 3.6). Für *ATM* wiesen die Werte nach 5 Gy Bestrahlung im CC-Genotyp einen höheren Maximalwert ($x_{CCMax}(5 \text{ Gy}) = 9,72$) verglichen mit den anderen Genotypen ($x_{CTMax}(5 \text{ Gy}) = 5,08$; $x_{TTMax}(5 \text{ Gy}) = x_{TTMin}(5 \text{ Gy}) = 4,49$) auf, während sich die Minimalwerte weniger unterschieden ($x_{CCMin}(5 \text{ Gy}) = 2,14$; $x_{CTMin}(5 \text{ Gy}) = 2,12$). Nach 20 Gy hingegen wies der heterozygote Genotyp einen höheren maximalen Phosphorylierungsgrad auf ($x_{CCMax}(20 \text{ Gy}) = 11,90$; $x_{CTMax}(20 \text{ Gy}) = 15,68$; $x_{TTMax}(20 \text{ Gy}) = x_{TTMin}(20 \text{ Gy}) = 5,17$), während die Unterschiede in den Minimalwerten geringer ausfielen ($x_{CCMin}(20 \text{ Gy}) = 3,28$; $x_{CTMin}(20 \text{ Gy}) = 1,99$). In den *p53*-Nachweisen wurden in beiden Bestrahlungsdosen engere Wertebereiche beobachtet ($x_{CCMin}(5 \text{ Gy}) = 2,35$; $x_{CCMax}(5 \text{ Gy}) = 4,75$; $x_{CCMin}(20 \text{ Gy}) = 2,03$; $x_{CCMax}(20 \text{ Gy}) = 5,60$; $x_{CTMin}(5 \text{ Gy}) = 2,00$; $x_{CTMax}(5 \text{ Gy}) = 2,47$; $x_{CTMin}(20 \text{ Gy}) = 2,07$; $x_{CTMax}(20 \text{ Gy}) = 2,82$; $x_{TTMin}(5 \text{ Gy}) = x_{TTMax}(5 \text{ Gy}) = 2,38$; $x_{TTMin}(20 \text{ Gy}) = x_{TTMax}(20 \text{ Gy}) = 2,98$). Für *SMC1* waren die Wertebereiche ähnlich breit. In

beiden Bestrahlungsdosen wies der CT-Genotyp einen niedrigeren Wert Minimalwert auf als die anderen Genotypen ($x_{CTMin}(5 \text{ Gy}) = 0,38$; $x_{CTMin}(20 \text{ Gy}) = 1,02$; $x_{CCMin}(5 \text{ Gy}) = 1,30$; $x_{CCMin}(20 \text{ Gy}) = 2,17$; $x_{TTMin}(5 \text{ Gy}) = x_{TTMax}(5 \text{ Gy}) = 2,03$; $x_{TTMin}(20 \text{ Gy}) = x_{TTMax}(20 \text{ Gy}) = 3,08$), die Maximalwerte des CC-Genotyps lagen höher als die der anderen Gruppen ($x_{CCMax}(5 \text{ Gy}) = 2,89$; $x_{CTMax}(5 \text{ Gy}) = 2,57$; $x_{CCMax}(20 \text{ Gy}) = 6,12$; $x_{CTMax}(20 \text{ Gy}) = 5,25$).

Der Median des CC-Genotyps in den p53-Nachweisen lag nach 5 Gy ionisierender Strahlung bei $\bar{x}(5 \text{ Gy}) = 1,20$, verglichen mit den anderen Genotypen also etwas niedriger. Nach 20 Gy hingegen war der mediane Phosphorylierungsgrad des CC-Genotyps mit $\bar{x}(20 \text{ Gy}) = 3,10$ höher im Vergleich zu den Ergebnissen der beiden anderen Gruppen. Für ATM lagen die Mediane des CC-Genotyps mit $\bar{x}(5 \text{ Gy}) = 1,61$ und $\bar{x}(20 \text{ Gy}) = 4,53$ unterhalb der Ergebnisse der anderen Genotypen, wobei nach 5 Gy der TT- und nach 20 Gy der CT-Genotyp im Vergleich die höchste mediane Phosphorylierung aufwiesen. Für SMC1 war ein höherer Median des CC-Genotyps im Vergleich zu den Ergebnissen der anderen beiden Genotypen nach beiden Bestrahlungsdosen zu verzeichnen ($\bar{x}(5 \text{ Gy}) = 2,54$; $\bar{x}(20 \text{ Gy}) = 4,94$).

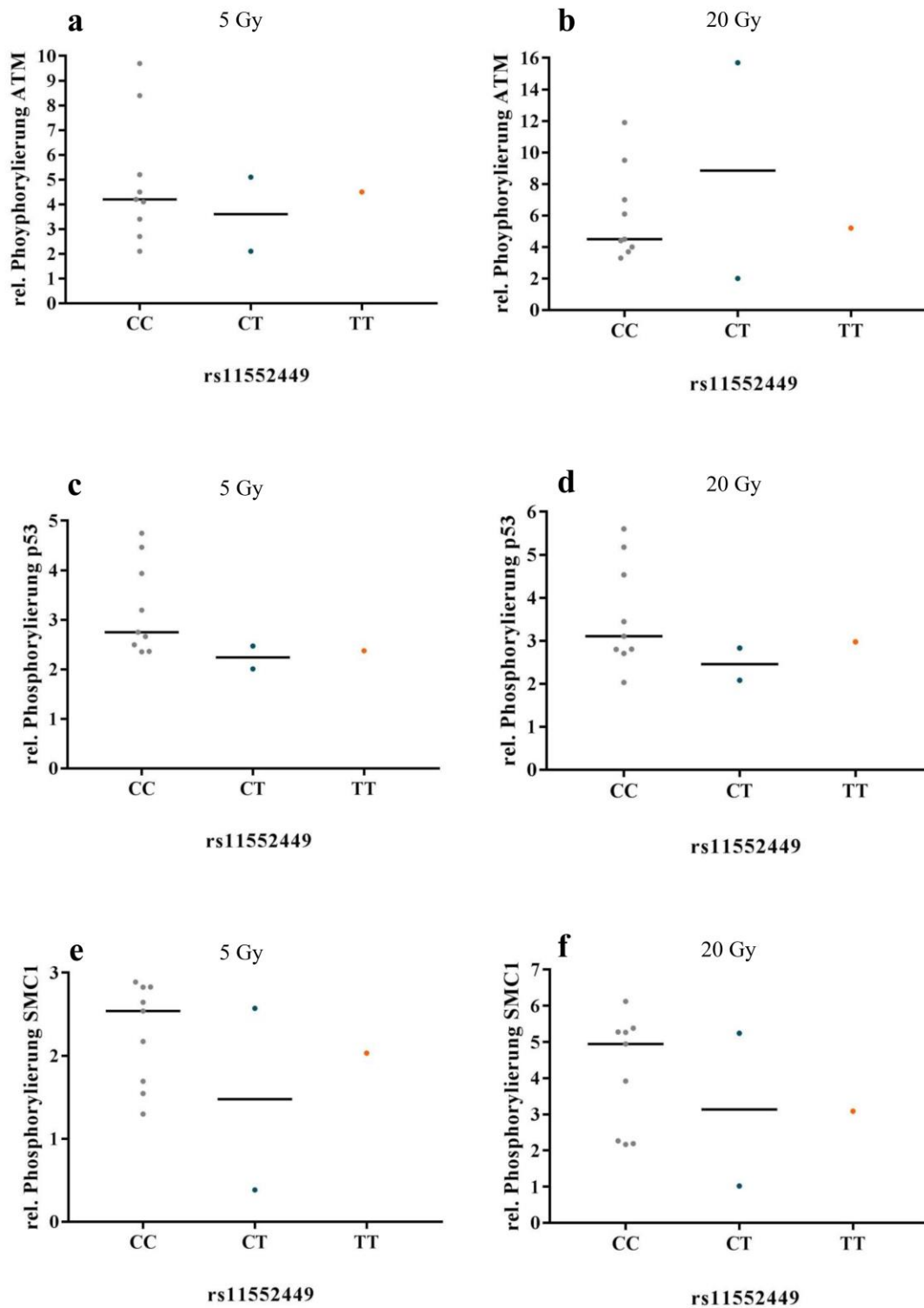


Abbildung 3.6: Darstellung der Verteilung der relativen Phosphorylierung nach Exposition mit 5 bzw. 20 Gy ionisierender Strahlung für die drei Genotypen CC, CT und TT am SNP rs11552449 im Streudiagramm, wobei ATM in a und b, p53 in c und d, und SMC1 in e und f dargestellt sind.

3.1.4 Phosphorylierungsgrad und Apollo-Expressionslevel

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den Phosphorylierungsgraden und dem Apollo-Expressionslevel wurden in vorangegangenen Studien ermittelte RNA-Expressionsniveaus dem jeweiligen Genotyp des SNPs rs6674834 zugeordnet [Demuth et al., unveröffentlichte Ergebnisse]. Diejenigen mit dem Genotyp AA hatten dabei ein signifikant höheres Expressionslevel als diejenigen mit dem Genotyp GG ($H(1) = 8,08$; $p = 0,004$). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Phosphorylierungsgrade wurden zu diesem Zweck dem Genotyp am SNP rs6674834 zugeordnet (AA, GG). Bei gleicher Gruppengröße ($n = 12$) ergaben sich hier Untergruppen von $n_{AA} = 7$ und $n_{GG} = 5$.

Auch die hierfür erstellten Streudiagramme wiesen deutlich verschiedene Wertebereiche auf (Abbildung 3.7). Für ATM war zwar nach 5 Gy Bestrahlung eine höhere maximale Phosphorylierung im AA-Genotyp ($x_{AAMax}(5 \text{ Gy}) = 9,72$), im Vergleich zum GG-Genotyp ($x_{GGMax}(5 \text{ Gy}) = 5,19$), bei ähnlichen Minima ($x_{AAMin}(5 \text{ Gy}) = 2,14$; $x_{GGMin}(5 \text{ Gy}) = 2,12$) zu erkennen. Nach 20 Gy IR hingegen kehrte sich dieses Verhältnis um: $x_{AAMax}(20 \text{ Gy}) = 11,90$; $x_{GGMax}(20 \text{ Gy}) = 15,68$; $x_{AAMin}(20 \text{ Gy}) = 3,28$; $x_{GGMin}(20 \text{ Gy}) = 1,99$. Die mediane Phosphorylierung von ATM war nach 5 Gy ionisierender Strahlung im GG-Genotyp ($\bar{x}_{AA}(5 \text{ Gy}) = 4,17$; $\bar{x}_{GG}(5 \text{ Gy}) = 4,50$) und nach 20 Gy im AA-Genotyp etwas höher ($\bar{x}_{AA}(20 \text{ Gy}) = 5,17$; $\bar{x}_{GG}(20 \text{ Gy}) = 4,53$). Die Wertebereiche im p53-Nachweis unterschieden sich wenig: $x_{AAMin}(5 \text{ Gy}) = 2,35$; $x_{AAMax}(5 \text{ Gy}) = 4,46$; $x_{GGMin}(5 \text{ Gy}) = 2,01$; $x_{GGMax}(5 \text{ Gy}) = 4,75$; $x_{AAMin}(20 \text{ Gy}) = 2,03$; $x_{AAMax}(20 \text{ Gy}) = 5,17$; $x_{GGMin}(20 \text{ Gy}) = 2,08$; $x_{GGMax}(20 \text{ Gy}) = 5,60$. Die mediane Phosphorylierung war nach beiden Bestrahlungsdosen im AA-Genotyp etwas höher als im GG-Genotyp ($\bar{x}_{AA}(5 \text{ Gy}) = 2,75$; $\bar{x}_{GG}(5 \text{ Gy}) = 2,47$; $\bar{x}_{AA}(20 \text{ Gy}) = 3,10$; $\bar{x}_{GG}(20 \text{ Gy}) = 2,81$). Die für SMC1 nachgewiesenen relativen Phosphorylierungen unterschieden sich vor allem hinsichtlich ihrer Minimalwerte: im GG-Genotyp waren diese in beiden Bestrahlungsdosen niedriger als im AA-Genotyp ($x_{AAMin}(5 \text{ Gy}) = 1,55$; $x_{GGMin}(5 \text{ Gy}) = 0,38$; $x_{AAMin}(20 \text{ Gy}) = 2,26$; $x_{GGMin}(20 \text{ Gy}) = 1,02$). Die Maximalwerte lagen auf ähnlicher Höhe ($x_{AAMax}(5 \text{ Gy}) = 2,89$; $x_{GGMax}(5 \text{ Gy}) = 2,83$; $x_{AAMax}(20 \text{ Gy}) = 6,12$; $x_{GGMax}(20 \text{ Gy}) = 5,26$). Der mediane Phosphorylierungsstatus des AA-Genotyps (höheres Apollo-Expressionslevel) lag in beiden Bestrahlungsdosen höher im Vergleich zum GG-Genotyp (niedrigeres Apollo-Expressionslevel).

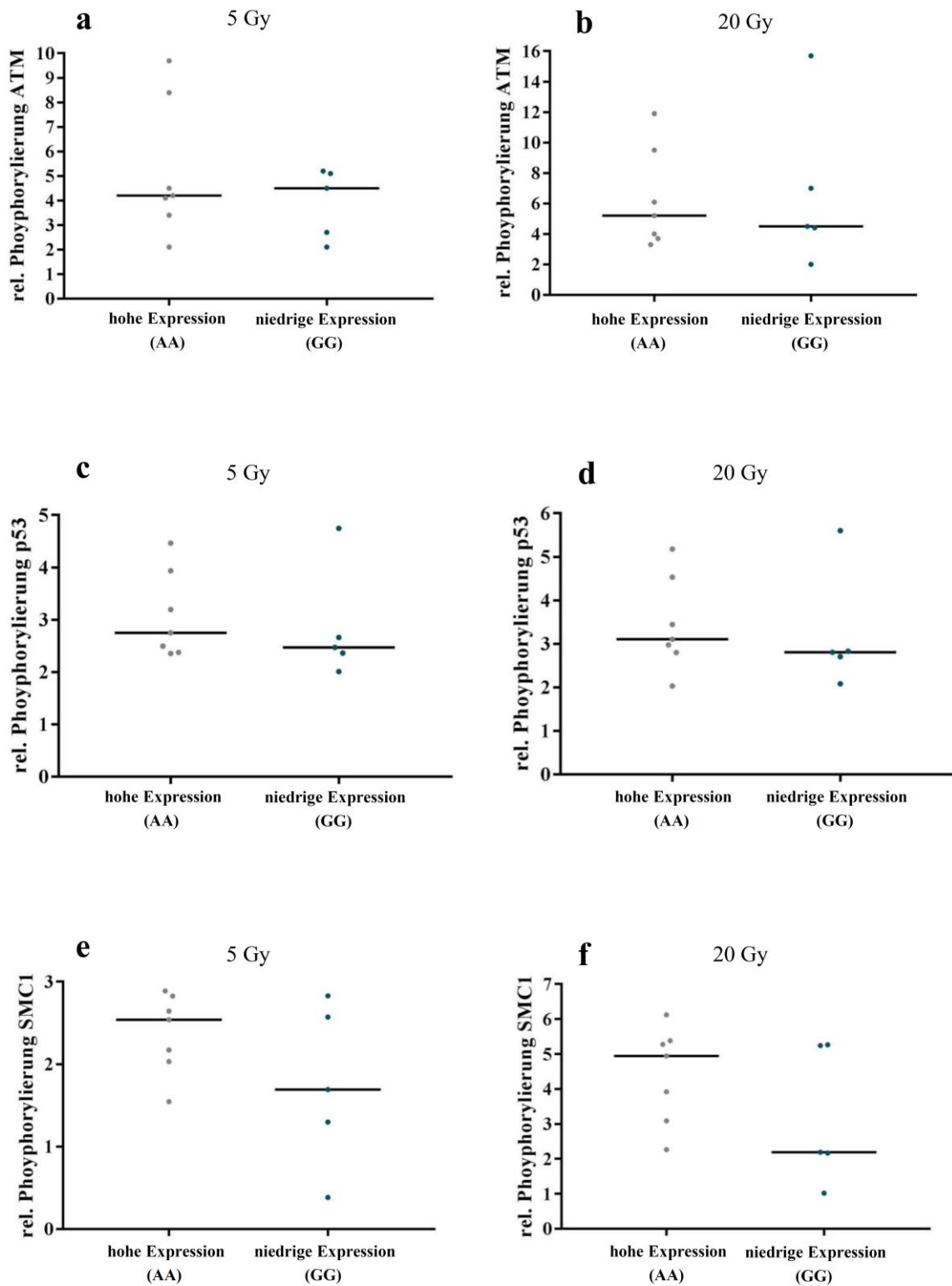


Abbildung 3.7: Darstellung der Verteilung der relativen Phosphorylierung nach Exposition mit 5 bzw. 20 Gy ionisierender Strahlung auf die Apollo-Expressionslevels im Streudiagramm, wobei ATM in a und b, p53 in c und d, und SMC1 in e und f dargestellt sind.

3.2 Telomerlängenbestimmung

Über die Telomerlängenbestimmung ausgewählter Zelllinien (LCLs) aus der Berliner Altersstudie II mittels qPCR und Verwendung bestehender Daten für Leukozytentelomerlängen [84] wurde der Zusammenhang zwischen dem Genotyp des SNPs rs11552449 und der Telomerlänge nachgegangen.

3.2.1 Telomerlänge lymphoblastoider Zelllinien und SNP rs11552449

Für die LCLs, wurden mit einer Referenz (Gemisch von DNA aus 10 LCL-Zelllinien) und der mitgeführten Standardreihe die ct-Werte bestimmt (Abbildung 3.8, Abbildung 3.9).

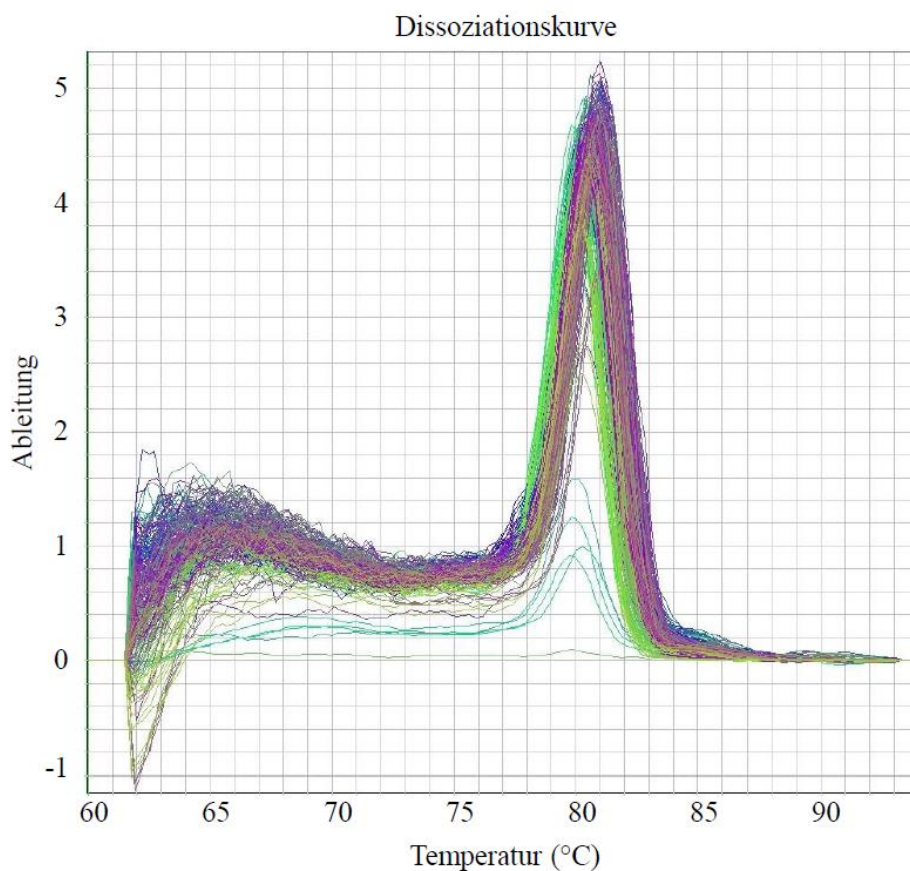


Abbildung 3.8: Dissoziationskurven der qPCR aller untersuchten LCLs. Nicht dargestellt sind die Dissoziationskurven der Standardreihe.

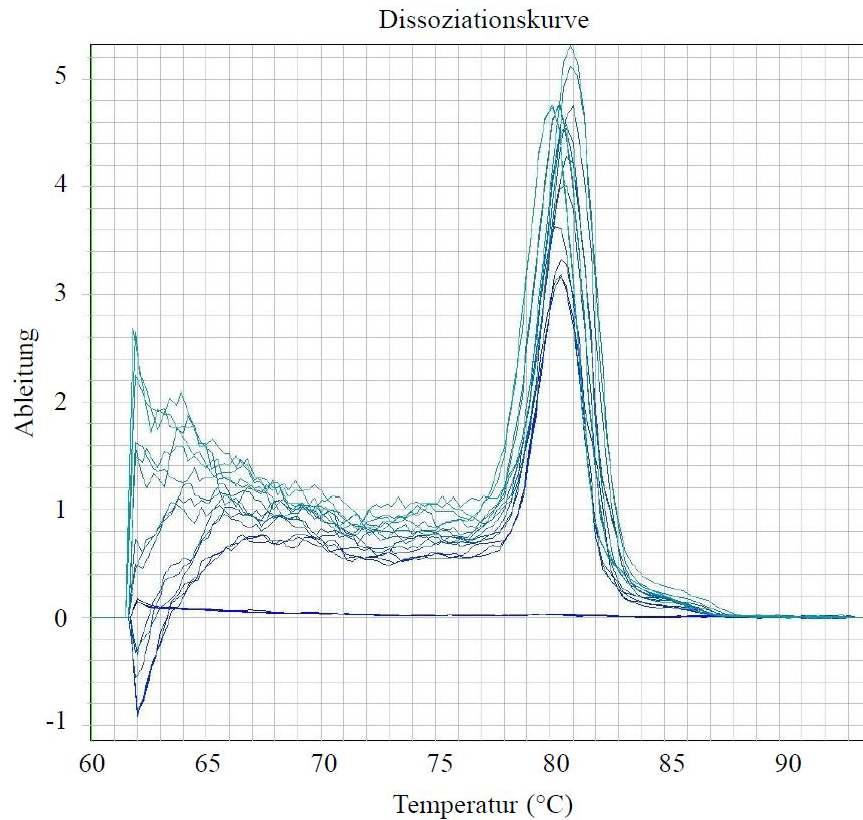
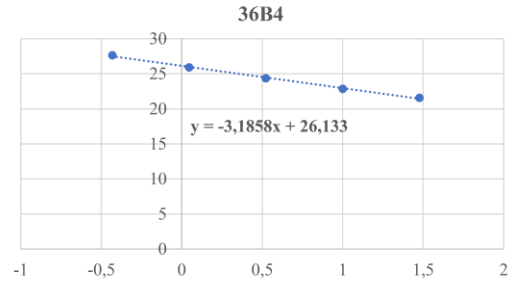
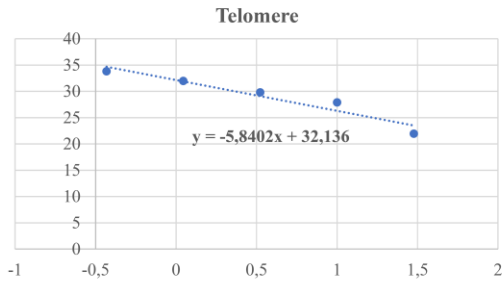


Abbildung 3.9: Dissoziationskurven der Standardreihe.

Mittels $\Delta\Delta ct$ -Methode wurden aus den in der qPCR ermittelten ct-Werten die relativen Telomerlängen für die LCL-Zelllinien errechnet (Abbildung 3.11). Die mittlere Telomerlänge der Referenz (R) diente dabei als Bezugsgröße. Die hierfür notwendigen Effizienzen der PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe der jeweiligen Referenzzelllinie für beide Platten berechnet (Abbildung 3.10).



c	log ₁₀ c	MW
0	-	-
0,37	-0,4317983	33,8298457
1,11	0,04532298	31,9715203
3,33	0,52244423	29,7863713
10	1	27,9050423
30	1,47712125	21,9267657

c	log ₁₀ c	MW
0	-	35,5382823
0,37	-0,4317983	27,6345703
1,11	0,04532298	25,9212973
3,33	0,52244423	24,3618767
10	1	22,8604043
30	1,47712125	21,5629417

E 1,483313252

E 2,060121809

Abbildung 3.10: Berechnung der Effizienzen über die bekannten DNA-Mengen der Referenzen nach Pfaffl [134]. *c* bezeichnet die DNA-Konzentration, *MW* den Mittelwert aus den Triplikaten der ermittelten *ct*-Werte, *E* die Effizienz der Reaktion.

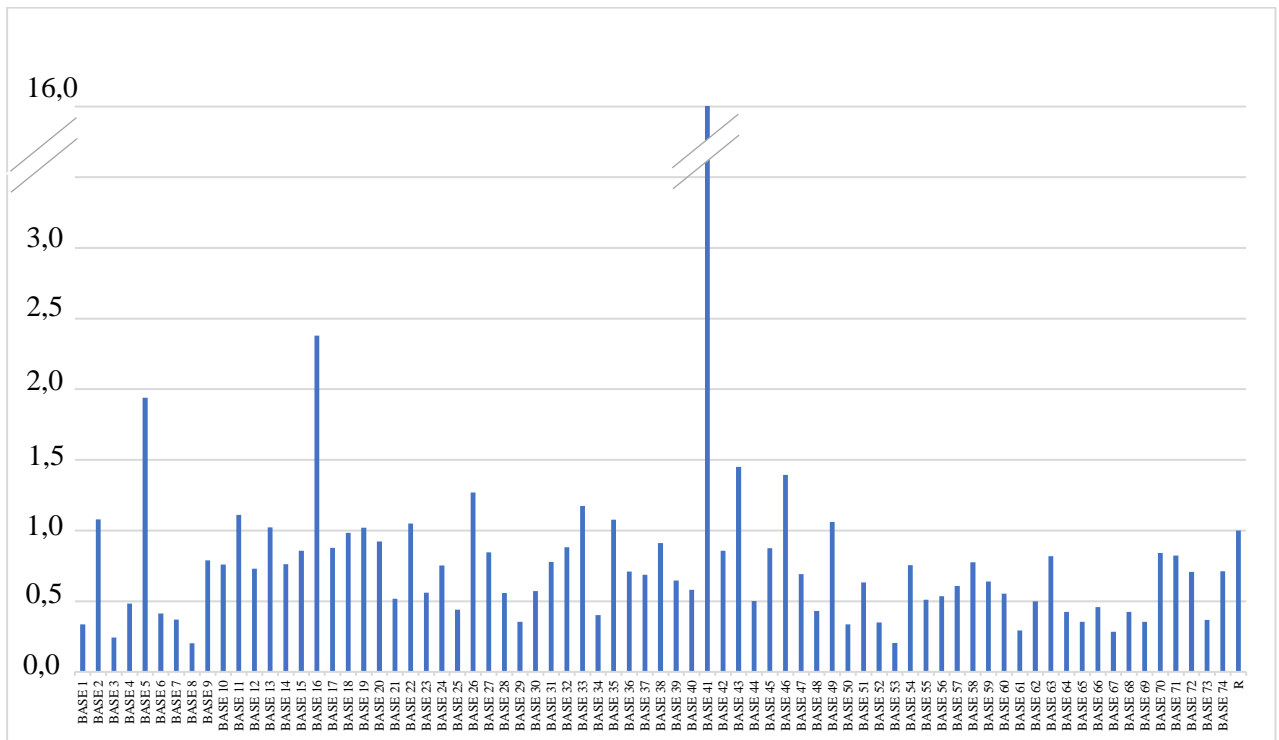


Abbildung 3.11: Darstellung der mittels $\Delta\Delta ct$ -Methode aus den Ergebnissen der *qPCR* errechneten relativen Telomerlänge (*y*-Achse) der einzelnen Proben bezogen auf die Referenz (*R*).

Für die überwiegende Anzahl der verwendeten Zelllinien waren die Genotypen des SNPs rs11552449 bekannt. Es konnte so eine Zuordnung der jeweiligen Zelllinie zum Genotyp und zur ermittelten Telomerlänge vorgenommen werden. Bei einer Gruppengröße von $n = 62$ wurden so drei Gruppen mit $n_{CC} = 40$, $n_{CT} = 15$ und $n_{TT} = 7$ generiert.

Im Streudiagramm fiel auf, dass in der Gruppe mit dem CC-Genotyp ein höhere maximale relative Telomerlänge gemessen wurde ($\Delta\Delta ct_{CCMax} = 16,151$) als in den anderen beiden Genotypen ($\Delta\Delta ct_{CTMax} = 1,27$; $\Delta\Delta ct_{TTMax} = 0,92$) (Abbildung 3.12). Die Minimalwerte lagen dagegen in ähnlichen Bereichen ($\Delta\Delta ct_{CCMin} = 0,21$; $\Delta\Delta ct_{CTMin} = 0,24$; $\Delta\Delta ct_{TTMin} = 0,29$). Auch die Mediane unterschieden sich nur geringfügig ($\bar{x}_{CC} = 0,69$; $\bar{x}_{CT} = 0,73$; $\bar{x}_{TT} = 0,56$).

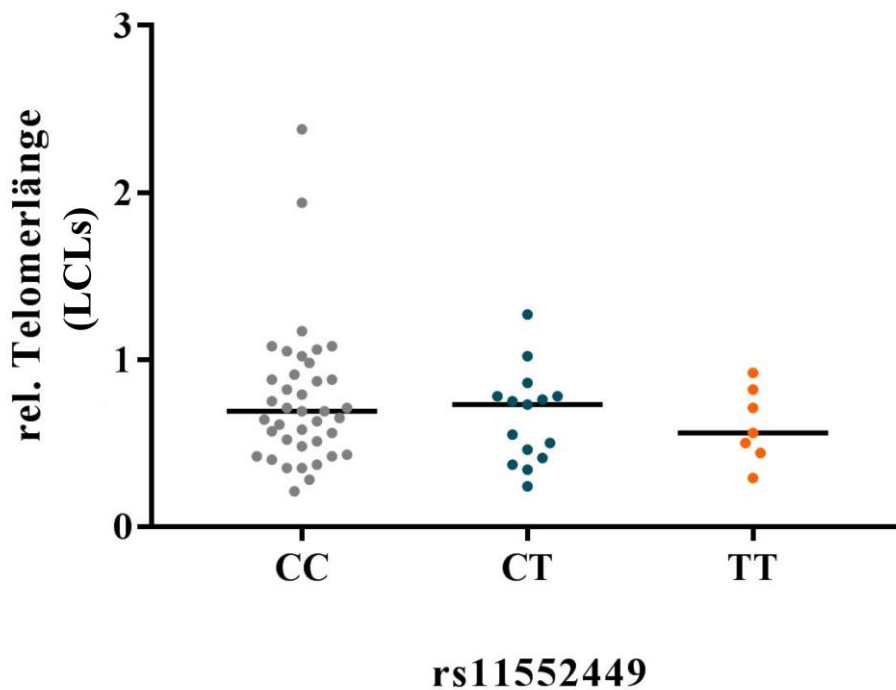


Abbildung 3.12: Verteilung der relativen Telomerlänge nach Genotyp von rs11552449 in DNA aus LCLs. Horizontale Linien markieren jeweils den Median ($\bar{x}_{CC} = 0,69$; $\bar{x}_{CT} = 0,73$; $\bar{x}_{TT} = 0,56$). Hellgraue Punkte bezeichnen Telomerlängen von Zelllinien mit dem Genotyp CC, petroldarbene Punkte solche mit dem Genotyp CT und orange solche mit dem Genotyp TT, wobei $n_{CC} = 40$, $n_{CT} = 15$ und $n_{TT} = 7$. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Darstellung so gewählt, dass sich ein Messwert mit dem Genotyp CC außerhalb des dargestellten Bereichs befindet ($\Delta\Delta ct = 16,151$).

Die statistische Analyse des Zusammenhangs von Genotyp des SNPs rs11552449 und Telomerlänge erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. Als Zielvariable wurde dabei die

Telomerlänge gewählt, die Einflussvariable war der Genotyp mit den drei Faktorstufen CC, CT und TT. Anhand der durchgeführten Analyse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den relativen Telomerlängen der drei Gruppen festgestellt werden ($H(2) = 1,221$; $p = 0,543$).

3.2.2 Relative Leukozytentelomerlänge und SNP rs11552449

Für 1710 Probanden aus der BASE-II Studie waren sowohl die Genotypen bekannt, als auch die relative Leukozyten-Telomerlänge (rLTL) von Meyer et al. [84] aus EDTA-Vollblut mit der Methode nach Pfaffl bestimmt worden [136]. Da bekannt ist, dass die in LCLs bestimmte Telomerlänge nicht mit der aus Leukozyten korreliert [137], wurden diese Daten ebenfalls dem Genotyp an rs11552449 zugeordnet und auf Unterschiede hin getestet. Es wurden hier drei Gruppen mit $n_{CC} = 1197$, $n_{CT} = 475$ und $n_{TT} = 38$ gebildet.

In der Darstellung im Streudiagramm stellten sich die Mediane der relativen Telomerlängen aller drei Genotypen auf nahezu gleicher Höhe dar ($\bar{x}_{CC} = 1,14$; $\bar{x}_{CT} = 1,13$; $\bar{x}_{TT} = 1,12$) (Abbildung 3.13). Der CC-Genotyp wies einen etwas größeren Wertebereich auf, als die anderen beiden Genotypen ($\Delta\Delta_{ct_{CCMin}} = 0,17$; $\Delta\Delta_{ct_{CCMax}} = 2,13$; $\Delta\Delta_{ct_{CTMin}} = 0,38$; $\Delta\Delta_{ct_{CTMax}} = 1,87$; $\Delta\Delta_{ct_{TTMin}} = 0,72$; $\Delta\Delta_{ct_{TTMax}} = 1,61$).

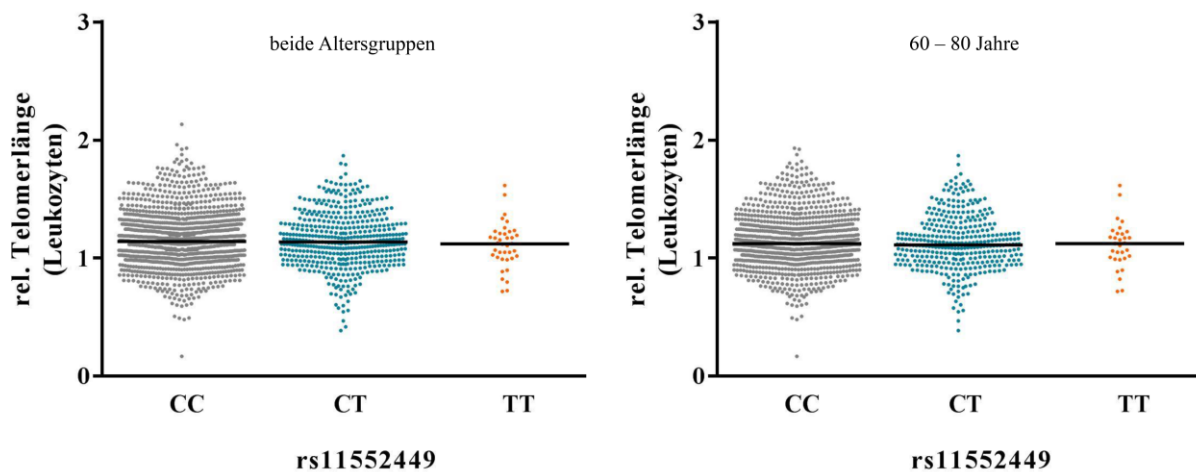


Abbildung 3.13: Verteilung der rLTL nach Genotyp von rs11552449 in DNA aus Leukozyten (aus Vollblut). Hellgraue Punkte bezeichnen Telomerlängen von Zelllinien mit dem Genotyp CC, petrol-farbene Punkte solche mit dem Genotyp CT und orange solche mit dem Genotyp TT ($\bar{x}_{CC} = 1,14$; $\bar{x}_{CT} = 1,13$; $\bar{x}_{TT} = 1,12$).

Die statistische Auswertung erfolgte auch in diesem Fall mittels Kruskal-Wallis-Test. Es konnte weder bei Einschluss beider Altersgruppen ($H(2) = 1,656$; $p = 0,437$) noch bei isolierter

Betrachtung der älteren Probandengruppe ($H(2) = 0,929$; $p = 0,628$) signifikante Unterschiede der Telomerlängen zwischen den drei Genotypen gezeigt werden.

3.2.3 Korrelation von Leukozyten- und LCL-Telomerlänge

Da für beide Datensätze die gleiche Referenzprobe verwendet wurde, konnten die Telomerlängen-Daten für die Zelllinien (LCLs) und die Leukozyten-Telomerlängen direkt miteinander verglichen werden. Die Korrelation zwischen den relativen Telomerlängen aus LCLs und Leukozyten aus dem Vollblut wurde zunächst im Streudiagramm dargestellt. Die Datenpunkte lagen vorrangig oberhalb der Geraden mit $f(x) = x$ (Abbildung 3.14).

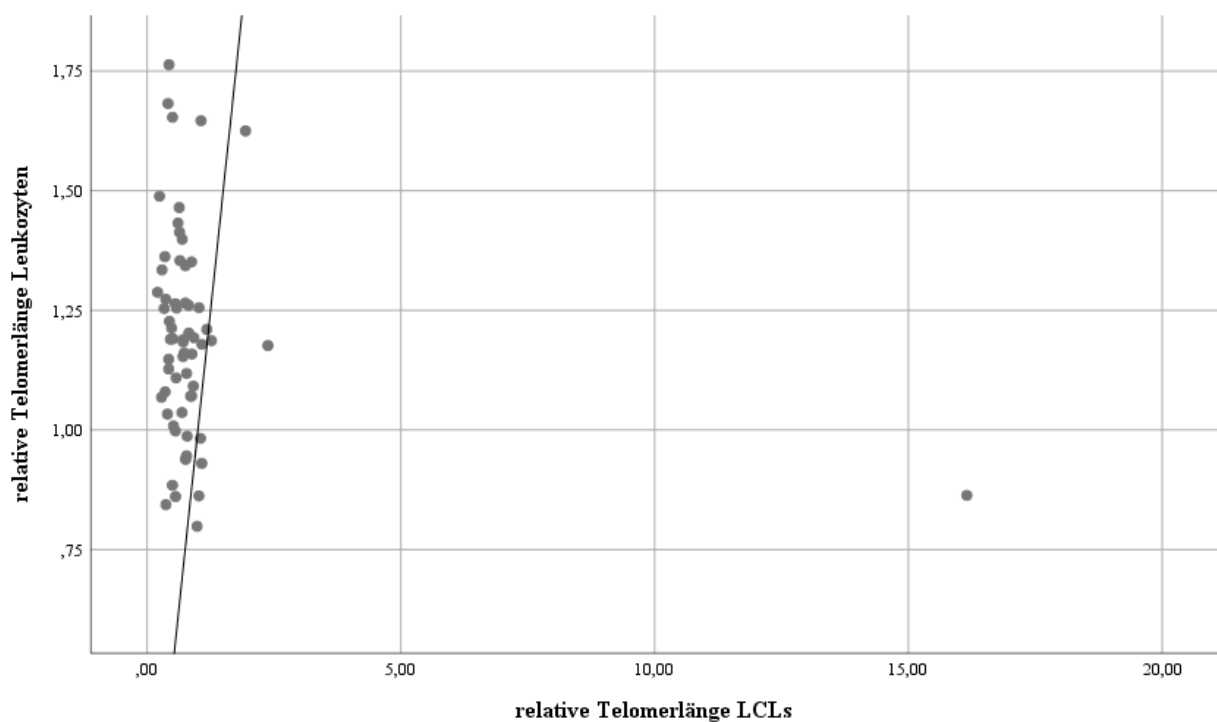


Abbildung 3.14: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation der relativen Telomerlängen aus lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) und Leukozyten aus dem Vollblut. Eingezeichnete Gerade stellt die Funktion $f(x) = x$ dar.

Für die statistische Analyse wurde die Korrelationsanalyse nach Spearman herangezogen. Für die erhobenen Daten konnte keine lineare Korrelation gezeigt werden ($r = -0,203$; $p = 0,113$).

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Telomerlänge in Leukozyten und lymphoblastoiden Zelllinien

Während die relativen Telomerlängen der aus dem Vollblut gewonnenen DNA ein Gemisch der verschiedenen Leukozyten-Subgruppen enthält, sind die Ergebnisse der DNA aus den LCLs lediglich einer Zellklasse zuzuordnen. Lin et al. konnten eine Zelltyp-Spezifität der Veränderungen in der Telomerlänge zeigen [137]. Während die Telomerlängen der verschiedenen Zelltypen vom selben Probanden unterschiedlich waren, jedoch eng korrelierten, war bei der Änderungsrate der Längen eine Korrelation mit dem Zelltyp zu beobachten. In B-Zellen beispielsweise konnte die schnellste Telomerverkürzung beobachtet werden (196 Basenpaare pro Jahr). In aus Vollblut gewonnener DNA bzw. Leukozytengemischen bestimmt der individuell unterschiedliche Anteil des jeweiligen Zelltyps folglich die Auswirkungen auf die durchschnittliche Verkürzungsrate. Vergleiche zwischen den gewonnenen Ergebnissen können also nur erfolgen, sofern diese Anteile bekannt sind. Um dieser Problematik zu begegnen, könnte beispielsweise mittels FACS (*fluorescent-activated-cell-scanning*) eine Differenzierung der verschiedenen Zellarten erfolgen, die Telomerlängen getrennt bestimmt und verglichen werden.

Vor dem Hintergrund, dass sich auch die Anteile der verschiedenen zellulären Blutbestandteile mit dem Alter ändern, sind diese Auswirkungen zudem chronologischen Änderungen unterworfen [138]. Zur Überprüfung könnte eine erneute Untersuchung der Apollo-bezogenen Telomerlängen im Rahmen einer Längsschnittstudie durchgeführt werden. Hierfür würde sich die Verwendung von Proben anbieten, die beispielsweise bei der bereits geplanten *follow-up* Erhebung von BASE-II-Probanden im Rahmen des GendAge-Projektes gewonnen werden können.

4.1.2 Passage der lymphoblastoiden Zelllinien

Lymphoblastoide Zelllinien sind in der Zellkultur häufig verwendete permanente Zelllinien, da ihre Anzucht relativ unkompliziert ist und sie als Modell für eine Vielzahl von Fragestellungen dienen können. Einige der EBV-behandelten Zelllinien entgehen jedoch der Immortalisierung und können nur für einen begrenzten Zeitraum (definitionsgemäß <160 Passagen) kultiviert werden [139]. Da diese Zellen in aller Regel nicht vor Durchführung der Versuche identifiziert werden, können sie durch möglicherweise gering ausgeprägte DNA-Schadensantwort-Signale die Ergebnisse verfälschen. Probleme in der Anzucht, wie sie für eine Zelllinie in der vorliegenden

Arbeit beschrieben sind, können auf diese Weise erklärt werden und sind auch in der Betrachtung der gewonnenen Ergebnisse zu bedenken.

4.1.3 Einfluss der Immortalisierung in lymphoblastoiden Zelllinien

Hinsichtlich der untersuchten Proteine ist auch die Beobachtung interessant, dass vor allem Zellen mit einem niedrigen p53-Expressionslevel immortalisiert werden [140]. Durch diese Selektion könnte die Detektion aufgrund des erniedrigten p53-Gesamtniveaus erschwert sein. In der vorliegenden Arbeit wurden die Phosphorylierungsgrade mittels Western Blots relativ bestimmt und auf Blot-interne Kontrollen bezogen, sodass sich ein möglicherweise geringeres Gesamtniveau nicht auf die Messungen innerhalb einer Zelllinie auswirken würde. Im Vergleich der Zelllinien untereinander wäre jedoch ein Einfluss der Immortalisierung auf das p53-Level denkbar.

Unklar ist, ob auch die Phosphorylierung nach Immortalisierung verändert ist. In vergleichenden Untersuchungen der Korrelationen von Geno- und Phänotyp in DNA-Reparatur-Assays in LCLs und PBMCs konnten deutliche Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus beiden Stichproben gezeigt werden [141]. Die Nachweise der Phosphorylierungsniveaus von γ H2A.X wiesen in LCLs größere inter-experimentelle Variabilität auf als die Ergebnisse aus den PBMCs. Auch zeigten sich bei den EBV-transfizierten Zelllinien häufiger chromosomale Instabilitäten. Die Verwendung lymphoblastoider Zelllinien für die Untersuchung der DNA-Reparatur-Proteine muss vor diesem Hintergrund kritisch betrachtet und die beschriebene Variabilität müssen bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden, insbesondere unter Berücksichtigung der Gruppengrößen der jeweils für die Versuche verwendeten Zelllinien.

4.1.4 γ -Bestrahlung

Da die Messungen über einen Zeitraum von mehreren Monaten durchgeführt wurden, mussten jahreszeitlich bedingte Temperaturänderungen zur Erhaltung einer dauerhaft konstanten Versuchsumgebung ausgeglichen werden. Um die Temperaturänderungen möglichst gering zu halten, wurde für den Transport der lebenden Zellen zur Bestrahlungsquelle eine Styroporbox mit Wärmeakkus, und für den Rücktransport eine solche mit Kälteakku verwendet. Die dennoch möglicherweise aufgetretenen Temperaturänderungen und die schwankenden Temperaturen der Bestrahlungskammer selbst könnten für die Unterschiede in den Phosphorylierungsgraden innerhalb der drei Gruppen eine Rolle gespielt haben und erklären, dass kein linearer

Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der drei Versuchsdurchführungen ermittelt werden konnte.

Demuth et al. zeigten 15 Minuten nach IR-Exposition mit Dosen von 0,3 bzw. 3 bis 20 Gy Unterschiede der relativen Phosphorylierungsgrade für ATM, p53, SMC1 und γ H2A.X entsprechend der Bestrahlungsdosen zwischen hSNM1B-depletierten Zellen und der Kontrolle [105]. Basierend auf dieser Grundlage wurden in der vorliegenden Arbeit die Zellen ebenfalls nach der Bestrahlung über 15 Minuten bei 37°C inkubiert, bevor sie auf den Kälteblock überführt und anschließend lysiert wurden. In humanen Fibroblasten (GM00639) durchgeführte Bestrahlungsversuche legen die Beteiligung Apollos an einer frühen Antwort (ab 10 Sekunden nach Schädigung) auf induzierte DSBs nahe [105]. Vor diesem Hintergrund wäre denkbar, dass nach 15 Minuten bereits andere, Apollo-unabhängige Reparatur*pathways* aktiviert oder Apollo-abhängige *pathways* schon wieder deaktiviert wurden. Betroffene Zellen hätten zwar eine langsamere Schadensantwort auf DSBs, würden aber schlussendlich die gleiche Menge phosphorylierten Proteins exprimieren wie die Kontrolle. Der mit dem SNP möglicherweise auftretende negativ regulierende Effekt auf die Apollo-Funktion ist erwartungsgemäß geringer als der einer vollständigen Apollo-Depletion. Bei einer außerdem geringen Probenanzahl - wie im Falle der vorliegenden Arbeit - könnten die nach 15 Minuten bereits zum Teil kompensierten und dementsprechend geringer ausfallenden Unterschiede eventuell kein statistisches Signifikanzniveau erreichen (s. 4.1.7.). Eine Möglichkeit, diese Überlegung zu prüfen wäre ein abgewandelter Versuchsaufbau. Während in der vorliegenden Arbeit die Bestrahlungsdosis als Variable diente, wäre hierbei die Zeit bis zum Transfer auf den Kälteblock zu variieren, sodass die Zellen nach IR-vermittelter DNA-Schädigung unterschiedlich viel Zeit für die Schadensantwort hätten. Einen ähnlichen Versuchsaufbau präsentieren Gatei et al. [142]. Unter anderem wurde hier die Phosphorylierung von p53 nach γ -Bestrahlung zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 30 Minuten und 2 Stunden an LCLs von Patienten mit dem *Nijmegen-breakage*-Syndrom untersucht. Adams et al. wiesen zu mehreren Zeitpunkten zwischen 10 Minuten und 12 Stunden nach Bestrahlung ATM-Foci sowie Unterschiede in der relativen Phosphorylierung von ATM in HeLa-Zellen nach [143]. Demuth et al. zeigten die ersten hSNM1B/Apollo-Akkumulationen an DNA-Schädigungsorten 10 Sekunden nach Schadensinduktion [105]. Nach 40 Sekunden wurde eine Akkumulationsspitze erreicht, während das Level von 1 bis 5 Minuten nach Bestrahlung konstant blieb. In einem alternativen Versuchsaufbau könnten also entsprechend mehrere Intervalle zwischen 10 Sekunden und den in der vorliegenden Arbeit verwendeten 15 Minuten Inkubationszeit gewählt werden, die die Zellen nach Bestrahlung auf dem Wärmeblock verbleiben,

bevor sie auf den Kälteblock überführt werden. Auf diese Weise könnten nicht nur möglicherweise unerkannte Unterschiede in den Phosphorylierungen nachgewiesen, sondern auch Zusammenhänge mit den beobachteten nukleären Akkumulationen aufgetan werden.

Vor dem Hintergrund, dass die frühe Apollo-Rekrutierung an IR-induzierten Schädigungsorten ATM-unabhängig geschieht, könnte es zudem interessant sein, eine Auswahl zusätzlicher Proteine der IR-Schadensantwort wie z.B. Chk1 aus dem ATR-*pathway* oder ATR selber in den vorgeschlagenen Versuchsaufbau einzubeziehen [105]. Bei diesem Ansatz sollten entsprechend der Annahme einer späteren Aktivierung von ATR durch ionisierende Strahlung auch längere Reparaturzeiten von bis zu 2 Stunden angesetzt werden [143].

4.1.5 Western Blot und Densitometrie

Für die vergleichende Untersuchung von phosphoryliertem und Gesamtprotein ist der Western Blot eine häufig herangezogene Methode. In der vorliegenden Arbeit wurde aus Gründen der Verfügbarkeit der Nachweis mittels Chemilumineszenz durchgeführt. Dieser Ansatz ist nicht zuletzt wegen der Vielzahl der empfindlichen Schritte, Techniken, Agenzien und der unter Umständen problematischen Detektion Gegenstand von Diskussionen. Häufig auftretende Probleme sind Unspezifitäten und die Frage, welche der detektierten Banden bei der Quantifizierung berücksichtigt werden. Eine gründliche Auswahl der verwendeten Antikörper im Vorhinein ist essentiell. Auch können die Detektion des Hintergrundsignals und die Auswahl der Expositionszeit kritisch sein. Letztere muss für die Auswertung durch die meisten Programme außerhalb des Sättigungsbereiches liegen. Da die Auswahl der für die Berechnung verwendeten Aufnahme jedoch über das optische Signal erfolgt, besteht stets die Gefahr, dass dieser Bereich mit dem menschlichen Auge nicht detektiert werden kann. Ergebnisse von höherer Bildqualität sowie größerer Exaktheit und Konsistenz werden für den Nachweis mittels Fluoreszenz beschrieben [144]. Ob diese Beobachtung auch für die vorliegende Fragestellung zutreffend ist, müsste im Einzelnen getestet werden. Die Schwierigkeiten der Methodik in der Verwendung eines semi-quantitativen Nachweises spiegeln sich in der statistischen Betrachtung der Reliabilität wider: mittels Spearman-Korrelation konnte lediglich ein schwacher bis moderater Zusammenhang zwischen den Ergebnissen aus den drei Wiederholungen gezeigt werden.

Für vergleichbare Nachweise im Western Blot sind äquivalente Proteinmengen notwendig. Als Parameter hierfür wurde in der präsentierten Arbeit die Lebendzellzahl verwendet. Die Methode ist leicht zu erlernen und somit zuverlässig, obgleich vom Durchführenden abhängig. Dennoch

können Faktoren wie beispielsweise eine ineffiziente Lyse nach der Zellzählung zu unterschiedlichen Proteinmengen führen. Um diese nachvollziehen zu können, wäre der quantitative Proteinnachweis, beispielsweise nach Bradford möglich. Im präsentierten Versuchsaufbau jedoch wurden alle ermittelten Phosphorylierungen zur internen Standardisierung auf das Gesamtprotein bezogen. Es wurden also ausschließlich Verhältnisse betrachtet und somit war eine Bestimmung absoluter Proteinmengen nicht notwendig.

Eine Alternative zum Western Blot könnte möglicherweise der Phosphoproteinnachweis mittels Massenspektrometrie (Phosphoproteomik) darstellen. Die Methode gestattet den gezielten quantitativen Nachweis einer großen Zahl an Proteinen sowie deren phosphorylierter Form. Jedoch beinhaltet sie aufwendige und sehr spezifische Schritte zur Vorbereitung der Probe, wie beispielsweise Isotopenmarkierung (SILAC; *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*), Stimulation sowie Isolierung und Anreicherung, beispielsweise durch Immunoprecipitation. Ob die Etablierung entsprechender Arbeitsmethoden und der damit zusammenhängende technische sowie zeitliche Aufwand im Verhältnis zum Informationsgewinn stünden, müsste für die spezielle Fragestellung untersucht werden, um zu eruieren ob die Phosphoproteomik eine geeignete Alternative zum Western Blot bieten könnte.

4.1.6 Telomerlängenbestimmung durch quantitative Polymerasekettenreaktion

Um die interindividuellen Unterschiede bezüglich der Telomerlänge im Zusammenhang mit den SNPs zu untersuchen, bieten sich verschiedenen Methoden, wie die *terminal restriction fragmentation* (TRF), die *single telomere length analysis* (STELA) oder die quantitative Polymerasekettenreaktion an [145,146]. Die TRF bietet den Vorteil einer Ermittlung absoluter Telomerlängen und damit der Vergleichbarkeit der erhobenen Daten mit Ergebnissen anderer Studien. Jedoch werden für die Durchführung DNA-Mengen $> 1 \mu\text{g}$ benötigt und die Ergebnisse können durch Polymorphismen an der Restriktionsschnittstelle oder in subtelomerischen Regionen verfälscht werden. Die STELA ist für die Bestimmung der Telomerlängen spezifischer Chromosomenuntergruppen geeignet, bietet sich jedoch nicht für die Bestimmung mittlerer Telomerlängen für größere Datensätze an. In der qPCR können aus DNA-Mengen im Nanogramm-Bereich relative Telomerlängen ermittelt und durch Verwendung eines *single-copy-gene* als Referenz interindividuelle Variationen der eingesetzten DNA-Mengen normalisiert werden. Cawthon et al. konnten zeigen, dass die qPCR eine einfache Methode darstellt, mit der zuverlässig Unterschiede in den Telomerlängen bestimmt werden können [132]. Mit dem Ziel, die Telomerlängen aus LCLs von 74 Probanden zu bestimmen und vor dem Hintergrund, dass

Daten von 1710 Probanden (Leukozyten) aus einer vorherigen Untersuchung zur Verfügung standen, die ebenfalls mittel qPCR ermittelt worden waren, wurde diese auch für die vorliegende Arbeit als adäquate Methode betrachtet.

4.1.7 Statistische Auswertung

Bei der Interpretation von Signifikanztests ist stets zu beachten, dass ein nicht signifikantes Ergebnis nicht als Zutreffen der Nullhypothese gewertet werden darf. Für die statistische Auswertung der präsentierten Ergebnisse wurden aufgrund der geringen Fallzahlen nicht-parametrische Tests herangezogen. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist insbesondere die geringe Stichprobengröße zu bedenken, da die Ergebnisse der verwendeten Signifikanztests abhängig von der Fallzahl sind. So könnten in einer größeren Stichprobe zuvor nicht signifikante Unterschiede signifikant werden. Zur Überprüfung dieser Zusammenhänge bezogen auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde aus den gewonnenen Daten eine Fallzahlplanung für eine prospektive Studie mit der Software *g*power* vorgenommen. Auf diese Weise konnte ermittelt werden welcher Stichprobenumfang notwendig wäre, damit Gruppenunterschiede signifikant nachgewiesen werden können. In den Proteinnachweisen wird die kleinste auftretende Effektstärke von 0,37 für den Nachweis von SMC1 und die Zuordnung zu den Genotypen des SNPs rs11552449 ermittelt. Um bei einer *power* von 80% und einem zweiseitigen Signifikanzniveau von 0,05 mit ANOVA (*fixed effects, omnibus, one-way*) zu erhalten, müsste eine Gruppengröße von insgesamt mindestens 117 Probanden verteilt auf die drei Gruppen (CC, CT, TT) bei den gegebenen Verteilungen des Genotyps rekrutiert werden. Eine Durchführung der Nachweise mittels Western Blot ist in diesem Rahmen ist nicht praktikabel. Um eine Untersuchung in diesem Umfang durchführen zu können, müsste eine andere Methode für den Proteinnachweis gewählt werden.

Die Effektstärke der Telomerlängenbestimmung wurde mit 0,48 berechnet. Unter Verwendung der gleichen statistischen Parameter (*power* 80%, zweiseitiges Signifikanzniveau $p = 0,05$) wurde mit *g*power* (ANOVA – *fixed effects, omnibus, one-way*) eine notwendige Gruppengröße von mindestens 72 Probanden berechnet.

Die statistische Analyse erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels Kruskal-Wallis-Test. Für die vorliegenden Gruppen konnte keine Normalverteilung bewiesen werden. Auch bei angepassten Gruppengrößen bleibt die Frage nach Normalverteilung für die Analyse mit ANOVA wichtig. Zudem müsste auf Varianzhomogenität bzw. gleich große Gruppen für die drei Genotypen

geachtet werden. Ob durch die Anpassung der Gruppengrößen und -aufteilungen auch bei Auswertung mit einem nicht-parametrischen Test signifikante Ergebnisse erzielt werden können, bleibt unklar. Voraussetzung für das Erzielen signifikanter Ergebnisse durch die Anpassung der Stichprobengröße an die errechnete Fallzahlabeschätzung wäre zudem die gleiche Verteilung der zusätzlichen Ereignisse wie die bereits ermittelten.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Phosphorylierungsstatus nach IR-Exposition im Bezug zum Genotyp

In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigten sich nach ionisierender Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede in den Phosphorylierungslevels der untersuchten Proteine (ATM, p53 und SMC1) über den Gruppen der Genotypen am SNP rs11552449 (CC, CT und TT). Ebenso konnte kein Zusammenhang mit dem Apollo-Expressionsniveau auf RNA-Ebene festgestellt werden.

4.2.1.1 Apollo in der Schadensantwort auf ionisierende Strahlung

Auf die Frage nach der Bedeutung Apollos für das Überleben nach IR-induzierter DNA-Schädigung sind in der Literatur konträre Antworten zu finden. So wurde eine erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung für humane Fibroblasten (GM00637) und HeLa-Zellen mit *Apollo-knockdown* von Demuth et al. beschrieben [102]. Diese erwiesen sich gegenüber ionisierender Strahlung in Dosen von 1 bis 6 Gy sensitiver als die Kontrolle. Bae et al. hingegen machten eine andere Beobachtung [101]: in *Apollo-knockdown* Zellen (HEK293T) konnte lediglich eine verstärkte Sensitivität gegenüber Mitomycin C gezeigt werden. Zellen mit shRNA-vermitteltem *Apollo-knockdown* zeigten keine erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung verglichen mit Zellen mit unspezifischer shRNA. Für die γ -Bestrahlung wurden hier Dosen von 2, 4 und 6 Gy verwendet. Zu dieser Beobachtung passen auch die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse.

4.2.1.2 p53, SMC1 und ATM in der Schadensantwort auf ionisierende Strahlung

In *Apollo*-depletierten HEK293T-Zellen konnte zudem eine Verminderung der ATM-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung gezeigt werden [105]. *Apollo*-depletierte GM00637-Zellen wiesen nach IR-Exposition ebenfalls eine verringerte Phosphorylierung von ATM sowie dessen Substraten p53, SMC1 und H2A.X auf.

Diese Zusammenhänge untermauern wiederum die Hypothese, dass die Funktion Apollos weit oben in der Schadensantwort auf ionisierende Strahlung von Bedeutung ist und sich bei Funktionseinschränkung auf genomischer Ebene Unterschiede in der Aktivierung von Proteinen der untersuchten Kaskade über deren Phosphorylierung zeigen lassen.

Eine verminderte Aktivierung von ATM und einem seiner *downstream* Zielproteine, Chk2, dagegen konnte in *Apollo-knockdown*-Zellen (HEK293T) lediglich nach MMC-Exposition beobachtet werden, nach IR dagegen war die Chk2-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle unverändert [101]. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse bestätigen diese Beobachtung hinsichtlich der ATM *downstream* Proteine und darüber hinaus für ATM selbst.

4.2.1.3 Funktionelle Bedeutung des SNPs rs11552449

In den genannten Versuchen aus der Literatur wurde stets der Einfluss gezielter *Apollo* Veränderung an verschiedenen Zelllinien beleuchtet. Über den Einfluss des SNP rs11552449 auf diese Kaskade ist dagegen wenig beschrieben. Zwar wurde ein Zusammenhang mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko von verschiedenen Arbeitsgruppen ermittelt, inwiefern sich der Genotyp jedoch auf die Interaktion mit ATM auswirkt, ist weitgehend unklar [123,124]. Auch durch Prädiktionsprogramme konnte dem SNP keine eindeutig krankheitsverursachende Rolle zugeordnet werden [122,125,126]. Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe (AG Demuth) weisen auf eine funktionelle Bedeutung für das Überleben nach Mutagen-Exposition hin [Herwest et al., unveröffentlichte Ergebnisse].

4.2.1.4 Phosphorylierungsstatus und Überleben

Auch über die Zusammenhänge von Phosphorylierungsstatus und Überleben muss kritisch nachgedacht werden. So machten beispielsweise Fumagalli et al. auf Aspekte der Phosphorylierung in Bezug auf die Seneszenz aufmerksam [147]: Die Annahme, dass seneszente Zellen die Fähigkeit einer adäquaten DNA-Schadensantwort progressiv verlieren würden konnte über den Nachweis relativer Phosphorylierungen von Proteinen der DDR widerlegt werden. Vielmehr beruhte sie auf der verminderten Phosphorylierungsrate aufgrund der progressiv abnehmenden Lebendzellzahl. Bei Betrachtung der einzelnen Zellen konnten auch Jahre nach Induktion der Seneszenz DDR-Foci nachgewiesen werden. Obgleich in der vorliegenden Arbeit keine seneszenten Zellen verwendet wurden, sollten derartige Überlegungen aufgrund der

oben genannten möglichen Schwierigkeiten bei der Immortalisierung nicht außer Acht gelassen werden.

Eine weitere Überlegung ist der Zusammenhang der Sensitivität der Zellen gegenüber der Noxe und dem Grad der Schadensantwort. Zellen, die einen höheren Phosphorylierungsgrad aufweisen, könnten einerseits über eine aktivere DNA-Schadensantwort verfügen, sodass ein höheres Phosphorylierungslevel einen Überlebensvorteil bietet. Andererseits könnte ein hoher Phosphorylierungsgrad auch für eine starke Schädigung sprechen, worauf eine entsprechend ausgeprägte Schadensantwort folgen muss. Dann wäre ein hoher Phosphorylierungsgrad vor allem bei besonders empfindliche Zellen zu beobachten, welche wiederum ein geringeres Überleben aufweisen könnten. Möglicherweise spielen aber auch beide Mechanismen eine Rolle. Überlebensexperimente von Herwest et al. deuten auf eine Bedeutung Apollos für das Überleben nach Behandlung mit verschiedenen Mutagenen hin. Die beschriebenen Modulationen im Versuchsaufbau wie beispielsweise eine größere Fallzahl wären auch hinsichtlich einer Zuordnung von Überleben und Phosphorylierungsgrad interessant [Herwest et al., unveröffentlichte Ergebnisse].

Schließlich sind auch andere Reparaturkaskaden zu bedenken, die infolge von DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung aktiviert werden. p53 beispielsweise ist in ein Netz verschiedener *pathways* eingebunden. Unter anderem wurde ATR eine Rolle in der p53-Aktivierung zugeschrieben, die eine verzögerte Phosphorylierung von p53 nach sich ziehen könnte [148]. So wäre denkbar, dass auch seine über den Apollo-SNP veränderte Phosphorylierung durch Aktivierung solcher alternativen Signalkaskaden kompensiert wird. Auch an dieser Stelle würden sich Techniken der Phosphoproteomik für die weitere Untersuchung dieser *pathways* anbieten. Auf diese Weise könnten in der Kaskade aktivierte Proteine identifiziert und Phosphorylierungsgrade für eine große Zahl an Proteinen *in vivo* verglichen werden.

4.2.2 Telomerlänge im Bezug zum Genotyp

In Zusammenschau der Ergebnisse und der statistischen Auswertung ließ sich auf keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Telomerlänge und dem SNP schließen: weder für Leukozyten, noch für lymphoblastoide Zelllinien ließen sich signifikante Telomerlängenunterschiede im Zusammenhang mit dem rs11552449-Genotyp feststellen.

4.2.2.1 Apollo und Telomerdefekte

Zusammenhänge von Apollo-Depletion und Defekten an den Telomeren konnten in vorausgegangenen Studien bereits gezeigt werden. So konnten van Overbeek und de Lange in mittels shRNA generierten IMR90-Apollo-*knockdown*-Zellen vermehrte DNA-Schadenssignale darstellen, von denen über die Hälfte an Telomeren lokalisiert war [103]. Lenain et al. machten ebenfalls die Beobachtung vermehrter *telomere dysfunctional induces foci* (TIFs) nach siRNA-vermittelter Verminderung der Apollo-Aktivität in HT1080-Zellen mit kompromittierter TRF2-Funktion [115]. Daneben wurden vermehrte Telomerfusionen und Wachstumsdefekte in Apollo-depletierten HT1080- und MEF-Zellen beschrieben [115,116]. In letzteren zeigten sich zudem Defekte in der Generierung des 3'-Überhangs [116]. Die Beobachtung doppelter Fluoreszenz-Signale (FISH) an den Telomerenenden, die während oder nach der Replikation in Apollo-depletierten IMR90-Zellen auftraten, werteten van Overbeek und de Lange als Ausdruck einer unvollständigen Telomerreplikation [103].

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse bestätigen nicht die Haupthypothese, dass der SNP rs11552449 nicht mit der Telomerfunktion korreliert. Diese Annahme wird insbesondere durch die Veränderungen in der Telomerfunktion des Hoyeraal-Hreidarsson-Patienten gestützt. In vorangegangenen Studien mit anderen Zelllinien konnten jedoch, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit, keine Unterschiede der Telomerlängen in Assoziation mit veränderter Apollo-Funktion festgestellt werden [115].

4.2.2.2 rs11552449 und der modulare Aufbau Apollos

Interessant sind diesbezüglich auch die Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen, die darauf hinweisen, dass sich die TRF2-Interaktionsdomäne Apollos C-terminal befindet [5]. Bei einem Patienten mit dem Hoyeraal-Hreidarsson-Syndrom beispielsweise wurde das Fehlen des C-terminalen Teils von Apollo beschrieben [119]. Tatsächlich konnten lediglich *Telomerdoublets* und End-zu-End-Fusionen der Telomere nachgewiesen werden, wohingegen sich keine Hypersensitivitäten gegenüber Mitomycin C und Cisplatin zeigten. Entsprechend ist vor allem eine Beteiligung des fehlenden Teils am Telomerschutz, nicht aber an der DNA-Schadensantwort zu vermuten. Ein ähnlicher Zusammenhang kann für den SNP rs11552449 angenommen werden. Die These des modularen Aufbaus Apollos wird auch durch Ergebnisse aus LCLs gestützt, in denen Unterschiede in der MMC-Sensitivität im Zusammenhang mit diesem SNP gezeigt werden konnten [Herwest et al., unveröffentlichte Ergebnisse]. Der Polymorphismus befindet sich an der

genomischen Position 181, kodiert also eher im N-terminalen Bereich des korrespondierenden Proteins. Der Basenaustausch C>T zieht einen Aminosäureaustausch von Histidin durch Tyrosin nach sich. Bei beiden handelt es sich um aromatische Aminosäuren. Während Tyrosin mit einem isoelektrischen Punkt von 5,64 im sauren Bereich liegt, besitzt Histidin eine basische Seitenkette, kann aber sowohl als Protonenakzeptor, als auch als Protonendonator fungieren. Die Ähnlichkeit dieser Eigenschaften könnte eine weitere mögliche Erklärung dafür sein, dass nicht alle Funktionen Apollos verändert sind und sich so zum Beispiel keine Unterschiede in den Telomerlängen der untersuchten Probanden-DNA im Zusammenhang mit dem Basenaustausch am SNP rs11552449 ermitteln ließen.

4.3 Abschließende Bemerkung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit werden Aspekte der Zusammenhänge des SNPs rs1152449 im *DCLRE1B*-Gen mit bestimmten Rollen Apollos hinsichtlich DNA-Schadensantwort und Telomerprotektion beleuchtet. Weiterhin wird die Etablierung einer Methode zur Untersuchung der Phosphorylierungsunterschiede in Proteinen der DNA-Schadensantwort auf ionisierende Strahlung evaluiert. Es drängen sich im Zuge dessen verschiedene Fragen auf, die in nachfolgenden Studien beantwortet werden können.

Hinsichtlich der Aktivierung der DNA-Reparaturkaskade im Zusammenhang mit dem SNP rs11552449 konnten mittels Western Blot und Densitometrie keine Genotyp-spezifischen Unterschiede ermittelt werden. In der statistischen Analyse der durchgeführten Wiederholungen zeigte sich die Methodik nicht eindeutig als reliabel für die gegebene Fragestellung. Eine alternative Methode könnte hier zum Beispiel die Massenspektrometrie bieten. In Anbetracht der dargelegten Funktion Apollos in der frühen Schadensantwort auf ionisierende Strahlung wären daneben weitere Variationen im Versuchsaufbau interessant. So könnte die Reparaturzeit nach Bestrahlung anstelle der Bestrahlungsdosis verändert werden, um Unterschiede in der Geschwindigkeit der Antwort je nach Genotyp zu demaskieren.

Auch hinsichtlich des Telomerschutzes könnte, neben der relativen Telomerlänge, die Untersuchung weiterer Aspekte bedeutsam sein. Vor dem Hintergrund, dass in vorausgegangenen Studien Zusammenhänge zwischen *Apollo-knockdown* und Defekten wie Telomerfusionen oder TIFs bereits beschrieben wurden, sollte auch das Auftreten dieser Parameter unter Berücksichtigung des Genotyps ergründet werden [115,103,114,116]. Im Hinblick auf die Telomerlänge wäre die Untersuchung im Rahmen einer Longitudinalstudie wie dem GendAge-

Projekt (*follow-up* der BASE-II-Studie) denkbar. Um die Vergleichbarkeit der erhobenen Daten zu gewährleisten und die in der BASE-II-Studie bereits gewonnenen Daten nutzen zu können, sollten für die Folgeuntersuchung entweder Leukozyten aus dem Vollblut gewonnen oder lymphoblastoide Zelllinien generiert werden. Zu bedenken sind dabei die diskutierten Vor- und Nachteile der Immortalisierung und die entsprechend unterschiedliche Aussagekraft der Ergebnisse aus den LCLs gegenüber denen aus dem Leukozytengemisch.

Durch eine ausreichende Datenlage wäre auch die Untersuchung weiterer Zusammenhänge möglich, wie beispielsweise die Rolle der Telomerlänge für die DNA-Schadensantwort. SO zeigten Drissi et al. zeigten, dass die durch Telomerverkürzung hervorgerufenen Veränderungen in der Chromatinstruktur die Interaktion von ATM mit dem Chromatin erschweren [149]. Die folglich verminderte DNA-Reparaturfähigkeit wird als Erklärungsmodell für die Beobachtung einer erhöhten Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung bei Zellen mit geringerer Telomerlänge vorgeschlagen.

Die Erkenntnisse um die genauere Funktion Apollos sind nicht ausschließlich von wissenschaftlichem Interesse. Analog zu den strukturell ähnlichen, bereits verfügbaren MBL-Inhibitoren ist ein Einsatz spezifischer Apollo-Inhibitoren als *sensitizer* für Krebstherapeutika denkbar [5]. Diese könnten über gezielte Hemmung der DNA-Reparatur den Angriff des eigentlichen Medikaments erleichtern. Welche Rolle der Einsatz ionisierender Strahlung dabei spielen kann, muss durch weitere Forschungen eruiert werden. Unter Berücksichtigung des postulierten modularen Aufbaus von hSNM1B/Apollo könnten daneben SNPs auf die vermuteten korrespondierenden Funktionen in der DNA-Schadensantwort und im Telomerschutz hin untersucht werden. Für zahlreiche Erkrankungen dienen bereits bekannte SNPs als wertvolle diagnostische Marker. Vor dem Hintergrund der für Apollo beschriebenen Funktion und mit dem Wissen um die bekannten Assoziationen von Polymorphismen im *DCLRE1B*-Gen könnte die Identifikation weiterer SNPs ebenfalls von diagnostischer Relevanz sein.

Im komplexen Netz dieser bereits verstandenen und noch zu ergründenden Zusammenhänge tragen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse als ein wichtiger Baustein zum Verständnis bei und können als Grundlage für fortführende Studien dienen.

Literaturverzeichnis

1. Delia, D.; Mizutani, S. The DNA damage response pathway in normal hematopoiesis and malignancies. *Int. J. Hematol.* **2017**, doi:10.1007/s12185-017-2300-7.
2. Helleday, T.; Eshtad, S.; Nik-Zainal, S. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 585–598, doi:10.1038/nrg3729.
3. Sage, E.; Shikazono, N. Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *107*, 125–135, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.008.
4. Bernstein, C.; Prasad, A. R.; Nfonsam, V.; Bernstein, H. DNA Damage, DNA Repair and Cancer. **2013**, doi:10.5772/53919.
5. Schmiester, M.; Demuth, I. SNM1B/Apollo in the DNA damage response and telomere maintenance. *Oncotarget* **2017**, doi:10.18632/oncotarget.16864.
6. Muniandy, P.; Liu, J.; Majumdar, A.; Liu, S.; Seidman, M. M. DNA INTERSTRAND CROSSLINK REPAIR IN MAMMALIAN CELLS: STEP BY STEP. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *45*, 23–49, doi:10.3109/10409230903501819.
7. Friedberg, E. C.; McDaniel, L. D.; Schultz, R. A. The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2004**, *14*, 5–10, doi:10.1016/j.gde.2003.11.001.
8. Hoeijmakers, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 1475–1485, doi:10.1056/NEJMra0804615.
9. Choi, J. D.; Lee, J.-S. Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. *Genomics Inform.* **2013**, *11*, 164–173, doi:10.5808/GI.2013.11.4.164.
10. Dronkert, M. L.; Kanaar, R. Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat. Res.* **2001**, *486*, 217–247.
11. Mitchell, J. R.; Hoeijmakers, J. H.; Niedernhofer, L. J. Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 232–240, doi:10.1016/S0955-0674(03)00018-8.
12. Lindahl, T. An N-Glycosidase from *Escherichia coli* That Releases Free Uracil from DNA Containing Deaminated Cytosine Residues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1974**, *71*, 3649–3653.
13. Krokan, H. E.; Bjørås, M. Base Excision Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012583, doi:10.1101/cshperspect.a012583.
14. MARINUS, M. G. DNA Mismatch Repair. *EcoSal Plus* **2012**, *5*, doi:10.1128/ecosalplus.7.2.5.

15. Kass, E. M.; Jasin, M. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 3703–3708, doi:10.1016/j.febslet.2010.07.057.
16. Karanam, K.; Kafri, R.; Loewer, A.; Lahav, G. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Mol. Cell* **2012**, *47*, 320–329, doi:10.1016/j.molcel.2012.05.052.
17. Haber, J. E. DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 271–275.
18. Rupp, W. D.; Howard-Flanders, P. Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation. *J. Mol. Biol.* **1968**, *31*, 291–304.
19. Goodman, M. F.; Woodgate, R. Translesion DNA Polymerases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, doi:10.1101/cshperspect.a010363.
20. Shachar, S.; Ziv, O.; Avkin, S.; Adar, S.; Wittschieben, J.; Reißner, T.; Chaney, S.; Friedberg, E. C.; Wang, Z.; Carell, T.; Geacintov, N.; Livneh, Z. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *EMBO J.* **2009**, *28*, 383–393, doi:10.1038/emboj.2008.281.
21. Clauson, C.; Schärer, O. D.; Niedernhofer, L. Advances in understanding the complex mechanisms of DNA interstrand cross-link repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012732, doi:10.1101/cshperspect.a012732.
22. Hanada, K.; Budzowska, M.; Modesti, M.; Maas, A.; Wyman, C.; Essers, J.; Kanaar, R. The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strand breaks. *EMBO J.* **2006**, *25*, 4921–4932, doi:10.1038/sj.emboj.7601344.
23. Blackford, A. N.; Jackson, S. P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* **2017**, *66*, 801–817, doi:10.1016/j.molcel.2017.05.015.
24. Kitagawa, R.; Bakkenist, C. J.; McKinnon, P. J.; Kastan, M. B. Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM–NBS1–BRCA1 pathway. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 1423–1438, doi:10.1101/gad.1200304.
25. Banin, S.; Moyal, L.; Shieh, S.; Taya, Y.; Anderson, C. W.; Chessa, L.; Smorodinsky, N. I.; Prives, C.; Reiss, Y.; Shiloh, Y.; Ziv, Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **1998**, *281*, 1674–1677.

26. Rogakou, E. P.; Pilch, D. R.; Orr, A. H.; Ivanova, V. S.; Bonner, W. M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5858–5868.
27. Bakkenist, C. J.; Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **2003**, *421*, 499–506, doi:10.1038/nature01368.
28. Dupré, A.; Boyer-Chatenet, L.; Gautier, J. Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 451–457, doi:10.1038/nsmb1090.
29. Canman, C. E.; Lim, D. S.; Cimprich, K. A.; Taya, Y.; Tamai, K.; Sakaguchi, K.; Appella, E.; Kastan, M. B.; Siliciano, J. D. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* **1998**, *281*, 1677–1679.
30. Beucher, A.; Birraux, J.; Tchouandong, L.; Barton, O.; Shibata, A.; Conrad, S.; Goodarzi, A. A.; Krempler, A.; Jeggo, P. A.; Löbrich, M. ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.* **2009**, *28*, 3413–3427, doi:10.1038/emboj.2009.276.
31. Shiloh, Y.; Ziv, Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 197–210, doi:10.1038/nrm3546.
32. Jiang, W.; Crowe, J. L.; Liu, X.; Nakajima, S.; Wang, Y.; Li, C.; Lee, B. J.; Dubois, R. L.; Liu, C.; Yu, X.; Lan, L.; Zha, S. Differential phosphorylation of DNA-PKcs regulates the interplay between end-processing and end-ligation during nonhomologous end-joining. *Mol. Cell* **2015**, *58*, 172–185, doi:10.1016/j.molcel.2015.02.024.
33. Caron, P.; Choudjaye, J.; Clouaire, T.; Bugler, B.; Daburon, V.; Aguirrebengoa, M.; Mangeat, T.; Iacovoni, J. S.; Álvarez-Quilón, A.; Cortés-Ledesma, F.; Legube, G. Non-redundant Functions of ATM and DNA-PKcs in Response to DNA Double-Strand Breaks. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 1598–1609, doi:10.1016/j.celrep.2015.10.024.
34. Zou, L.; Elledge, S. J. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **2003**, *300*, 1542–1548, doi:10.1126/science.1083430.
35. Kumagai, A.; Lee, J.; Yoo, H. Y.; Dunphy, W. G. TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* **2006**, *124*, 943–955, doi:10.1016/j.cell.2005.12.041.
36. Haahr, P.; Hoffmann, S.; Tollenaere, M. A. X.; Ho, T.; Toledo, L. I.; Mann, M.; Bekker-Jensen, S.; Räschle, M.; Mailand, N. Activation of the ATR kinase by the RPA-binding protein ETAA1. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 1196–1207, doi:10.1038/ncb3422.

37. Chen, Y.-H.; Jones, M. J. K.; Yin, Y.; Crist, S. B.; Colnaghi, L.; Sims, R. J.; Rothenberg, E.; Jallepalli, P. V.; Huang, T. T. ATR-mediated phosphorylation of FANCI regulates dormant origin firing in response to replication stress. *Mol. Cell* **2015**, *58*, 323–338, doi:10.1016/j.molcel.2015.02.031.
38. Walworth, N.; Davey, S.; Beach, D. Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature* **1993**, *363*, 368–371, doi:10.1038/363368a0.
39. Matsuoka, S.; Ballif, B. A.; Smogorzewska, A.; McDonald, E. R.; Hurov, K. E.; Luo, J.; Bakalarski, C. E.; Zhao, Z.; Solimini, N.; Lerenthal, Y.; Shiloh, Y.; Gygi, S. P.; Elledge, S. J. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **2007**, *316*, 1160–1166, doi:10.1126/science.1140321.
40. Couch, F. B.; Bansbach, C. E.; Driscoll, R.; Luzwick, J. W.; Glick, G. G.; Bétous, R.; Carroll, C. M.; Jung, S. Y.; Qin, J.; Cimprich, K. A.; Cortez, D. ATR phosphorylates SMARCAL1 to prevent replication fork collapse. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 1610–1623, doi:10.1101/gad.214080.113.
41. Ceccaldi, R.; Sarangi, P.; D’Andrea, A. D. The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 337–349, doi:10.1038/nrm.2016.48.
42. Chan, D. W.; Mody, C. H.; Ting, N. S.; Lees-Miller, S. P. Purification and characterization of the double-stranded DNA-activated protein kinase, DNA-PK, from human placenta. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* **1996**, *74*, 67–73.
43. Uematsu, N.; Weterings, E.; Yano, K.; Morotomi-Yano, K.; Jakob, B.; Taucher-Scholz, G.; Mari, P.-O.; van Gent, D. C.; Chen, B. P. C.; Chen, D. J. Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* **2007**, *177*, 219–229, doi:10.1083/jcb.200608077.
44. De Bont, R.; van Larebeke, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* **2004**, *19*, 169–185.
45. Knoch, J.; Kamenisch, Y.; Kubisch, C.; Berneburg, M. Rare hereditary diseases with defects in DNA-repair. *Eur. J. Dermatol. EJD* **2012**, *22*, 443–455, doi:10.1684/ejd.2012.1654.
46. McKinnon, P. J. ATM and the molecular pathogenesis of ataxia telangiectasia. *Annu. Rev. Pathol.* **2012**, *7*, 303–321, doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132509.
47. Nissenkorn, A.; Ben-Zeev, B. Ataxia telangiectasia. *Handb. Clin. Neurol.* **2015**, *132*, 199–214, doi:10.1016/B978-0-444-62702-5.00014-7.
48. Yang, Y.-G.; Herceg, Z.; Nakanishi, K.; Demuth, I.; Piccoli, C.; Michelon, J.; Hildebrand, G.; Jasin, M.; Digweed, M.; Wang, Z.-Q. The Fanconi anemia group A protein modulates

- homologous repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Carcinogenesis* **2005**, *26*, 1731–1740, doi:10.1093/carcin/bgi134.
49. Mamrak, N. E.; Shimamura, A.; Howlett, N. G. Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia. *Blood Rev.* **2017**, *31*, 93–99, doi:10.1016/j.blre.2016.10.002.
50. Maher, R. L.; Branagan, A. M.; Morrical, S. W. Coordination of DNA Replication and Recombination Activities in the Maintenance of Genome Stability. *J. Cell. Biochem.* **2011**, *112*, 2672–2682, doi:10.1002/jcb.23211.
51. Weinert, T.; Hartwell, L. Control of G2 delay by the rad9 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci. Suppl.* **1989**, *12*, 145–148.
52. Suryadinata, R.; Sadowski, M.; Sarcevic, B. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Biosci. Rep.* **2010**, *30*, 243–255, doi:10.1042/BSR20090171.
53. Larochelle, S.; Merrick, K. A.; Terret, M.-E.; Wohlbold, L.; Barboza, N. M.; Zhang, C.; Shokat, K. M.; Jallepalli, P. V.; Fisher, R. P. Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells. *Mol. Cell* **2007**, *25*, 839–850, doi:10.1016/j.molcel.2007.02.003.
54. Matsuoka, S.; Huang, M.; Elledge, S. J. Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase. *Science* **1998**, *282*, 1893–1897, doi:10.1126/science.282.5395.1893.
55. Patil, M.; Pabla, N.; Dong, Z. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2013**, *70*, 4009–4021, doi:10.1007/s00018-013-1307-3.
56. Mailand, N.; Falck, J.; Lukas, C.; Syljuâsen, R. G.; Welcker, M.; Bartek, J.; Lukas, J. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* **2000**, *288*, 1425–1429.
57. Gatei, M.; Sloper, K.; Sorensen, C.; Syljuâsen, R.; Falck, J.; Hobson, K.; Savage, K.; Lukas, J.; Zhou, B.-B.; Bartek, J.; Khanna, K. K. Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 14806–14811, doi:10.1074/jbc.M210862200.
58. Saha, A.; Lu, J.; Morizur, L.; Upadhyay, S. K.; Aj, M. P.; Robertson, E. S. E2F1 mediated apoptosis induced by the DNA damage response is blocked by EBV nuclear antigen 3C in lymphoblastoid cells. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002573, doi:10.1371/journal.ppat.1002573.
59. Zannini, L.; Delia, D.; Buscemi, G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J. Mol. Cell Biol.* **2014**, *6*, 442–457, doi:10.1093/jmcb/mju045.

60. Falck, J.; Mailand, N.; Syljuåsen, R. G.; Bartek, J.; Lukas, J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* **2001**, *410*, 842–847, doi:10.1038/35071124.
61. Narasimha, A. M.; Kaulich, M.; Shapiro, G. S.; Choi, Y. J.; Sicinski, P.; Dowdy, S. F. Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *eLife* **2014**, *3*, doi:10.7554/eLife.02872.
62. Petersen, B. O.; Lukas, J.; Sørensen, C. S.; Bartek, J.; Helin, K. Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J.* **1999**, *18*, 396–410, doi:10.1093/emboj/18.2.396.
63. Hayflick, L.; Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **1961**, *25*, 585–621.
64. Kerr, J. F. R.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* **1972**, *26*, 239–257.
65. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **2000**, *407*, 770–776, doi:10.1038/35037710.
66. Cain, K.; Brown, D. G.; Langlais, C.; Cohen, G. M. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 22686–22692.
67. Zhou, M.; Li, Y.; Hu, Q.; Bai, X.; Huang, W.; Yan, C.; Scheres, S. H. W.; Shi, Y. Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1. *Genes Dev.* **2015**, *29*, 2349–2361, doi:10.1101/gad.272278.115.
68. Thornberry, N. A.; Rano, T. A.; Peterson, E. P.; Rasper, D. M.; Timkey, T.; Garcia-Calvo, M.; Houtzager, V. M.; Nordstrom, P. A.; Roy, S.; Vaillancourt, J. P.; Chapman, K. T.; Nicholson, D. W. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 17907–17911.
69. Rich, T.; Allen, R. L.; Wyllie, A. H. Defying death after DNA damage. *Nature* **2000**, *407*, 777–783, doi:10.1038/35037717.
70. Shieh, S. Y.; Ikeda, M.; Taya, Y.; Prives, C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **1997**, *91*, 325–334.
71. Jack, M. T.; Woo, R. A.; Hirao, A.; Cheung, A.; Mak, T. W.; Lee, P. W. K. Chk2 is dispensable for p53-mediated G1 arrest but is required for a latent p53-mediated apoptotic response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 9825–9829, doi:10.1073/pnas.152053599.

72. Donner, A. J.; Hoover, J. M.; Szostek, S. A.; Espinosa, J. M. Stimulus-specific transcriptional regulation within the p53 network. *Cell Cycle Georget. Tex* **2007**, *6*, 2594–2598, doi:10.4161/cc.6.21.4893.
73. Olovnikov, A. M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* **1973**, *41*, 181–190.
74. Blackburn, E. H. Structure and function of telomeres. *Nature* **1991**, *350*, 569–573, doi:10.1038/350569a0.
75. Moyzis, R. K.; Buckingham, J. M.; Cram, L. S.; Dani, M.; Deaven, L. L.; Jones, M. D.; Meyne, J.; Ratliff, R. L.; Wu, J. R. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 6622–6626.
76. Makarov, V. L.; Hirose, Y.; Langmore, J. P. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* **1997**, *88*, 657–666.
77. Palm, W.; de Lange, T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.* **2008**, *42*, 301–334, doi:10.1146/annurev.genet.41.110306.130350.
78. Sfeir, A. J.; Chai, W.; Shay, J. W.; Wright, W. E. Telomere-end processing the terminal nucleotides of human chromosomes. *Mol. Cell* **2005**, *18*, 131–138, doi:10.1016/j.molcel.2005.02.035.
79. Griffith, J. D.; Comeau, L.; Rosenfield, S.; Stansel, R. M.; Bianchi, A.; Moss, H.; de Lange, T. Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell* **1999**, *97*, 503–514, doi:10.1016/S0092-8674(00)80760-6.
80. Wu, L.; Multani, A. S.; He, H.; Cosme-Blanco, W.; Deng, Y.; Deng, J. M.; Bachilo, O.; Pathak, S.; Tahara, H.; Bailey, S. M.; Deng, Y.; Behringer, R. R.; Chang, S. Pot1 Deficiency Initiates DNA Damage Checkpoint Activation and Aberrant Homologous Recombination at Telomeres. *Cell* **2006**, *126*, 49–62, doi:10.1016/j.cell.2006.05.037.
81. Vaziri, H.; Dragowska, W.; Allsopp, R. C.; Thomas, T. E.; Harley, C. B.; Lansdorp, P. M. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 9857–9860.
82. Benetos, A.; Gardner, J. P.; Zureik, M.; Labat, C.; Xiaobin, L.; Adamopoulos, C.; Temmar, M.; Bean, K. E.; Thomas, F.; Aviv, A. Short telomeres are associated with increased carotid

- atherosclerosis in hypertensive subjects. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **2004**, *43*, 182–185, doi:10.1161/01.HYP.0000113081.42868.f4.
83. Saßenroth, D.; Meyer, A.; Salewsky, B.; Kroh, M.; Norman, K.; Steinhagen-Thiessen, E.; Demuth, I. Sports and Exercise at Different Ages and Leukocyte Telomere Length in Later Life--Data from the Berlin Aging Study II (BASE-II). *PloS One* **2015**, *10*, e0142131, doi:10.1371/journal.pone.0142131.
84. Meyer, A.; Salewsky, B.; Spira, D.; Steinhagen-Thiessen, E.; Norman, K.; Demuth, I. Leukocyte telomere length is related to appendicular lean mass: cross-sectional data from the Berlin Aging Study II (BASE-II). *Am. J. Clin. Nutr.* **2016**, *103*, 178–183, doi:10.3945/ajcn.115.116806.
85. Greider, C. W.; Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **1985**, *43*, 405–413.
86. Cooke, H. J.; Smith, B. A. Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1986**, *51 Pt 1*, 213–219.
87. Morin, G. B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **1989**, *59*, 521–529.
88. Hedrick, P. W. *Genetics of Populations*; Jones & Bartlett Learning, 2011; ISBN 978-0-7637-5737-3.
89. Sachidanandam, R.; Weissman, D.; Schmidt, S. C.; Kakol, J. M.; Stein, L. D.; Marth, G.; Sherry, S.; Mullikin, J. C.; Mortimore, B. J.; Willey, D. L.; Hunt, S. E.; Cole, C. G.; Coggill, P. C.; Rice, C. M.; Ning, Z.; Rogers, J.; Bentley, D. R.; Kwok, P. Y.; Mardis, E. R.; Yeh, R. T.; Schultz, B.; Cook, L.; Davenport, R.; Dante, M.; Fulton, L.; Hillier, L.; Waterston, R. H.; McPherson, J. D.; Gilman, B.; Schaffner, S.; Van Etten, W. J.; Reich, D.; Higgins, J.; Daly, M. J.; Blumenstiel, B.; Baldwin, J.; Stange-Thomann, N.; Zody, M. C.; Linton, L.; Lander, E. S.; Altshuler, D.; International SNP Map Working Group A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* **2001**, *409*, 928–933, doi:10.1038/35057149.
90. Wang, B.; Zhang, L.; Qiu, F.; Fang, W.; Deng, J.; Zhou, Y.; Lu, J.; Yang, L. A Newfound association between MDC1 functional polymorphism and lung cancer risk in Chinese. *PloS One* **2014**, *9*, e106794, doi:10.1371/journal.pone.0106794.
91. Henriques, J. A. P.; Moustacchi, E. Isolation and Characterization of pso Mutants Sensitive to Photo-Addition of Psoralen Derivatives in SACCHAROMYCES CEREVISIAE. *Genetics* **1980**, *95*, 273–288.

92. Cassier-Chauvat, C.; Moustacchi, E. Allelism between *pso1-1* and *rev3-1* mutants and between *pso2-1* and *snm1* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **1988**, *13*, 37–40.
93. Brendel, M.; Bonatto, D.; Strauss, M.; Revers, L. F.; Pungartnik, C.; Saffi, J.; Henriques, J. A. P. Role of PSO genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **544**, 179–193.
94. Brendel, M.; Henriques, J. A. The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. *Mutat. Res.* **2001**, *489*, 79–96.
95. Munari, F. M.; Guecheva, T. N.; Bonatto, D.; Henriques, J. A. P. New features on Pso2 protein family in DNA interstrand cross-link repair and in the maintenance of genomic integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet. Biol. FG B* **2013**, *60*, 122–132, doi:10.1016/j.fgb.2013.09.003.
96. Wang, A. T.; Sengerová, B.; Cattell, E.; Inagawa, T.; Hartley, J. M.; Kiakos, K.; Burgess-Brown, N. A.; Swift, L. P.; Enzlin, J. H.; Schofield, C. J.; Gileadi, O.; Hartley, J. A.; McHugh, P. J. Human SNM1A and XPF-ERCC1 collaborate to initiate DNA interstrand cross-link repair. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 1859–1870, doi:10.1101/gad.15699211.
97. Akhter, S.; Legerski, R. J. SNM1A acts downstream of ATM to promote the G1 cell cycle checkpoint. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *377*, 236–241, doi:10.1016/j.bbrc.2008.09.130.
98. Ma, Y.; Pannicke, U.; Schwarz, K.; Lieber, M. R. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **2002**, *108*, 781–794.
99. Zhang, X.; Zhu, Y.; Geng, L.; Wang, H.; Legerski, R. J. Artemis is a negative regulator of p53 in response to oxidative stress. *Oncogene* **2009**, *28*, 2196–2204, doi:10.1038/onc.2009.100.
100. Riballo, E.; Kühne, M.; Rief, N.; Doherty, A.; Smith, G. C. M.; Recio, M.-J.; Reis, C.; Dahm, K.; Fricke, A.; Krempler, A.; Parker, A. R.; Jackson, S. P.; Gennery, A.; Jeggo, P. A.; Löbrich, M. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol. Cell* **2004**, *16*, 715–724, doi:10.1016/j.molcel.2004.10.029.
101. Bae, J.-B.; Mukhopadhyay, S. S.; Liu, L.; Zhang, N.; Tan, J.; Akhter, S.; Liu, X.; Shen, X.; Li, L.; Legerski, R. J. Snm1B/Apollo Mediates Replication Fork Collapse and S Phase

- Checkpoint Activation in Response to DNA Interstrand Cross-Links. *Oncogene* **2008**, *27*, 5045–5056, doi:10.1038/onc.2008.139.
102. 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*, 8611–8618, doi:10.1038/sj.onc.1207895.
103. van Overbeek, M.; de Lange, T. Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase. *Curr. Biol. CB* **2006**, *16*, 1295–1302, doi:10.1016/j.cub.2006.05.022.
104. Liu, L.; Akhter, S.; Bae, J.-B.; Mukhopadhyay, S. S.; Richie, C. T.; Liu, X.; Legerski, R. SNM1B/Apollo interacts with astrin and is required for the prophase cell cycle checkpoint. *Cell Cycle Georget. Tex* **2009**, *8*, 628–638, doi:10.4161/cc.8.4.7791.
105. Demuth, I.; Bradshaw, P. S.; Lindner, A.; Anders, M.; Heinrich, S.; Kallenbach, J.; Schmelz, K.; Digweed, M.; Meyn, M. S.; Concannon, P. Endogenous hSNM1B/Apollo interacts with TRF2 and stimulates ATM in response to ionizing radiation. *DNA Repair* **2008**, *7*, 1192–1201, doi:10.1016/j.dnarep.2008.03.020.
106. Anders, M.; Mattow, J.; Digweed, M.; Demuth, I. Evidence for hSNM1B/Apollo functioning in the HSP70 mediated DNA damage response. *Cell Cycle Georget. Tex* **2009**, *8*, 1725–1732, doi:10.4161/cc.8.11.8605.
107. Akkari, Y. M. N.; Bateman, R. L.; Reifsteck, C. A.; D'Andrea, A. D.; Olson, S. B.; Grompe, M. The 4N Cell Cycle Delay in Fanconi Anemia Reflects Growth Arrest in Late S Phase. *Mol. Genet. Metab.* **2001**, *74*, 403–412, doi:10.1006/mgme.2001.3259.
108. Mason, J. M.; Das, I.; Arlt, M.; Patel, N.; Kraftson, S.; Glover, T. W.; Sekiguchi, J. M. The SNM1B/APOLLO DNA nuclease functions in resolution of replication stress and maintenance of common fragile site stability. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 4901–4913, doi:10.1093/hmg/ddt340.
109. Stringer, J. R.; Counter, C. M. Snm1B interacts with PSF2. *PloS One* **2012**, *7*, e49626, doi:10.1371/journal.pone.0049626.
110. Tumini, E.; Plevani, P.; Muzi-Falconi, M.; Marini, F. Physical and functional crosstalk between Fanconi anemia core components and the GINS replication complex. *DNA Repair* **2011**, *10*, 149–158, doi:10.1016/j.dnarep.2010.10.006.
111. Ishiai, M.; Kimura, M.; Namikoshi, K.; Yamazoe, M.; Yamamoto, K.; Arakawa, H.; Agematsu, K.; Matsushita, N.; Takeda, S.; Buerstedde, J.-M.; Takata, M. DNA cross-link

- repair protein SNM1A interacts with PIAS1 in nuclear focus formation. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 10733–10741, doi:10.1128/MCB.24.24.10733-10741.2004.
112. Jiang, Y.; Chen, H.-C.; Su, X.; Thompson, P. A.; Liu, X.; Do, K.-A.; Wierda, W.; Keating, M. J.; Plunkett, W. ATM function and its relationship with ATM gene mutations in chronic lymphocytic leukemia with the recurrent deletion (11q22.3-23.2). *Blood Cancer J.* **2016**, *6*, e465, doi:10.1038/bcj.2016.69.
113. Freibaum, B. D.; Counter, C. M. hSnm1B is a novel telomere-associated protein. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 15033–15036, doi:10.1074/jbc.C600038200.
114. Ye, J.; Lenain, C.; Bauwens, S.; Rizzo, A.; Saint-Léger, A.; Poulet, A.; Benarroch, D.; Magdinier, F.; Morere, J.; Amiard, S.; Verhoeven, E.; Britton, S.; Calsou, P.; Salles, B.; Bizard, A.; Nadal, M.; Salvati, E.; Sabatier, L.; Wu, Y.; Biroccio, A.; Londoño-Vallejo, A.; Giraud-Panis, M.-J.; Gilson, E. TRF2 and apollo cooperate with topoisomerase 2alpha to protect human telomeres from replicative damage. *Cell* **2010**, *142*, 230–242, doi:10.1016/j.cell.2010.05.032.
115. Lenain, C.; Bauwens, S.; Amiard, S.; Brunori, M.; Giraud-Panis, M.-J.; Gilson, E. The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair. *Curr. Biol. CB* **2006**, *16*, 1303–1310, doi:10.1016/j.cub.2006.05.021.
116. Lam, Y. C.; Akhter, S.; Gu, P.; Ye, J.; Poulet, A.; Giraud-Panis, M.-J.; Bailey, S. M.; Gilson, E.; Legerski, R. J.; Chang, S. SNMIB/Apollo protects leading-strand telomeres against NHEJ-mediated repair. *EMBO J.* **2010**, *29*, 2230–2241, doi:10.1038/emboj.2010.58.
117. Wu, P.; Takai, H.; de Lange, T. Telomeric 3' overhangs derive from resection by Exo1 and Apollo and fill-in by POT1b-associated CST. *Cell* **2012**, *150*, 39–52, doi:10.1016/j.cell.2012.05.026.
118. Akhter, S.; Lam, Y. C.; Chang, S.; Legerski, R. J. The telomeric protein SNM1B/Apollo is required for normal cell proliferation and embryonic development. *Aging Cell* **2010**, *9*, 1047–1056, doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00631.x.
119. Touzot, F.; Callebaut, I.; Soulier, J.; Gaillard, L.; Azerrad, C.; Durandy, A.; Fischer, A.; de Villartay, J.-P.; Revy, P. Function of Apollo (SNM1B) at telomere highlighted by a splice variant identified in a patient with Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 10097–10102, doi:10.1073/pnas.0914918107.
120. Liang, X.; Pfeiffer, R. M.; Wheeler, W.; Maeder, D.; Burdette, L.; Yeager, M.; Chanock, S.; Tucker, M. A.; Goldstein, A. M.; Yang, X. R. Genetic variants in DNA repair genes and the risk of cutaneous malignant melanoma in melanoma-prone families with/without

CDKN2A mutations. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **2012**, *130*, 2062–2066,
doi:10.1002/ijc.26231.

121. Karami, S.; Han, Y.; Pande, M.; Cheng, I.; Rudd, J.; Pierce, B. L.; Nutter, E. L.; Schumacher, F. R.; Kote-Jarai, Z.; Lindstrom, S.; Witte, J. S.; Fang, S.; Han, J.; Kraft, P.; Hunter, D. J.; Song, F.; Hung, R. J.; McKay, J.; Gruber, S. B.; Chanock, S. J.; Risch, A.; Shen, H.; Haiman, C. A.; Boardman, L.; Ulrich, C. M.; Casey, G.; Peters, U.; Amin Al Olama, A.; Berchuck, A.; Berndt, S. I.; Bezieau, S.; Brennan, P.; Brenner, H.; Brinton, L.; Caporaso, N.; Chan, A. T.; Chang-Claude, J.; Christiani, D. C.; Cunningham, J. M.; Easton, D.; Eeles, R. A.; Eisen, T.; Gala, M.; Gallinger, S. J.; Gayther, S. A.; Goode, E. L.; Grönberg, H.; Henderson, B. E.; Houlston, R.; Joshi, A. D.; Küry, S.; Landi, M. T.; Le Marchand, L.; Muir, K.; Newcomb, P. A.; Permut-Wey, J.; Pharoah, P.; Phelan, C.; Potter, J. D.; Ramus, S. J.; Risch, H.; Schildkraut, J.; Slattery, M. L.; Song, H.; Wentzensen, N.; White, E.; Wiklund, F.; Zanke, B. W.; Sellers, T. A.; Zheng, W.; Chatterjee, N.; Amos, C. I.; Doherty, J. A.; GECCO and the GAME-ON Network: CORECT, DRIVE, ELLIPSE, FOCI, and TRICL Telomere structure and maintenance gene variants and risk of five cancer types. *Int. J. Cancer* **2016**, *139*, 2655–2670, doi:10.1002/ijc.30288.
122. ExAC Browser Available online: <http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000118655> (accessed on Sep 14, 2017).
123. Michailidou, K.; Hall, P.; Gonzalez-Neira, A.; Ghoussaini, M.; Dennis, J.; Milne, R. L.; Schmidt, M. K.; Chang-Claude, J.; Bojesen, S. E.; Bolla, M. K.; Wang, Q.; Dicks, E.; Lee, A.; Turnbull, C.; Rahman, N.; Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Collaboration; Fletcher, O.; Peto, J.; Gibson, L.; Dos Santos Silva, I.; Nevanlinna, H.; Muranen, T. A.; Aittomäki, K.; Blomqvist, C.; Czene, K.; Irwanto, A.; Liu, J.; Waisfisz, Q.; Meijers-Heijboer, H.; Adank, M.; Hereditary Breast and Ovarian Cancer Research Group Netherlands (HEBON); van der Luijt, R. B.; Hein, R.; Dahmen, N.; Beckman, L.; Meindl, A.; Schmutzler, R. K.; Müller-Myhsok, B.; Lichtner, P.; Hopper, J. L.; Southey, M. C.; Makalic, E.; Schmidt, D. F.; Uitterlinden, A. G.; Hofman, A.; Hunter, D. J.; Chanock, S. J.; Vincent, D.; Bacot, F.; Tessier, D. C.; Canisius, S.; Wessels, L. F. A.; Haiman, C. A.; Shah, M.; Luben, R.; Brown, J.; Luccarini, C.; Schoof, N.; Humphreys, K.; Li, J.; Nordestgaard, B. G.; Nielsen, S. F.; Flyger, H.; Couch, F. J.; Wang, X.; Vachon, C.; Stevens, K. N.; Lambrechts, D.; Moisse, M.; Paridaens, R.; Christiaens, M.-R.; Rudolph, A.; Nickels, S.; Flesch-Janys, D.; Johnson, N.; Aitken, Z.; Aaltonen, K.; Heikkinen, T.; Broeks, A.; Veer, L. J. V.; van der Schoot, C. E.; Guénel, P.; Truong, T.; Laurent-Puig, P.; Menegaux, F.; Marme,

- F.; Schneeweiss, A.; Sohn, C.; Burwinkel, B.; Zamora, M. P.; Perez, J. I. A.; Pita, G.; Alonso, M. R.; Cox, A.; Brock, I. W.; Cross, S. S.; Reed, M. W. R.; Sawyer, E. J.; Tomlinson, I.; Kerin, M. J.; Miller, N.; Henderson, B. E.; Schumacher, F.; Le Marchand, L.; Andrulis, I. L.; Knight, J. A.; Glendon, G.; Mulligan, A. M.; kConFab Investigators; Australian Ovarian Cancer Study Group; Lindblom, A.; Margolin, S.; Hooning, M. J.; Hollestelle, A.; van den Ouweland, A. M. W.; Jager, A.; Bui, Q. M.; Stone, J.; Dite, G. S.; Apicella, C.; Tsimiklis, H.; Giles, G. G.; Severi, G.; Baglietto, L.; Fasching, P. A.; Haeberle, L.; Ekici, A. B.; Beckmann, M. W.; Brenner, H.; Müller, H.; Arndt, V.; Stegmaier, C.; Swerdlow, A.; Ashworth, A.; Orr, N.; Jones, M.; Figueroa, J.; Lissowska, J.; Brinton, L.; Goldberg, M. S.; Labrèche, F.; Dumont, M.; Winqvist, R.; Pylkäs, K.; Jukkola-Vuorinen, A.; Grip, M.; Brauch, H.; Hamann, U.; Brüning, T.; GENICA (Gene Environment Interaction and Breast Cancer in Germany) Network; Radice, P.; Peterlongo, P.; Manoukian, S.; Bonanni, B.; Devilee, P.; Tollenaar, R. A. E. M.; Seynaeve, C.; van Asperen, C. J.; Jakubowska, A.; Lubinski, J.; Jaworska, K.; Durda, K.; Mannermaa, A.; Kataja, V.; Kosma, V.-M.; Hartikainen, J. M.; Bogdanova, N. V.; Antonenkova, N. N.; Dörk, T.; Kristensen, V. N.; Anton-Culver, H.; Slager, S.; Toland, A. E.; Edge, S.; Fostira, F.; Kang, D.; Yoo, K.-Y.; Noh, D.-Y.; Matsuo, K.; Ito, H.; Iwata, H.; Sueta, A.; Wu, A. H.; Tseng, C.-C.; Van Den Berg, D.; Stram, D. O.; Shu, X.-O.; Lu, W.; Gao, Y.-T.; Cai, H.; Teo, S. H.; Yip, C. H.; Phuah, S. Y.; Cornes, B. K.; Hartman, M.; Miao, H.; Lim, W. Y.; Sng, J.-H.; Muir, K.; Lophatananon, A.; Stewart-Brown, S.; Siriwanarangsang, P.; Shen, C.-Y.; Hsiung, C.-N.; Wu, P.-E.; Ding, S.-L.; Sangrajrang, S.; Gaborieau, V.; Brennan, P.; McKay, J.; Blot, W. J.; Signorello, L. B.; Cai, Q.; Zheng, W.; Deming-Halverson, S.; Shrubsole, M.; Long, J.; Simard, J.; Garcia-Closas, M.; Pharoah, P. D. P.; Chenevix-Trench, G.; Dunning, A. M.; Benitez, J.; Easton, D. F. Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 353–361, 361e1–2, doi:10.1038/ng.2563.
124. Caswell, J. L.; Camarda, R.; Zhou, A. Y.; Huntsman, S.; Hu, D.; Brenner, S. E.; Zaitlen, N.; Goga, A.; Ziv, E. Multiple breast cancer risk variants are associated with differential transcript isoform expression in tumors. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 7421–7431, doi:10.1093/hmg/ddv432.
125. MutationTaster Available online: <http://www.mutationtaster.org/> (accessed on Sep 14, 2017).
126. PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs Available online: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml> (accessed on Sep 14, 2017).

127. Bertram, L.; Böckenhoff, A.; Demuth, I.; Düzel, S.; Eckardt, R.; Li, S.-C.; Lindenberg, U.; Pawelec, G.; Siedler, T.; Wagner, G. G.; Steinhagen-Thiessen, E. Cohort profile: The Berlin Aging Study II (BASE-II). *Int. J. Epidemiol.* **2014**, *43*, 703–712, doi:10.1093/ije/dyt018.
128. Burnette, W. N. “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **1981**, *112*, 195–203.
129. Romero-Calvo, I.; Ocón, B.; Martínez-Moya, P.; Suárez, M. D.; Zarzuelo, A.; Martínez-Augustin, O.; de Medina, F. S. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem.* **2010**, *401*, 318–320, doi:10.1016/j.ab.2010.02.036.
130. Lin, J. C.; Choi, E. I.; Pagano, J. S. Qualitative and quantitative analyses of Epstein-Barr virus early antigen diffuse component by western blotting enzyme-linked immunosorbent assay with a monoclonal antibody. *J. Virol.* **1985**, *53*, 793–799.
131. Mullis, K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **1990**, *48*, 579–582.
132. Cawthon, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e47.
133. Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J.; Williams, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **1996**, *6*, 986–994.
134. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45.
135. Mukaka, M. A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Med. J. J. Med. Assoc. Malawi* **2012**, *24*, 69–71.
136. Meyer, A.; Salewsky, B.; Buchmann, N.; Steinhagen-Thiessen, E.; Demuth, I. Relative Leukocyte Telomere Length, Hematological Parameters and Anemia - Data from the Berlin Aging Study II (BASE-II). *Gerontology* **2016**, *62*, 330–336, doi:10.1159/000430950.
137. Lin, J.; Cheon, J.; Brown, R.; Coccia, M.; Puterman, E.; Aschbacher, K.; Sinclair, E.; Epel, E.; Blackburn, E. H. Systematic and Cell Type-Specific Telomere Length Changes in Subsets of Lymphocytes. *J. Immunol. Res.* **2016**, *2016*, 5371050, doi:10.1155/2016/5371050.
138. Sansoni, P.; Vescovini, R.; Fagnoni, F.; Biasini, C.; Zanni, F.; Zanlari, L.; Telera, A.; Lucchini, G.; Passeri, G.; Monti, D.; Franceschi, C.; Passeri, M. The immune system in extreme longevity. *Exp. Gerontol.* **2008**, *43*, 61–65, doi:10.1016/j.exger.2007.06.008.

139. Jeon, J.-P.; Nam, H.-Y.; Shim, S.-M.; Han, B.-G. Sustained viral activity of epstein-Barr virus contributes to cellular immortalization of lymphoblastoid cell lines. *Mol. Cells* **2009**, *27*, 143–148, doi:10.1007/s10059-009-0018-y.
140. Szekely, L.; Pokrovskaja, K.; Jiang, W. Q.; Selivanova, G.; Löwbeer, M.; Ringertz, N.; Wiman, K. G.; Klein, G. Resting B-cells, EBV-infected B-blasts and established lymphoblastoid cell lines differ in their Rb, p53 and EBNA-5 expression patterns. *Oncogene* **1995**, *10*, 1869–1874.
141. Zijno, A.; Porcedda, P.; Saini, F.; Allione, A.; Garofalo, B.; Marcon, F.; Guarrera, S.; Turinetti, V.; Minieri, V.; Funaro, A.; Crebelli, R.; Giachino, C.; Matullo, G. Unsuitability of lymphoblastoid cell lines as surrogate of cryopreserved isolated lymphocytes for the analysis of DNA double-strand break repair activity. *Mutat. Res.* **2010**, *684*, 98–105, doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.12.008.
142. Gatei, M.; Young, D.; Cerosaletti, K. M.; Desai-Mehta, A.; Spring, K.; Kozlov, S.; Lavin, M. F.; Gatti, R. A.; Concannon, P.; Khanna, K. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 115–119, doi:10.1038/75508.
143. Adams, K. E.; Medhurst, A. L.; Dart, D. A.; Lakin, N. D. Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex. *Oncogene* **2006**, *25*, 3894–3904, doi:10.1038/sj.onc.1209426.
144. Silva, J. M.; McMahon, M. The fastest Western in town: a contemporary twist on the classic Western blot analysis. *J. Vis. Exp. JoVE* **2014**, e51149, doi:10.3791/51149.
145. Kimura, M.; Stone, R. C.; Hunt, S. C.; Skurnick, J.; Lu, X.; Cao, X.; Harley, C. B.; Aviv, A. Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1596–1607, doi:10.1038/nprot.2010.124.
146. Hills, M.; Lucke, K.; Chavez, E. A.; Eaves, C. J.; Lansdorp, P. M. Probing the mitotic history and developmental stage of hematopoietic cells using single telomere length analysis (STELA). *Blood* **2009**, *113*, 5765–5775, doi:10.1182/blood-2009-01-198374.
147. Fumagalli, M.; Rossiello, F.; Mondello, C.; Fagagna, F. d’Adda di Stable Cellular Senescence Is Associated with Persistent DDR Activation. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e110969, doi:10.1371/journal.pone.0110969.
148. Tibbetts, R. S.; Brumbaugh, K. M.; Williams, J. M.; Sarkaria, J. N.; Cliby, W. A.; Shieh, S. Y.; Taya, Y.; Prives, C.; Abraham, R. T. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 152–157.

149. Drissi, R.; Wu, J.; Hu, Y.; Bockhold, C.; Dome, J. S. Telomere shortening alters the kinetics of the DNA damage response after ionizing radiation in human cells. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* **2011**, *4*, 1973–1981, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0069.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lösungen und Medien (Zellkultur)	25
Tabelle 2: Laborzubehör und Geräte (Zellkultur)	25
Tabelle 3: Mutagene Behandlung (ionisierende Bestrahlung)	26
Tabelle 4: Proteinlysat	26
Tabelle 5: Puffer	26
Tabelle 6: Gele und Membran	27
Tabelle 7: Proteinmarker	27
Tabelle 8: Antikörper	27
Tabelle 9: Lösungen (Western Blot)	28
Tabelle 10: Laborzubehör und Geräte (Western Blot)	28
Tabelle 11: DNA-Extraktion	29
Tabelle 12: Primer	29
Tabelle 13: Laborzubehör und Geräte (qPCR)	29
Tabelle 14: Allgemeines Laborzubehör	31
Tabelle 15: Auflistung der ermittelten Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p) für die Phosphorylierungsgrade	41

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Darstellung ausgewählter Signalkaskaden (magenta) mit Beteiligung von ATM, ATR und DNA-PK	10
Abbildung 1.2: Darstellung des Zellzyklus und ausgewählter für die Regulation der Kontrollpunkte relevanter Kaskaden	12
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der beiden hauptsächlichen Apoptosewege anhand ausgewählter Beispiele	14
Abbildung 1.4: Darstellung der genomischen Struktur und funktioneller Domänen von hSNM1B/Apollo	17

Abbildung 1.5: Darstellung der Interaktion von hSNM1B/Apollo mit dem Shelterinkomplex ...	21
Abbildung 3.1: Beispielhafte Darstellung der Nachweise von p53-p Ser15 (a) und p53 _{ges} (b) im Western Blot unbestrahlt, nach 5 und 20 Gy γ -Bestrahlung.	37
Abbildung 3.2: Beispielhafte Darstellung der Nachweise von SMC1-p Ser957 (a) und SMC1 _{ges} (b) im Western Blot.	37
Abbildung 3.3: Beispielhafte Darstellung der Nachweise von ATM-p Ser1981 (a) und ATM _{ges} (b) im Western Blot.	38
Abbildung 3.4: Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Ratio (x/ 0Gy).	39
Abbildung 3.5: Streudiagramme zur Darstellung der Unterschiede der relativen Phosphorylierung (x/0Gy) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis.	40
Abbildung 3.6: Darstellung der Verteilung der relativen Phosphorylierung.	43
Abbildung 3.7: Darstellung der Verteilung der relativen Phosphorylierung.	45
Abbildung 3.8: Dissoziationskurven der qPCR aller untersuchten LCLs.	46
Abbildung 3.9: Dissoziationskurven der Standardreihe.	47
Abbildung 3.10: Berechnung der Effizienzen über die bekannten DNA-Mengen der Referenzen nach Pfaffl [134].	48
Abbildung 3.11: Darstellung der mittels $\Delta\Delta$ ct-Methode aus den Ergebnissen der qPCR errechneten relativen Telomerlänge (y-Achse) der einzelnen Proben bezogen auf die Referenz (R).	48
Abbildung 3.12: Verteilung der relativen Telomerlänge nach Genotyp von rs11552449 in DNA aus LCLs.	49
Abbildung 3.13: Verteilung der rLTL nach Genotyp von rs11552449 in DNA aus Leukozyten (aus Vollblut).	50
Abbildung 3.14: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation der relativen Telomerlängen aus lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) und Leukozyten aus dem Vollblut.	51

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
ATM	ataxia teleangiectasia mutated
ATR	ataxia-Rad3-related
ATRIP	ATR-interacting protein

BER	Basen-Exzisions-Reparatur
CASP	CPS-Artemis-SNMI-Pso2, CPS-Artemis-SNMI-Pso2
Cdk2	Cyclin-abhängige Kinase 2 (cycline-dependent kinase 2)
COS-Zelllinie	CV-1 (Nierenzelllinie aus der grünen Meerkatze) in Origin, carrying SV49
CPSF	cleavage and polyadenylation specificity factor
ct	cycle threshold
DCLRE	DNA-crosslink repair protein
DDR	DNA-Schadensantwort (DNA-damage-response)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-Proteinkinase, DNA-Proteinkinase
ds DNA	Doppelstrang-DNA (double-stranded DNA)
DSB	Doppelstrangbruch (Double-strand-breakage)
ETAA1	Ewing tumor associated antigen 1
FA/BRCA-pathway	Fanconi anemia/breast cancer pathway
FACS	fluorescent-activated cell-scanning
FADD	FAS-associated protein with death domain
FANCI	Fanconi anemia, complementation group I
g	gravitational force
G	Guanin
HEK	human embryonic kidney
HeLa-Zellen	Henrietta-Lacks-Zervix-Karzinom-Zellen
HR	homologe Rekombination
HT-1080-Zellen	Fibrosarkom-Zellen
ICL	interstrand-crosslink
IR	ionizing radiation
MAT-1	menage a trois homologe 1
MBL	Metall-Betalaktamase
MDC1	mediator of DNA-damage control
Mdm2	mouse double minute 2 homolog
MMC	Mitomycin C
MRN-Komplex	Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur

NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i>
PHTF1	<i>putative homeodomain transcription factor 1</i>
PIKK	<i>phosphoinositol-3-Kinase</i>
Pol η	<i>Polymerase η</i>
POT1	<i>protector of telomeres 1</i>
PSF2	<i>partner of SLD five 2</i>
Pso	<i>Psoralen-sensitive</i>
PVDF-Membran	<i>Polyvenyldendifluorid-Membran</i>
R	<i>Referenz</i>
RAP1	<i>repressor/activator protein 1</i>
rLTL	<i>relative Leukozyten-Telomerlänge</i>
RPA	<i>Replikationsprotein A (replication protein A)</i>
SDS-PAGE	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
SILAC	<i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
SMC1	<i>structural maintenance of chromosomes protein 1</i>
SNM	<i>sensitive to nitrogen mustard</i>
SNP	<i>Einzelnukleotidpolymorphismus (single-nucleotide-polymorphism)</i>
SSB	<i>Einzelstrangbruch (single-strand-breakage)</i>
ssDNA	<i>Einzelstrang-DNA (single-stranded-DNA)</i>
STELA	<i>single telomere length analysis</i>
SV40	<i>Simian-virus-40</i>
T	<i>Thymin</i>
TBS-T	<i>tris-buffered saline with Tween20</i>
TIFs	<i>telomere dysfunctional induced foci</i>
TIN2	<i>TRF1 interacting nuclear factor 2</i>
TLS	<i>translesion-synthesis</i>
TopB1	<i>topoisomerase binding protein 1</i>
TPP1	<i>TINT1, PTOP, PIP1 — POT1-TIN2 organizing protein</i>
TRF	<i>terminal restriction fragment</i>
TRF1	<i>telomere repeat factor 1</i>
TRF2	<i>telomere repeat factor 2</i>
γ H2A.X	<i>phosphoryliertes Histon 2A.X</i>

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Carolin Albers, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Zelluläre Untersuchungen zur Funktion des hSNM1B/Apollo-Proteins unter Berücksichtigung von DNA-Schadensantwort und Telomerlänge“ 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

Lebenslauf

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

Danksagung

Besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Ilja Demuth für die großartige Betreuung dieser Arbeit aussprechen. Seinem konstruktiven Rat, seinen lehrreichen Hinweisen und seiner zuverlässigen Ansprechbarkeit bei Fragen und Problemen verdanke ich zum großen Teil das Gelingen dieser Arbeit.

Herrn Dipl.-Ing. Bastian Salewsky danke ich für die engagierte Einarbeitung, sorgfältige Vermittlung der Methoden und pragmatischen Lösungsvorschläge.

Herrn Prof. Dr. Lars Bertram möchte ich für die Zurverfügungstellung der BASE-II-Genotyp-Daten danken.

Außerdem bedanken möchte ich mich bei Frau Gabriele Hildebrand, Frau Susanne Rothe, sowie den Mitgliedern der „AG Biologie des Alterns“ für die beständige Ansprechbarkeit bei labortechnischen Problemen.

Ein besonderer Dank gilt zudem meinen Eltern für immerwährende Unterstützung, Akzeptanz und Verständnis.

Danken möchte ich schließlich auch Richard Golnik, dessen kritische Hinweise und Anregungen mir großen Rückhalt beim Anfertigen dieser Arbeit boten.