

Defining novel functions of the genome
maintenance factor SLX4IP



Doctoral thesis
for
the award of the doctoral degree
of the Faculty of Mathematics and Natural Sciences
of the University of Cologne

submitted by
Jessica Spindler
in the year 2025

Zusammenfassung

Die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität ist entscheidend für das Überleben von Organismen und die fehlerfreie Weitergabe genetischer Informationen an die nächsten Generationen. Dennoch wird die Stabilität des Genoms ständig durch endogene und exogene Belastungen bedroht, die die zelluläre Homöostase und die Gesundheit des Organismus gefährden. Um das Genom vor den gefährlichen Auswirkungen von DNA-Schäden zu schützen, haben Zellen hochspezialisierte Mechanismen entwickelt, die zusammenfassend als DNA-Schadensantwort (DNA Damage Response, DDR) bezeichnet werden. Eine fehlerhafte DNA-Schadensantwort führt zu erhöhter genomischer Instabilität und ist in der Regel mit neurologischen und immunologischen Defekten, altersbedingten Erkrankungen und Krebs assoziiert – was die Notwendigkeit unterstreicht, ihre zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu verstehen.

SLX4IP ist ein Protein, das als Interaktionspartner wichtiger DNA-Reparaturproteine identifiziert wurde, dessen molekulare Funktionen jedoch lange Zeit unbekannt blieben. In den letzten Jahren wurde es eingehend als Regulator des sogenannten *Alternative Lengthening of Telomeres*-Signalwegs (ALT) charakterisiert. ALT ist ein Mechanismus zur Telomererhaltung, bei dem Krebszellen DNA-Reparaturproteine zweckentfremden, um ihre Telomere über einen rekombinationsbasierten Mechanismus zu verlängern und so replikative Immortalität zu erlangen. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass SLX4IP die Prozessierung von telomerischen Rekombinations-Intermediaten reguliert. Neben dieser Telomer-spezifischen Funktion im ALT-Mechanismus sowie ersten Hinweisen auf eine Rolle bei der Reparatur von *DNA Interstrand Crosslinks* und der Stabilität von sogenannten *Common Fragile Sites* ist das gesamte Wirkungsspektrum von SLX4IP und seine zugrunde liegenden molekularen Mechanismen – insbesondere im physiologischen Kontext – bislang weitgehend unerforscht. Daher war das übergeordnete Ziel dieser Studie, neue Funktionen von SLX4IP bei der Aufrechterhaltung des Genoms, sowohl im ALT-Kontext als auch darüber hinaus, zu identifizieren und zu charakterisieren.

Hier zeige ich, dass SLX4IP zusätzlich zu seiner etablierten Funktion bei der Regulation von Rekombination auch an der Antwort auf Replikationsstress an ALT-Telomeren beteiligt ist. Konkret wirkt SLX4IP der BLM-abhängigen Entwindung unligierter Okazaki-Fragmente entgegen und begrenzt dadurch den Replikationsstress, der vom Folgestrang ausgeht. Darüber hinaus wirkt SLX4IP in

einem parallelen Signalweg zu FANCM, um BLM-induzierten Replikationsstress zu vermindern, und offenbart so eine weitere Komplexität des *ALT*-Signalnetzwerks.

Die hier präsentierten Daten legen zudem nahe, dass die Regulation der Replikationsstressantwort durch SLX4IP nicht auf *ALT*-Telomere beschränkt ist, sondern sich auch auf nicht-*ALT*- und nicht-telomerische Kontexte an bestimmten Regionen entlang des gesamten Genoms erstreckt.

Meine Interaktomanalyse von SLX4IP weist zudem auf eine breitere Beteiligung an der Erhaltung der Genomstabilität hin. Wir zeigen, dass SLX4IP mit dem DNA-Endresektionsfaktor CtIP interagiert und potenzielle Interaktionen mit Faktoren aufweist, die an der Chromatinmodifikation und Nukleosomen-Assemblierung beteiligt sind. Darüber hinaus habe ich Proteine der sogenannten *Mismatch*-Reparatur (MMR) als mögliche Bindungspartner identifiziert und erste weiterführende Experimente durchgeführt, die eine gemeinsame Funktion von SLX4IP mit der MMR-Maschinerie unterstützen.

Zusammenfassend liefert diese Studie neue Erkenntnisse zur Funktion von SLX4IP in der Genomstabilisierung. Insbesondere zeigen wir, dass SLX4IP ein Regulator der Replikationsstressantwort an *ALT*-Telomeren und, höchstwahrscheinlich, an weiteren genomischen Loci ist. Zudem wurden neue mögliche Rollen von SLX4IP bei der DNA-Endresektion, der Regulation der Chromatinstruktur und der *Mismatch*-Reparatur aufgezeigt, die als Grundlage für detaillierte Folgestudien dienen werden.

Abstract

The maintenance of genomic integrity is crucial for the survival of organisms and the intact propagation of genetic information to next generations. Nonetheless, genome stability is constantly challenged by endogenous and exogenous stresses putting cellular homeostasis and organismal health at risk. To protect the genome from the harmful effects of DNA damage, cells have evolved highly sophisticated mechanisms that are collectively known as the DNA damage response. A faulty DNA damage response results in heightened genome instability and is usually associated with neurological and immunological defects, age-related diseases and cancer, underscoring the necessity to understand its underlying molecular mechanisms.

SLX4IP is a protein that was detected as an interactor of key DNA repair proteins, but its molecular functions remained unknown for a long time. In the last few years, it was extensively characterized as a regulator of the Alternative lengthening of telomeres pathway, shortly ALT. ALT is a telomere maintenance mechanism in which cancer cells co-opt DNA repair proteins to elongate their telomeres by a recombination-based mechanism and thereby achieve replicative immortality. SLX4IP in particular, was demonstrated to regulate the processing of telomere recombination intermediates. Besides this telomere-specific function in ALT and first implications in interstrand crosslink repair and common fragile site stability, the full spectrum of SLX4IP's roles and the underlying molecular mechanisms, especially in the physiological context, remain largely undefined. Therefore, the overarching aim of this study was to identify and characterize novel functions of SLX4IP in genome maintenance in ALT and beyond.

Here, I report that SLX4IP is involved in the replication stress response at ALT telomeres in addition to its established function in regulating recombination. Specifically, SLX4IP counteracts BLM-dependent unwinding of unligated Okazaki fragments to restrict replication stress arising from the lagging strand. Moreover, SLX4IP acts in a parallel pathway to FANCM to mitigate BLM-induced replication stress unveiling another layer of complexity of the ALT network.

The data presented in this study also implicate that the regulation of the replication stress response by SLX4IP is not restricted to ALT telomeres but extends to the non-ALT and non-telomeric context at defined regions across the genome. Furthermore, my interactome analysis of SLX4IP points to a broader range of its involvement in genome maintenance.

We show that SLX4IP interacts with the DNA end resection factor CtIP and detected potential interactions with factors mediating chromatin modification and nucleosome assembly. Moreover, I identified mismatch repair proteins as candidate interactors and performed first subsequent experiments that support a joint function of SLX4IP with the MMR machinery.

In summary, this study provides new insights into the function of SLX4IP in genome maintenance. In particular, we show that SLX4IP is a regulator of the replication stress response at ALT telomeres and beyond. Furthermore, new potential implications of SLX4IP in DNA end resection, chromatin structure regulation and mismatch repair have been uncovered and will serve as a foundation for detailed follow-up studies.