

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

## DISSERTATION

Die *hSNM1B/Apollo*-Variante rs11552449 ist mit zellulärer  
Sensitivität gegenüber Mitomycin C und ionisierender  
Strahlung assoziiert

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Herwest  
aus Horb am Neckar

Datum der Promotion: 03.12.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>Deutscher Abstract .....</b>	<b>1</b>
<b>Englischer Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1. hSNM1B/Apollo und seine Funktionen .....	5
1.2. Die ICL- und DSB-induzierenden Agenzien Mitomycin C und ionisierende Strahlung ....	13
1.3. Varianten mit erhöhtem Krebsrisiko.....	14
1.4. Zielsetzung .....	14
<b>2. Vertiefung der Methodik.....</b>	<b>15</b>
2.1. Zellkultur.....	15
2.2. Zellzahlbestimmung .....	16
2.3. MMC/IR Zell-Vitalitäts-Assay .....	16
2.4. rs11552449-Genotypisierung.....	19
2.5. Relative hSNM1B/Apollo-Expression.....	22
2.6. Bestimmung der relativen Telomerlängen (rTL) .....	25
2.7. Statistische Auswertung .....	25
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>27</b>
4.1. Weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen.....	30
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>32</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>37</b>
<b>Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation .....</b>	<b>38</b>
<b>Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>).....</b>	<b>39</b>
<b>Druckexemplar der ausgewählten Publikation .....</b>	<b>41</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>51</b>
<b>Publikationsliste.....</b>	<b>53</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>54</b>

## Deutscher Abstract

**Hintergrund:** Das Gen *DCLRE1B* kodiert für die Nuklease hSNM1B/Apollo, die sowohl für die Reparatur von DNA-Schäden, als auch für die Telomerintegrität relevant ist. In Zellen mit vermindertem hSNM1B/Apollo-Gehalt haben Studien eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Noxen festgestellt: Es zeigte sich eine erhöhte Sensitivität sowohl gegenüber Mitomycin C (MMC), einer DNA-Interstrangvernetzungen-induzierenden Substanz, als auch gegenüber ionisierender Strahlung (IR), die unter anderem DNA-Doppelstrangbrüche induziert. Außerdem führt eine Reduktion des hSNM1B/Apollo-Gehalts in Zellen zu einem verstärkten DNA-Reparatursignal an den Telomeren. Mit rs11552449 (c.181C>T, p.His61Tyr) wurde wiederholt ein Einzelnukleoid-Polymorphismus (SNP) im *DCLRE1B*-Gen beschrieben, der für eine Missense-Variante von hSNM1B/Apollo kodiert und mit erhöhtem Brustkrebsrisiko assoziiert ist. Darüber hinaus wurde rs11552449 mit alternativem Spleißen von hSNM1B/Apollo-Transkripten in Verbindung gebracht.

**Ziel:** Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Beziehung zwischen dem SNP rs11552449 und der Funktion des hSNM1B/Apollo-Proteins zu untersuchen, und somit möglicherweise einer funktionellen Erklärung der Befunde zum erhöhten Brustkrebsrisiko näher zu kommen. Dafür wurde untersucht, ob sich, in Abhängigkeit vom rs11552449-Genotyp, die Telomerlänge, das Ausmaß an Sensitivität gegenüber MMC und IR und die Menge an hSNM1B/Apollo-Transkript unterscheiden.

**Methodik:** Zunächst wurde der rs11552449-Genotyp von 69 lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) von Probanden aus der Berliner Altersstudie II (BASE-II) bestimmt. Diese Zelllinien wurden in Zell-Vitalitäts-Experimenten auf ihre Sensitivität gegenüber MMC und IR geprüft (alamarBlue-Assay). Des Weiteren wurden in einem Teil der Zelllinien (N=24) die relative Menge an hSNM1B/Apollo-mRNA mit vollständiger Länge und die relative Telomerlänge (N=62) bestimmt. Die Ergebnisse aller Experimente wurden im Kontext des rs11552449-Genotyps analysiert und statistisch ausgewertet. Darüber hinaus wurde der Zusammenhang von Telomerlänge und rs11552449-Genotyp an Daten von Leukozyten von BASE-II-Probanden (N=1.710) untersucht.

**Ergebnisse:** Der SNP rs11552449 war sowohl mit der zellulären Sensitivität gegenüber MMC und IR assoziiert als auch mit der relativen Menge an vollständigem, also das Exon 2 enthaltenden, hSNM1B/Apollo-Transkript. Bezogen auf diesen SNP homozygote LCLs

(beide Genotypen) zeigten eine signifikant höhere Viabilität gegenüber MMC ( $p=0,012$ ) und IR ( $p=0,0012$ ) als heterozygote Zelllinien. Zwischen den homozygoten Zelllinien wurde weder bezüglich der zellulären Sensitivität ( $p=0,85$  für MMC und  $p=0,96$  für IR) noch bezüglich der Expression von hSNM1B/Apollo ( $p=1,0$ ) ein Unterschied gefunden. Hinsichtlich der relativen Telomerlänge wurde weder bei den LCLs ( $p=0,719$ ) noch bei den Leukozyten ( $p=0,514$ ) eine rs11552449-Assoziation gefunden.

**Fazit:** Durch diese Studie wird der Zusammenhang zwischen erhöhtem Brustkrebsrisiko und dem rs11552449-Genotyp näher beleuchtet und ein Grundstein für weitere Forschung über die klinische Signifikanz des rs11552449-Genotyps im Rahmen einer Antitumorthherapie mit MMC oder IR gelegt. Die Ergebnisse weisen außerdem darauf hin, dass *DCLRE1B*, das Gen für hSNM1B/Apollo, ein modulierender Faktor für das Brustkrebsrisiko ist.

## Englischer Abstract

**Background:** The *DCLRE1B* gene encodes the nuclease hSNM1B/Apollo, which is relevant for the repair of DNA damage and telomere integrity. Studies have demonstrated that cells with down-regulated hSNM1B/Apollo show increased sensitivity to DNA-damaging noxae: Cells showed increased sensitivity to mitomycin C (MMC), a DNA interstrand cross-linking inducing substance, and to ionizing radiation (IR), which amongst others induces DNA double-strand breaks. Reduced hSNM1B/Apollo expression in cells leads to an increased DNA repair signal at telomeres. rs11552449 (c.181C>T, p.His61Tyr) is a single nucleoid polymorphism (SNP) in the *DCLRE1B* gene encoding a missense variant of hSNM1B/Apollo associated with increased breast cancer risk. In addition, rs11552449 was shown to be associated with alternative splicing of hSNM1B/Apollo transcripts.

**Objective:** The aim of the study was to investigate the relationship between the SNP rs11552449 and the function of hSNM1B/Apollo protein and thus possibly come closer to a functional explanation of the findings on increased breast cancer risk. Therefore, it was investigated whether telomere length, degree of sensitivity towards MMC and IR, and the amount of hSNM1B/Apollo transcript differ depending on the rs11552449 genotype.

**Methods:** First, the rs11552449 genotype of 69 lymphoblastoid cell lines (LCLs) established from subjects of the Berlin Age Study II (BASE-II) was determined. These cell lines were tested in cell vitality experiments for their sensitivity towards MMC and IR (alamarBlue assay). Furthermore, the relative amount of full-length hSNM1B/Apollo-mRNA (N=24) and the relative telomere length (N=62) were determined in subsets of the cell lines. The results of all experiments were analyzed and statistically evaluated in the context of the rs11552449 genotype. In addition, telomere lengths data of leukocytes from BASE-II subjects (N=1.710) were evaluated according to their rs11552449 genotype.

**Results:** The SNP rs11552449 was associated with cellular sensitivity to MMC and IR and with the relative amount of complete hSNM1B/Apollo transcript containing exon 2. After exposure to MMC ( $p=0.012$ ) and IR ( $p=0.0012$ ), homozygous LCLs showed significantly higher viability than heterozygous cell lines. No difference was found between the homozygous (CC or TT) cell lines with respect to cellular sensitivity ( $p=0.85$  for MMC and  $p=0.96$  for IR) or expression of hSNM1B/Apollo ( $p=1.0$ ). Neither in LCLs ( $p=0.719$ ) nor in leukocytes ( $p=0.514$ ) telomere length was associated with rs11552449.

**Conclusion:** This study sheds light on the relationship between increased breast cancer risk and the rs11552449 genotype and paves the ground for further research on the clinical significance of the rs11552449 genotype in antitumor therapy with MMC or IR. The results also indicate that *DCLRE1B*, the gene for hSNM1B/Apollo, might be a modulating factor for breast cancer risk.

# 1. Einleitung

## 1.1. hSNM1B/Apollo und seine Funktionen

Die evolutionär hoch konservierte Nuklease hSNM1B/Apollo (human sensitive to nitrogen mustard) ist beim Menschen sowohl für die Telomerintegrität als auch in der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden von Bedeutung (1).

### 1.1.1. Telomerintegrität

Am Erhalt der Chromosomenenden, der Telomere, ist hSNM1B/Apollo über verschiedene Mechanismen beteiligt (1). Die Telomere bestehen aus repetitiven TTAGGG-Sequenzen, endend in einem einzelsträngigen G-reichen 3'-Überhang, der über ein t-Loop in die TTAGGG-Sequenzen invadiert. Dadurch ist das DNA-Ende nicht mehr frei zugänglich und wird somit nicht fälschlicherweise als DNA-Schaden erkannt. Um die Telomere zusätzlich vor dem Abbau zu schützen, bindet der aus Proteinen bestehende Shelterin-Komplex an die Telomer-DNA. Der Komplex ist aus den sechs Proteinen POT1, TPP1, TIN2, TRF2, RAP1 und TRF1 aufgebaut. Bei einer Beeinträchtigung des Telomer-Shelterin-Komplexes werden Telomere von der Zelle vermehrt als DNA-Doppelstrangbruch (DSB) erkannt, woraufhin die Zelle versucht, diese mittels nicht-homologer Endverknüpfung (NHEJ) zu reparieren. Dies führt zu vermehrten Telomer- und somit Chromosomenfusionen (2). An den Shelterin-Komplex binden weitere assoziierte Proteine, die ebenfalls zur Telomerintegrität beitragen. Auch hSNM1B/Apollo, welches über sein C-terminales Ende an TRF2 bindet, zählt zu diesen Proteinen. In einer Arbeit von Van Overbeek und de Lange konnte in Zellen mit verringertem hSNM1B/Apollo-Gehalt ein verstärktes DNA-Schadenssignal an den Telomeren in der S-Phase beobachtet werden (3). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass hSNM1B/Apollo, vermutlich TRF2-vermittelt, an der Generierung der 3'-Überhänge beteiligt ist und zu einer besseren Ablesbarkeit der Telomere bei der Replikation durch Auflösung aberranter Sekundärstrukturen führt (1). Aufgrund ihrer Struktur sind Telomere während der Replikation anfällig für DNA-Replikationsstress (4), der unter anderem anhand von hSNM1B/Apollo reduziert werden kann. Die zum Beispiel durch einen verringerten Topoisomerase 2 $\alpha$ -Gehalt induzierte Telomer-Defizienz konnte mittels hSNM1B/Apollo-Überexpression aufgehoben werden (5). Die Relevanz von hSNM1B/Apollo und dessen Interaktion mit TRF2 für die Integrität der Telomere beim Menschen wurde außerdem in Zellen eines Patienten mit Hoyeraal-Hreidarsson-

Syndrom gezeigt. Hierbei handelt es sich um eine schwere Form der Dyskeratosis congenita, die mit vorzeitigem Altern, einer gestörten Immunantwort und Knochenmarksversagen einhergeht. Bei dem beschriebenen Patienten lag eine pathogene Variante vor, die für ein verkürztes hSNM1B/Apollo-Protein kodiert, dem unter anderem die TRF2-Bindungsdomäne fehlt. In Experimenten zeigten die betroffenen Zellen deutliche Anzeichen einer Telomerdysfunktion, wie Telomerduplets, Telomerfusionen und eine beschleunigte Verkürzung der Telomere (6).

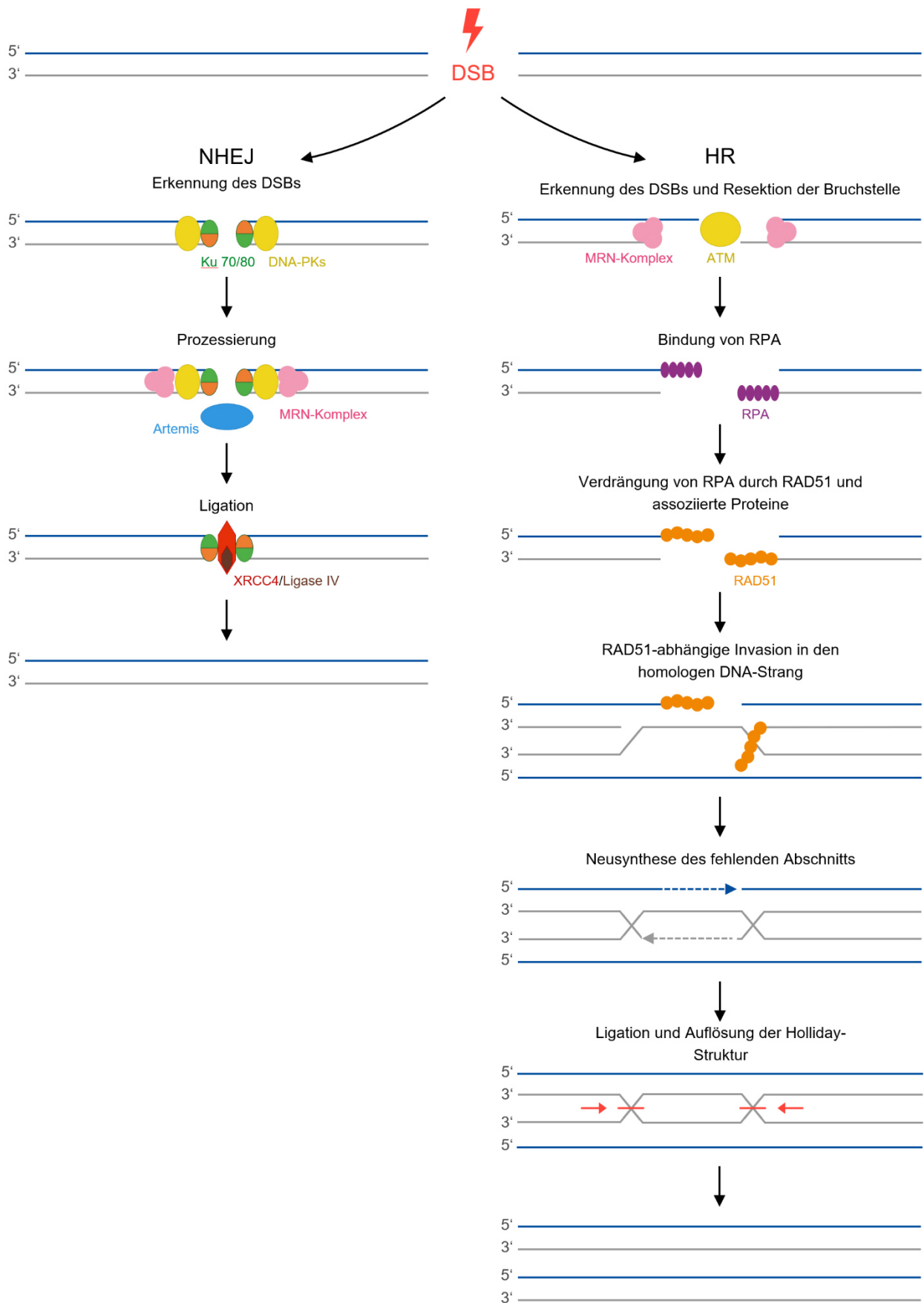
#### 1.1.2. DNA-Schadensantwort

Ursprünglich identifiziert wurde hSNM1B/Apollo durch seine N-terminale Homologie zu Pso2p, einer Nuklease der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welche an der Reparatur kovalenter Quervernetzungen komplementärer DNA-Stränge (ICLs), beziehungsweise der daraus resultierenden DSBs, beteiligt ist (7). Auch bei Wirbeltieren wurde hSNM1B/Apollo im Rahmen des DNA-Schadensreparaturnetzwerkes insbesondere mit der Reparatur von ICLs und DSBs in Verbindung gebracht. Dies basiert darauf, dass eine Reduktion des hSNM1B/Apollo-Gehalts in Zellen zu einer geringeren Vitalität beziehungsweise einer erhöhten zellulären Sensitivität gegenüber ICL-induzierenden Substanzen wie Mitomycin C (MMC) und Cisplatin und in einigen Studien auch gegenüber der unter anderem DSB-induzierenden ionisierenden Strahlung (IR) führt (7-11). hSNM1B/Apollo ist über das ATM-/ATR-Netzwerk, Zellzyklus-Kontrollpunkte, die Verarbeitung blockierter Replikationsgabeln und den Fanconi-Anämie-Reparaturweg an der zellulären Antwort auf DNA-Schäden beteiligt (1). Die DNA-Reparatur und -Schadenserkenkung erfolgt durch ein komplexes Protein-Netzwerk (12). Nachfolgend sollen exemplarisch Reparaturwege mit Beteiligung von hSNM1B/Apollo dargestellt werden.

##### 1.1.2.1 Reparatur von DSBs und das ATM-/ATR-Netzwerk

DSBs beeinträchtigen die zelluläre Vitalität erheblich. Nach der Erkennung des DSBs durch Sensorproteine wird das entstandene Schadenssignal von Transduktor-Proteinen amplifiziert und an Effektor-Proteine weitergeleitet. Aus der Kaskade an Effektor-Proteinen resultieren schließlich ein Zellzyklusarrest, die Reparatur des DNA-Schadens oder die Apoptoseinduktion. Dabei gibt es für die Reparatur von DSBs zwei Mechanismen: die nicht-homologe Verknüpfung von DNA-Enden (non-homologous end joining, NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR) (13).





**Abbildung 1:** Vereinfachte Darstellung der Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSBs) mittels nicht-homologer Verknüpfung von DNA-Enden (non-homologous end joining, NHEJ) und Homologer Rekombination (HR). Der DSB ist rot dargestellt, die Schwesterchromatiden blau bzw. grau. Rote Pfeile stellen Inzisionen der DNA dar. Es sind nur ein Teil der beteiligten Proteine dargestellt. Erklärung zu der Abbildung im Text. Abbildung nach Khanna et al. 2001 (13).

Bei der Reparatur durch NHEJ werden beide gebrochenen DNA-Enden direkt verknüpft. Somit kann dieser Reparaturweg in jeder Zellzyklus-Phase stattfinden. Allerdings entstehen aufgrund von Ungenauigkeiten kleine Deletionen. Im Rahmen des NHEJ erkennen Ku70/Ku80-Heterodimere DSBs. Anschließend werden DNA-Proteinkinasen (DNA-PKs), wie „Ataxia telangiectasia mutated“ (ATM) beziehungsweise „Ataxia telangiectasia and Rad3 related“ (ATR), rekrutiert. Daraufhin erfolgt die Rekrutierung und Aktivierung des eigentlichen Reparaturkomplexes aus XRCC4 und DNA-Ligase IV, der die Verknüpfung der DNA-Enden katalysiert. Beim NHEJ ist außerdem, insbesondere wenn die DNA-Enden vor der Verknüpfung verändert werden müssen, der Rad50-Mre11-Nbs1 Komplex, auch MRN-Komplex genannt, beteiligt (13), an den über Mre11 auch hSNM1B/Apollo binden kann (11).

Bei der HR erfolgt nach der Schadenserkenkung durch ATM eine 5'-3' End-Resektion mittels MRN-Komplex im DSB-Bereich, wodurch einzelsträngige 3'-Überhänge entstehen. Diese werden durch das Protein RPA stabilisiert. Mittels Rad51/FANCR, dem HR-Schlüsselprotein, und Rad51-assoziierten Proteinen werden homologe DNA-Domänen erkannt. Auch bei der folgenden Invasion des 3'-Endes in die homologe Sequenz spielen Rad51 und seine assoziierten Proteine eine entscheidende Rolle. Dann erfolgt mittels DNA-Polymerase eine komplementäre Neusynthese des fehlenden Abschnitts. Ab diesem Schritt existieren verschiedene Weiterführungen, in denen bei einigen eine DNA-Überkreuz-Struktur, die Holliday-Struktur, entsteht. Gemeinsam haben sie, dass eine Vielzahl verschiedener Proteine beteiligt ist und nach der Trennung wieder zwei intakte DNA-Moleküle vorliegen (13).

Sowohl beim NHEJ als auch bei der HR sind die Proteinkinasen ATM und ATR als Sensor- und Transduktor-Proteine beteiligt. Aktiviert phosphorylieren sie entscheidende Effektor-Proteine, wie die hauptsächlich von ATR phosphorylierte Checkpoint-Kinase 1 (Chk1), die vorrangig von ATM phosphorylierte Checkpoint-Kinase 2 (Chk2), das Tumorsuppressor-Protein p53 und viele weitere. Dies führt zu einem G1- & G2-Zellzyklusarrest, einer Reparatur des DNA-Schadens und einer zellulären Stressantwort (13). hSNM1B/Apollo spielt in der Aktivierung des ATM- und möglicherweise auch des ATR-Signalnetzwerkes eine Rolle, allerdings ist der genaue Mechanismus unbekannt. In einer Studie mit humanen Fibroblasten führte eine hSNM1B/Apollo-Depletion zu einer verminderten Phosphorylierung von ATM und seiner Effektorproteine p53, SMC1 und H2A.X nach IR-Exposition. Allerdings konnten Demuth et al. auch eine ATM-

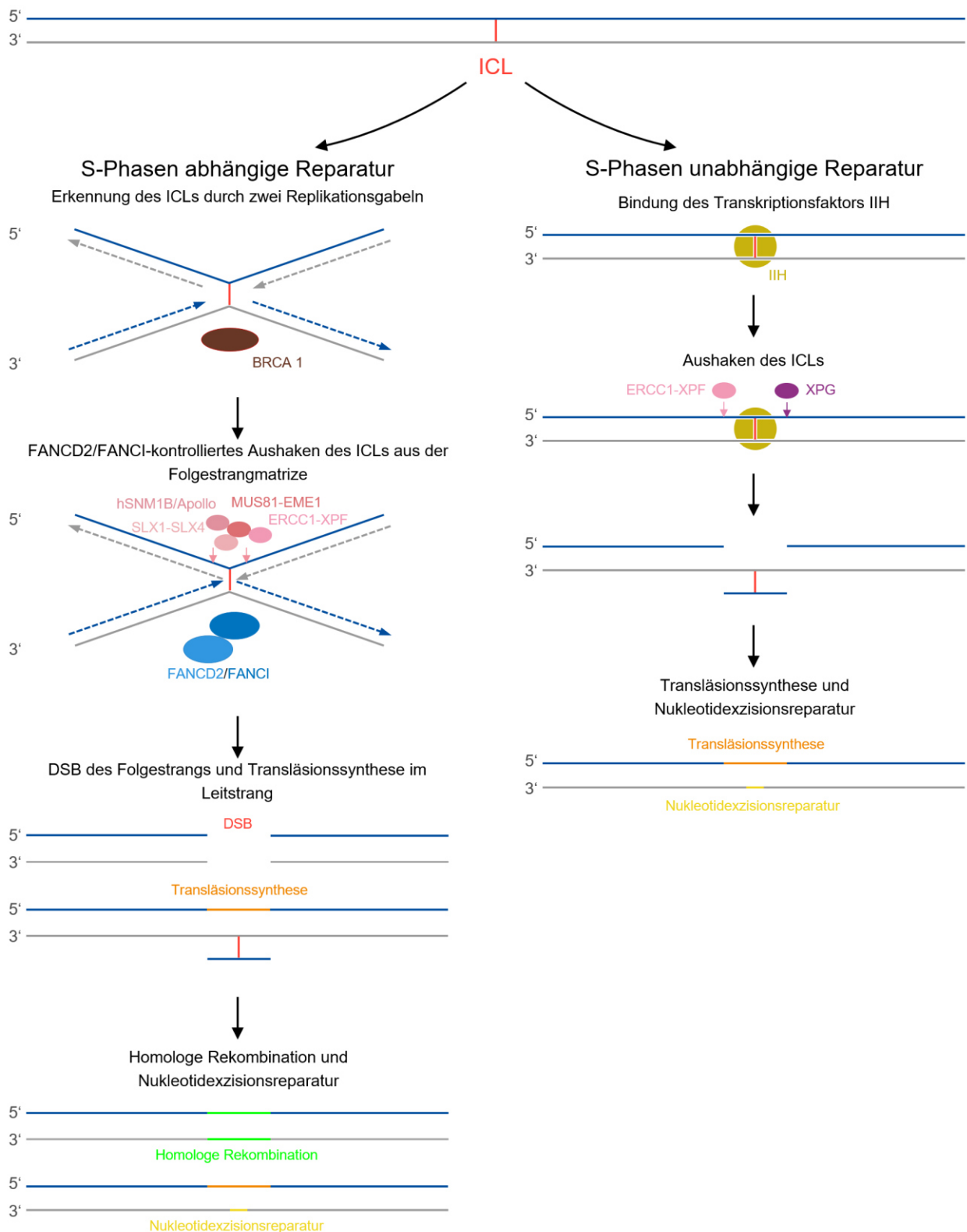
unabhängige Rekrutierung von hSNM1B/Apollo an die DNA-Schäden nach Bestrahlung zeigen (8). Darüber hinaus wurde in hSNM1B/Apollo-depletierten HEK-Zellen in Reaktion auf eine MMC-Behandlung eine geringere ATM-, Chk2- und Nbs1-Phosphorylierung gefunden. Allerdings erfolgte keine geringere Phosphorylierung von Chk1. Nach IR-Exposition wurden keine reduzierten Phosphorylierungen festgestellt (11). Im Gegensatz dazu führte in einer weiteren Studie eine Reduktion von hSNM1B/Apollo in humanen Fibroblasten zu einer verminderten Phosphorylierung von Chk1 nach UV-C-Bestrahlung (14).

#### *1.1.2.2. Zellzyklusarrest*

Die oben beschriebenen Prozesse führen unter anderem ATM- und ATR-vermittelt zu einem Zellzyklusarrest (13). Auch hierauf konnte ein Einfluss von hSNM1B/Apollo nachgewiesen werden: HEK- und HeLa-Zellen mit reduziertem hSNM1B/Apollo-Gehalt zeigten nach MMC-Exposition eine G2/M-Akkumulation und keine verminderte DNA-Synthese, was auf einen fehlerhaften S-Phase-Kontrollpunkt hindeutet (11). Zudem konnte gezeigt werden, dass HeLa-Zellen mit vermindertem hSNM1B/Apollo-Gehalt einen Defekt in einem weiteren Kontrollpunkt, dem Prophase-Kontrollpunkt, aufweisen. Dieser Einfluss könnte über die N-terminale Bindung zu Astrin vermittelt sein, da der Prophase-Kontrollpunkt auch bei hSNM1B/Apollo-Punktmutationen, die zu einer defekten Astrin-Bindungsstelle führen, beeinträchtigt war (15).

#### *1.1.2.3. Reparatur von ICLs*

Kovalente Verknüpfungen von Basen komplementärer Stränge (ICLs) sind für Zellen besonders schwerwiegend, da sie die Öffnung des DNA-Doppelstrangs und somit die für die Funktion der Zelle vitale Transkription und die für die Teilung der Zelle unabdingbare Replikation verhindern. Sowohl die Transkription als auch die Replikation sind entsprechend kritische Momente für die chromosomale Stabilität und damit für das Überleben der Zelle. Deshalb gibt es in Zellen ausgeklügelte Netzwerke zur Reparatur von ICLs, die sich je nach Zellzyklusphase unterscheiden. Seltener erfolgen Reparaturen über S-Phasen unabhängige Mechanismen, meist über S-Phasen abhängige Mechanismen (12). An letzteren sind unter anderem auch der Fanconi-Anämie-Reparaturweg und hSNM1B/Apollo beteiligt.



**Abbildung 2:** Vereinfachte Darstellung der S-Phasen-abhängigen und S-Phasen-unabhängigen Reparatur kovalenter Interstrangvernetzungen (ICLs). Die Interstrangvernetzung ist rot dargestellt, die Schwesterchromatiden blau bzw. grau. Farbige Pfeile stellen Inzisionen der DNA dar. Die mittels Transläsionssynthese synthetisierte DNA ist orange dargestellt, die mittels Homologer Rekombination synthetisierte DNA grün und die durch Nukleotidexzisionsreparatur synthetisierte DNA gelb. Beteiligte Proteine sind nur zum Teil dargestellt. Erklärung zu der Abbildung im Text. Die Abbildung basiert auf folgenden Publikationen: Bae et al. 2008 (11), Clauson et al. 2013 (12) und Ceccaldi et al. 2016 (16).

Bei der S-Phasen-unabhängigen Reparatur von ICLs werden diese vermutlich über eine aus ihnen resultierende Helix-Distorsion oder im Rahmen der Transkription erkannt, wodurch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) initiiert wird. Nach Bindung des Transkriptionsfaktors IIH werden verschiedene Downstream-Faktoren, unter anderem die Nukleasen ERCC1-XPF und XPG, rekrutiert. Einer der DNA-Stränge wird nun von ERCC1-XPF 5'-wärts und von XPG 3'-wärts der Läsion geschnitten. Im Anschluss muss der nun fehlende Abschnitt über die Transläsionssynthese von fehleranfälligeren Transläsions-Polymerasen resynthetisiert werden, da die normalen Polymerasen nicht über einen DNA-Schaden hinwegsynthetisieren können. Daraufhin wird der neusynthetisierte Abschnitt ligiert. Schließlich liegt der ehemalige ICL nur noch auf einem DNA-Strang, also „ausgehakt“ vor und kann mittels NER repariert werden (12).

Die Reparatur von ICLs in der S-Phase wird über eine bzw. zwei aufgehaltene Replikationsgabeln an dieser Stelle initiiert, die in einer Entfernung von circa 20-40 Basenpaaren des ICLs blockieren. Eine Reparaturinitiierung erfordert allerdings eine geringere Distanz der blockierten Replikationsgabeln zu dem ICL. Diese Annäherung erfolgt unter anderem BRCA1/FANCS-vermittelt. Bei der Erkennung spielen auch der ATR-Signalweg und der Fanconi-Anämie-Core-Komplex eine Rolle, der außerdem FANCD2 und FANCI aktiviert, die ein Heterodimer bilden. Der FANCD2/FANCI-Komplex kontrolliert das Aushaken des ICLs aus der Folgestrang-Matrize durch Inzisionen beidseits des ICLs durch ERCC1-XPF/FANCD1 und vermutlich MUS81-EME1 beziehungsweise SLX1-SLX4/FANCP. Folglich entsteht ein DSB des Folgestrangs und seiner Matrize sowie ein ausgehakter ICL auf der Leitstrang-Matrize (12, 16). Hierbei wird eine Beteiligung von hSNM1B/Apollo vermutet, da Zellen mit erniedrigtem hSNM1B/Apollo-Gehalt eine defekte DSB-Induktion nach Behandlung mit dem ICL-induzierenden MMC zeigen (11). Im Leitstrang erfolgt nun die Transläsionssynthese, die wahrscheinlich ebenfalls durch Proteine des Fanconi-Anämie-Reparaturwegs reguliert wird. Anschließend wird der entstandene DNA-Abschnitt ligiert. Um den DSB zu reparieren erfolgt dann die HR, bei der der 3'-Überhang der Matrize des Folgestrangs wie in Abschnitt 1.1.2.1. beschrieben RAD51-vermittelt in den homologen Abschnitt auf dem Leitstrang invadiert. Dieser Schritt wird durch den BRCA2/FANCD1-PALB2/FANCD2-Komplex katalysiert. Auch RAD51C/FANCO, ein RAD51-paralogenes Protein, spielt hierbei eine Rolle. Die Beendigung der HR ist wiederum FANCD2- und FANCI-abhängig. Nach

der HR kann der ausgehakte ICL auf der Leitstrang-Matrize durch die NER entfernt werden (16).

Somit ist der Fanconi-Anämie-Reparaturweg ein essentieller Bestandteil der, vor allem S-Phase abhängigen, Reparatur von ICLs. Inaktivierung eines der 22 bekannten Gene FANCA-FANCW durch Keimzellmutationen führt zu einer Beeinträchtigung des Fanconi-Anämie-Reparaturweges und somit zu dem Krankheitsbild der Fanconi-Anämie (17). Dieses ist gekennzeichnet von Knochenmarksinsuffizienz, Prädisposition für Tumore und verschiedenen angeborenen Fehlbildungen. Auf zellulärer Ebene kommt es zu einer chromosomalen Instabilität, einer erhöhten Sensitivität gegenüber ICL-induzierenden Substanzen und Störungen des Zellzyklus (16, 18), was sich mit dem bereits beschriebenen Phänotyp hSNM1B/Apollo-depletierter Zellen deckt. hSNM1B/Apollo ist über FANCD2 und SLX4/FANCP mit dem Fanconi-Anämie-Reparaturweg verknüpft (11, 19), allerdings wurde noch keine Fanconi-Anämie-verursachende Variante in *hSNM1B/Apollo* gefunden. Dies könnte daran liegen, dass hSNM1B/Apollo im Menschen essentiell ist, worauf die oben beschriebene pathogene *DCLRE1B* Variante in einem Patienten mit Hoyeraal-Hreidarsson und ein Experiment mit *SNM1B/Apollo* Knockout-Mäusen hindeuten. Die Inaktivierung von *SNM1B/Apollo* in der Maus resultierte hier in einer perinatalen Letalität (20).

#### *1.1.2.4 Erkennung, Stabilisierung und Prozessierung blockierter Replikationsgabeln*

Neben ICLs können weitere Faktoren zu DNA-Replikationsstress, also zu einer blockierten Replikationsgabel führen. Beispiele hierfür sind anderweitige DNA-Schäden, DNA-Sekundärstrukturen oder grundsätzlich besonders anfällige DNA-Abschnitte, wie beispielsweise die Telomere (4). An der Erkennung, Stabilisierung und Prozessierung blockierter Replikationsgabeln sind eine Vielzahl von Proteinen beteiligt. Hierbei spielen ATR und seine Effektorproteine eine zentrale Rolle. Weitere involvierte Proteine sind unter anderem MRE11, ein Protein des MRN-Komplexes, MUS81-EME1 (21), FANCD2 (22) und FANCP/SLX4 (23). Auch hSNM1B/Apollo wird nicht nur in Abhängigkeit von ICLs mit der Prozessierung blockierter Replikationsgabeln in Verbindung gebracht. hSNM1B/Apollo ist ein Bindungspartner von MRE11, FANCD2, SLX4/FANCP und MUS81-EME1 (11, 19). Darüber hinaus erwiesen sich humane Kolon-Karzinom-Zellen mit reduziertem hSNM1B/Apollo-Gehalt gegenüber Aphidicolin, einem Replikationsstress-induzierenden Agens, hypersensibel, auch wenn die Aktivierung der ATR-Effektorproteine Chk1 und Rpa32 nicht reduziert war (24).

## 1.2. Die ICL- und DSB-induzierenden Agenzien Mitomycin C und ionisierende Strahlung

### 1.2.1. Mitomycin C (MMC)

MMC ist ein photoinstabiles Alkylans, das aus Kulturfiltraten des Bakteriums *Streptomyces caespitosus* gewonnen wird. Um aktiviert zu werden muss es intrazellulär metabolisiert und reduziert werden, wobei zusätzlich zu der direkt DNA-schädigenden Wirkung von MMC potentiell DNA-schädigende Sauerstoffradikale entstehen (25). Im aktivierten Zustand alkyliert MMC DNA-Stränge und verursacht ICLs. Dies geschieht fast ausschließlich in CpG-Inseln durch Reaktion mit dem N<sup>2</sup> in Guanin und einem Guanin des komplementären Strangs (26). Somit führt MMC zu einer DNA-Synthesehemmung und Inter- bzw. Intrastrangbrüchen. MMC wird in der Rezidivprophylaxe oberflächlicher Harnblasenkarzinome, in der palliativen Therapie diverser fortgeschrittener Tumore, wie beispielsweise Mamma- oder Bronchialkarzinom, und bei verschiedenen chirurgischen Eingriffen am Auge eingesetzt (25).

### 1.2.2. Ionisierende Strahlung (IR)

IR ist Strahlung, die ausreichend energetisch ist, um neutrale Atome zu ionisieren, also in geladene Teilchen umzuwandeln. Zu IR gehören Alpha-, Beta-, Gamma- und Röntgenstrahlung (27). Gammastrahlung, die in dieser Arbeit genutzte IR-Form, wird sowohl therapeutisch als Gamma-Knife, beispielsweise bei Vestibularis-Schwannomen (28), als auch diagnostisch, beispielsweise im Rahmen von Positronen-Emissions-Tomographien (PET) und Einzelphotonen-Emissions-Tomographien (SPECT), eingesetzt (29). Die von ionisierender Strahlung verursachte zelluläre Schädigung wird vor allem durch oxidativen Stress auf Makromoleküle der Zelle, wie DNA, Proteine und Lipide erklärt. IR schädigt durch direkte Ionisierung und über, in einer komplexen Kettenreaktion entstehende, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bzw. reaktive Nitrogenspezies (RNS). Die DNA ist gegenüber IR besonders sensitiv, insbesondere die Base Guanin, da sie das vergleichsweise niedrigste Ionisierungspotential besitzt. Resultierende DNA-Schäden sind DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, oxidierte Basen, abasische Stellen, DNA-Protein-Verbindungen (DPCs) und ICLs, wobei in Bezug auf die zelluläre Vitalität DSBs die entscheidenden Läsionen sind (30).

### 1.3. Varianten mit erhöhtem Krebsrisiko

Wie bereits in Kapitel 1.1.2.3 im Rahmen des Fanconi-Anämie-Reparaturweges erwähnt, ist die Integrität der zellulären DNA-Schadensantwort essentiell für den Schutz vor Tumoren. Illustriert wird dies z.B. durch Keimzellmutationen in BRCA2/FANCD1 und BRCA1/FANCS, die im Wesentlichen mit einer Prädisposition für Brust- und Eierstock-Krebs assoziiert sind (31). Es sind allerdings viele weitere pathogene heterozygote Varianten in Genen der DNA-Reparatur bekannt, die zu einem erhöhten Krebsrisiko führen (32). Auch in *hSNM1B/Apollo* wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) identifiziert, die mit verschiedenen Tumorarten assoziiert sind (33-35). Einer davon ist der in der europäischen Bevölkerung mit einer Allelfrequenz von 19% vorkommende Polymorphismus rs11552449 (35). Synonyme Bezeichnungen des sich am Ende des Exon 1 von *hSNM1B/Apollo* befindenden SNPs rs11552449 sind rs12022378 und rs52822912 (36). Er kodiert die Missense-Variante p.His61Tyr, deren Einfluss auf die Funktion und Struktur von *hSNM1B/Apollo* in PolyPhen-2 mit 92% Sensitivität und 86% Spezifität als vermutlich benigne eingeschätzt wird (37). In einer genomweiten Analyse wurde eine signifikante Assoziation von rs11552449 mit Brustkrebs gezeigt ( $p = 1,8 \times 10^{-8}$ ) (35), die in einer weiteren Studie bestätigt wurde (38). Caswell et al. untersuchten zusätzlich eine mögliche Assoziation einiger mit erhöhtem Krebsrisiko assoziierter SNPs mit alternativem Spleißen. Dabei war rs11552449 mit signifikant erhöhter Exon 2-Inklusion in *hSNM1B/Apollo* sowie einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert. Allerdings war das alternative Spleißen von PHTF1 ebenfalls signifikant mit rs11552449 assoziiert, wodurch keine eindeutige Aussage hinsichtlich einer Assoziation getroffen werden konnte (38).

### 1.4. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der durch den SNP rs11552449 bedingten Missense-Variante His61Tyr auf die Funktion des *hSNM1B/Apollo*-Proteins zu untersuchen und damit möglicherweise einer funktionellen Erklärung der Befunde zum erhöhten Brustkrebsrisiko aus den genetischen Assoziationsstudien näher zu kommen. *hSNM1B/Apollo* ist, wie in 1.1 beschrieben, für die chromosomale Integrität und die Reparatur von DNA-Schäden wichtig und somit am zellulären Schutz vor einer onkogenen Transformation beteiligt. rs11552449 liegt in Exon 1 von *hSNM1B/Apollo* und wurde mit alternativem Spleißen von Exon 2 in Verbindung gebracht (38). Außerdem weisen Daten (N=117) aus dem „Genotype-Tissue Expression“ (GTEx) Projekt darauf



hin, dass rs11552449 ein „Expression Quantitative Trait Locus“ (eQTL) für das hSNM1B/Apollo-Gen *DCLRE1B* ist ( $p = 0,0016$ ), also die Expressionsmenge von hSNM1B/Apollo-mRNA beeinflusst (39). Sollte rs11552449 somit einen Einfluss auf die Funktion hSNM1B/Apollo haben, könnte damit das mit rs11552449-assoziierte erhöhte Brustkrebsrisiko besser verstanden werden. Um dies zu untersuchen, wurden, basierend auf der Rolle von hSNM1B/Apollo in der Reparatur von ICLs und DSBen, lymphoblastoide Zellen, die von überwiegend gesunden Personen etabliert wurden, mit MMC und IR behandelt und ihre Vitalität in Bezug zum rs11552449-Genotyp ausgewertet. Außerdem wurde in Anbetracht der Ergebnisse der Vitalitäts-Experimente, der eQTL-Effekt von rs11552449 auf *DCLRE1B* untersucht. Zusätzlich wurde, aufgrund der Wichtigkeit von hSNM1B/Apollo für die chromosomale Integrität, die Telomerlänge in lymphoblastoiden Zellen und Leukozyten in Abhängigkeit ihres rs11552449-Genotyps analysiert.

## 2. Vertiefung der Methodik

### 2.1. Zellkultur

Die Zellkultivierung erfolgte unter einer Laminair Flow-Arbeitsbank (Heraeus Holding GmbH), um sterile Arbeitsbedingungen sicherzustellen. Es wurden mit Eppstein-Barr-Virus immortalisierten B-Zelllinien, auch lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) genannt, genutzt. Die benötigten Zelllinien waren bereits kryokonserviert und stammten von zufällig ausgewählten Probanden der Berliner Altersstudie II. Für diese wurden ein älteres (60 – 82 Jahre) und ein jüngeres (20 – 37 Jahre) Probandenkollektiv aus Berlin rekrutiert. Ausführliche Informationen hierüber wurden von Bertram et al. und Gerstorf et al. publiziert (40, 41). Für die Experimente wurden, soweit möglich, nur Zelllinien von männlichen älteren Studienteilnehmern genutzt. Allerdings wurden aufgrund der geringen Allelfrequenz des rs11552449 TT-Genotyps auch zwei Zelllinien männlicher junger und drei Zelllinien weiblicher Studienteilnehmer berücksichtigt. Die Zellen wurden aufgetaut und in ein 15 ml Spitzbodenröhrchen (BD-Falcon, Becton Dickinson and Company) überführt, in dem 9ml RPMI-Medium (Gibco RPMI Medium 1640, Thermo Fisher Scientific Inc.) vorgelegt waren. Nach mehrmaligem Resuspendieren wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur bei 1000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 10 Minuten zentrifugiert (Megafuge 2.0R, Heraeus Holding GmbH). Nach Absaugen des Überstandes mit 10% Kryokonservator Dimethylsulfoxid (DMSO), wurden 5 ml RPMI-Medium hinzugegeben und die Zellsuspension in eine 25 cm<sup>2</sup>- und nach ausreichendem

Wachstum in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche (BD-Falcon, Becton Dickinson and Company) überführt. Dem RPMI 1640 Medium waren 15% fetales Kälberserum (PAN-Biotech GmbH) und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco Life Technologies) zugesetzt. Bei 37°C, 21% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen in einem Brutschrank mit befeuchteter Luft (Thermo Fisher Scientific Inc.) kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig über die Farbe des RPMI-Mediums eingeschätzt und bei Bedarf RPMI-Medium hinzugegeben und gegebenenfalls zusätzlich ein Teil Zellsuspension entnommen.

## 2.2. Zellzahlbestimmung

Die Zellernte für die Experimente erfolgte in logarithmischem Wachstum. In einem Vergleich der Zellzahlmessungen mittels Zählkammer „Neubauer Improved“ (Laboroptik Ltd.) und Zellzähler „Coulter-Counter Z2“ (Beckman Coulter) vor Versuchsbeginn, zeigte sich, dass die Zellzahl vitaler Zellen nach Adjustierung der Grenzwerte mittels Coulter-Counter Z2, der mittels Neubauer Improved ermittelten Gesamtzellzahl entsprach. Allerdings variierte in der Neubauer Improved der Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtzellzahl trotz Ernte in logarithmischem Wachstum. Da die genaue Bestimmung der Vitalität der Zellen für unsere Experimente essentiell war, wurde sich deshalb für die Zählung mittels Neubauer Improved entschieden. Dafür wurden aus der resuspendierten Zellkultur 20 µL entnommen und dazu 20 µL Trypanblau (Gibco Life Technologies) hinzugegeben. Nach einer kurzen Einwirkzeit wurde die Zählkammer mit etwa 10 µL davon befüllt und sowohl die Gesamtzellzahl, als auch der Anteil an toten Zellen in allen vier Quadranten gezählt. Daraus wurde der Mittelwert an vitalen Zellen errechnet. Dieser Wert wurde mit  $2 \times 10^4$  multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten.

## 2.3. MMC/IR Zell-Vitalitäts-Assay

In der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Sensitivität gegenüber MMC und IR von insgesamt 69 LCLs untersucht, wovon 45 den rs11552449 CC-Genotyp aufwiesen, 15 den CT-Genotyp und 9 den TT-Genotyp, was ungefähr dem Auftreten der jeweiligen Genotypen in der europäischen Bevölkerung entspricht (CC 62%, CT 28%, TT 10%).

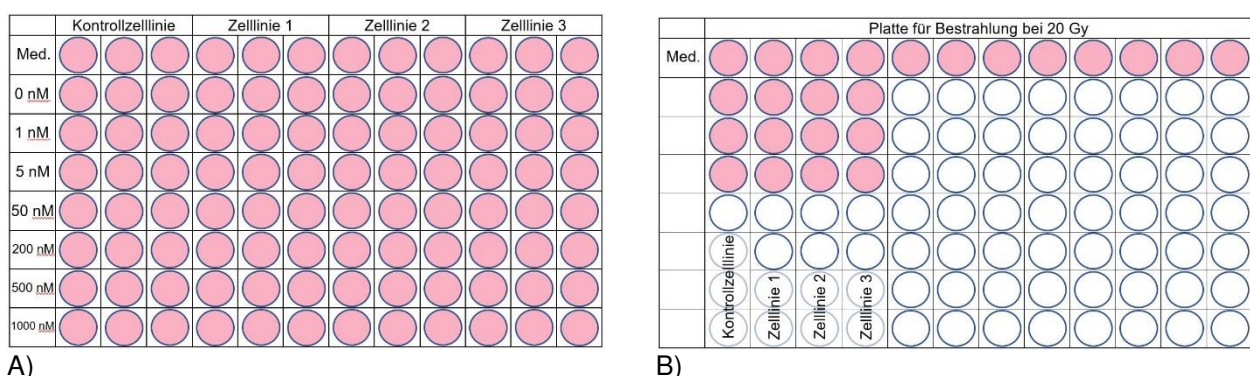
Im Gegensatz zu den MMC-Vitalitäts-Experimenten musste der Assay nach Bestrahlung mit IR im Rahmen der vorliegenden Arbeit erst etabliert werden. Zellzahlen sowie Inkubationszeiten wurden wie bei den MMC-Experimenten belassen. Zur orientierenden Festlegung der Bestrahlungsstärken diente eine Arbeit von Bishay et al., die mit LCLs die gleichen Zellen und mit  $4 \times 10^5$  Zellen/ml eine ähnliche Zellzahl für ihre Experimente

nutzten (42). Da allerdings bereits bei 20 Gy eine starke Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen erkennbar war und die Zellen nicht unnötig lange bei unter 37°C kultiviert werden sollten, wurde die Bestrahlungsstärke nicht bis auf 32 Gy erhöht.

Für beide Assays wurden die Zellen nach der in 3.2.2. beschriebenen Zellzählung in 10 ml auf  $3 \times 10^5$  Zellen/ml verdünnt und jeweils 100  $\mu$ L davon, entsprechend  $3 \times 10^4$  Zellen je Well, wurden auf eine 96-Well-Platte (Falcon, Thermo Fisher Scientific Inc.) ausplattiert.

Für die MMC-Experimente wurden auf jede 96-Well-Platte 4 Zelllinien in jeweils 3 nebeneinander liegende Spalten pipettiert. Als Leerkontrolle diente die erste Reihe, welche ausschließlich mit 100  $\mu$ L Medium je Well befüllt wurde. Um manipulationsbedingten zellulären Stress zu reduzieren, wurden die Zellen anschließend für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte die Behandlung mit MMC (Sigma-Aldrich) unter abgedunkelten Bedingungen. Das hierfür benötigte MMC wurde zu Beginn der experimentellen Phase ebenfalls unter abgedunkelten Bedingungen mit einer Konzentration von 100  $\mu$ g angesetzt und in Aliquots bei -20°C gelagert, um interexperimentelle Unterschiede durch Konzentrationsunterschiede in der Ausgangslösung zu verhindern. 100  $\mu$ L des MMCs wurden zu Endkonzentrationen von jeweils 0, 1, 5, 50, 200, 500 und 1000 nM zu den Zellen pipettiert. Die Konzentrationen resultierten aus einer Verdünnungsreihe mit dem in 3.2.1. beschriebenen Zellmedium.

































































































Für die IR-Assays wurde je Bestrahlungsstärke eine 96-Well-Platte mit Zellen bestückt. Dafür wurde zuerst 100  $\mu$ L Medium in alle zu befüllenden Wells pipettiert. Die erste Reihe wurde wie bei den MMC-Assays mit weiteren 100  $\mu$ L Medium je Well gefüllt, pro Spalte wurden eine Zelllinie in Triplikaten von je  $3 \times 10^4$  Zellen ausplattiert. Ebenfalls nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Platten jeweils mit 0, 1, 2, 5, 7,5, 10 und 20 Gy bestrahlt (GSRD1, Gamma-Service Medical GmbH). Die jeweiligen Ausplattier-Schemata für die Experimente mit MMC und IR sind in Abbildung 3 grafisch dargestellt.



**Abbildung 3:** Ausplattier-Schema der Zellen auf der 96-Well Platte für die MMC- (A) und die IR-Vitalitäts-Experimente (B) mit Angabe der Zelllinien und Menge an MMC (A) beziehungsweise Bestrahlungsstärke (B). Med. = ausschließlich Medium. Eigene Abbildung.

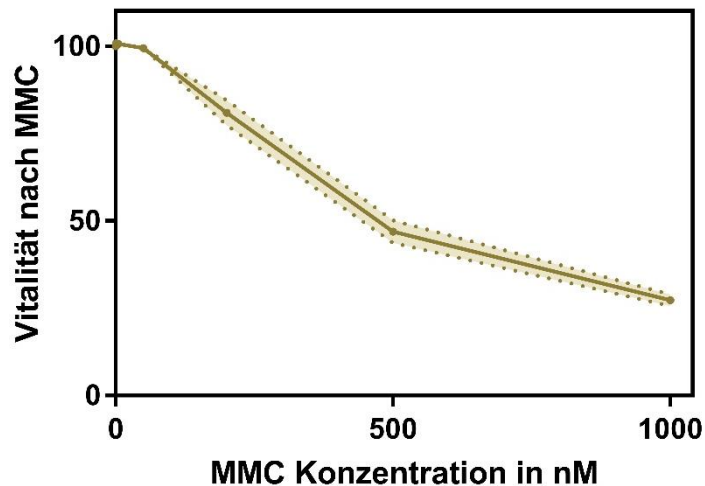
Nach weiteren 6 Tagen/144 Stunden der Inkubation bei 37°C wurde in einem Verhältnis von 1:10 das alamarBlue-Reagenz (Thermo Fisher Scientific Inc.) zu den Zellen und jeweils der halben Reihe Medium auf den MMC- und IR-Platten hinzugegeben und resuspendiert. Auch dieser Schritt erfolgte unter abgedunkelten Bedingungen.

Wie im alamarBlue-Manual angegeben, wurde der durch das reduzierende Milieu vitaler Zellen erzeugte Farbumschlag von blau zu rot nach 24 Stunden Inkubation durch eine Messung der Absorption bei 570 nm und 600 nm mittels Mikrotiterplatten-Photometer (Sunrise, Tecan Group AG) quantifiziert. Eine beispielhafte Darstellung einer gemessenen MMC-Platte ist in Abbildung 4 zu finden. Um die relative Reduktion der Fluoreszenz und damit die Zellvitalität mit steigenden MMC-/IR-Werten zu berechnen, wurde die im alamarBlue-Manual beschriebene Methode genutzt.

	Kontrollzelllinie			Zelllinie 1			Zelllinie 2			Zelllinie 3		
Med.												
0 nM												
1 nM												
5 nM												
50 nM												
200 nM												
500 nM												
1000 nM												

**Abbildung 4:** Beispielhafte Darstellung einer mit Zellen bestückten 96-Well Platte zum Zeitpunkt der Messung nach Anwendung des MMC-Protokolls. In der linken Spalte sind die MMC-Mengen angegeben, in der obersten Reihe die jeweiligen Zelllinien. Med. = ausschließlich Medium. Eigene Abbildung.

Die Assays wurden jeweils mindestens dreimal (MMC) beziehungsweise zweimal (IR) für jede Zelllinie durchgeführt. Dabei diente auf jeder Platte eine zu Beginn willkürlich ausgewählte Zelllinie als Referenz, um die interexperimentelle Variabilität einschätzen zu können. Da, wie in Abbildung 5 dargestellt, das 95% Konfidenzintervall der Lebensfähigkeit der Kontrollzelllinie gegenüber MMC 3,62 und weniger betrug, wurde das Zusammenführen der einzelnen Durchgänge einer Zelllinie für die Auswertung als valide Strategie angesehen.



**Abbildung 5:** Mittelwert und 95% Konfidenzintervall aller Vitalitätskurven der Kontrollzelllinie nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen von MMC. Eigene Abbildung.

## 2.4. rs11552449-Genotypisierung

### 2.4.1. Zellernte und DNA-Extraktion

Da der rs11552449-Genotyp vor Versuchsbeginn nur indirekt, wie in Herwest et al. beschrieben, bestimmt worden war, wurde eine direkte Genotypisierung durchgeführt (N=69), um eventuelle Fehlzuweisungen von Genotypen zu vermeiden (43). Bei dem jeweils ersten Durchgang der MMC-Vitalitäts-Assays wurde DNA aus etwa  $1 \times 10^6$  Zellen extrahiert. Dabei wurde die jeweilige Menge an Zellsuspension, nachdem sie resuspendiert wurde, geerntet und in ein 15 ml Spitzbodenröhrchen überführt. Dieses wurde bei 1300 rpm (Megafuge 2.0R) und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend auf Eis platziert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml kalter phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS, Thermo Fisher Scientific Inc.) vorsichtig resuspendiert und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf AG) überführt, welches für 5 Minuten bei 6000 rpm (Heraeus Fresco 21, Heraeus Holding GmbH) zentrifugiert wurde. Nach Abpipettieren des PBS-Überstandes wurde das Pellet bei -20°C bis zu der DNA-Extraktion eingefroren. Für die DNA-Extraktion wurde das ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System (Promega Corporation) genutzt. Der erste Abschnitt der Extraktion erfolgte auf Eis. Die Pellets wurden nach Zugabe von 160 µL DPBS aufgetaut, mit einer Pipette homogenisiert und nach Zugabe von 20 µL Proteinase K und 200 µL Zellyse-Puffer für 10 Sekunden gevortext. Nach der Inkubation in einem Thermomixer für 1 Stunde 20 Minuten bei 56°C und 400 rpm wurde das Gemisch kurz anzentrifugiert, 20 µL RNase-A-Lösung hinzugegeben und für 10 Sekunden gevortext. Nach der erneuten Inkubation bei 56°C und 400 rpm für 10 Minuten wurde das Gemisch wieder

kurz anzentrifugiert. Die weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach der Zugabe von 250  $\mu\text{L}$  Bindepuffer und 10 Sekunden Vortexen wurde die Probe auf die „ReliaPrep Binde-Säule“ überführt, die in einem Sammelröhrchen stand. Nach einminütigem Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit (Heraeus Fresco 21) wurde das Zentrifugat verworfen. Nun erfolgten mit jeweils frischen Sammelröhrchen 3 Waschschrte, bei denen jeweils 500  $\mu\text{L}$  Säulen-Waschlösung auf die Säule gegeben, für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und das Zentrifugat anschließend verworfen wurde. Im Anschluss wurde die Säule in ein steriles 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gestellt. Für das Auswaschen der DNA wurde 80  $\mu\text{L}$  Nuklease-freies Wasser auf die Säule gegeben und bei maximaler Geschwindigkeit für 1 Minute zentrifugiert. Nach Messen der DNA-Konzentration (Nanodrop, Implen, Axon Lab AG) wurden alle DNA-Proben mittels Nuklease-freiem Wasser auf 50 ng/ $\mu\text{L}$  angeglichen und bei 4°C gelagert.

#### 2.4.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Nachdem die DNA extrahiert war, wurde eine PCR mit den Primern 5'-CATCGCAGTGGACTTCTGGA und 5'-TGGAGTCATAGAATGGGGGC durchgeführt. In einem Mastermix wurden die notwendigen Komponenten für die PCR angesetzt. Dabei wurden ein Vielfaches von 15,3  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{HPLC}}$  (Merck KGaA), 2,5  $\mu\text{L}$  Puffer BD (Solis BioDyne), 1,5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (Solis BioDyne), 2,0  $\mu\text{L}$  dNTPs (Bioline GmbH), jeweils 0,75  $\mu\text{L}$  Primer (biomers.net GmbH) und 0,2  $\mu\text{L}$  FirePol Polymerase (Solis BioDyne) angesetzt und gemischt. Entsprechend wurden jeweils 23  $\mu\text{L}$  des Mastermixes in die Vertiefungen der PCR-Platten (Sarstedt AG & Co. KG) pipettiert und 2,0  $\mu\text{L}$  der genomischen DNA mit der Konzentration von 50 ng/ $\mu\text{L}$  hinzugegeben. In einem Thermocycler (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.) lief nun die eigentliche PCR ab, mit initial 5 Minuten bei 95°C, anschließend 5 Zyklen der DNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung und Primer-Verlängerung mit 10 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 58-54°C und 60 Sekunden bei 72°C, daraufhin 30 Zyklen mit 10 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 55°C und 60 Sekunden bei 72°C und nachfolgend einer 10-minütigen Phase bei 72°C. Zum Schluss erfolgte eine Abkühlung des Produkts auf 12°C. Das dabei entstehende Produkt bestand aus 249 Basenpaaren.

#### 2.4.3. Kontroll-Agarose-Gelelektrophorese

Um sicherzustellen, dass die PCR erfolgreich verlaufen war, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Das Gel wurde dabei aus Elektrophoresepuffer (TBE), 1,5% Agarose (Agarose NEEO Ultra-Quality, Carl Roth GmbH & Co. KG) und 2-5 µg/100 ml Ethidiumbromid (SERVA Electrophoresis GmbH) hergestellt. Nachdem das gegossene Agarose-Gel fest geworden war, wurde es in eine Kammer (PEQLAB Biotechnologie GmbH) mit TBE gelegt und neben einer 100 bp-Leiter (Größenmarker) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.) jeweils 5 µL des PCR-Produktes mit etwa 2-3 µL Agarose-Dye auf das Gel aufgetragen. Bei 120 V wanderten die DNAs nun durch das Agarose-Gel, was anschließend durch einen UV-Flächenstrahler (G:Box iChemi XR, Syngene, Biocon Limited) sichtbar gemacht wurde.

#### 2.4.4. Aufreinigung und Sequenzierung

Im nächsten Schritt wurde das Gemisch enzymatisch gereinigt, um bei der darauffolgenden Sanger-Sequenzierung unspezifische Anlagerungen zu vermeiden. Der hierfür angesetzte Mastermix bestand aus einem Vielfachen von 3,85 µL H<sub>2</sub>O<sub>HPLC</sub>, 0,5 µL 10x Exonuklease-Reaktionspuffer, 0,5 µL 10x Antarctic-Puffer, 0,05 µL Exonuklease I (New England BioLabs) und 0,1 µL Antarctic Phosphatase. Jeweils 5 µL des Mastermixes wurden zu 5 µL PCR-Produkt gegeben, 45 Minuten bei 37°C inkubiert und schließlich 15 Minuten bei 80°C inaktiviert. Anschließend wurde das aufgereinigte PCR-Produkt auf 12°C abgekühlt. Für die im Anschluss durchgeführte Sanger-Sequenzierung wurde ein Mastermix (Thermo Fisher Scientific Inc.) aus dem Vielfachen von 6,0 µL H<sub>2</sub>O<sub>HPLC</sub>, 0,5 µL „BigDye“, 2,0 µL BigDye-Puffer und 0,5 µL 5'-TGGAGTCATAGAATGGGGGC-Primer (biomers.net GmbH) erstellt, von dem je 9 µL zu jeweils 1 µL aufgereinigtem PCR-Produkt gegeben wurden. In dem Thermocycler erfolgte nun die Reaktion für 2 Minuten bei 96°C, dann 25 Zyklen bei 96°C für 10 Sekunden, 50°C für 5 Sekunden und 60°C für 2 Minuten und anschließendem Abkühlen auf 4°C. Nach der Fällung erfolgte eine kapillarelektrophoretische Auftrennung (3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems, HITACHI). Ausgewertet wurde die Sequenzierung mit dem Programm „Gene Mapper“ (Applied Biosystems).

## 2.5. Relative hSNM1B/Apollo-Expression

### 2.5.1. Zellernte und RNA-Extraktion

Von jeweils acht zufällig ausgewählten Zelllinien der Genotypen C/C, C/T und T/T wurden etwa  $5 \times 10^6$  Zellen für die RNA-Extraktion geerntet. Dabei wurde die jeweilige Menge an Zellsuspension abgenommen und in ein 15 ml Spitzbodenröhrchen überführt. Dieses wurde bei 1300 rpm (Megafuge 2.0R) und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml kalter DPBS vorsichtig resuspendiert und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt, welches für 5 Minuten bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert wurde (Heraeus Fresco 21). Der resultierende Überstand wurde abpipettiert und das Mikroreaktionsgefäß bei Raumtemperatur belassen. Nun wurden 1 ml Trizol (Invitrogen) zu dem Zellpellet gegeben, das Gemisch mit einer Pipette homogenisiert, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Nukleoproteinkomplexe zu lösen, und anschließend bei -20°C gelagert bis aus allen 24 Zelllinien Zellen geerntet waren. Für die nun folgende RNA-Extraktion war ein RNase freies Arbeiten wichtig, weshalb die Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen steril waren und bei jedem Zentrifugieren die Handschuhe gewechselt und desinfiziert wurden. Zuerst wurde zu jeder Zelllinie in einem Verhältnis von 1:5 Chloroform (Merck KGaA) pipettiert. Nach dem End-über-End Schwenken des Mikroreaktionsgefäßes wurde das Gemisch für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 15 Minuten bei 12.000 xg und 4°C zentrifugiert (Heraeus Fresco 21), um die Phasen aus Proteinen und Nukleinsäuren zu trennen. Die obere wässrige, RNA-enhaltende Phase wurde nun in ein, zuvor mit 500 µL Raumtemperatur-warmem Isopropanol (Merck KGaA) befüllten, 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt, umgehend End-über-End geschwenkt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Zentrifugieren für 15 Minuten bei 12.000 xg und 4°C, wurde der Überstand abgenommen, das resultierende Pellet mit 500 µL kaltem 80% Ethanol (Merck KGaA) gewaschen und nach kurzem Vortexen wieder 10 Minuten bei 12.000 xg und 4°C zentrifugiert. Um ein möglichst flüssigkeitsfreies Pellet zu erhalten, wurde der Überstand abgenommen, das Pellet maximal zentrifugiert, der restliche Überstand abgenommen und schließlich das Mikroreaktionsgefäß kurz mit offenem Deckel bei 37°C im Thermoblock getrocknet. Hiernach wurde das Pellet in 50 µL H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> (Invitrogen) aufgenommen. Für die Behandlung mit der DNase wurde ein Mastermix aus dem Vielfachen von 38 µL H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> (Invitrogen), 10 µL DNase I Puffer (New England BioLabs) und 2 µL DNase I (New



England BioLabs) erstellt, zu der RNA zugegeben und gemischt. Dann wurde das Gemisch im Thermomixer bei 37°C und 350 rpm inkubiert. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten wieder auf Eis. Der Zugabe von 100 µL H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> (Invitrogen) schlossen sich drei Waschschriffe an, um die RNA weiter von Proteinen und der DNA zu trennen. Für die ersten zwei Waschschriffe wurde jeweils 200 µL PCA (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol, Merck KGaA) hinzugegeben, das Gemisch für 5 Sekunden auf niedrigster Stufe gevortext und anschließend 10 Minuten bei 12.000 xg und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige RNA-haltige Phase wurde jeweils in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Für den dritten Waschschriff wurde 200 µL Chloroform hinzugegeben und wie in den zwei vorhergehenden Waschschriffen gevortext und zentrifugiert. Die nun entstandene obere RNA-haltige Phase wurde noch ein letztes Mal abgenommen und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß mit 20 µL 3M Natrium-Acetat mit pH 6 (Merck KGaA) überführt. Nach Zugabe von 550 µL kaltem hundertprozentigem Ethanol (Merck KGaA) wurde die RNA für 30 Minuten bei -80°C gefällt. Daraufhin wurde für 15 Minuten bei 13.800 xg und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das RNA-Pellet mit 500 µL 80% Ethanol (Merck KGaA) resuspendiert. Anschließend wurde 10 Minuten wie zuletzt beschrieben zentrifugiert, der Überstand verworfen, maximal zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zur Verflüchtigung letzter Reste des Überstands wurde das Pellet nun für 2-3 Minuten bei 37°C und geöffnetem Deckel im Thermomixer getrocknet. Anschließend wurde wieder bei Raumtemperatur gearbeitet. Nach Aufnahme des Pellets in 50 µL TE-Puffer mit pH 8,0 (Carl Roth GmbH & Co. KG) wurde dieses kurz gevortext und für 5 Minuten bei 37°C und 1000 rpm im Thermomixer gelöst. Nach kurzem Anzentrifugieren und Resuspendieren wurde die RNA-Menge gemessen (Nanodrop, Implen, Axon Lab AG), mit Nuklease-freiem Wasser auf 200 ng/µL aufgefüllt und über Nacht bei -20°C gelagert.

### 2.5.2. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Für die quantitative Messung der hSNM1B/Apollo-Menge wurde die RNA mittels reverser Transkription in die stabilere cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden zwei Mastermixe erstellt. Mastermix I beinhaltet ein Vielfaches von 3,0 µL H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>, 1,0 µL „Random Hexamers“ und 1 µL dNTPs, Mastermix II ein Vielfaches von 0,5 µL H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>, 2,0 µL RT-Puffer, 4,0 µL MgCl<sub>2</sub>, 2,0 µL Dithiothreitol und 0,5 µL RNaseOut (Invitrogen). Jeweils 5 µL des Mastermix I wurden auf eine PCR-Platte zu jeweils 5 µL RNA pipettiert, wobei die RNA in Duplikaten ausplattiert wurde. Nach dem Anzentrifugieren der Platte (Megafuge

2.0R) wurde sie im Thermocycler für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und umgehend für 1 Minute auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde sie an zentrifugiert, wieder auf Eis gestellt und jeweils 9 µL des Mastermix II hinzupipettiert. Dann erfolgte die Zugabe von 1,0 µL der Superscript III-Reversen Transkriptase, zu jeweils einer der zweimalig aufgetragenen RNAs. Anschließend wurde die Platte an zentrifugiert und im Thermocycler erfolgte für 10 Minuten bei 25°C, 50 Minuten bei 50°C und 5 Minuten bei 85°C die Umschreibung und Abkühlung auf 12°C. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Um zu zeigen, dass die RT-Proben frei von gDNA waren und dass die cDNA in allen Proben ähnlich effizient synthetisiert wurden war, wurde eine GAPDH-Kontroll-PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Für die GAPDH-PCR wurden die Primer 5'-CATGTTTCGTCATGGGTGTGA und 5'-TACCAGGAAATGAGCTTGAC (biomers.net GmbH) genutzt. Die PCR lief analog zu der in 3.2.4.2. beschriebenen PCR ab, mit dem Unterschied, dass nur 1 µL DNA zu dem Mastermix hinzugegeben wurde und in diesem deshalb jeweils 1 µL mehr H<sub>2</sub>O<sub>HPLC</sub> enthalten waren. Außerdem wurden die ersten 5 Zyklen des PCR Profils nicht durchgeführt, dafür aber im Anschluss 35 statt 30 Zyklen. Die anschließend durchgeführte Gelelektrophorese auf Agarose-Gel wurde wie in 3.2.4.3. beschrieben durchgeführt. Dabei zeigte sich eine ähnlich starke Bande auf gleicher Höhe bei den jeweiligen Proben mit Reverser Transkriptase und keine Bande bei den Proben ohne Zugabe der Reversen Transkriptase.

#### 2.5.4. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Auf einer 96-Well-Platte wurden jeweils 8 µL der cDNA mit 112 µL H<sub>2</sub>O<sub>HPLC</sub> (Merck KGaA) verdünnt. Daraufhin wurde von dieser cDNA-Verdünnung je Zelllinie 4 Triplets von je 6 µL auf eine 384er-Platte (Applied Biosystems) übertragen und bei -20°C gelagert, da anschließend eine qRT-PCR mit 4 verschiedenen Primerpaaren in 3-maliger Wiederholung je Zelllinie erfolgen sollte. Für die qRT-PCR wurden die Primer 5'-AGCCTCGCCTTTGCCGA und 5'-CTGGTGCCTGGGCG (Invitrogen) in Aktin, 5'-CTCTTGCATCGTCACCTACA und 5'-GTTACGGTCATGGTCTCTTG in Exon 1 und 2 von hSNM1B/Apollo (Invitrogen), 5'-GAGGTTGGTGAGAGCCATGT und 5'-GAAACATGACAGAACCAGGACA ausschließlich in Exon 2 von hSNM1B/Apollo (biomers.net GmbH) und 5'-GACCCACCCTACGATTGCTA und 5'-CGAAGCTCGGAGTAAGAGGA ausschließlich in Exon 4 von hSNM1B/Apollo (biomers.net GmbH) genutzt. Vor Beginn der qRT-PCR wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> (Invitrogen) und den jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsprimern ein Primer-Mix angelegt, der jeweils

2,5  $\mu\text{M}$  der beiden Primer enthielt. Ein Vielfaches von 2,2  $\mu\text{L}$  des Primer-Mixes, 0,8  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  (Invitrogen) und 9,0  $\mu\text{L}$  des „Power SYBR Green PCR Master Mix“ (Applied Biosystems) wurde lichtgeschützt zu einem Mastermix für die qRT-PCR zusammengefügt und entsprechend jeweils 12  $\mu\text{L}$  davon mit einer elektronischen Multistep-Pipette (Multipette Xstream, Eppendorf AG) zu den aufgetauten und auf Eis stehenden cDNAs pipettiert. Dabei wurde je Primerpaar ein Triplet jeder Zelllinie bestückt. Anschließend wurde die Platte bei 3000 RPM 1 Minute zentrifugiert (Megafuge 2.0R) und mit einer optischen Folie (MicroAmp Optical Adhesive Film, Applied Biosystems) luftblasenfrei beklebt. Der Transport zu dem qRT-PCR-Thermocycler (ABI 7900HT Fast Real Time System, Applied Biosystems) erfolgte auf Eis lichtgeschützt in einer Box. Für die Durchführung wurde in der Realtime-Software SDS v.2.4. (Applied Biosystems) das Standardprotokoll und zusätzlich die Erstellung einer Dissoziationskurve gewählt. Ausgewertet wurden die Ergebnisse der relativen Expression von Exon 1/2, Exon 2 und Exon 4 in Bezug auf das konstitutiv exprimierte Aktin mittels  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode in MS Excel 2010.

## 2.6. Bestimmung der relativen Telomerlängen (rTL)

Die Auswertung der rTL in Abhängigkeit des rs11552449-Genotyps wurde sowohl für 62 LCLs als auch für 1710 Leukozyten-Proben durchgeführt. Da die Bestimmung der rTL nicht Teil der vorliegenden Arbeit war, wird für die Methodik auf die Publikation von Herwest et al. (43) und Meyer et al. (44) verwiesen.

## 2.7. Statistische Auswertung

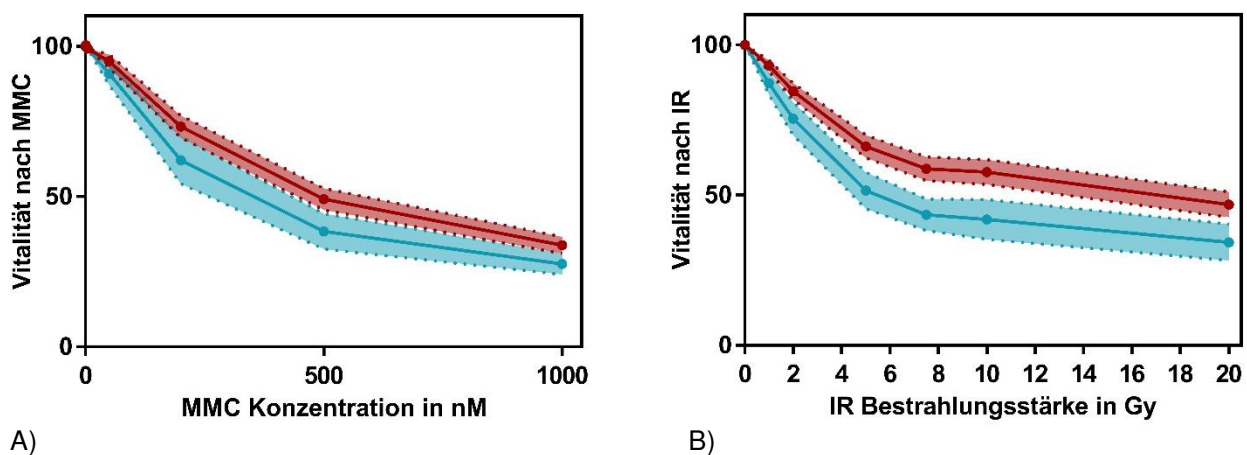
Die MMC- und IR-Vitalitätskurven aller Durchgänge einer Zelllinie wurden in MS Excel 2010 zu jeweils einer MMC- und IR-Vitalitätskurve zusammengefügt und die Fläche unter den Kurven (AUC) in GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc.) bestimmt. Die AUC-, qRT-PCR- und rTL-Werte wurden unter Verwendung der Software IBM SPSS Statistics v24 (International Business Machines Corporation) statistisch ausgewertet. Die Werte der jeweiligen rs11552449-Genotypen wurden zuerst mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und mittels Levene-Test auf Homoskedastizität getestet. Im Anschluss wurden die Gruppen über einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) beziehungsweise die rTL-Werte zusätzlich durch nichtparametrische Testung (Mann-Whitney-U) verglichen. Bei einem signifikanten Ergebnis ( $p < 0.05$ ) wurde daraufhin ein Post-Hoc T-Test mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen angewandt. Die getesteten Unterschiede

zwischen den rs11552449-Genotypen wurden bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  als signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden ausführlich in Herwest et al. (43) beschrieben, weshalb hier nur eine kurze Zusammenfassung erfolgt. Der rs11552449-Genotyp war signifikant mit der zellulären Sensitivität gegenüber MMC und IR und der relativen Expression von hSNM1B/Apollo in LCLs assoziiert, allerdings weder in LCLs noch in Leukozyten mit der rTL.

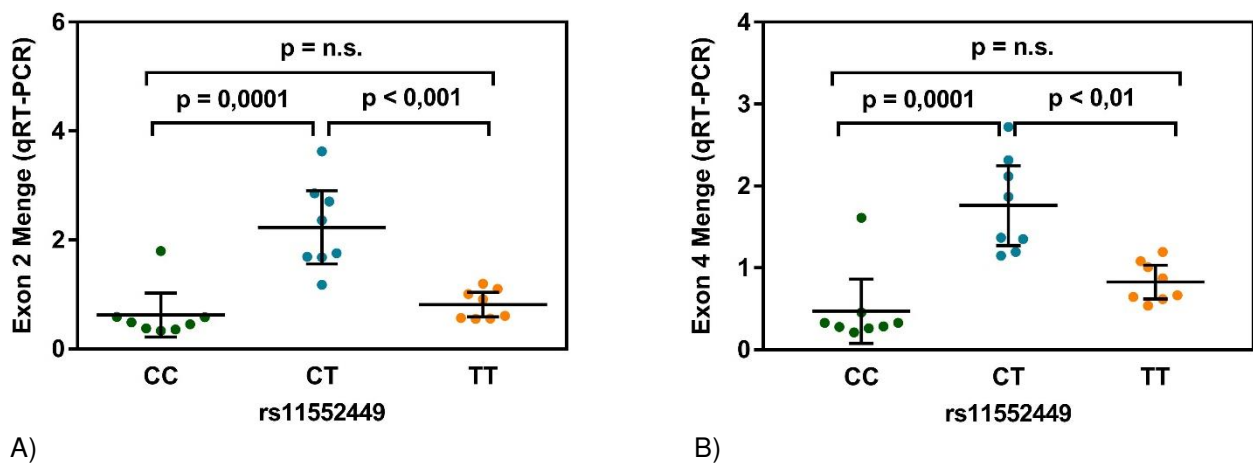
Dabei zeigte sich in heterozygoten Zelllinien im Vergleich zu homozygoten Zelllinien eine geringere Vitalität, sowohl nach MMC-Behandlung ( $p = 0,012$ ) als auch nach Bestrahlung mit IR ( $p = 0,0012$ ), auch wenn der Unterschied zwischen dem CT- und ausschließlich dem TT-Genotyp nach Bestrahlung nicht signifikant war ( $p = 0,24$ ). In Abbildung 6 ist der Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall der zugrundeliegenden Vitalitätskurven der homozygoten und heterozygoten Zelllinien nach MMC-Applikation abgebildet.



**Abbildung 6:** Vitalitätskurven von 69 LCLs, die mit steigenden Konzentrationen MMC (A) oder IR (B) behandelt wurden. Die Aufteilung der Zelllinien in zwei Gruppen erfolgte anhand ihres rs11552449-Genotyps. Die Abbildung zeigt den Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall der homozygoten (rot) und heterozygoten (blau) Zelllinien. Die Werte wurden in einem alamarBlue-Assay bestimmt. Abbildung nach Herwest et al. 2018 (43).

In der qRT-PCR zeigte sich mit Primern in Exon 1 und 2 signifikant mehr hSNM1B/Apollo-RNA in rs11552449-heterozygoten Zelllinien als in C/C- ( $p = 0,000084$ ) oder T/T-Zelllinien ( $p = 0,000006$ ). Dabei wurde einer der Primer in Exon 2 platziert, da wir nur hSNM1B/Apollo mit Exon 2 als kodierend für ein funktionelles hSNM1B/Apollo ansahen, da ein Ausschneiden von Exon 2 zu einer Leserasterverschiebung führt, die in einem Abbruch der Translation hSNM1B/Apollo resultiert. Da rs11552449 allerdings im

Zusammenhang mit alternativem Spleißen von Exon 2 beschrieben wurde (38), wurde zusätzlich eine qRT-PCR mit Primern in ausschließlich Exon 2 bzw. Exon 4 durchgeführt, was, wie in Abbildung 7 gezeigt, zu vergleichbaren Ergebnissen führte. Mit Primern in Exon 2 exprimierten die Zelllinien mit C/T-Genotyp signifikant mehr hSNM1B/Apollo-mRNA als die Zellen des C/C- ( $p = 0,000102$ ) oder T/T-Genotyps ( $p = 0,000489$ ), während zwischen den homozygoten Zelllinien kein Unterschied feststellbar war ( $p = 1,0$ ). Auch mit Primern in Exon 4 exprimierten die Zelllinien des C/T-Genotyps signifikant mehr hSNM1B/Apollo-mRNA als die Zellen des C/C- ( $p = 0,000111$ ) und T/T-Genotyps ( $p = 0,004542$ ). Auch hier war kein Unterschied zwischen den homozygoten Zelllinien detektierbar ( $p = 1,0$ ).



**Abbildung 7:** qRT-PCR Ergebnisse, die die relative Menge an hSNM1B/Apollo-mRNA in 24 LCLs mit Primern in Exon 2 (A) und in Exon 4 (B) in Abhängigkeit ihres rs11552449-Genotyps zeigen. Dabei ist der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall für alle drei Gruppen angegeben. T-Tests mit Bonferroni-Korrektur ( $n = 3$ ) wurden angewandt. Abbildung nach Herwest et al. 2018 (43).

Weder die in den auch für die MMC- und IR-Assays genutzten LCLs bestimmte rTL ( $p = 0,719$ ), noch die in den Leukozyten von Probanden der Berlin Altersstudie II bestimmte rTL ( $p = 0,514$ ) zeigte einen Zusammenhang zwischen Telomerlänge und rs11552449-Genotyp.

#### 4. Diskussion

In zwei aktuellen Studien war rs11552449 mit erhöhtem Brustkrebsrisiko assoziiert (35, 38). Rs11552449 ist ein SNP, bei dem an Position chr1:113905767 ein Thymin anstatt eines Cytosins steht, was die Missense-Variante p.His61Tyr im hSNM1B/Apollo-Protein kodiert. GTEx-Daten legen nahe, dass rs11552449 ein eQTL für das hSNM1B/Apollo-Gen *DCLRE1B* ist ( $p = 0,0016$ ) (39) und in einer Studie wurde rs11552449 mit

alternativem Spleißen von hSNM1B/Apollo-Exon 2 in Verbindung gebracht (38). Basierend auf der Funktion, die hSNM1B/Apollo in der Reparatur von ICLs und DSBen hat, wurden LCLs mit ICL-induzierendem MMC und DSB-induzierender IR behandelt und die zelluläre Vitalität daraufhin in Bezug auf ihren rs11552449-Genotyp ausgewertet. Anschließend wurde die relative Menge der hSNM1B/Apollo-mRNA bestimmt und nach rs11552449-Genotypen ausgewertet. In Anbetracht der Telomer-schützenden Funktion hSNM1B/Apollo, wurde außerdem die rTL in LCLs und Leukozyten, auf den rs11552449-Genotyp bezogen, ausgewertet.

Nach der Behandlung mit MMC und in ähnlicher Weise nach der Behandlung mit IR, zeigte sich im Vergleich zu homozygoten C/C- und T/T-Zelllinien eine geringere Vitalität heterozygoter C/T-Zelllinien. Dies deutet darauf hin, dass das erhöhte Brustkrebsrisiko auf heterozygote rs11552449-Träger beschränkt ist, was zunächst nicht mit vorhergehenden Ergebnissen von Michailidou et al. vereinbar ist, die eine Risikoerhöhung von 1% in T/T-Homozygoten (OR 1,09) im Vergleich zu C/T-Heterozygoten (OR 1,08) beschrieben. Allerdings lag das 95% Konfidenzintervall der T/T-Homozygoten bei einer OR von 1,01 – 1,19 (35), was sowohl mit einem erhöhten, als auch mit einem erniedrigten Risiko T/T-Homozygoter im Vergleich zu C/T-Heterozygoten vereinbar ist.

Die soeben beschriebenen Ergebnisse der MMC- und IR-Vitalitäts-Experimente konnten somit weder durch bestehende GTEx-eQTL-Daten, noch durch alternatives Spleißen von Exon 2 erklärt werden, da hier kein Heterozygoten-Effekt zu erwarten wäre. Deshalb wurde die relative Expression von hSNM1B/Apollo mittels qRT-PCR in den jeweiligen rs11552449-Genotypen bestimmt. Dafür wurde einer der Primer in Exon 2 positioniert, da wir nur hSNM1B/Apollo-RNA mit Exon 2 als kodierend für ein funktionelles Apollo ansahen, da ein Ausschneiden von Exon 2 zu einer Leserasterverschiebung führt, die wiederum zu einem Abbruch der Translation hSNM1B/Apollo führt. Ein mögliches alternatives Start-Codon in Exon 4 existiert, die Relevanz in Bezug auf die Translation als auch auf die Funktion des potentiellen Proteinfragments ist allerdings unklar. Um zu zeigen, dass wir mit diesem Vorgehen nicht nur das zuvor beschriebene rs11552449-assoziierte alternative Spleißen von Exon 2 abbildeten (38), führten wir eine zusätzliche qRT-PCR mit Primern ausschließlich in Exon 4 von hSNM1B/Apollo durch. Sowohl in den qRT-PCRs mit Primern in Exon 2 als auch in der qRT-PCR mit Primern in Exon 4 war in heterozygoten Zelllinien mehr hSNM1B/Apollo-mRNA vorhanden als in homozygoten

C/C- und T/T-Zelllinien. Dieses Ergebnis ist nicht vereinbar mit den Ergebnissen der GTEx-Daten, die einen rs11552449-dosisabhängigen eQTL-Effekt auf hSNM1B/Apollo andeuten, deren Daten jedoch nur aus einer Zelllinie des T/T-Genotyps bestehen (39). Aus dem Ergebnis der qRT-PCRs ergibt sich die Frage, wie rs11552449 mit vermehrter hSNM1B/Apollo-mRNA Expression assoziiert sein könnte. Da nur in Heterozygoten mehr hSNM1B/Apollo mRNA vorhanden war, nicht aber in T/T-Homozygoten, ist das Ergebnis nicht mit einem negativen Einfluss von rs11552449 auf die mRNA-Stabilität zu vereinbaren. Eine mögliche Erklärung hängt damit zusammen, dass beschrieben wurde, dass hSNM1B/Apollo Homomere formen kann (3). Es könnte somit sein, dass die Bindung von hSNM1B/Apollo-Proteinen mit unterschiedlicher Aminosäure an Stelle 61, wie in heterozygoten Zellen vorhanden, im Gegensatz zu zwei Proteinen mit identischer Aminosäure an Stelle 61, beeinträchtigt sein könnte. Dies könnte eine reduzierte Funktionalität bewirken, die wiederum reaktiv zu einer verstärkten Transkription *DCLRE1Bs* führen könnte.

Da sowohl die MMC- und IR-Vitalitäts-Experimente, als auch die Expression von hSNM1B/Apollo-mRNA einen Unterschied zwischen Homo- und Heterozygoten nahelegen, ist dies ein Hinweis darauf, dass die rs11552449-abhängige Expression von hSNM1B/Apollo relevanter für die Funktion hSNM1B/Apollo in der DNA-Schadensantwort ist, als das alternative Spleißen von Exon 2, wenn man annimmt, dass die mRNA-Werte auf Proteinebene übertragen werden können. Obwohl dies zuerst kontraintuitiv ist, da weniger hSNM1B/Apollo zu einer stärkeren zellulären Sensitivität gegenüber MMC und IR führt (7-10, 45), könnte diese Schlussfolgerung im Rahmen der oben angesprochenen Hypothese erklärbar sein. Da eine heterozygote Trägerschaft von rs11552449 zu einer geringeren Vitalität nach Behandlung mit MMC und IR führte, könnte es sein, dass die reduzierte Funktionalität der hSNM1B/Apollo-Homomere in Heterozygoten nicht vollständig durch die verstärkte Transkription kompensiert werden kann. Allerdings ist diese Hypothese spekulativ, da nicht eindeutig ist, ob hSNM1B/Apollo unter physiologischen Umständen homomerisiert und die hSNM1B/Apollo-Kristallform monomerisch ist (46). Unabhängig von der Hypothese konnte in Zellkulturen mit überexprimiertem hSNM1B/Apollo ein toxischer Effekt auf die Zellen gezeigt werden (47) und auch physiologisch wird hSNM1B/Apollo nur in so geringem Maße exprimiert, dass es durch Verfahren wie Western-Blot nicht detektierbar ist (3, 7). Dies könnte darauf

hinweisen, dass erhöhte Mengen von hSNM1B/Apollo in heterozygoten Zelllinien zusätzlich die zelluläre Lebensfähigkeit beeinträchtigen.

In Bezug auf die rTL war innerhalb der rs11552449-Genotypen in unseren Daten kein Unterschied detektierbar. In der Literatur wurde ein Einfluss von hSNM1B/Apollo auf die Telomerintegrität, wie in der Einleitung beschrieben, gezeigt. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass ausschließlich die Menge von hSNM1B/Apollo keinen Einfluss auf die Länge der Telomere hat. Das schließt allerdings eine Rolle von hSNM1B/Apollo in der Bewahrung der Telomerintegrität nicht aus, da in dieser Arbeit keine weiteren Endpunkte, wie beispielsweise die Schadensantwort an Telomeren in der S-Phase, untersucht wurden.

Caswell et al. konnten nicht ausschließen, dass das alternative Spleißen von *PHTF1* ursächlich für das rs11552449-assoziierte erhöhte Brustkrebsrisiko war (38). Zwar kann dies auch durch die vorliegende Arbeit nicht ausgeschlossen werden, allerdings deuten die Ergebnisse darauf hin, dass dies nicht der Fall ist, da eine Beteiligung hSNM1B/Apollo an der Schadensantwort auf ICLs und DSBs, im Gegensatz zu *PHTF1*, mehrfach beschrieben wurde. Eine weitere Limitation ist die Messung des hSNM1B/Apollo-mRNA-Gehalts statt der direkten Proteinmenge. Dies ist darin begründet, dass die hSNM1B/Apollo Menge zu gering für die Detektion durch aktuelle Methoden der Proteinmengenbestimmung, wie Western Blot, ist, weshalb eine indirekte Messung auf RNA Ebene erforderlich war (3, 7).

#### 4.1. Weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen

Sowohl in der Studie von Michailidou et al. als auch in unserer Studie lag nur eine geringe Anzahl an T/T-Zelllinien vor, weshalb für die Beantwortung der Frage, ob das erhöhte Brustkrebsrisiko auf heterozygote Träger beschränkt ist, weitere Forschung mit größeren Zellzahlen nötig ist. Gleiches gilt für den eQTL-Effekt von rs11552449 auf *DCLRE1B*.

In zukünftigen Studien sollte die klinische Signifikanz von rs11552449 untersucht werden. Dafür könnten beispielsweise rs11552449-abhängige Unterschiede bezüglich unerwünschter Nebenwirkungen oder Behandlungserfolg nach antitumoraler Therapie mit MMC und IR betrachtet werden, was insbesondere im Hinblick auf eine 30-40 prozentige Ansprechrate auf MMC von Interesse wäre (25). Zwei Studien von Dorling et al. konnten zwar keine Assoziation zwischen rs11552449 und Toxizität einer Behandlung mit IR bzw. zwischen rs11552449 und Neutropenie oder Taxan-induzierter Neuropathie



nach unterschiedlichen Chemotherapien bei Brustkrebs finden, allerdings war die statistische Power dieser Studien nicht ausreichend (48, 49). Wir gehen, basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, von einem Unterschied zwischen homozygoten und heterozygoten rs11552449-Trägern aus. Verschiedene Studien haben bereits Unterschiede in der Reaktion auf antitumorale Therapien zwischen hetero- und homozygoten SNP-Trägern aufgezeigt. Dazu gehören weniger schwere unerwünschte Nebenwirkungen und ein längeres progressionsfreies Überleben und medianes Überleben in heterozygoten Trägern der SNPs rs3757843 und rs3176658 in *POLD2* und *XPA*, Gene des Nukleotidexzisionsreparaturweges oder rs1537514 und rs1801131 im Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Gen (*MTHFR*) (50, 51).

## 5. Literaturverzeichnis

1. Schmiester M, Demuth I. SNM1B/Apollo in the DNA damage response and telomere maintenance. *Oncotarget*. 2017;8(29):48398-409.
2. Wagener C. *Molekulare Onkologie*. Stuttgart: Thieme Verlag; 2010; S. 127-129.
3. van Overbeek M, de Lange T. Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase. *Curr Biol*. 2006;16(13):1295-302.
4. Bjerregaard VA, Ozer O, Hickson ID, Liu Y. The Detection and Analysis of Chromosome Fragile Sites. *Methods Mol Biol*. 2018;1672:471-82.
5. Ye J, Lenain C, Bauwens S, Rizzo A, Saint-Leger A, Poulet A, et al, Benarroch D, Magdinier F, Morere J, Amiard S, Verhoeyen E, Britton S, Calsou P, Salles B, Bizard A, Nadal M, Salvati E, Sabatier L, Wu Y, Biroccio A, Londoño-Vallejo A, Giraud-Panis MJ, Gilson E. TRF2 and apollo cooperate with topoisomerase 2alpha to protect human telomeres from replicative damage. *Cell*. 2010;142(2):230-42.
6. Touzot F, Callebaut I, Soulier J, Gaillard L, Azerrad C, Durandy A, Fischer A, de Villartay JP, 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(22):10097-102.
7. Demuth I, Digweed M, Concannon P. Human SNM1B is required for normal cellular response to both DNA interstrand crosslink-inducing agents and ionizing radiation. *Oncogene*. 2004;23(53):8611-8.
8. Demuth I, Bradshaw PS, Lindner A, Anders M, Heinrich S, Kallenbach J, Schmelz K, Digweed M, Meyn MS, Concannon P. Endogenous hSNM1B/Apollo interacts with TRF2 and stimulates ATM in response to ionizing radiation. *DNA Repair (Amst)*. 2008;7(8):1192-201.
9. Ishiai M, Kimura M, Namikoshi K, Yamazoe M, Yamamoto K, Arakawa H, Agematsu K, Matsushita N, Takeda S, Buerstedde JM, Takata M. DNA cross-link repair protein SNM1A interacts with PIAS1 in nuclear focus formation. *Mol Cell Biol*. 2004;24(24):10733-41.
10. Nojima K, Hochegger H, Saberi A, Fukushima T, Kikuchi K, Yoshimura M, Orelli BJ, Bishop DK, Hirano S, Ohzeki M, Ishiai M, Yamamoto K, Takata M, Arakawa H, Buerstedde JM, Yamazoe M, Kawamoto T, Araki K, Takahashi JA, Hashimoto N, Takeda S, Sonoda E. Multiple repair pathways mediate tolerance to chemotherapeutic cross-linking agents in vertebrate cells. *Cancer Res*. 2005;65(24):11704-11.
11. Bae JB, Mukhopadhyay SS, Liu L, Zhang N, Tan J, Akhter S, Liu X, Shen X, Li L, Legerski RJ. Snm1B/Apollo mediates replication fork collapse and S Phase checkpoint activation in response to DNA interstrand cross-links. *Oncogene*. 2008;27(37):5045-56.
12. Clauson C, Scharer OD, Niedernhofer L. Advances in understanding the complex mechanisms of DNA interstrand cross-link repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(10):a012732.
13. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*. 2001;27(3):247-54.
14. Anders M, Mattow J, Digweed M, Demuth I. Evidence for hSNM1B/Apollo functioning in the HSP70 mediated DNA damage response. *Cell Cycle*. 2009;8(11):1725-32.

15. Liu L, Akhter S, Bae JB, Mukhopadhyay SS, Richie CT, Liu X, Legerski R. SNM1B/Apollo interacts with astrin and is required for the prophase cell cycle checkpoint. *Cell Cycle*. 2009;8(4):628-38.
16. Ceccaldi R, Sarangi P, D'Andrea AD. The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(6):337-49.
17. Knies K, Inano S, Ramirez MJ, Ishiai M, Surralles J, Takata M, Schindler D. Biallelic mutations in the ubiquitin ligase RFD3 cause Fanconi anemia. *J Clin Invest*. 2017;127(8):3013-27.
18. Nalepa G, Clapp DW. Fanconi anemia and the cell cycle: new perspectives on aneuploidy. *F1000Prime Rep*. 2014;6:23.
19. Salewsky B, Schmiester M, Schindler D, Digweed M, Demuth I. The nuclease hSNM1B/Apollo is linked to the Fanconi anemia pathway via its interaction with FANCP/SLX4. *Hum Mol Genet*. 2012;21(22):4948-56.
20. Akhter S, Lam YC, Chang S, Legerski RJ. The telomeric protein SNM1B/Apollo is required for normal cell proliferation and embryonic development. *Aging Cell*. 2010;9(6):1047-56.
21. Mazouzi A, Velimezi G, Loizou JI. DNA replication stress: causes, resolution and disease. *Exp Cell Res*. 2014;329(1):85-93.
22. Schlacher K, Wu H, Jasin M. A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell*. 2012;22(1):106-16.
23. Balint A, Kim T, Gallo D, Cussiol JR, Bastos de Oliveira FM, Yimit A, Ou J, Nakato R, Gurevich A, Shirahige K, Smolka MB, Zhang Z, Brown GW. Assembly of Slx4 signaling complexes behind DNA replication forks. *EMBO J*. 2015;34(16):2182-97.
24. Mason JM, Das I, Arlt M, Patel N, Kraftson S, Glover TW, Sekiguchi JM. The SNM1B/APOLLO DNA nuclease functions in resolution of replication stress and maintenance of common fragile site stability. *Hum Mol Genet*. 2013;22(24):4901-13.
25. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. 2016 [abgerufen am 29.04.2019 von [www.drugbase.de](http://www.drugbase.de)].
26. Tomasz M. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol*. 1995;2(9):575-9.
27. Reisz JA, Bansal N, Qian J, Zhao W, Furdui CM. Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(2):260-92.
28. Hentschel M, Rovers M, Markodimitraki L, Steens S, Kunst H. An international comparison of diagnostic and management strategies for vestibular schwannoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2019;276(1):71-8.
29. Herzog H. In vivo functional imaging with SPECT and PET. *Radiochimica Acta*. 2001;89:203-14.
30. Karbownik M, Reiter RJ. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000;225(1):9-22.
31. Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genet Med*. 2010;12(5):245-59.
32. Nielsen FC, van Overeem Hansen T, Sorensen CS. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(9):599-612.
33. Liang XS, Pfeiffer RM, Wheeler W, Maeder D, Burdette L, Yeager M, Chanock S, Tucker MA, Goldstein AM, Yang XR. Genetic variants in DNA repair genes and

- the risk of cutaneous malignant melanoma in melanoma-prone families with/without CDKN2A mutations. *Int J Cancer*. 2012;130(9):2062-6.
34. Karami S, Han Y, Pande M, Cheng I, Rudd J, Pierce BL, Nutter EL, Schumacher FR, Kote-Jarai Z, Lindstrom S, Witte JS, Fang S, Han J, Kraft P, Hunter DJ, Song F, Hung RJ, McKay J, Gruber SB, Chanock SJ, Risch A, Shen H, Haiman CA, Boardman L, Ulrich CM, Casey G, Peters U, Amin AI Olama A, Berchuck A, Berndt SI, Bezieau S, Brennan P, Brenner H, Brinton L, Caporaso N, Chan AT, Chang-Claude J, Christiani DC, Cunningham JM, Easton D, Eeles RA, Eisen T, Gala M, Gallinger SJ, Gayther SA, Goode EL, Grönberg H, Henderson BE, Houlston R, Joshi AD, Küry S, Landi MT, Le Marchand L, Muir K, Newcomb PA, Permuth-Wey J, Pharoah P, Phelan C, Potter JD, Ramus SJ, Risch H, Schildkraut J, Slattery ML, Song H, Wentzensen N, White E, Wiklund F, Zanke BW, Sellers TA, Zheng W, Chatterjee N, Amos CI, Doherty JA. Telomere structure and maintenance gene variants and risk of five cancer types. *Int J Cancer*. 2016;139(12):2655-70.
  35. Michailidou K, Hall P, Gonzalez-Neira A, Ghoussaini M, Dennis J, Milne RL, Schmidt MK, Chang-Claude J, Bojesen SE, Bolla MK, 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 TA, 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 RB, Hein R, Dahmen N, Beckman L, Meindl A, Schmutzler RK, Müller-Myhsok B, Lichtner P, Hopper JL, Southey MC, Makalic E, Schmidt DF, Uitterlinden AG, Hofman A, Hunter DJ, Chanock SJ, Vincent D, Bacot F, Tessier DC, Canisius S, Wessels LF, Haiman CA, Shah M, Luben R, Brown J, Luccarini C, Schoof N, Humphreys K, Li J, Nordestgaard BG, Nielsen SF, Flyger H, Couch FJ, Wang X, Vachon C, Stevens KN, Lambrechts D, Moisse M, Paridaens R, Christiaens MR, Rudolph A, Nickels S, Flesch-Janys D, Johnson N, Aitken Z, Aaltonen K, Heikkinen T, Broeks A, Veer LJ, van der Schoot CE, Guénel P, Truong T, Laurent-Puig P, Menegaux F, Marme F, Schneeweiss A, Sohn C, Burwinkel B, Zamora MP, Perez JI, Pita G, Alonso MR, Cox A, Brock IW, Cross SS, Reed MW, Sawyer EJ, Tomlinson I, Kerin MJ, Miller N, Henderson BE, Schumacher F, Le Marchand L, Andrulis IL, Knight JA, Glendon G, Mulligan AM; kConFab Investigators; Australian Ovarian Cancer Study Group, Lindblom A, Margolin S, Hooning MJ, Hollestelle A, van den Ouweland AM, Jager A, Bui QM, Stone J, Dite GS, Apicella C, Tsimiklis H, Giles GG, Severi G, Baglietto L, Fasching PA, Haeberle L, Ekici AB, Beckmann MW, Brenner H, Müller H, Arndt V, Stegmaier C, Swerdlow A, Ashworth A, Orr N, Jones M, Figueroa J, Lissowska J, Brinton L, Goldberg MS, 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 RA, Seynaeve C, van Asperen CJ, Jakubowska A, Lubinski J, Jaworska K, Durda K, Mannermaa A, Kataja V, Kosma VM, Hartikainen JM, Bogdanova NV, Antonenkova NN, Dörk T, Kristensen VN, Anton-Culver H, Slager S, Toland AE, Edge S, Fostira F, Kang D, Yoo KY, Noh DY, Matsuo K, Ito H, Iwata H, Sueta A, Wu AH, Tseng CC, Van Den Berg D, Stram DO, Shu XO, Lu W, Gao YT, Cai H, Teo SH, Yip CH, Phuah SY, Cornes BK, Hartman M, Miao H, Lim WY, Sng JH, Muir K, Lophatananon A, Stewart-Brown S, Siriwanarangsarn P, Shen CY, Hsiung CN, Wu PE, Ding SL, Sangrajrang S, Gaborieau V, Brennan P, McKay J, Blot WJ, Signorello LB, Cai Q, Zheng W, Deming-Halverson S, Shrubsole M, Long J, Simard J, Garcia-Closas M, Pharoah

- PD, Chenevix-Trench G, Dunning AM, Benitez J, Easton DF. Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat Genet.* 2013;45(4):353-61, 61e1-2.
36. Kersey PJ, Allen JE, Allot A, Barba M, Boddu S, Bolt BJ, Carvalho-Silva D, Christensen M, Davis P, Grabmueller C, Kumar N, Liu Z, Maurel T, Moore B, McDowall MD, Maheswari U, Naamati G, Newman V, Ong CK, Paulini M, Pedro H, Perry E, Russell M, Sparrow H, Tapanari E, Taylor K, Vullo A, Williams G, Zadissia A, Olson A, Stein J, Wei S, Tello-Ruiz M, Ware D, Luciani A, Potter S, Finn RD, Urban M, Hammond-Kosack KE, Bolser DM, De Silva N, Howe KL, Langridge N, Maslen G, Staines DM, Yates A. Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D802-D8.
  37. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-9.
  38. Caswell JL, Camarda R, Zhou AY, Huntsman S, Hu D, Brenner SE, 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(25):7421-31.
  39. National Institutes of Health (NIH). Genotype-Tissue Expression (GTEx) consortium eQTL web-browser [abgerufen am 13.10.2017 von <https://gtexportal.org/home/>].
  40. Bertram L, Bockenhoff A, Demuth I, Duzel S, Eckardt R, Li SC, Lindenberger U, Pawelec G, Siedler T, Wagner GG, Steinhagen-Thiessen E. Cohort profile: The Berlin Aging Study II (BASE-II). *Int J Epidemiol.* 2014;43(3):703-12.
  41. Gerstorf D, Bertram L, Lindenberger U, Pawelec G, Demuth I, Steinhagen-Thiessen E, Wagner GG. Editorial. *Gerontology.* 2016;62(3):311-5.
  42. Bishay K, Ory K, Lebeau J, Levalois C, Olivier MF, Chevillard S. DNA damage-related gene expression as biomarkers to assess cellular response after gamma irradiation of a human lymphoblastoid cell line. *Oncogene.* 2000;19(7):916-23.
  43. 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;72:93-8.
  44. 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(3):330-6.
  45. Mason JM, Sekiguchi JM. Snm1B/Apollo functions in the Fanconi anemia pathway in response to DNA interstrand crosslinks. *Hum Mol Genet.* 2011;20(13):2549-59.
  46. Allerston CK, Vollmar M, Krojer T, Pike ACW, Newman JA, Carpenter E, Quigley A, Mahajan P, von Delft F, Bountra C, Arrowsmith CH, Edwards A, Gileadi O. Crystal structure of human 5' exonuclease Apollo. 2015 [abgerufen am 13.10.2017 von <https://www.rcsb.org/structure/5AHO>].
  47. Freibaum BD, Counter CM. The protein hSnm1B is stabilized when bound to the telomere-binding protein TRF2. *J Biol Chem.* 2008;283(35):23671-6.
  48. Dorling L, Barnett GC, Michailidou K, Coles CE, Burnet NG, Yarnold J, Elliott RM, Dunning AM, Pharoah PD, West CM. Patients with a High Polygenic Risk of Breast Cancer do not have An Increased Risk of Radiotherapy Toxicity. *Clin Cancer Res.* 2016;22(6):1413-20.
  49. Dorling L, Kar S, Michailidou K, Hiller L, Vallier AL, Ingle S, Hardy R, Bowden SJ, Dunn JA, Twelves C, Poole CJ, Caldas C, Earl HM, Pharoah PD, Abraham JE.

- The Relationship between Common Genetic Markers of Breast Cancer Risk and Chemotherapy-Induced Toxicity: A Case-Control Study. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158984.
50. Song X, Wang S, Hong X, Li X, Zhao X, Huai C, Chen H, Gao Z, Qian J, Wang J, Han B, Bai C, Li Q, Wu J, Lu D. Single nucleotide polymorphisms of nucleotide excision repair pathway are significantly associated with outcomes of platinum-based chemotherapy in lung cancer. *Sci Rep*. 2017;7(1):11785.
  51. Li X, Shao M, Wang S, Zhao X, Chen H, Qian J, Song X, Wang J, Jin L, Wu J, Li Q, Bai C, Han B, Gao Z, Lu D. Heterozygote advantage of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms on clinical outcomes in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with platinum-based chemotherapy. *Tumour Biol*. 2014;35(11):11159-70.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sarah Herwest, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die *hSNM1B/Apollo*-Variante rs11552449 ist mit zellulärer Sensitivität gegenüber Mitomycin C und ionisierender Strahlung assoziiert“ 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](http://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.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben ist. 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.“

Berlin, den 22.10.2019

---

Unterschrift

## Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Sarah Herwest hatte folgenden Anteil an der Publikation

Herwest S, Albers C, Schmiester M, Salewsky B, Hopfenmuller 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;72:93-8.

- Planung des experimentellen Aufbaus gemeinsam mit Prof. Dr. Ilja Demuth und Bastian Salewsky
- Datenbank-Recherchen zum SNP rs11552449 (z.B. Ensembl)
- Durchführung der in silico-Analysen mittels PolyPhen-2, gemeinsam mit Prof. Dr. Ilja Demuth
- Vorbereitung der lymphoblastoiden Zelllinien für die DNA-Extraktion (N=69)
- Anteil an der Durchführung der DNA-Extraktion (N=16)
- Direkte Genotypisierung der lymphoblastoiden Zelllinien bis auf die kapillarelektrophoretische Trennung (N=69)
- Durchführung der MMC-Vitalitätsexperimente
- Etablierung und Durchführung der IR-Vitalitätsexperimente
- Durchführung der RNA-Extraktion, RT-PCR und qRT-PCR (N=24)
- Hauptanteil an der statistischen Auswertung der Viabilitäts-, qRT-PCR- und rTL-Daten
- Erstellung aller Tabellen und Grafiken
- Hauptanteil am Verfassen des Manuskripts (Erstellung der ersten Manuskriptversion und Überarbeitung im Zuge der Revision)

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift der Doktorandin



Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI

Selected Categories: **"TOXICOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS

**Gesamtanzahl: 93 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Annual Review of Pharmacology and Toxicology	7,820	12.103	0.009900
2	ENVIRONMENTAL HEALTH PERSPECTIVES	42,165	8.049	0.039510
3	Particle and Fibre Toxicology	4,174	6.561	0.006860
4	JOURNAL OF TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL HEALTH-PART B-CRITICAL REVIEWS	1,753	6.436	0.001470
5	MUTATION RESEARCH-REVIEWS IN MUTATION RESEARCH	3,566	6.081	0.004090
6	Nanotoxicology	4,675	5.955	0.007920
7	ARCHIVES OF TOXICOLOGY	10,270	5.741	0.015560
8	Reviews of Environmental Contamination and Toxicology	2,185	5.462	0.001550
9	CELL BIOLOGY AND TOXICOLOGY	1,749	5.097	0.001360
10	DRUGS	10,520	4.993	0.013240
11	CRITICAL REVIEWS IN TOXICOLOGY	4,153	4.771	0.003440
12	ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY	20,697	4.527	0.022570
13	CLINICAL TOXICOLOGY	3,750	4.398	0.007070
14	Toxins	7,709	3.895	0.015930
15	Toxin Reviews	600	3.840	0.000810
16	INFLAMMOPHARMACOLOGY	1,522	3.838	0.001770
17	AQUATIC TOXICOLOGY	15,194	3.794	0.014410
18	FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY	26,870	3.775	0.022550

19	Mycotoxin Research	981	3.741	0.001160
20	DNA REPAIR	5,058	3.711	0.011920

Abgerufen am 06.09.2019

## Druckexemplar der ausgewählten Publikation

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;72:93-8.

<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.09.004>

## Supplementary Data

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;72:93-8.

<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.09.004>

## Lebenslauf

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

## Publikationsliste

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;72:93-8.

<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.09.004>

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zu der Entstehung dieser Dissertation beigetragen haben und mich in unterschiedlichster Art und Weise bei der Fertigstellung unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Ilja Demuth, der mir das Thema zur Verfügung stellte, mich in jeglichen Situationen hervorragend betreut hat und jederzeit als Ansprechpartner zur Verfügung stand.

Mein weiterer Dank gilt Bastian Salewsky und Gabriele Hildebrand für die großartige technische und moralische Unterstützung im Laboralltag.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Koautoren und Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Biologie des Alterns“ für die tolle Zusammenarbeit und kritische Auseinandersetzung mit dieser Arbeit.

Meinen Freunden und Marc Nesch danke ich innig für die liebevolle und motivierende Unterstützung und konstruktiven Anmerkungen.

Vielen lieben Dank euch allen!