

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

Zu den Mechanismen der Nierendegeneration durch die Akkumulation von DNA-Schäden und R-Loops

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Janna Bredow
aus Bielefeld

promoviert am 24. April 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Professor Dr. med. B. Schermer
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. B. Schumacher

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Durchführung der Promotionsarbeit ist von Dr. Gisela Slaats und Prof. Dr. Bernhard Schermer betreut worden. Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch verschiedene Mitarbeiterinnen/Mitarbeiter des *NephroLabs* Köln von mir selbst ausgeführt worden. Die massenspektrometrische Messung der Proben und initiale Verarbeitung der entstandenen Daten erfolgte durch Mitarbeiter der *CECAD Proteomics Facility*; die Opferung der Versuchstiere und andere unmittelbare Arbeit an und mit lebenden Mäusen erfolgte durch die *in vivo Research Facility* des CECAD und Dr. Gisela Slaats.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Hamburg, den 01.10.2024

Unterschrift: _____

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich beim Team des gesamten NephroLabs Köln bedanken, die mich voller Begeisterung und mit geballtem Fachwissen in die Welt der experimentellen Forschung aufgenommen und eingearbeitet haben. Dank euch bin jeden Tag gerne ins CECAD gekommen und durfte neben den zahlreichen Fertigkeiten für experimentelle Methoden auch eine ganz besondere wissenschaftliche Zusammenarbeit bei *Progressreports* und *JournalClubs* miterleben. Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Bernhard Schermer, der mir als Doktorvater die Möglichkeit gab, in seiner Forschungsgruppe an einem so vielfältigen Projekt mitzuarbeiten und bei aussichtslosen gedanklichen Sackgassen immer noch eine grandiose Idee für weiterführende Experimente hervorholte. Dr. Gisela Slaats zeigte mir nicht nur, wie man von einer Hypothese über zahlreiche Experimente zu Ergebnissen kommt und diese immer wieder reevaluiert, sondern lebte mir an der Laborbank tagtäglich eine bewundernswerte Ausdauer und Zielstrebigkeit vor, die mich motivierten, an mich zu glauben und mein Forschungsprojekt zu Ende zu bringen. Ich freue mich sehr, dass ich auf eine zuverlässige und erfolgreiche Zusammenarbeit vom ersten bis zum letzten Tag zurückblicken kann. Dank je wel! Fachliche Expertise bekam ich nicht nur von den Mitarbeitern des NephroLabs, sondern auch von den hilfsbereiten Teams der *Proteomics*- und der *ImagingFacility*. Auch wenn die Lichtverhältnisse beim Ablichten der Zellen zugegebenermaßen gewöhnungsbedürftig sind, habe ich meine Zeit an den Mikroskopen in faszinierender Erinnerung behalten.

Auch durfte ich erfahren, dass in einem Labor nicht jeder allein vor sich hinarbeitet, sondern dass Forschung davon lebt, dass man voneinander lernt. Holprige Phasen und lange Labornächte steht man am besten gemeinsam durch und das schweiß zusammen. So wurden über die Zeit aus einigen Mitdotorandinnen und Mitdotoranden sehr gute Freunde. Ich bin glücklich, dass diese Freundschaften über unsere Zeit im Labor hinaus fortbestehen und ich mich heute über weitaus mehr als Doktorarbeitsthemen mit euch austauschen kann.

Ein sehr großes Dankeschön geht nun zuletzt an meine Familie, Freundinnen und Freunde. Vor allem während des Schreibprozesses - ob in Köln, Bielefeld, Frankfurt oder Hamburg - bekam ich von euch tatkräftige Unterstützung in Form von Snacks, Vollverpflegung oder gutem Zureden. Ich konnte mich jederzeit auf euch verlassen und habe von euch Verständnis, Zeit und Rückendeckung bekommen. Damit habt ihr mich immer wieder aufgemuntert und motiviert und somit einen großen Teil dazu beigetragen, dass ich das Projekt Doktorarbeit meistern konnte. Danke!

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1 ZUSAMMENFASSUNG	12
2 EINLEITUNG	13
2.1 Die Niere	13
2.2 Chronische Nierenerkrankungen	13
2.3 Die Ziliopathie Nephronophthise	13
2.4 Alterungsprozesse der Niere	14
2.5 Renale Fibrose	14
2.6 Inflammation, Zelltod und Seneszenz – Ursachen oder Folgen der Fibrose?	15
2.6.1 Inflammation	16
2.6.2 Zelltod	17
2.6.2.1 Apoptose	17
2.6.2.2 Regulierte Nekrose	17
2.6.3 Seneszenz	18
2.7 DNA-Schäden	18
2.7.1 Ursachen und Folgen von DNA-Schädigungen	18
2.7.2 Zentrale Komponenten der <i>DNA-Damage Response</i>	19
2.8 AATF im <i>DDR-Signaling</i>	20
2.9 DNA-Reparaturmechanismen	21
2.9.1 Nukleotidexzisionsreparatur und die Rolle von ERCC1	22
2.10 R-loops	23
2.11 Zielsetzung der Arbeit	27
3 MATERIAL UND METHODEN	28
3.1 Verbrauchsmaterialien	28
3.2 Ausstattung/Laborgeräte	29
3.3 Softwares und Programme	31
3.4 Chemikalien/Reagenzien und Lösungen	31
3.5 Kits/Assays	34
3.6 Primäre Antikörper	34
3.7 Sekundäre Antikörper	35

3.8	Antikörperverdünnung	35
3.9	Zellkultur	35
3.9.1	Zellen einfrieren und auftauen	37
3.9.2	Transfektionen durch Lipofektion zur RNA-Interferenz	37
3.9.3	Induktion der RNaseH1-GFP mit Hilfe des T-REx™ Systems	38
3.9.4	Induktion von DNA-Schäden	38
3.9.5	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	38
3.9.5.1	Immunfluoreszenzfärbung U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP mit AATF-Antikörper	39
3.9.5.2	Immunfluoreszenzfärbung U2OS AATF/GFP.GFP TALEN mit S9.6 und AATF	39
3.10	Protein Biochemie	40
3.10.1	Zellen ernten und lysieren mit RIPA-Puffer	40
3.10.2	Proteinkonzentrationsmessung	40
3.10.3	SDS Polyacrylamid Gel Elektrophorese und Immunoblotting	41
3.10.4	Immunopräzipitation für die Massenspektrometrie	42
3.10.5	Vorbereitung der Proben auf die Massenspektrometrie	43
3.10.6	Stage Tipping	43
3.10.7	Massenspektrometrie und Auswertung	44
3.11	Mausarbeit	44
3.11.1	Paraffinschnittherstellung	45
3.11.2	Immunhistochemie	45
3.11.2.1	Antikörperfärbungen	45
3.11.2.2	PAS-Reaktion	46
3.12	Arbeit mit Nukleinsäuren	46
3.12.1	RNA Isolierung	46
3.12.2	cDNA Synthese und quantitative <i>real time</i> PCR (qPCR) Analyse	47
3.12.2.1	Oligonukleotide/qPCR Primer	48
4	ERGEBNISSE	49
4.1	Das Vorliegen von AATF im Kontext von R-loops	49
4.1.1	Methodik zur Untersuchung von R-loops	49
4.1.2	Analyse des subzellulären Verteilungsmusters und Kolo-kalisation des <i>Apoptosis Antagonizing Transcription Factors</i> (AATF) neben R-loop-Komplexen	50
4.1.3	R-loop-Interaktom in humanen U2OS Zellen (hU2OS)	54
4.1.3.1	Veränderungen des R-loop-Komplexes durch den Verlust von AATF	55
4.1.4	R-loops und Zilien	58
4.2	Die beeinträchtigte <i>DNA-Damage Response</i> in Versuchstieren mit tubulärem <i>Ercc1 Knockout</i> führt zu phänotypischen Veränderungen, Apoptose, Seneszenz und dem SASP der Nieren	62
4.2.1	Eingeschränkte Nierenfunktion und veränderte Gewebearchitektur in Versuchstieren mit tubulärem <i>Ercc1 Knockout</i>	62
4.2.2	Expression Seneszenz-assoziiierter Gene in der Niere von Versuchstieren mit tubulärem <i>Ercc1 Knockout</i>	63
4.2.3	Expression Seneszenz-assoziiierter Proteine in histologischen Schnitten von Mäusenieren mit tubulusepithelspezifischem <i>Ercc1 Knockout</i>	65
4.2.4	Detektion apoptotischer Zellen in histologischen Schnitten von Mäusenieren mit tubulusepithelspezifischem <i>Ercc1 Knockout</i>	66

5	DISKUSSION	67
5.1	Die Rolle AATFs in der Regulation von R-loops und <i>DNA-Damage</i> : Interaktionen und neue Perspektiven	67
5.2	Aufdeckung neuer und bereits bekannter R-loop assoziierter Proteinkomponenten in humanen U2OS Zellen	69
5.3	Veränderungen des R-loop-Komplexes durch den Verlust von AATF	69
5.4	R-loops in ziliären und zentrosomalen Signalwegen	70
5.5	Der Zusammenhang zwischen <i>DNA-Damage</i> Reparaturdefekten und Nierenfibrose	72
5.6	Potenzielle Therapieansätze bei CKD, Ziliopathien und renaler Fibrose	74
6	LITERATURVERZEICHNIS	77
7	ANHANG	85
7.1	Ergänzende Tabellen	85
7.2	Abbildungsverzeichnis	90
7.3	Tabellenverzeichnis	91

Abkürzungsverzeichnis

% v/v	Volumenkonzentration
% w/v	Gewichtskonzentration
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AATF	<i>Apoptosis Antagonizing Transcription Factor</i>
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACN	Acetonitril
ACTB	Actin-β
AID	Aktivierungs-induzierte Cytidin-Desaminase
APS	Ammoniumpersulfat
AQR	Aquarius
ATM	<i>Ataxia teleangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia teleangiectasia and Rad-3 related</i>
Bak	<i>Bcl-2 antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated protein X</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
C/EBP-β	CCAAT/Enhancer-bindende-Proteine
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CDK	Zyclin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEP164	Zentrosomales Protein 164 kDa
Chk1 und 2	Checkpointkinase 1 und 2
CKD	Chronische Nierenerkrankung(en)
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus
CSB	Cockayne Syndrom Gruppe B
CSK	zytoskelettal
CSR	Antikörperklassenwechsel (<i>Class Switch Recombination</i>)
Ctrl	Kontrolle (<i>Control</i>)
DAMP	<i>Damage associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DDB2	<i>Damage Specific DNA Binding Protein 2</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DDR	<i>DNA-Damage Response</i>
DDX21	<i>Death-box Helicase</i>
DEFA3	Neutrophil Defensin 3/ Defensin alpha 3
DHX9	ATP-abhängige RNA-Helikase A
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAM-1	DNAX Akzessorisches Molekül-1
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol

ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EPO	Erythropoetin
ERCC1	<i>Excision Repair Cross-Complementation Group 1</i>
EtOH	Ethanol
FADD	FAS-assoziertes Todesdomänenprotein
FBS	Fetales bovines Serum
fl	flankiert (<i>floxed</i>)
fl/fl	flox/flox
FLNA	Filamin A
Foxo4	<i>Forkhead-Box-Protein O4</i>
g	Gramm
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
GG-NER	Globale genomische Nukleotidexzisionsreparatur
GSDMD	Gasdermin D
h	human
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HR	homologe Rekombination
HRP	Meerrettichperoxidase
IAA	Jodacetamid
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IGHV3-74	Ig heavy chain V-III region JON
IGLV2-8	Ig lamda chain-V-II region MGC
IL	Interleukin
IMCD3	<i>Inner medullary collecting duct 3</i> Zelllinie
IP	Immunopräzipitation
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
m	murin
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MK2	<i>Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2</i>
ml	Milliliter
MLKL	<i>Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase</i>
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MRE11	Doppelstrangbruch Reparaturprotein MRE11
MRLC3	Myosin regulatorische Leichtkette 3
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
Na ₂ HPO ₄	Natrium(di-)hydrogenphosphat Heptahydrat
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
Na-DOC	Natriumdeoxycholat

NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NDS	<i>Normal Donkey Serum</i>
NEAT 1	<i>Nuclear paraspeckle assembly transcript 1</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF-κB	Nukleärer Faktor ' <i>kappa-light-chain-enhancer</i> ' aktivierter B-Zellen
ng	Nanogramm
NGDN	Neuroguidin
NHEJ	Nichthomologe End-zu-End-Verknüpfung
NKG2D	<i>Natural killer group 2 member D</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NOL10	Nucleolar protein 10
NPH(-RC)	Nephronophthise(- <i>related Ciliopathies</i>)
NPHP1	Nephrozystin-1
NPHP9	Nephronophthisisprotein 9
NRAGE	<i>Neutrophilin Receptor Interacting MRAGE homolog</i>
P53	Zelluläres Tumorantigen p53
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PAS	Periodsäure Schiff
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PIM	Protease Inhibitor Mix
PLK1	Polo-ähnliche Kinase 1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PUMA	<i>P53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
(q)PCR	(quantitative) Polymerasekettenreaktion
RAD51	DNA Reparatur Protein RAD51
Rb	Retinoblastom-Protein
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay(-Puffer)
RIPK1/3	Rezeptor-interagierende Serin/Threonin-Proteinkinase 1/3
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
RPA	Replikations-Protein A
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RUVBL1	<i>RuvB Like AAA ATPase 1</i>
s	Sekunden
SAFB2	<i>Scaffold Attachment Factor B2</i>
SAMHD1	<i>SAM And HD Domain Containing Deoxynucleoside Triphosphate</i>
SASP	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp
SDS	Natriumdodecylsulfat
SETX	Senataxin
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
siRNA	<i>Small interfering</i> Ribonukleinsäure
SIRT1	Sirtuin-1
snoRNA	<i>Small nucleolar</i> Ribonukleinsäure
s. o.	Siehe oben
SRN	Synchronisierte regulierte Nekrose
SRSF1	Serin und Arginin reicher Spleißfaktor 1
SSB	Einzelstrangbruch
ssDNA	<i>Single strain</i> Desoxyribonukleinsäure

STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
STED	Stimulierte Emissionsdepletion
TALEN	<i>Transcription Activator-like Effector Nuclease</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TC-NER	Transkriptionsgekoppelte Nukleotidexzisionsreparatur
TCR	Transkriptionsgekoppelte Reparatur
TECR	Trans-2,3-Enoyl-CoA Reduktase
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
tg	transgen
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TLS	Transläsionale Synthese
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
T-REx™	Tetrazyklin-reguliertes murines Expressionssystem
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten (<i>Units</i>)
u. a.	Und andere/unter anderem
U2OS	<i>Bone Osteosarcoma Epithelial Cells</i>
UBA5	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
VE	vollentsalzt
WHSC1	Wolf-Hirschhorn Syndrom Kandidat 1
Wnt	<i>Wg (Wingless) and Int-Gen</i>
Wt	Wildtyp
XAB2	XPA Bindeprotein 2
XPC	<i>Xeroderma Pigmentosum, complementation group C</i>
XPF/G	<i>Xeroderma Pigmentosum Protein F/G</i>
YWHAG	14-3-3 gamma
YWHAQ	14-3-3 theta
ZNF423	Zink Finger Protein 423

1 Zusammenfassung

Bahnbrechende Studien der letzten Jahrzehnte haben DNA-Schäden und ihr Reparaturnetzwerk in der Pathogenese onkologischer und degenerativer Krankheiten wie chronischer Nierenerkrankungen ins Blickfeld gerückt¹⁻⁷. Dabei wurden R-loops als bemerkenswerte Mediatorstrukturen beschrieben⁸⁻¹¹.

Die vorliegende Arbeit basiert auf dem Befund, dass der nierenspezifische Verlust sowohl von *Ercc1*, einem zentralen DNA-Reparaturprotein, als auch von *Aatf*, einem Schlüsselfaktor der p53 abhängigen *DNA-Damage Response*, in der Maus zur fibrotischen Degeneration der Niere führt.

Da der Verlust von *Aatf* die Entstehung von R-Loops im Nierenepithel fördert, hat sich diese Arbeit zunächst mit der Frage beschäftigt, welche Folgen der Verlust von *Aatf* im R-loop-*Signaling* Netzwerk hervorruft. Durch Immunfluoreszenzfärbungen und die massenspektrometrische Analyse humaner U2OS Zellen konnten neue Erkenntnisse über Auswirkungen des AATF-Verlusts auf die Zusammensetzung von R-loop-assoziierten Proteinkomplexen und die Funktion und Lokalisation von AATF und R-loops in der Zelle gewonnen werden. Dabei wurden unter anderem an ribosomalen und genregulatorischen Vorgängen beteiligte Proteine als potenzielle R-loop-Komponenten identifiziert. Für die experimentelle Analyse von R-loops unter Replikationsstress wurde eine induzierbare genetisch veränderte Ribonuklease H1 (D210N) eingesetzt. In erweiterten Interaktomanalysen in humanen U2OS Zellen konnten neue Verknüpfungen zwischen R-loops und ziliären Proteinen, welche an der Pathogenese von Ziliopathien beteiligt sein könnten, aufgedeckt werden. Proteine des kanonischen WNT-Signalwegs scheinen ein Teil dieser Verbindung zu sein. Es handelt sich hierbei um einen vielversprechenden Ansatz zukünftiger Untersuchungen zum weiteren Verständnis der phänotypischen Merkmale und der pathophysiologischen Entstehung von Ziliopathien.

Darüber hinaus wurden auch die *in vivo*-Konsequenzen der Akkumulation von DNA-Schäden in der Niere untersucht. Um die Frage zu beantworten, welche Mechanismen zum degenerativen Prozess der Fibrosierung der Niere führen, wurden Untersuchungen an einem nierenspezifischen *Ercc1*-defizienten Mausmodell durchgeführt. In diesem Modell ist *Ercc1* im distalen Teil des Nephrons deletiert, was in einer Nierenfibrose resultiert. Anhand steigender Retentionsparameter und biometrischer Daten wie dem Körpergewicht ließ sich bereits phänotypisch eine Krankheitsprogression erahnen. Mittels qPCR konnte eine erhöhte Expression Seneszenz-assoziiierter Gene in Nieren von 8, 12 und 16 Wochen alten Mäusen festgestellt werden, welche auf Proteinebene in histologischen Schnitten weiter untersucht wurde. Die Daten zeigen weiterhin, dass neben Seneszenz auch regulierter Zelltod an der Fibrogenese beteiligt ist.

Die durch diese Arbeit gewonnenen Ergebnisse und Erkenntnisse liefern interessante neue Anknüpfungspunkte in den Forschungsbereichen der *DNA-Damage Response* und R-loops, der Pathogenese fibrotischer Nierenerkrankungen und renaler Ziliopathien, sowie zu möglichen Verbindungen zwischen diesen beiden Pathologien.

2 Einleitung

2.1 Die Niere

Nieren sind paarig im Retroperitoneum angelegte, zum Urogenitaltrakt gehörende Organe und verantwortlich für diverse essenzielle Funktionen des Körpers. Dazu gehören unter anderem die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, die Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts, des Blutdrucks und des Säure-Basen-Haushalts, sowie endokrine Funktionen und die Produktion von Erythropoetin und anderen Hormonen. Um diesen Aufgaben nachzukommen, hat die Niere einen komplexen Aufbau und wird als eines der stoffwechselaktivsten Organe des Körpers mit 20% des Herzzeitvolumens versorgt^{12,13}.

Die kleinste Funktionseinheit der Niere ist das Nephron, bestehend aus je einem Glomerulum und dem sich anschließendem Tubulussystem. Jede Niere besitzt ca. 1 Million Nephrone. Tubuli und Glomeruli bestehen aus verschiedensten Zellen, die aufeinander abgestimmt arbeiten und miteinander kommunizieren¹⁴. Defekte im Bereich der Niere wirken sich durch ihre zentrale Rolle im Stoffwechsel und als Ausscheidungsorgan oft auf den ganzen Organismus aus. Umgekehrt ist die Niere bei Systemerkrankungen häufig stark mitbetroffen.

2.2 Chronische Nierenerkrankungen

Chronische Erkrankungen der Nieren (CKD) sind häufig und durch die Assoziation mit höherem Lebensalter eine weltweit wachsende Herausforderung für die Gesundheitssysteme. Aktuell leiden 9,1% der Weltbevölkerung an einer CKD. Die durchschnittliche Prävalenz stieg in den letzten 30 Jahren um 29,3%¹⁵. Dies lässt sich auch auf die demographische Entwicklung und den Anstieg des durchschnittlichen Lebensalters zurückführen¹⁶. Neben der Prävalenz stieg auch die Mortalität um 41,5%¹⁵. CKD standen bereits im Jahr 2017 mit 4,6% aller Todesfälle an zwölfter Stelle der global häufigsten Todesursachen¹⁷. Wichtige begünstigende Faktoren für die CKD sind Hypertonie und Diabetes¹⁸.

Während CKD häufig ist, sind die einzelnen Erkrankungen, die zur CKD führen, oft recht selten. Zu diesen Erkrankungen gehört die Gruppe der sogenannten Ziliopathien. Als Ziliopathien bezeichnet man eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die auf den Funktionsverlust primärer Zilien zurückzuführen ist. Primäre Zilien sind antennen-ähnliche sensorische Organellen auf der Oberfläche vieler Zelltypen, die als Signalplattform für eine Vielzahl regulatorischer Signalwege dienen. Obwohl genetische Veränderungen dieser Organellen den gesamten Körper betreffen und es sich dabei folglich um Systemerkrankungen handelt, dominiert bei vielen der monogenetischen Krankheitsbilder ein renaler Phänotyp. Dieser weist je nach vorliegender Mutation eine unterschiedliche Morphologie auf. So kann es in unterschiedlichem Ausmaß zur Ausbildung von Zysten, zur Hyperproliferation, zur Fibrosierung oder zur Degeneration des Nierengewebes kommen¹⁹.

2.3 Die Ziliopathie Nephronophthise

Die Fibrosierung des Nierengewebes ist vor allem bei der Nephronophthise (NPH), einer pädiatrischen, autosomal-rezessiv vererbten, zystischen Nierenerkrankung ein zentraler Krankheitsaspekt. Diese Ziliopathie ist die häufigste angeborene Ursache eines terminalen Nierenversagens im Kindesalter. Bisher wurden Mutationen in über 20 verschiedenen Genen als Ursache dieses Krankheitsbildes entdeckt²⁰. Den mutierten Genen ist gemeinsam, dass sie fast alle für ziliär lokalisierte Proteine kodieren. Zilien sind sensorische Organellen, die die Signale aus der Zellumgebung in die Zelle weiterleiten und zusätzlich mit dem Zellzyklus

verknüpft sind²¹. Welche Rolle die aus den Mutationen resultierende ziliäre Dysfunktion während der Fibrogenese spielt, ist noch nicht hinreichend geklärt.

Das klinische Bild der NPH ist charakterisiert durch Polyurie, Polydipsie, sekundäre Enuresis, Anämie und Wachstumsretardierung. Bei 15% der Patienten kommt es außerdem zu extrarenalen Symptomen, welche Augen, Leber, Knochen und das zentrale Nervensystem betreffen können. Hier handelt es sich meist um sogenannte NPH-verwandte Ziliopathien (*NPH-related ciliopathies*; NPH-RC)²². Dazu zählen unter anderem das Senior-Løken Syndrom, das Alströmsyndrom, das Bardet Biedl Syndrom und das Joubert Syndrom sowie schwerere Formen wie das Jeune Syndrom oder das Meckel Gruber Syndrom. Klinisch lässt sich die NPH an veränderten Laborparametern, welche die zurückgehende Nierenfunktion anzeigen, und sonographisch feststellen. Im Ultraschall zeigen sich bei 50% der Patienten kleine bis normal große echodichte Nieren mit Zysten am kortikomedullären Übergang. Dies entspricht dem histologischen Korrelat, welches neben Zysten und diffuser interstitieller Fibrose auch Veränderungen der tubulären Basalmembran, Tubulusatrophie und chronische Inflammation des Gewebes aufweist^{23,24}. Eine Biopsie oder eine genetische Untersuchung sind für die Diagnosestellung in der Regel nicht erforderlich.

Obwohl sich eine Vielzahl an Studien mit NPH und NPH-RC beschäftigt und inzwischen einige Ansätze und Ideen für die symptomatische Behandlung dieser Erkrankungen existieren, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch keine ursachenbekämpfende Therapie für Menschen verfügbar^{25,26}, so dass die Betroffenen auf regelmäßige Dialyse oder eine Nierentransplantation angewiesen sind.

2.4 Alterungsprozesse der Niere

Auch im physiologischen Alterungsprozess der Niere lassen sich strukturelle Veränderungen, die Parallelen zu den Veränderungen bei CKD aufweisen, feststellen. Mit fortschreitendem Alter nehmen das funktionelle Nierenvolumen und die Anzahl funktionsfähiger Nephrone und dadurch die glomeruläre Filtrationsrate ab. Gleichermaßen sinken zunehmend die Stresstoleranz und die Effizienz renaler DNA-Reparaturmechanismen. Zudem lässt sich im peritubulären Gewebe ein Verlust von Kapillaren beobachten, welcher ebenfalls mit interstitieller Fibrose einhergeht²⁷. Vorgänge wie Inflammation und eine Zunahme des Anteils seneszenten Zellen im Gewebe werden als Ursachen des Funktionsverlustes diskutiert, genauere Kausalzusammenhänge bleiben jedoch weiterhin Bestandteil der Forschung²⁸.

2.5 Renale Fibrose

Fibrotische Veränderungen des interstitiellen Gewebes sind ein wichtiges Kennzeichen der Nierenalterung und chronisch degenerativer Nierenerkrankungen²⁹. Als Fibrose bezeichnet man eine pathologische Vermehrung von hauptsächlich kollagenem Bindegewebe in einem Organ oder Gewebe, welche zu einer irreversiblen Verhärtung und im fortgeschrittenen Stadium auch zu einer Funktionseinschränkung der betroffenen Region führt. Durch die Periodsäure Schiff (PAS)-Reaktion lassen sich Glykogen und andere Kohlenhydrate, wie sie sich in kollagenhaltigem fibrotischem Gewebe finden, leicht darstellen (**Abbildung 1**).

Über Fibrose im Allgemeinen ist bekannt, dass sie durch extrazelluläre Matrix produzierende Myofibroblasten verursacht wird, welche durch inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert wurden³⁰. Myofibroblasten entstehen unter anderem aus Fibroblasten des Knochenmarks, Endothelzellen, Perizyten, interstitiellen Fibroblasten oder Epithelzellen³¹.

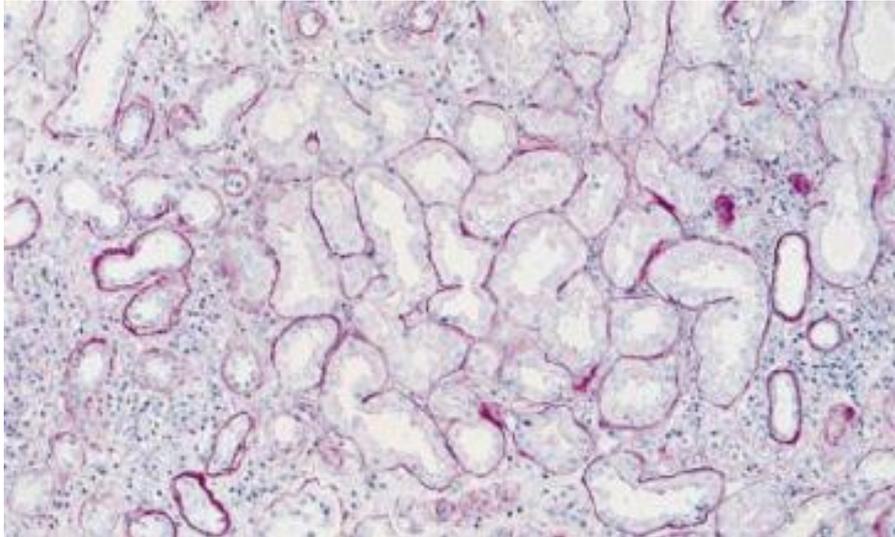


Abbildung 1: PAS-Färbung humaner Nierenbiopsie mit Quer- und Longitudinalanschnitten verschiedener Nierentubuli. Vor allem die untere Bildhälfte zeigt fokale tubulointerstitielle Fibrose, direkt angrenzend an Areale mit regulärer Tubulusarchitektur. (Abbildung 6a aus Ito et al.³², Nachdruck genehmigt durch Elsevier, *Copyright Clearance Center*)

Dabei spielt vor allem der durch *Transforming growth factor-β* (TGF-β) induzierte Vorgang der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) eine bedeutende Rolle³³. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch bei Ziliopathien eine durch TGF-β induzierte EMT stattfindet. Hierbei werden renale Tubulusepithelzellen zu Myofibroblasten umgewandelt³⁴.

Um das Auftreten und Fortschreiten des irreversiblen Prozesses der Fibrose zu verhindern, braucht es detaillierte Kenntnisse über Signalübertragung und Messenger in diesem Geschehen. In Signalwegen wie dem Wnt (*Wg (Wingless) and Int-Gen*)-^{35,36} und Shh (*Sonic Hedgehog*)-Signalweg³⁷ konnten im Zusammenhang mit der Entstehung von NPH und NPH-RC bereits Veränderungen detektiert werden, doch lässt sich durch einen Defekt innerhalb dieser Signalkaskaden noch kein direkter erklärender Kausalzusammenhang zur Entstehung der Fibrose finden. Es ist daher nötig, die Mechanismen hinter diesem vielschichtigen Prozess sowohl auf Zell- als auch Protein- und Genebene weiter aufzuschlüsseln, um mögliche Therapiestrategien entwickeln zu können.

2.6 Inflammation, Zelltod und Seneszenz – Ursachen oder Folgen der Fibrose?

Die zellulären Vorgänge, die hinter dem Vorgang des fibrotischen Gewebeumbaus stehen, sind komplex. Schädigungen und unzureichende Reparatur von Nierenepithelzellen stimulieren die renale Fibrosierung³⁸. Mechanismen wie chronische Inflammation, oxidativer Stress, zelluläre Seneszenz und regulierter Zelltod tragen maßgeblich dazu bei³⁹. Bereits seit Jahren wird diskutiert, welche Vorgänge primäre Auslöser sind, und welche Reaktionen nur sekundäre Folgen in diesem Geschehen sind. Ein mögliches Modell zur Veranschaulichung der groben Kausalzusammenhänge zwischen *DNA-Damage*, Inflammation, Zelltod und Seneszenz ist in **Abbildung 2** dargestellt. Die Abbildung orientiert sich an einer Skizze der an der *DNA-Damage Response* (DDR) und Inflammation beteiligten Vorgänge von Nakad et al.⁴⁰ und inhaltlichen Ergänzungen zu Ferroptose und DDR von Chen et al.⁴¹.

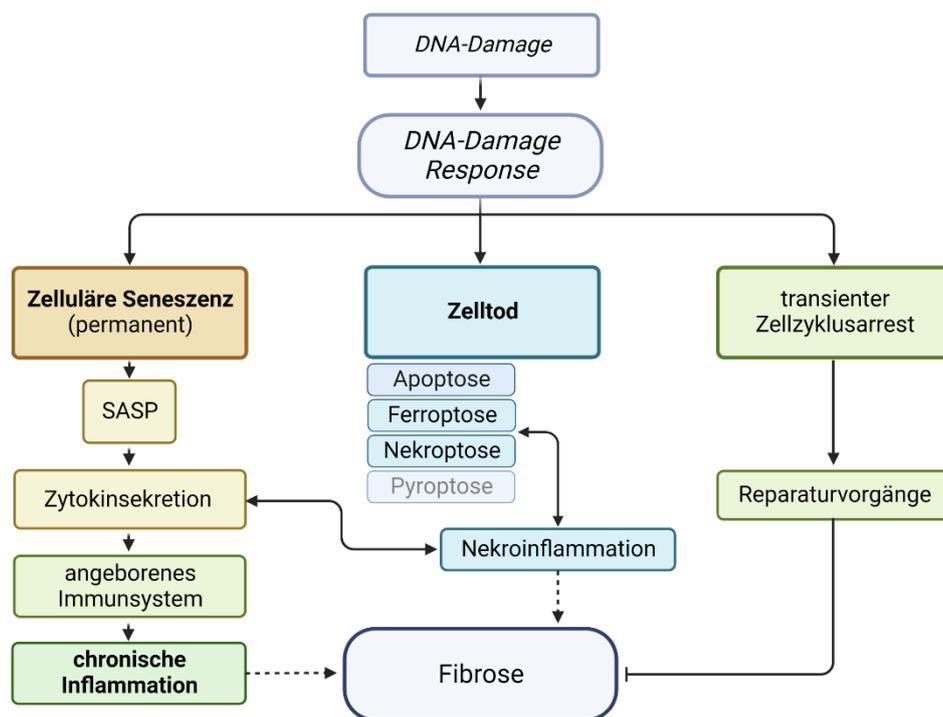


Abbildung 2: Modell zur Skizzierung der an DNA-Damage Response (DDR) und Fibrogenese beteiligten Vorgänge. DNA-Damage löst auf zellulärer Ebene die DDR aus. Durch die DDR kann es zum transienten Zellzyklusarrest kommen, der Reparaturvorgänge induziert, welche der Fibrogenese entgegenwirken. Demgegenüber stehen verschiedene Formen des Zelltods, die zum Beispiel durch Nekroinflammation zu Fibrose führen können, sowie die zelluläre Seneszenz. Durch die Aktivierung des SASP (Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp) kommt es zur Sekretion verschiedener Zytokine und zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Dies kann eine chronische Inflammation herbeiführen, welche wiederum durch Gewebsumbau Fibrose herbeiführen kann. Created in BioRender.com

2.6.1 Inflammation

Daten verschiedener Arbeitsgruppen unterstreichen, dass durch Replikationsstress entstandene DNA-Schäden einen entscheidenden Einfluss auf den Prozess der Fibrosierung der Niere haben könnten⁴²⁻⁴⁴. Im Kontext der NPH wurde gezeigt, dass Proteine, welche gehäuft im Primärzilium vorkommen, scheinbar eine protektive Rolle gegenüber der Akkumulation dieser Schäden spielen und dass ziliäre Signaldefekte mit einer veränderten Reaktion der Zelle auf jene Schäden einhergehen. Mittels RNA-Sequenzierungsanalyse der Gesamt-RNA aus Nierentubulifragmenten wurde in Mäusen mit einem NPH-Phänotyp kürzlich außerdem eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Expression Inflammations-assoziiierter Gene im Gewebe festgestellt⁴⁵. Dies könnte dafürsprechen, dass Immunvorgänge in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden, der DDR, eine Rolle spielen. Auch Chaki et al. beschäftigten sich im Kontext von Ziliopathien mit der DDR. Sie konnten zeigen, dass genetische Varianten in drei an der DDR beteiligten Proteinen, MRE11, ZNF423 und CEP164, eine NPH-RC verursachen können⁴⁶.

Die DDR ist ein Auslöser von gesteigertem *Immunsignaling* und chronischer Inflammation. Sie induziert die Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie Interferone und Liganden, die an Immunrezeptoren binden können. Dieser Vorgang konnte zum Beispiel für die Liganden NKG2D, einem Mitglied der C-Typ Lektin-ähnlichen Superfamilie, und DNAM-1 (DNAX Akzessorisches Molekül-1) gezeigt werden⁴⁰. Andersherum führt chronische Inflammation eines Gewebes selbst auch zur Schädigung nukleärer und mitochondrieller DNA. Grund dafür ist die vermehrte Aktivität von Enzymen wie der NADPH-Oxidase und der Stickstoffmonoxid-Synthetase in entzündeten Geweben. Neutrophile Granulozyten und

Makrophagen generieren dadurch zunehmend mutagene Substanzen wie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffradikale, welche die DNA schädigen^{47,48}.

2.6.2 Zelltod

2.6.2.1 Apoptose

Apoptose, eine Caspase-abhängige Form des regulierten Zelltodes, spielt während der Entwicklung und im Rahmen von Regenerationsprozessen in der Niere eine Rolle. Bei der Apoptose kommt es über einen intrinsischen und extrinsischen Signalweg zu einer kontrollierten Abrundung und Schrumpfung beschädigter Zellen, bis diese in Vesikel, welche funktionsfähige Organellen und kondensiertes Chromatin enthalten, zerfallen. Um umliegendes Gewebe vor Schäden zu schützen, werden die Vesikel in der Regel schnell und effizient durch Phagozytose aufgenommen, so dass eine Inflammationsreaktion ausbleibt. Um Apoptosevorgänge im experimentellen Setting zu untersuchen, eignet sich die immunhistochemische Untersuchung von Geweben mittels Antikörper gegen prozessierte Caspasen wie *Cleaved Caspase 3*⁴⁹. Zahlreiche Arbeiten der letzten Dekaden beschäftigten sich mit der Bedeutung von Apoptose bei Nierenerkrankungen. Nach neuesten Erkenntnissen ist Apoptose jedoch ein eher untergeordneter Prozess, der die Pathogenese der CKD und vor allem akuter Nierenschädigungen (AKI) nicht hinreichend erklären kann⁵⁰.

2.6.2.2 Regulierte Nekrose

Vielmehr scheint die synchronisierte, regulierte Nekrose (SRN) ein wichtiger Mechanismus bei der Entstehung von Tubulusnekrosen und Nephronverlust zu sein. Zur regulierten Nekrose gehören Ferroptose und Nekroptose, zwei Signalwege, die im Gegensatz zur Apoptose mit einem Verlust der Membranpermeabilität einhergehen⁵¹.

Bei **Ferroptose** handelt es sich um einen eisenabhängigen Vorgang des Zelluntergangs durch unkontrollierte Lipid-Peroxidation, welcher eintritt, wenn die Homöostase innerhalb einer Zelle durch Antiredox-Systeme nicht mehr gewährleistet ist. Wachsende Evidenz belegt die Bedeutung dieses Vorgangs im Rahmen von akuten und chronischen Nierenerkrankungen⁵².

Nekroptose ist ein Kinase-abhängiger Prozess, bei dem RIPK3 (Rezeptor-interagierende Serin/Threonin-Proteinkinase 3) mit Ripk1 und FADD eine amyloidartige Struktur, das sogenannte Nekrosom, bildet. RIPK3 phosphoryliert dann MLKL (*Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase*), was über noch unklare Mechanismen, wahrscheinlich jedoch durch Porenbildung, eine Plasmamembranruptur herbeiführt. MLKL gehört zu den am stärksten signifikant hochregulierten Genen in einer Vielzahl von Modellen für AKI^{50,53}.

Erst kürzlich stellten Belavgeni et al. ein Modell vor, in dem der Untergang von Nephronstrukturen im Rahmen eines AKI auf einem Phänomen beruht, welches als „Todeswelle“ bezeichnet wird⁵⁴. Nach diesem Modell ist die SRN getriggert durch Nekroptose und wird durch Ferroptose ausgeführt. Der Untergang einzelner Zellen führt dabei zur Ausbreitung des Zellsterbens auf Nachbarzellen^{51,54}. Durch die Freisetzung von DAMPs (*Damage associated molecular patterns*) und Antigenen aus den nekrotischen Zellen wird eine Immunreaktion ausgelöst, welche als **Nekroinflammation** bezeichnet wird. Dabei agieren klassische dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen und aktivieren über T-Zellen die adaptive Immunantwort. Es kommt außerdem zur Reifung und Freisetzung von Zytokinen. Möglicherweise findet in diesem Rahmen auch ein *Crosstalk* zwischen dendritischen Zellen und Myofibroblasten statt, deren proliferative Signale einen fibrotischen Umbau und damit irreversiblen Nephronverlust auslösen⁵⁰.

Zusammenfassend konnte im Bereich akuter Nierenschäden somit bereits ein Zusammenhang von Immunvorgängen mit Ferroptose und Nekroptose gezeigt werden. Die Datenlage hinsichtlich detaillierter Kausalzusammenhänge bei CKD und Fibrogenese ist bisher jedoch unzureichend, um Kausalaussagen über die Entstehung der Nierenschäden und Fibrose durch regulierte Nekrose und Inflammation treffen zu können, so dass es intensiver weiterer Nachforschungen bedarf.

2.6.3 Seneszenz

Ein weiterer Vorgang bei der Entstehung chronischer Nierenerkrankungen ist die Seneszenz⁵⁵. Zelluläre Seneszenz wird definiert als permanenter Zellzyklusarrest, in dem die Zellen einen persistierenden proinflammatorischen Phänotyp entwickeln⁴⁹. Sie kann als Reaktion auf verschiedene Arten von Schäden auftreten. Bekannte Auslöser sind intensive onkogene Signalübertragung, DNA-Schäden und die Verkürzung chromosomaler Telomere⁵⁶. Senescente Zellen finden sich vor allem im Zusammenhang mit dem Alterungsprozess, Krebs und Gewebereparatur. Charakteristika vorzeitiger Seneszenz zeigen sich beispielsweise auch an beschädigten Tubuluszellen nach akutem Nierenversagen. Betroffene Zellen generieren profibrotische Faktoren, welche die Fibrosierung der Niere fördern⁵⁷.

Eine andauernde DDR sowie erhöhte Spiegel freier Sauerstoffradikale können direkt oder indirekt die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und C/EBP- β aktivieren, welche wiederum zur Aktivierung des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP) führen. Zum SASP gehören unter anderem p21 und p16⁵⁸, TNF- α , IL-6 und IL-1a⁴, IL-1b und Foxo4⁴⁹. Die gesteigerte Expression der Zellzyklusinhibitoren p21 und p16 führt zum permanenten Zellzyklusarrest. Durch die Sekretion verschiedener Zytokine, Immunmodulatoren und Wachstumsfaktoren kommt es zur Rekrutierung von Immunzellen mit dem Ziel, Antigene und beschädigte Zellen zu eliminieren, sowie zur Proliferation und Differenzierung der renalen Progenitor- und Stammzellen. Falls dieser Mechanismus zur Regeneration des Gewebes nicht ausreicht, akkumulieren senescente Zellen, und der Prozess der Zellalterung wird beschleunigt, was zu altersbedingten Veränderungen des Nierengewebes von der Fibrosierung bis hin zum terminalen Nierenversagen führen kann⁴.

2.7 DNA-Schäden

2.7.1 Ursachen und Folgen von DNA-Schädigungen

Bei der Vielzahl an Vorgängen könnte *DNA-Damage* ein interessanter, übergeordneter Knotenpunkt sein. Zudem ist genomische Instabilität durch DNA-Schäden der Hauptauslöser der meisten Krebserkrankungen⁵⁹, aber auch vieler anderer Krankheits- und Alterungsprozesse.

Die DNA-Doppelhelix mit über 3 Milliarden Basenpaaren ist der Speicher der Erbinformation jeder einzelnen Zelle. Das Erbgut wird bei der Zellteilung idealerweise unverändert an zahlreiche nächste Generationen von Zellen und Organismen weitergegeben. Aufgrund der Komplexität und der hohen Frequenz, mit der der Vorgang der Replikation stattfindet, aber auch ohne Replikation durch genotoxische Einflüsse kommt es regelmäßig zu Schäden der DNA, welche die genomische Integrität der Zellen gefährden. Fehlpaarungen einzelner DNA-Basen, Doppelstrangbrüche, Dysfunktionen in der Aktivität von Topoisomerase I und II und anderer Enzyme, reaktive Sauerstoffradikale, welche als Nebenprodukte in Stoffwechselprozessen der Zelle anfallen, aber auch Defekte, die bei diversen anderen Reaktionen entstehen können, sind bekannte endogene Trigger von DNA-Schäden⁴⁰. In der Niere sind auch urämische Toxine als Auslöser genomischer Schäden relevant⁶⁰.

Im letzten Jahrzehnt konnte zudem gezeigt werden, dass R-loops, Hybrid-Strukturen aus DNA und RNA, die unter anderem während der Transkription entstehen, DNA-Schäden verursachen können, wenn sie nicht rechtzeitig wieder aufgelöst werden⁶¹.

Neben endogenen Auslösern gibt es auch zahlreiche exogene Auslöser von DNA-Schäden. Nennenswert sind hierbei UV-Licht, ionisierende Strahlung und verschiedenste chemische oder medikamentöse Noxen⁶².

2.7.2 Zentrale Komponenten der *DNA-Damage Response*

Da es in jeder Körperzelle täglich zu bis zu 10^5 Läsionen der DNA kommt^{63,64}, ist es essenziell, dass die DNA regelmäßig auf Schäden untersucht wird. In verschiedenen Phasen des Zellzyklus bieten sogenannte *Checkpoints* regulatorischen Enzymen die Möglichkeit der Kontrolle und Entschleunigung des Vorgangs der Zellteilung, um je nach Ausmaß des Schadens entweder Reparaturen stattfinden zu lassen, die Zelle in die replikative Seneszenz oder in den programmierten Zelltod, die Apoptose, zu schicken⁶⁵. Diese *Checkpoints* finden sich in der G₁-S, intra-S und G₂-M Phase⁶⁶. Die detektierten DNA-Läsionen müssen an Effektoren gemeldet und zelluläre Mechanismen in Gang gesetzt werden, die die Rekrutierung von DNA-Reparaturfaktoren regulieren. Hierbei spielen die Enzyme *Ataxia teleangiectasia mutated* (ATM), *Ataxia teleangiectasia Rad-3 related* (ATR) und die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) (Familie der Phosphatidylinositol 3-Kinase ähnlichen Proteinkinasen) sowie die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen 1 und 2 (PARP 1/2) eine bedeutende Rolle⁶⁷. ATM und ATR werden zu DNA-Doppelstrangbrüchen und mit Replikations-Protein A (RPA) bedeckter einzelsträngiger DNA (ssDNA) rekrutiert^{68,69}. Die darauffolgende Aktivierung der beiden Kinasen führt unter anderem zur Lockerung des Chromatins an den beschädigten Stellen und trägt zur Aktivierung von p53, der *Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2* (MK2) und den Checkpointkinasen-1 und -2 (CHK1/2) bei. Gemeinsam mit ATM und ATR senken CHK1 und 2 die Aktivität der den Zellzyklus vorantreibenden, Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs), so dass mehr Zeit für Reparaturen bleibt, bevor die DNA repliziert wird oder die Zelle in die Mitose übergeht⁶⁶. Eine Hauptaufgabe ATMs und ATRs ist außerdem die Induktion von DNA-Reparaturproteinen. Diese kann durch verschiedenste Veränderungen wie Phosphorylierungen, Acetylierungen, Ubiquitinierung oder Sumoylierung während und nach der Transkription erreicht werden⁷⁰. Ein prominentes Beispiel ist in diesem Zusammenhang die Modifikation des Doppelstrangbrüche flankierenden Histons H2AX an Serinrest-139 und die Phosphorylierung am Tyrosinrest-142, welche maßgeblich zur DDR beitragen^{71,72}. Die phosphorylierten Mediatorproteine beschleunigen die DDR, indem sie weitere ATM- und ATR-Substrate rekrutieren.

Neben schnellen Modifikationen wird ein signifikanter Anteil des *DDR-Signalings* zusätzlich durch langsame transkriptionelle Veränderungen vermittelt, welche die Integration neuer Informationen über die Zeit hinweg ermöglichen. Dabei ist der Transkriptionsfaktor p53 von zentraler Bedeutung, denn dieser beeinflusst die Expression zahlreicher Apoptose- und Zellzyklus-steuernder Proteine. Aufgrund dieser Eigenschaften handelt es sich bei p53 um ein Tumorsuppressorgen. Durch den Faktor werden unter anderem die Transkription des CDK-Inhibitors p21 und der proapoptotischen Proteine *Bcl-2-associated protein X* (Bax), *Bcl-2 antagonist/killer* (Bak) und *P53 Upregulated Modulator of Apoptosis* (PUMA) reguliert. So kann p53 die Apoptose, Seneszenz oder einen vorübergehenden Zellzyklusarrest, in dem notwendige Reparaturen stattfinden können, einleiten und bestimmt dadurch das Schicksal der Zelle⁶⁶. An der Aktivierung einiger Reparaturmechanismen wie der homologen Rekombination, der nichthomologen End-zu-End-Verknüpfung und der Nukleotidexzisionsreparatur (NER), ist p53 (zum Beispiel über die Regulation der NER-

Faktoren *Xeroderma Pigmentosum, complementation group C* (XPC) und *Damage Specific DNA Binding Protein 2* (DDB2)) sogar direkt beteiligt⁷³.

2.8 AATF im DDR-Signaling

Der *Apoptosis Antagonizing Transcription Factor* (AATF), auch bekannt unter der Bezeichnung CHE-1 oder Traube, ist ein wichtiger Vermittler der zellulären Reaktion auf die p53-gesteuerte DDR. Das humane AATF-Gen liegt auf Chromosom 17 und kodiert für das 558 Aminosäuren lange Protein, dessen Name *Apoptosis Antagonizing Transcription Factor* bereits seine Funktion als Apoptose-Inhibitor andeutet⁷⁴. Sobald es in der Zelle zu genotoxischem Stress durch DNA-Schäden, oxidative Schäden, hyperosmotischen Stress oder eine Hypoxie kommt, wird AATF durch die DDR-Mediatoren MK2, ATM und CHK2 modifiziert und aktiviert^{75,76}. Posttranslationale Veränderungen des Proteins sind dabei meist Phosphorylierungen. Aber auch Poly(ADP-ribosyl)ierung durch PARP 1, Ubiquitinierung und Isomerisation konnten nachgewiesen werden⁷⁷. Sie bestimmen die Funktion von AATF und regulieren weitere Interaktionen und damit das zelluläre Outcome. PARP 1 beispielsweise stabilisiert AATF bei DNA-Schäden und vermittelt als *DNA-Damage* Sensor die Rekrutierung der DNA-Reparationsmaschinerie an den Ort des Defekts⁷⁷.

Weitere bekannte Interaktoren von AATF sind die RNA-Polymerase II, die Transkriptionsfaktoren p65 und STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), das Retinoblastom-Protein (Rb), dessen wachstumsunterdrückende Aktivität durch AATF gehemmt wird, sowie die proapoptotische Dlk/ZIP Kinase und NRAGE (*Neutrophilin Receptor Interacting MRAGE homolog*)^{78,79}.

AATF kann zentrosomal oder im Zytoplasma an MRLC3 (*Myosin Regulatory Light Chain*) gebunden vorliegen⁸⁰. Außerdem ist bekannt, dass AATF auch an verschiedene RNA-Formen wie rRNA, mRNA und snoRNA bindet. Dabei liegt die Funktion AATFs vor allem in der Förderung der Ribosomenbiogenese. Ein Zusammenhang konnte insbesondere für rRNA-Prozessierung und den Zusammenbau der kleinen ribosomalen Untereinheit festgestellt werden^{81,82}. In seiner aktivierten Form befindet AATF sich vorwiegend in Zellkern und Nukleoli, wo es als kotranskriptioneller Faktor die Promotoren der Gene p21 und p53 rekrutiert. So verhindert es die p53-gesteuerte Transkription der proapoptotischen Proteine PUMA, Bax und Bak und sichert damit das Zellüberleben. Daran, dass AATF an Interphase-Zentrosomen bindet, für deren Duplikation sorgt, und die Ausbildung der Mitosespindel reguliert, wird deutlich, dass es nicht nur anti-apoptotische Funktionen hat, sondern durch die Kontrolle des Mitoseeintritts auch den Zellzyklus reguliert⁸⁰. Weitere Lokalisationen in der Zelle, an denen AATF detektiert wurde, sind primäre Zilien. Als Regulator des Zilienaufbaus und Modulator der DNA-Schadensantwort, verbindet AATF somit Signalwege der DDR mit der Pathogenese von Ziliopathien⁴⁵.

Alles in allem scheint AATF also ein wesentlicher Regulator zellulärer Prozesse zu sein. Seine Unentbehrlichkeit unterstreicht eine Studie an Mäuseembryonen, denen Aatf fehlt. Sie sterben aufgrund schwerer Störungen der Zellproliferation unmittelbar nach dem Morulastadium, noch vor der Implantation⁸³.

2.9 DNA-Reparaturmechanismen

Je nach DNA-Läsion greifen unterschiedliche hochspezialisierte Reparaturmechanismen. Eine Übersicht der wichtigsten DNA-Reparaturmechanismen zeigt **Abbildung 3**.

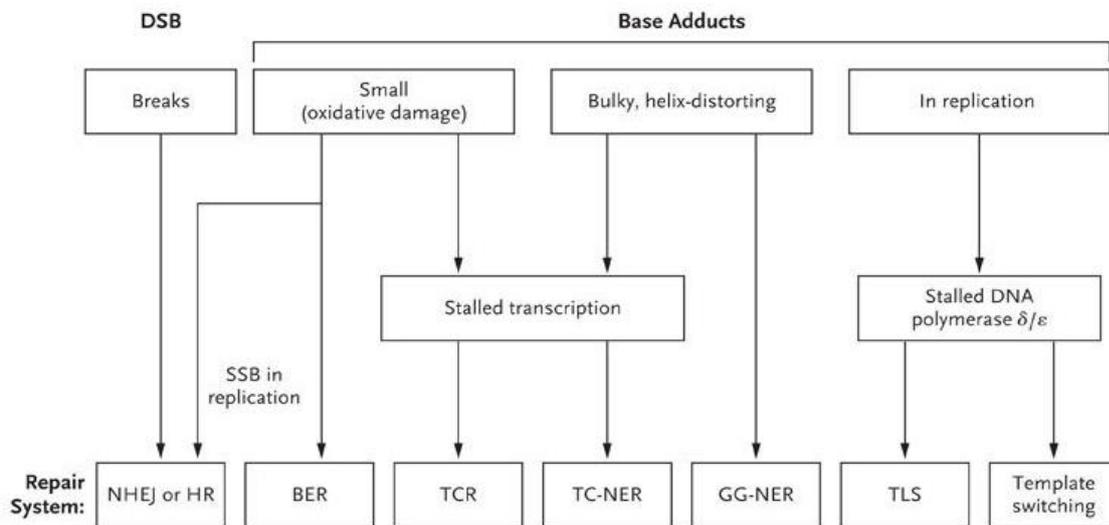


Abbildung 3: DNA-Läsionen und korrespondierende DNA-Reparatur- und Instandhaltungssysteme. Doppelstrangbrüche (DSB) und Einzelstrangbrüche (*Single strand breaks/SSB*) werden durch nichthomologe End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ) oder homologe Rekombination (HR) repariert. Andere Läsionen (*Basenaddukte/Base Adducts*), wie kleine oxidative Schäden (*small oxidative damage*), DNA-Helix deformierende Läsionen (*Bulky, helix-distorting lesions*) oder Läsionen während der Replikation (*in replication*) führen dazu, dass die Transkription oder die DNA-Polymerase δ/ϵ ins Stocken gerät (*stalled transcription/DNA polymerase δ/ϵ*). Folgende Reparaturmechanismen greifen: Basenexzisionsreparatur (BER), Transkriptions-gekoppelte Reparatur (TCR), transkriptions-gekoppelte und globale genomische Nukleotidexzisionsreparatur (TC- und GG-NER), translasionale Synthese (TLS) und *Template Switching*. (Ausschnitt aus Hoeijmakers 2009, Abb. 2⁶², reproduced with permission, Copyright Massachusetts Medical Society)

Doppelstrangbrüche werden in der Regel durch nichthomologe End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ) oder homologe Rekombination (HR) repariert. Die HR ist außerdem auch für die Reparatur von kleinen Schäden wie Einzelstrangbrüchen (SSB) durch oxidative Schäden während der Replikation zuständig. Basenexzisionsreparatur (BER) findet statt, wenn kleine DNA-Läsionen wie Oxidationen und Alkylierungen vorliegen. Falls diese Läsionen den Elongationsvorgang der RNA-Polymerase stören, kommt es zu einer Transkriptions-gekoppelten Reparatur (TCR). Während der Replikation können Strangbrüche und Querverbindungen (*Crosslinks*) die DNA-Polymerasen δ und ϵ an ihrer Arbeit hindern. In diesem Fall kann die Behebung der Schäden ebenfalls durch HR, allerdings in Form von *Template Switching* erfolgen. Alternativ kann ein Ersatz des ganzen Stranges oder auch die translasionale Synthese (TLS) erfolgen⁶². DNA-Helix deformierende Läsionen (*Bulky, helix-distorting lesions*) kommen relativ häufig vor, denn sie werden vor allem durch UV-Strahlung erzeugt, welche der quantitativ am stärksten schädigende Faktor der oben genannten exogenen *DNA-Damage* Auslöser ist. Diese durch UV-Strahlen und elektrophile Substanzen ausgelösten Schäden werden durch NER behoben⁸⁴.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Modell mit defizientem Ercc1 (*Excision Repair Cross-Complementation Group 1*) verwendet. Dieses spielt vor allem bei der NER eine zentrale Rolle, ist aber auch an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen und der *Interstrand Crosslink Repair* beteiligt⁸⁵.

2.9.1 Nukleotidexzisionsreparatur und die Rolle von ERCC1

Die NER ist ein vielschrittiges Verfahren, an dem mehr als 30 Proteine beteiligt sind⁸⁶. Sie läuft über zwei Hauptwege ab: die globale genomische NER (GG-NER) und die transkriptionsgekoppelte (TC)-NER⁸⁷ (**Abbildung 4**). GG-NER dient der Erkennung und Entfernung genomweiter helikaler Distorsionen mittels XPC. TC-NER erkennt und entfernt selektiv Distorsionen während der Transkription aktiver Gene durch die RNA-Polymerase.

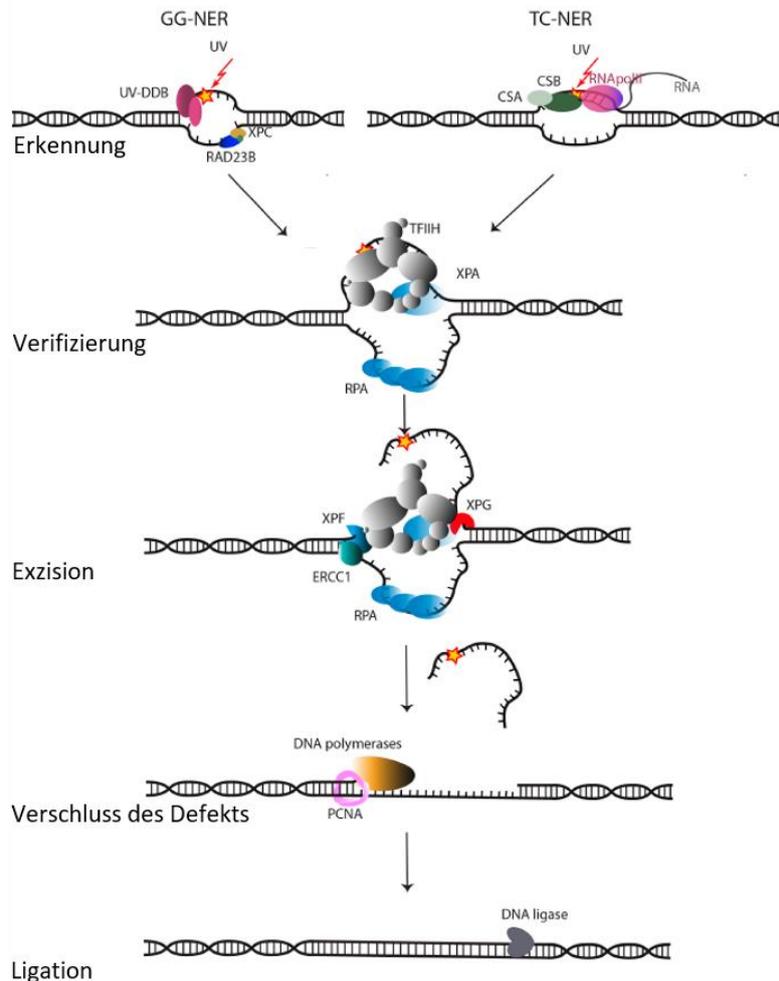


Abbildung 4: Nukleotidexzisionsreparatur - GG-NER und TC-NER Signalweg. Erkennung: UV (Ultraviolett)-Strahlung ist ein möglicher Auslöser von DNA-Läsionen. RAD23B (UV-Exzisionsreparaturprotein RAD23 Homolog B) und UV-DDBs (*UV-DNA Damage binding proteins*) erkennen die Läsionen und leiten die globale, genomweite Nukleotidexzisionsreparatur (GG-NER) durch Oligonukleotidexzision ein (links). Ins Stocken geratene Transkription an der RNA-Polymerase II (RNAPol II) führt zur transkriptionsgekoppelten Nukleotidexzisionsreparatur (TC-NER) (rechts). Die Cockayne Syndrom Proteine A und B (CSA, CSB) verschieben die RNAPol II, so dass die DNA-Läsion für Reparaturvorgänge zugänglich wird. Verifizierung und Exzision: Die DNA-Schäden werden verifiziert und es erfolgt ein Einschnitt auf der 5'-Seite durch die Endonuklease ERCC1-XPF (*Excision Repair Cross-Complementation Group 1-Xeroderma Pigmentosum Protein F*) und auf der 3'-Seite der Läsion durch XPG (*Xeroderma Pigmentosum Protein G*). Verschluss des Defekts und Ligation: Die nach dieser Exzision entstandene Lücke wird durch DNA-Resynthese durch die DNA-Polymerase aufgefüllt und mit der DNA-Ligase wieder zu einem geschlossenen Doppelstrang verbunden. TFIIH: Transkriptionsfaktor IIIH. XPA: Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group A. RPA: Replikationsprotein A. PCNA: *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*. (Ausschnitt aus Abbildung 1 aus Faridounnia et al.⁸⁵, *open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) license* (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>))

Während der NER bildet ERCC1 ein Heterodimer mit der Endonuklease Xeroderma Pigmentosum Protein F (XPF) und katalysiert den Einschnitt des 5'-Endes der DNA zur Entfernung der DNA-Läsionen. Die Endonuklease XPF-ERCC1 ist außerdem an der DNA-

Rekombination, der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und der Wiederherstellung von *Crosslinks* zwischen den DNA-Strängen beteiligt⁸⁸. Auf der gemeinsamen Endstrecke von TC-NER und GG-NER, an der ERCC1 beteiligt ist, kommt es zur Entwindung der DNA im Läsionsbereich, um zunächst eine Stabilisierung und Untersuchung des beschädigten DNA-Fragmentes zu ermöglichen und dann die Lücke des Einzelstranges aufzufüllen und zu ligieren.

Am Beispiel des *Knockouts* des Gens *Ercc1* in Mäusen zeigt sich, dass eine fehlerbehaftete NER innerhalb kurzer Zeit zu einer Akkumulation einer großen Menge von DNA-Schäden führt. Mäuse mit einem Ganzkörper*knockout Ercc1s* sind nicht überlebensfähig und entwickeln im Alter von ca. 3 Wochen ein Lebersversagen⁸⁹. Ein Hybrid-Genotyp (*Ercc1*^(-/Δ7)), entwickelt sich zu einem Phänotyp mit segmentaler progeroider, beschleunigter Alterung, welcher auch dem humanen Phänotyp frühzeitiger Alterungssyndrome ähnelt⁹⁰⁻⁹². Der *Ercc1*^(-/Δ7) Genotyp ist hemizygot für ein Allel mit vollständiger Deletion des Gens und eine Variante, bei der die letzten 7 Aminosäuren am C-Terminus des Wildtyp-Proteins verändert sind, sodass zwar die Funktion, nicht jedoch die Stabilität des Proteins beeinträchtigt ist. Um *Ercc1*-verknüpfte Signalwege wie die NER in einzelnen Organen genauer zu untersuchen und die Versuchstiere länger am Leben zu halten, existiert die Möglichkeit, über Cre-lox Systeme organspezifische *Knockouts* zu erzeugen, wie es von Doig et al. bereits zur Untersuchung der Haut durchgeführt wurde⁹³.

ERCC1 wird in der *US National Library of Medicine* im Jahre 1984 im Zusammenhang mit der Erkrankung Xeroderma Pigmentosum das erste Mal erwähnt⁹⁴. Das humane *ERCC1*-Gen liegt auf Chromosom 19q13.32 und kodiert für das gleichnamige Protein ERCC1, welches im Signalweg der NER ein wichtiger Regulator und *Downstream*-Effektor der DDR ist. Das Gen und sein Genprodukt finden sich auch unter den Synonymen COFS4, RAD10 und UV20 in der Literatur wieder. Bekannte, mit *ERCC1*-Mutationen assoziierte Erkrankungen sind das Cerebrooculofacioskeletale Syndrom 4 und das Cockayne Syndrom. Im weiteren Sinne besteht auch eine Verbindung zu pathologisch veränderten Signalwegen bei der Fanconi Anämie. Polymorphismen, die die Expression von ERCC1 verändern, scheinen außerdem eine Rolle in der Karzinogenese zu spielen⁸⁶.

2.10 R-loops

Sowohl für ERCC1 als auch für AATF wurde ein Zusammenhang mit R-Loops gezeigt, was diesen Strukturen, bestehend aus einem DNA/RNA-Hybrid und einem Einzelstrang DNA⁹⁵, im Rahmen dieser Arbeit eine zentrale Bedeutung einräumt^{45,96-98}. Während sich kurze DNA/RNA-Hybridabschnitte vorübergehend während der Transkription und DNA-Synthese bilden können, handelt es sich bei R-loops um längere Abschnitte, die durchschnittlich 200-300 Basenpaare umfassen^{99,100}. Sie entstehen bevorzugt in der Promoter-Region transkriptionell aktiver Gene, wenn sich ein Transkript eines DNA-Strangs wieder an den Template-DNA-Strang anlagert und die RNA-Polymerase II die entstandene RNA und die Template-DNA nicht weit genug voneinander separieren kann⁸. Vor allem durch einen hohen Anteil G-reicher RNA- und C-reicher DNA-Regionen können sie eine höhere thermodynamische Stabilität als doppelsträngige DNA erreichen.

Nachdem R-loops viele Jahrzehnte für biologisch irrelevant gehalten wurden, rückten sie in den vergangenen Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung, denn es werden ständig neue Funktionen dieser Strukturen aufgedeckt. Im Rahmen dieser Arbeit sind sie vor allem aufgrund ihrer Wirkung und regulativen Einflüsse im *DDR-Signaling* von großer Bedeutung.

Sie regulieren die Genexpression, die DNA-Replikation sowie DNA- und Histonmodifikationen¹¹. Auch beim Isotypenwechsel der Immunglobuline von B-Zellen spielen sie eine wesentliche Rolle: R-loops bilden sich zu Beginn des Klassenwechsels (CSR – *Class Switch Recombination*) an der G-reichen *Switch*-Region des IgH-Lokus aus. Dort rekrutieren sie die *Activation-induced Cytidin-Deaminase* (AID), indem sie diese mit einem stabilen ssDNA-Substrat versorgen, in welchem Cytidin zu Uracil umgewandelt wird und dann durch Basenexzision wieder entfernt wird. Damit triggern sie die Entstehung von Doppelstrangbrüchen, die durch NHEJ wieder repariert werden. Dies führt letztendlich zur evolutionär bedeutsamen Diversität der entstehenden Antikörper¹⁰¹. Eine protektive Funktion von R-loops konnte außerdem in verschiedenen Bereichen menschlicher Gene festgestellt werden. An 5'-Enden schützt DNA/RNA Hybridisierung vor übermäßiger DNA-Methylierung¹⁰², an 3'-Enden vermittelt sie effizient die Transkriptionstermination¹⁰³.

Paradoxaerweise kommen neben diesen günstigen auch immer mehr nachteilige Eigenschaften von R-loops ans Licht. Das im Zusammenhang mit der CSR in B-Zellen beschriebene Potential der R-loops, Doppelstrangbrüche zu erzeugen, kann in anderen Zellen und an anderen Stellen des Genoms gravierende Folgen nach sich ziehen und zum Beispiel zu *DNA-Damage* und genomischer Instabilität führen⁶¹. R-loops können die DNA dadurch anfällig für schädigende Substanzen machen und chromosomale Instabilität sowie Chromosomenbrüche und -verluste verursachen. Durch die Bildung von R-loops an bestimmten Trinukleotid-*Repeats* kommt es außerdem zur Heterochromatinbildung und die Transkription bestimmter Gene wird verhindert, die mit neurologischen Erkrankungen wie frontotemporaler Demenz und amyotropher Lateralsklerose, der Friedreich Ataxie und dem fragilen X-Syndrom assoziiert sind¹⁰⁴. Weiterhin finden sich auch immer mehr Beweise dafür, dass R-loops an Prozessen beteiligt sind, die bei Krebs dysreguliert sind¹⁰⁵. Aus diesen Gründen ist es wichtig, dass in Zellen eine physiologische Balance an R-loops aufrechterhalten wird und die Bildung dieser Strukturen streng kontrolliert wird.

Vor einigen Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen transkriptionsgekoppelten NER-Faktoren und der Entstehung von R-loops und R-loop-assoziiierter genomischer Instabilität durch DNA-Schäden festgestellt. R-loops werden durch die NER-Endonukleasen XPF und XPG aktiv zu DNA-Doppelstrangbrüchen prozessiert (**Abbildung 5**).

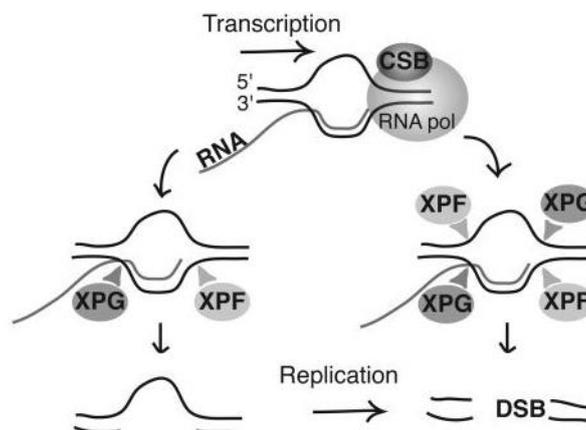


Abbildung 5: Skizzierung der Entstehung von DNA/RNA-Hybridstrukturen und Doppelstrangbrüchen im Zusammenhang mit der Transkription. DSB: Doppelstrangbruch, CSB: Cockayne Syndrom Protein B, XPF und XPG: Xeroderma Pigmentosum Protein F und G. (Abbildung 4E aus Sollier et al.¹⁰⁶, Nachdruck genehmigt durch Elsevier, *Copyright Clearance Center*)

Der Stillstand des Transkriptionskomplexes inklusive der RNA-Polymerase ermöglicht dem Faktor CSB, die Faktoren XPG und XPF zu rekrutieren. Diese können dann einen Spalt

generieren, welcher durch DNA-Replikation zu einem Doppelstrangbruch umgewandelt wird. Andersherum ist es auch möglich, dass XPG und XPF die R-loops an beiden Strängen schneiden und somit einen Doppelstrangbruch herbeiführen¹⁰⁶.

Auch für Ercc1, als direktem Bindungspartner von XPF, konnte kürzlich ein Zusammenhang mit R-loops nachgewiesen werden. In einem murinen *Ercc1 Knockout* Modell für das humane Progeroidsyndrom XFE kam es durch das Fehlen adäquater DNA-Reparaturen in Pankreaszellen zum Verlust der Gewebearchitektur und Fibrose. Durch anhaltende Akkumulation irreparabler DNA-Schäden ließ sich die vermehrte Bildung von R-loops und eine Freisetzung von ssDNA im Zytoplasma nachweisen. Dies triggerte eine Immunantwort innerhalb dieser Gewebe⁹⁷. Eine andere Arbeit zeigt, dass ein Komplex aus den Endonukleasen ERCC1-XPF und XPG mit XAB2 (XPA Bindeprotein 2), einem Spleißfaktor, außerhalb der NER an DNA/RNA-Hybride bindet und damit die R-loop Bildung begünstigt. Hier wird die spleißosomale Reaktion auf DNA-Schäden mit R-Loop-Prozessierung und Auswirkungen auf transkriptionsgekoppelte DNA-Reparaturstörungen in Verbindung gebracht⁹⁸. Ebenso scheint AATF, der RNA-bindende Transkriptionsfaktor, eine bedeutende Rolle im R-loop Metabolismus zu spielen. In Myelomzellen kolokalisieren AATF und R-loops und AATF bindet an die R-loop-auflösende *long noncoding* RNA (lncRNA) NEAT1_2 (*Nuclear paraspeckle assembly transcript 1*). Ein Fehlen von AATF führt zur Akkumulation von R-loops und zur Aktivierung von Interferonen, was wiederum eine Inflammationsreaktion hervorruft⁹⁶. Interessanterweise konnte zudem gezeigt werden, dass NEAT1 das Voranschreiten renaler Fibrose beschleunigt¹⁰⁷.

Auch in einem Mausmodell, in dem *Aatf* mit Hilfe embryonal aktiver Ksp1.3/Cre in distalen Nephronen der Niere deletiert wurde, konnte eine Akkumulation von R-loops beobachtet werden. Dieses Modell zeigt eine Anhäufung von DNA-Doppelstrangbrüchen und weist einen Phänotyp mit schwerer Tubulusatrophie, interstitieller Fibrose und Zysten auf, der dem Phänotyp der NPH ähnelt⁴⁵. Hierbei wird ein Zusammenhang von R-loops mit Ziliopathien hergestellt, der durch Erkenntnisse untermauert wird, dass *DNA-Damage*, als bekannter Auslöser der Entstehung von R-loops, bei NPH entscheidend zum fibrotischen Phänotyp beiträgt^{108,109}. Eine Aufdeckung molekularer Mechanismen im R-loop-*Signaling* verspricht demnach auch neue Erkenntnisse in der Entstehung NPH-assoziierter Fibrose.

Weitere bekannte Faktoren, die die Entstehung von R-loops beeinflussen, sind das evolutionär hochkonservierte Enzym Ribonuklease H (RNase H) und verschiedene Helikasen. Sowohl RNase H1 als auch RNase H2 können den RNA-Strang der R-loops schneiden und entfernen. RNase H1 besitzt dazu eine hybride Bindungsdomäne, während RNase H2 aus drei verschiedenen katalytischen Untereinheiten besteht, deren genaue Funktionen noch nicht vollends geklärt sind. RNase H1 ist auch an der mitochondrialen Replikation beteiligt, wohingegen RNase H2 die zusätzliche Funktion besitzt, einzelne Ribonukleotide, die fälschlicherweise bei der nukleären DNA-Replikation in Okazaki-Primer eingebaut wurden, zu entfernen¹¹⁰. Spezialisierte DNA/RNA-Helikasen wie Senataxin (SETX) und *Death-box Helicase* (DDX21), die vor allem auch für Transkription und Prozessierung der RNA-Polymerasen I & II benötigt wird¹¹¹, oder die ATP-abhängige RNA-Helikase A (DHX9)¹⁰⁵ sind dabei notwendig, um den zu entfernenden Strang zu entwinden, so dass RNase H binden kann. Ein wichtiger RNase H1-bindender Interaktor ist auch das Replikationsprotein A (RPA), welches sich an ssDNA an blockierten Replikationsgabeln und an beschädigte DNA setzt. RPA kolokalisiert sowohl mit RNase H1 als auch mit R-loops und scheint diese erkennen zu können, bevor sie zu Doppelstrangbrüchen führen¹¹².

Ebenfalls eine wichtige Rolle in der R-loop Regulation spielt die RNA Helikase Aquarius (AQR), die als Teil des Spleißosom-Komplexes zur Entfernung der Introns aus transkribierten Genen

verantwortlich für effektives prä-mRNA Spleißen ist. Bei einem *Knockdown* des *AQR*-Gens akkumulieren R-loops und es kommt zu genomischer Instabilität¹⁰⁶. Auch die Topoisomerase 1 kann die Bildung von R-loops unterdrücken, denn sie verhindert die Kollision zwischen Transkriptions- und Replikationskomplexen⁶¹. Zuletzt wurden nicht nur Proteine, sondern auch andere nicht-kanonische Nukleinsäurestrukturen mit R-loops in Verbindung gebracht. Dazu gehören G4 Quadruplexe (G4s), die sich wie R-loops bevorzugt an G-reichen Regionen wie Telomeren, Mikrosatelliten CpG-Inseln bilden. Diese DNA-Sekundärstrukturen werden aus zwei oder mehr gestapelten Guanin-Tetraden gebildet, die durch Hoogsteen-Wasserstoffbrücken zusammengehalten und durch Kalium und Natrium stabilisiert werden. G4s regulieren ähnlich wie R-loops die Funktionen von Nukleinsäuren und die genomische Stabilität lebender Zellen. Sie sind strukturell mit R-Loops verwandt und kompatibel. Der Wirkmechanismus von G4-Bindern wird nach neuesten Erkenntnissen vermutlich entscheidend von R-loops reguliert¹¹³.

Insgesamt ist es offensichtlich, dass ein komplexes Netzwerk an Enzymen und Strukturen mit R-loops interagiert, so dass vor allem der Akkumulation von DNA-Schäden durch die Prävention und Beseitigung von R-loops vorgebeugt wird. Ein besseres Verständnis von Signalwegen in diesem Gebiet verspricht Erkenntnisse in der Entstehung DDR-dysregulierter Erkrankungen.

2.11 Zielsetzung der Arbeit

DNA-Schäden und fehlerbehaftete DNA-Reparaturmechanismen spielen bei Alterungsprozessen, der Tumorentstehung und -therapie sowie bei vielen degenerativen Erkrankungen eine zentrale Rolle. Diese Arbeit wird sich mit der Aufdeckung ausgewählter molekularer Mechanismen hinter diesem Phänomen *in vitro* und *in vivo* beschäftigen und basiert auf der Beobachtung, dass sowohl der Verlust von Aatf, als einem Regulator der p53 abhängigen Signaltransduktion, als auch der Verlust des DNA-Reparaturenzyms Ercc1 in der Niere zu schweren degenerativen Phänotypen führt, die mechanistisch nicht gut verstanden sind. Nierenspezifische *Ercc1 Knockout*-Tiere entwickeln eine Nierenfibrose, während *Aatf Knockout*-Mäuse einen zystisch-degenerativen fibrotischen Phänotyp ähnlich einer NPH mit einer Akkumulation sogenannter R-Loops in renalen Epithelzellen zeigen⁴⁵. R-loops, die kürzlich als relevante Mitspieler im Netzwerk des DDR-Geschehens entdeckt wurden^{9,10,99}, und ihre Verbindung zu AATF werden dabei im ersten Teil dieser Arbeit genauer beleuchtet. Der zweite Teil beschäftigt sich mit den *in vivo*-Konsequenzen der Akkumulation von DNA-Schäden im Ercc1-Mausmodell.

Bei der Untersuchung zur Rolle von AATF im Kontext von R-loops wird die Lokalisation von AATF und DNA/RNA Hybriden auf subzellulärer Ebene in humanen U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zellen, in denen eine inaktive, und damit R-loop bindende, aber nicht auflösende Mutante der Ribonuklease H1 induzierbar ist und einer humanen Zelllinie, die GFP-markiertes AATF überexprimiert, studiert. Um neben AATF weitere Interaktoren, die im R-loop-Komplex von Relevanz sein könnten, aufzudecken, wird weiterhin das R-loop-Interaktom in humanen U2OS Zellen massenspektrometrisch analysiert. Dabei soll es vor allem um den Vergleich dieses Interaktoms mit den Genen/Proteinen, die unter einem zellulären *Knockout* von AATF an den R-loop-Komplex binden, gehen. Ziel dieser Analyse ist es, ein besseres Verständnis der Rolle AATFs im R-loop Netzwerk zu erlangen, und auf weiteres Verhalten der Hybride und AATFs im Rahmen von DNA-Schäden schließen zu können. Da AATF auch im primären Ziliom lokalisiert ist, können in diesem Kontext möglicherweise auch Hinweise auf Verbindungen zwischen Zilien und ziliären Signalwegen mit R-loops aufgedeckt, und durch AATF vermittelte Vorgänge der Fibrogenese bei NPH verstanden werden.

Interessanterweise weisen Mäuse mit einem konditionalen *Knockout* von *Ercc1* in Tubulusepithelzellen der Niere (*Ercc1^{tko}*) einen durch renale Fibrose geprägten degenerativen Phänotyp auf. In diesem Modell wird im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit der Zusammenhang zwischen *DNA-Damage* Reparaturdefekten und Nierenfibrose unter dem Ausschluss systemischer Effekte *in vivo* untersucht. Zunächst werden dabei biometrische Daten und laborchemische Parameter der Versuchstiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhoben und histopathologische Nierengewebeveränderungen analysiert. Dann werden, der Hypothese folgend, dass Vorgänge wie Seneszenz und programmierter Zelltod zur Entstehung des fibrotischen Phänotyps beitragen, Experimente auf Proteinebene und an histologischen Gewebeschnitten zur genaueren Aufschlüsselung dieser Teilprozesse durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Produktnummer
96-well plate qPCR/ Fast Thermal Cycling Plates 96 well 0,1 ml	Applied Biosystems	4346907
96-well Platte mit durchsichtigem Boden (BCA Assay)	Greiner	655180
adhäsive qPCR Folie	Sarstedt	95.1999
Biosphere Pipettenspitzen mit Filter 10 µl, steril	Sarstedt	70.1116.210
Biosphere Pipettenspitzen mit Filter 1000 µl, steril	Sarstedt	70.762.211
Biosphere Pipettenspitzen mit Filter 200 µl, steril	Sarstedt	70.760.211
Deckgläser (rund, 12/18 mm Durchmesser) Nr. 1,5	Menzel	CB00120RAC/CB00180RAC
Falcons (Polypropylen konisches Röhrchen) 15 mL	Greiner	227261
Falcons 50 mL	Greiner	188271
Filterpapier/ Whatmanpaper/ Blotting papier	Sartorius	FT-2-521-580600 G
Gelkassetten 1 mm	Novex	NC2010
Histosetten® zur Paraffineinbettung	Simport	M499/11
Nitrilhandschuhe S	Abena	224685
Objektträger mit Mattrand, geschnitten (76x26 mm, 3x1 inch)	Engelbrecht	K123
PAP-Pen Liquid Blocker (5 mm)	Plano	L4197
Parafilm „M“	Brand	163-9170002
Phiolen zur Kryokonservierung von Zellen	Sarstedt	72.377
PVDF-Membran Immobilon FL	Millipore	IPFL00010
PVDF-Membran Immobilon P	Millipore	IPVH00010
qPCR Reagenzgefäß 0,2 ml	Sarstedt	72985002
qPCR Reagenzgefäßdeckel	Sarstedt	65989002
Reagiergefäß (1,5 ml)	Sarstedt	72690
Reagiergefäß (2 ml)	Sarstedt	72691
Safe Lock Reagenzgefäß (1,5 ml)	Eppendorf	0030 123.328

Stripetten 10 ml	Corning	4101
Stripetten 25 ml	Corning	4251
Stripetten 50 ml	Corning	4501
Stripetten 5 ml	Corning	4051
tC18 Cartridges (Stage Tips)	Sep-Pak	WAT036790
TipOne Pipettenspitzen, wiederbefüllbar 10 µl	Starlab	S1111-3700
TipOne Pipettenspitzen, wiederbefüllbar 1000 µl	Starlab	S1111-6700
TipOne Pipettenspitzen, wiederbefüllbar 200 µl	Starlab	S1111-1700
TipOne sterile Pipettenspitzen 0,1-10 µl	Starlab	S1110-3810
TipOne sterile Pipettenspitzen 101-1000 µl	Starlab	S1111-6811
TipOne sterile Pipettenspitzen 1-200 µl	Starlab	S1111-1816
Unsterile Pipettenspitzen 10/20 µl	Starlab	S1110-3700
Unsterile Pipettenspitzen 1000 µl	Starlab	S1111-6701
Unsterile Pipettenspitzen 200 µl	Starlab	S1111-1700
Westernkämme (10 well, 1 mm) für Polyacrylamidgele	Thermo Fisher	NC3010
Wiegeschälchen (89 x 89 mm)	Roth	2150.1
Zellkulturplatten 12 well	Corning	3513
Zellkulturplatten 24 well	Corning	3257
Zellkulturplatten 6 well	Corning	3516
Zellkulturschalen 10 cm	Corning	430167

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

3.2 Ausstattung/Laborgeräte

Autoklav	Systemec	V-150
Axiovert Mikroskop	Zeiss	200M
Block Thermostat	VWR	460-0350P
Confokales Mikroskop/ Axiobserver	Zeiss	LSM 710
Cycler	Applied Biosystems	7900 HT
Elektrophorese-Netzteil	Consort (Sigma-Aldrich)	Z337447
Fusion Solo Chemiluminometer	PeqLab	60-FU-Solo
Hamilton Pipette (50 µl)	VWR	549-1155
Kreisschüttler	IKA	0002980200
Mikrotom	Leica	RM2235
Mikrowelle	Severin	MW7809 19CW

Minizentrifuge	VWR	521-2844
Mithras multimodaler Platten Reader EnSpire (BCA)	Perkin Elmer	2300-0000
MJ Mini Personal Thermal Cycler (RNA)	BIO-RAD	MM005670
Multichannelpipette (8 Kanäle) 30 – 300 µl	VWR	613-0887
Nanodrop Spectrophotometer	PeqLab	1000
Netzteil PowerPac HC (Transfer)	BIO-RAD	1645052
Pinzette für Deckgläser	VWR	232-0111
Pipetboy acu	Integra	613-4428
Pipetten	Gilson	P2, P10, P20, P100, P200, P1000
Precellys 24 Homogenisator	Bertin Technologies	432-3750
Real-Time PCR System	Applied Biosystems/ Thermo Fisher	7900HT
Rollermixer für Falkons	Stuart™ (Aldrich)	Z675113-1EA
Rotations-Vakuum-Konzentrator RVC 2-25	Christ Martin™	12314073
Semi-Dry Elektroblothing System (Transferkammer)	PeqLab	
Slidescanner	Leica	SCN400
Sterile Hood	SCANLAF	Class 2 Mars B2
Temperierbare Zentrifuge 5415 R	Eppendorf	2262140-8
Temperierbare Zentrifuge 5417R	Eppendorf	2262180-7
Temperierbare Zentrifuge 5430R	Eppendorf	5428000410
Thermoschüttler	Grant	80076-377
Tischzentrifuge für PCR Mini Star Silverline	VWR	521-2844
Tuberoller	Neolab	D-8400
Überkopfschüttler	Elmi	ELME10030
Ultraschall-Homogenisator Digital Sonifier ®	Brandson	EDP100214239R (250/450)
Ultraschall-Homogenisator Sonoplus	Bandelin	HD2070
Vakuum Saugpumpe Zellkultur	Hettich Benelux	HETTBE_29004B
Vortex Mixer/ Schüttler	VWR	444-1372
Wasserbad 37°C	GFL	1003
Wasserbad zur Paraffinschnitttherstellung	Leica	HI1210

XCell SureLock Elektrophoresesystem	Invitrogen	100601-1408
Zellkulturinkubator	Binder	BD115

Tabelle 2: Ausstattung/Laborgeräte

3.3 Softwares und Programme

Software	Hersteller	Version
DataAssist	Applied Biosystems	2.01
FusionCAPT	Vilber Lourmat	15.16
GraphPad Prism	Graphpad Software, Inc.	6.07
ImageJ/Fiji	Wayne Rasband	1.49h
ImageScope	Aperio	12.0.1.5030
Microsoft 365	Microsoft	2021
Nanodrop 1000	Thermo Scientific	3.7
RQ Manager	Applied Biosystems	1.2.1
SDS Software	Applied Biosystems	2.4
ZEN	Zeiss	3.0
MaxQuant	Max Planck	1.5.5.1
Perseus	Max Planck	1.5.5.3

Tabelle 3: Softwares und Programme

3.4 Chemikalien/Reagenzien und Lösungen

Name	Hersteller	Produktnummer
ABC-Reagenz	Vector labs	PK 7100
Acetic Acid (Essigsäure)	Sigma (Fluka)	49199
Acetonitrile (ACN)	AppliChem	701881.1611
Agarose	Sigma	A9539
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich	A6141
Ammoniumpersulfat (APS)	Applichem	A1142,0250
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma	A9418
Bromphenolblau	Roth	A512
CaCl ₂ 0,25 M	Merck	10035048
Chloroform	Merck	1.02445.1000
Citric Acid	Roth	1818.1
Citric Acid Monohydrat >99,5%	Fluka	27490
Coumarinsäure 90 mM	Sigma	C9008
D(+)-Saccharose	Roth	4621.1
DAB-Lösung	Thermo Scientific	34002
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher	R0862
DMSO (Dimethylsulfoxid)	AppliChem	A3672.0100
dNTPs 100 mM	Thermo Fisher	R0182
Doxyzyklin Hyclat	AppliChem	A2951.0025
Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (1x) Glutamax	Gibco=ThermoFisher	31966-021
Ethanol ≥99.9%	Roth	9065

Ethylen glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)	Sigma-Aldrich	E4378-100G
Ethylendiamin-tetraacetic acid (EDTA) 99%	Sigma	E5134-250G
Ethylenediaminetetraaceticacid disodium salt dehydrate (EDTA)	Sigma	60-00-4
Fetales Bovines Serum (FBS)	Gibco (by life technologies TM)	10270-106
Formaldehyd 37%	Th. Geyer	4979.1
Formic Acid ~98% (Ameisensäure)	Sigma (Fluka)	94318
Glycerol	Roth	3783
HEPES 1 M	Sigma	H0887
Histomount	National Diagnostics	HS-103
Hydroxyurea 10 mM	Sigma-Aldrich	H8627
Hygromycin B Gold 100 mg/ml	InvivoGen	Ant-hg-5
Iodoacetamide	Merck	8.04744.0025
Incidin PLUS	Igefa	225194
Incuwater-Clean	AppliChem	A5219,0100
Isopropanol	Roth	5752.3
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma/Roth	P5405/6781
KH ₂ PO ₄	Sigma	P5655
LC-MS-grade Wasser zur Chromatographie	Merck	1.15333.2500
Lipofectamin® RNAiMAX Transfektionsreagenz	Thermo Scientific	13778150
Luminol 250 mM in DMSO	Sigma (ehem. Fluka)	09253
Magnesium Sulfat Heptahydrat	Roth	P027
Mayer's Haematoxylin	Sigma-Aldrich	MHS 128-4L
Methanol ≥99.9%	Roth	4627
MgCl ₂	Merck	1.05833.0250
N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (TEMED)	Roth	2367.3
Na ₃ VO ₄ (Stock 0,1 M) Phosphatase Inhibitor 2 mM gelöst in H ₂ O	Sigma	S6508
Natrium Acetat	Merck	6268
Natrium Acid 99%	Roth	K305.1
Natrium(di-)hydrogenphosphat heptahydrat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma	S9390
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma	S5886
Natriumdeoxychololat (Na-DOC)	Sigma	D6750
Natriumhydroxid (NaOH) 2 N	Roth	T135
NEB 2.1 (10X)	NewEngland Biolabs	B72025

Normal Donkey Serum (NDS)	Jackson Immunoresearch	017-000-121
Opti-MEM®	Gibco/Invitrogen	31985-074
PageRuler™ Plus, vorgefärbter Proteinmarker 10 – 250 kDa	Thermo Scientific	26620
Paraformaldehyd (PFA) 4%	Sigma	P6148
Penicillin/Streptomycin 10 000 U/ml	Gibco	15140-122
Periodsäure 99%	Roth	3257
Phenol (TriReagent)	Sigma	T9429-200ML
PIM (Protease Inhibitor Mix)	Roche	11836145001
PMSF (Stocklösung 1 mg/mL) Protease Inhibitor, in Ethanol gelöst auf 44 µg/µl	AppliChem	A0999
Polyacrylamid	Roth	T802.1
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific	4367659
Prolong Diamond Antifade Mountant (Eindeckmedium) mit DAPI	Invitrogen (ThermoFisher)	P36971
Puromycin	InvivoGen	ant-pr-1
Ribonuklease A 10 mg/ml	AppliChem	A2760
RNase freies Wasser	Invitrogen	10977-035
Rotiblock (10x)	Roth	A151.2
Schiff's Reagenz	VWR	1.090.330.500
Sodium dodecyl sulfat (SDS) für Transferpuffer	AppliChem	A2263,0500
Sodium dodecyl sulfat-Pellets (SDS) für Laufpuffer	Roth	CN30.3
Tetrazyklin-freies FBS	Clonetech	631106
Trinatrium-citrate-dihydrate ≥99%	Roth	HN12.4
Tris-Base (Trizma® base)	Sigma	T1503
Tris-HCL (Hydrochlorid)	Roth	9090.3
Triton-X	Merck	1086431000
Trypsin-EDTA (1X) 0,05%	Gibco	25300096
Tween®-20	Caesar & Lorentz	3472
Urea	Sigma-Aldrich	U1250
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ 30%	Roth	8070.2
Xylol ≥98%	Geyer	0371.5000
Zirkonia/Glas Kügelchen, 1mm Durchmesser	Roth	N035.1

Tabelle 4: Chemikalien/Reagenzien und Lösungen

3.5 Kits/Assays

Kit/Assay	Hersteller	Produktnummer
Avidin/Biotin blocking kit (Vector sp2001)	Vector Labs	SP-2001
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit inkl. MultiScribe™ Reverse Transkriptase 50 U/μL	Applied Biosystems/ Thermo Fisher	4368813
MycoPCR Mycoplasmen-Detektionskit I/C	Promokine	PK-CA91-1096
Pierce™ BCA (Bichinchoninic Acid) Protein Assay Kit inkl. BCA Reagenz A/B	Pierce TM	23227
Rodent Polymer Mouse on Mouse (M.O.M.®) Elite® Peroxidase blocking Kit	Vector Labs	PK-2200
Super Signal® West Femto maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific	34045

Tabelle 5: Kits/Assays

3.6 Primäre Antikörper

Antigen	Wirt	Klonalität	Hersteller	Produktnummer	Verwendung (Verdünnung)
AATF/Che-1	Kaninchen	polyclonal	Geschenk von Maurizio Fanciulli, Rom, Italien (Fanciulli et al. 2000) ⁷⁹	-	IF (1:200)
Cleaved Caspase 3 (Asp 175)	Kaninchen	polyklonal	CellSignaling	9661	IHC (1:500)
DNA-RNA Hybrid (S9.6)	Maus	monoclonal	Kerafast	ENH001	IF (1:400)
GFP (FL)	Kaninchen	polyclonal	SantaCruz	sc-8334	WB (1:1000)
Histone H2A.X	Kaninchen	polyklonal	CellSignaling	2595	WB (1:1000)
P16 (M-156)	Kaninchen	polyklonal	SantaCruz	Sc-1207	IHC (1:200)
P16INK4a	Maus	monoklonal	Abcam	ab54210	IHC (1:200)
P21	Maus	monoklonal	SantaCruz	Sc-817	IHC (1:200)
P21 (H-164)	Kaninchen	polyklonal	SantaCruz	Sc-756	IHC (1:200)

Phospho-Histone H2A.X Ser139	Kaninchen	polyklonal	CellSignaling	2577	WB (1:1000) IF (1:500)
β -Tubulin (H-235)	Kaninchen	polyklonal	SantaCruz	sc-9104	WB (1:500)

Tabelle 6: Primäre Antikörper

3.7 Sekundäre Antikörper

Antigen/ Epitop	Tag	Wirt	Klonalität	Hersteller	Produkt-nummer	Verwendung (Verdünnung)
Kaninchen-IgG (H+L)	HRP	Ziege	polyklonal	Dako	P0448	WB (1:30 000) IHC (1:500)
Kaninchen-IgG (H+L)	Cy TM 3	Esel	polyclonal	Jackson Immuno Research	711-165-152	IF (1:400)
Kaninchen-IgG (H+L)	Cy TM 5 (DL649)	Esel	polyklonal	Jackson Immuno Research	715-175-150	IF (1:500)
Maus-IgG (H+L)	Biotin	Esel	polyklonal	Jackson Immuno Research	715-065-151	IHC (1:500)
Maus-IgG (H+L)	HRP	Ziege	polyklonal	Dako	P0447	IHC (1:500)
Maus-IgG (H+L)	Cy TM 3	Esel	polyclonal	Jackson Immuno Research	715-165-150	IF (1:400) IF S9.6 (1:500)

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper

3.8 Antikörperverdünnung

Immunfluoreszenzfärbung (IF) U2OS AATF/GFP.GFP TALEN mit S9.6 und AATF	2% BSA/PBS
Immunfluoreszenzfärbung (IF) U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP mit AATF	0,5% Triton-PBS (Primärantikörper zusätzlich + 5% NDS)
Immunhistochemie (IHC)	1% BSA/TBS
Western Blot (WB)	Proteinwaschpuffer (300 mM NaCl, 30 mM Tris, 0,3% Tween-20 (v/v))

Tabelle 8: Antikörperverdünnung

Die Durchführung der Versuche erfolgte, falls nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur. Die beschriebenen Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, in ddH₂O angesetzt.

3.9 Zellkultur

Die für die Experimente verwendeten immortalisierten Zellen wurden für bis zu 10 Passagen auf 10 cm-Zellkulturschalen in 37°C warmen Inkubatoren bei einem stabilen CO₂-Partialdruck

von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95% aufbewahrt. Je nach Zelllinie wurden durch die Verwendung unterschiedlicher Medien optimale Wachstumsbedingungen gewährleistet.

Die Kultivierung humaner U2OS Wildtyp Zellen (*human bone osteosarcoma epithelial cells*) erfolgte in DMEM(1X)Glutamax Medium mit Zusatz von 10% fetalem bovinen Serum (FBS). Dem Medium der U2OS TALEN Zellen mit integriertem GFP-AATF bzw. GFP (Kontroll)-Konstrukt wurde zusätzlich 2 µg/ml Puromycin hinzugefügt. Die U2OS RNaseH1(D210N) GFP Zellen wuchsen unter 1 µg/ml Puromycin und 50 µg/ml Hygromycin Selektion in DMEM(1X)Glutamax mit 10% tetrazyklinfreiem FBS und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin.

Die Arbeit an den Zellen erfolgte stets an Sicherheitswerkbänken mit Abzugshauben unter sterilen Konditionen, indem Geräte und Materialien sowie Arbeitsflächen vor und nach der Benutzung mit 70%igem Ethanol desinfiziert und ausschließlich steril filtrierte und autoklavierte Lösungen verwendet wurden. Zum Erhalt der Zellen wurden diese konfluenzabhängig in regelmäßigen Abständen auf neue Zellkulturschalen verteilt. Dazu wurde zunächst bei Raumtemperatur das Medium mit einer Vakuumpumpe abgesaugt, daraufhin ein kurzer Waschschritt mit PBS durchgeführt, und dann 1 ml 0,05%iges Trypsin-EDTA hinzugegeben, welches nach 5 Minuten Inkubation bei 37°C die Adhärenz der Zellen am Boden der Schale aufgelöst hatte. Durch Zugabe von 9 ml des auf 37°C vorgewärmten Mediums der jeweiligen Zelllinie konnte die Zellsuspension aufgenommen und in einer Verdünnung von 1:10-20 auf neue Zellkulturschalen verteilt werden.

1XPBS-Puffer (Phosphat Buffered Saline)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ (zur Zellkulturarbeit steril gefiltert)
--	--

Tabelle 9: Zusammensetzung PBS-Puffer

Zelllinien	
U2OS AATF.GFP TALEN Zellen	NephroLab, Köln
U2OS GFP.GFP TALEN Zellen (ctrl)	NephroLab, Köln
U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP	Pavel Janscak, Zürich
U2OS wt	NephroLab, Köln

Tabelle 10: Zelllinien

Zellkulturmedien	
U2OS wt	Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (1X) Glutamax, 10% FBS (v/v)
U2OS AATF/GFP.GFP TALEN	Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (1X) Glutamax, 10% FBS (v/v) Zusatz: 2 µg/ml Puromycin
U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP	Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (1X) Glutamax, 10% tetrazyklinfreies FBS (v/v), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin Zusätze: 1 µg/ml Puromycin 50 µg/ml Hygromycin B

Tabelle 11: Zellkulturmedien

3.9.1 Zellen einfrieren und auftauen

Zur Kryokonservierung wurden die trypsinisierten Zellen mit 9 ml des jeweiligen Zellkulturmediums versetzt und in einem 15 ml Reagenzröhrchen bei Raumtemperatur 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml zelllinienspezifischem Einfriermedium resuspendiert und zügig in eine Kryophiole transferiert, um dann mit Hilfe eines Gefrierbehälters langsam und gleichmäßig auf -80°C abgekühlt zu werden.

Zum Auftauen wurden die Zellen schnell auf 37°C erwärmt und in ein 15 ml Reagenzröhrchen mit 5 ml frischem, warmen Medium transferiert, um dann bei Raumtemperatur 5 min bei 1000 rpm zu einem Pellet herunterzentrifugiert zu werden. Nach der Aspiration des DMSO-haltigen Überstandes wurde das Pellet erneut in 10 ml warmem Medium resuspendiert und die Zellen wurden auf einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Für neu aufgetaute Zellen wurde routinemäßig mit einem Mycoplasmandetektionskit (Promokine) eine PCR zum Ausschluss einer Mykoplasmeninfektion durchgeführt.

Einfriermedien	
U2OS AATF/GFP.GFP TALEN	70% FBS (v/v) 20% U2OS AATF/GFP.GFP TALEN Zellkulturmedium (v/v) 10% DMSO (v/v)
U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP	80% U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zellkulturmedium (v/v) mit tetrazyklinfreiem FBS 20% DMSO (v/v)
U2OS wt	50% FBS (v/v) 40% U2OS wt Zellkulturmedium (v/v) 10% DMSO (v/v)

Tabelle 12: Einfriermedien

3.9.2 Transfektionen durch Lipofektion zur RNA-Interferenz

Zur temporären Ausschaltung von Genen wurden U2OS Wildtyp und U2OS AATF-GFP TALEN sowie U2OS GFP-GFP TALEN Zellen durch Lipofektion mittels *small interfering RNAs* (siRNAs) transfiziert. Durch die lipophile Eigenschaft von Zellwänden können siRNAs enthaltende Lipidkomplexe per Endozytose von Zielzellen aufgenommen werden und die spezifischen siRNAs intrazellulär an die zum Zielprotein komplementäre mRNA binden.

Die durch enzymatische Spaltung durch eine Endoribonuklease (Dicer) gebildete doppelsträngige siRNA wird zytosolisch vom RISC-Komplex (*RNA induced silencing complex*) gebunden, welcher daraufhin die komplementären mRNA-Stränge abbaut, so dass die Expression des Zielproteins verhindert wird.

In einem 1,5 ml Reagenzgefäß wurden dazu Optimem, Lipofectamine RNAimax und die jeweilige siRNA im Verhältnis 1000:15:6 vermischt, wobei zunächst die Hälfte des benötigten Optimems mit Lipofectamine RNAimax und die andere Hälfte mit den siRNAs vermischt und dann beide Lösungen zusammengemischt wurden. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit, in der sich durch die anionischen Eigenschaften der Phosphatgruppen der Nukleinsäuren und die kationischen Eigenschaften der Lipide Mizellen bildeten, wurde die Transfektionslösung gleichmäßig im Zellkulturmedium der zu transfizierenden Zellen verteilt. Je nach Verwendungszweck, wurden Zellen mit einer Konfluenz von 50-70% in 10 cm Zellkulturschalen, 6-, 12- oder 24-*well*-Platten mit oder ohne Deckgläser kultiviert. Nach einer

Inkubationszeit von 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden zum Beispiel für Immunfluoreszenzfärbungen fixiert oder geerntet. Für jede Transfektion wurde parallel eine Kontrolltransfektion mit SiCtrl RNA durchgeführt, in welcher die Expression des Zielproteins konstant blieb.

ON-TARGETplus SMARTpool siRNA Sequenzen (5' → 3')	
Ctrl siRNA/Non-targeting pool 20 nmol Dharmacon (D-001810-10)	UGGUUUACAUGUCGACUAA UGGUUUACAUGUUGUGUGA UGGUUUACAUGUUUUCUGA UGGUUUACAUGUUUCCUA
humane AATF siRNA 5 nmol Dharmacon (L-004373-00)	CAAGCGCUCUGUCUAUCGA GUGAUGACCUUCUCUAGUG GCACUAAAGCAUUGUUGA CCAGGGUGAUUGACAGGUU
humane AQR siRNA 5 nmol Dharmacon (L-022214-01)	CGUCAUGAACGUCGAAUUU GCUUACAGCUGGCACGAUU GGAUGGAUUUAGCCGACUA UAGAAGAAGUCAACGAUU

Tabelle 13: siRNA Sequenzen

3.9.3 Induktion der RNaseH1-GFP mit Hilfe des T-REx™ Systems

Das in die U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zelllinie integrierte T-REx™ System ermöglicht die Induktion einer inaktiven Ribonuklease H1-Mutante mittels Tetrazyklinen. Das System nutzt dazu regulatorische Elemente des nativen Tet Operons^{114,115}. Die Hauptbestandteile des Systems sind der induzierbare Expressionsvektor des zu untersuchenden Gens, welcher durch einen starken CMV-Promoter^{116,117} mit zwei Tet Operator 2 Seiten kontrolliert wird, und ein regulatorisches pcDNA6 Plasmid, das unter dem CMV-Promoter für Tetrazyklin für den Tet Repressor kodiert. Zur Induktion der Ribonuklease H1 mit D210N-Mutation wurde Doxyzyklin Hyclat in der Konzentration 1 ng pro ml Zellkulturmedium in die subkonfluenten Zellkulturschalen gegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.9.4 Induktion von DNA-Schäden

Um in den Zellen Schäden an der DNA zu verursachen, wurde Hydroxyurea verwendet. Das Zytostatikum wurde in einer Konzentration von 10 mM ins Zellkulturmedium gegeben und für 16 Stunden bei 37°C mit den Zellen inkubiert.

3.9.5 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Die Immunfluoreszenzfärbung dient der Darstellung der intrazellulären Lokalisation von Proteinen und anderer Strukturen, gegen deren spezifische Epitope Primärantikörper gerichtet sind. Durch Bindung fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper an die Primärantikörper wird das Signal mikroskopisch sichtbar. Die für die Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Zellen wurden in 24- oder 12-well-Zellkulturplatten auf runden Deckgläsern mit einem Durchmesser von 12 bzw. 18 mm ausgesät und entweder unbehandelt oder nach einer Lipofektion oder Zytostatikabehandlung bei einer 70-90%igen Konfluenz weiterverarbeitet. Aufnahmen der

Zellen erfolgten unter Verwendung des 63x Immersionsobjektivs mit dem konfokalen Mikroskop LSM710 von ZEISS.

3.9.5.1 Immunfluoreszenzfärbung U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP mit AATF-Antikörper

Um AATF, ein vorrangig nukleäres, Chromatin-gebundenes Protein besser darstellen zu können, wurde eine Präextraktion der Zellen durchgeführt^{118,119}. Dadurch kann das Signal zytosolischer, nicht Chromatin-gebundener Proteine vermindert werden. Hierzu wurden die Zellen nach einem kurzen Waschschrift mit PBS zur Präextraktion 10 Minuten auf Eis mit CSK-Puffer inkubiert und daraufhin 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 4% PFA (Paraformaldehyd) fixiert. Nachdem die Zellen drei weitere Male mit PBS gewaschen wurden, folgte ein fünfminütiger Permeabilisationsschritt mit 0,5%igem Triton in PBS. Daraufhin wurden die Zellen 30 Minuten in Blockpuffer mit 5% Eselserum geblockt, um unspezifisches Hintergrundsignal möglichst gering zu halten. Zur Inkubation mit Primärantikörpern in den oben angegebenen Verdünnungen wurden die mit den Zellen bedeckten Deckgläser über Nacht bei 4°C in einer angefeuchteten Färbekammer gelagert.

Danach wurden die Zellen drei Mal für jeweils 5 Minuten vorsichtig in PBS gewaschen und 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln in im Verhältnis von 1:400 in 0,5%igem Triton-PBS verdünnten jeweiligen speziesspezifischen Sekundärantikörpern inkubiert. Darauf folgten drei weitere kurze Waschschriffe in PBS, woraufhin die Deckgläser mit einem DAPI-haltigem Eindeckmedium auf Objektträgern fixiert wurden.

CSK(Präextraktions)-Puffer	300 mM D(+)-Saccharose, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl ₂ , 25 mM HEPES, 0,5% Triton x-100 (v/v) in Aqua dest.
Permeabilisationspuffer	0,5% Triton x-100 (v/v) in 1XPBS
IF-Blockpuffer	3% NDS (v/v), 0,5% Triton x-100 (v/v) in 1XPBS

Tabelle 14: Zusammensetzung IF-Puffer

3.9.5.2 Immunfluoreszenzfärbung U2OS AATF/GFP.GFP TALEN mit S9.6 und AATF

Nach einem kurzen Waschschrift mit PBS wurden 0,5 ml Methanol in jedes *Well* gegeben und die Zellen zur Fixation 5 Minuten bei -20°C inkubiert. Nachdem das Methanol entfernt wurde, erfolgten drei Waschschriffe mit PBS. Um später ein spezifisches Signal für R-loops (DNA/RNA Hybride) mittels des S9.6 Antikörpers zu erhalten, wurden die Zellen 30 Minuten bei 37°C mit 3 µg/ml Ribonuklease A (AppliChem, A2760) in RNaseA-Puffer inkubiert, so dass einzelsträngige RNA abgebaut wurde. Zur weiteren Reduktion des Hintergrundsignals wurden die Zellen für 4 Stunden bei Raumtemperatur in 2% bovinem Serum Albumin (BSA) in PBS geblockt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit Primärantikörpern über Nacht und den jeweiligen Sekundärantikörpern analog zur Immunfluoreszenzfärbung der U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP-Zellen (s. o.). Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 2% BSA in PBS.

RNaseA-Puffer	500 mM NaCl, 1% 10XNEB 2.1 (v/v) in Aqua dest.
----------------------	--

Tabelle 15: Zusammensetzung RNaseA-Puffer

3.10 Protein Biochemie

3.10.1 Zellen ernten und lysieren mit RIPA-Puffer

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen nach einem kurzen Waschschrift mit PBS bei Raumtemperatur durch die Zugabe weniger Tropfen 0,05%igen Trypsin-EDTAs (5 Minuten Inkubation bei 37°C) vom Boden der Zellkulturplatte gelöst. Durch Zugabe von 1 ml kaltem PBS (pro *Well* bei 6-*well*-Platten) bzw. 3 ml PBS (in 10 cm Zellkulturschalen) konnten die Zellen aufgenommen und in ein Reagenzgefäß transferiert werden. Dieses wurde dann 5 Minuten bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand des entstandenen Pellets wurde vorsichtig mit einer Vakuumpumpe abgenommen. Das Pellet wurde daraufhin in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und in einem 1,5 ml Reagenzgefäß nochmals 5 Minuten bei 4°C und 1000 rpm herunterzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wurden 40 µl 4°C kalter RIPA-Puffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren auf das Pellet gegeben. Nach 15-30 Minuten Lyse bei 4°C wurden die Proben 90 Sekunden lang (1 circ., 40% Power) per Ultraschall homogenisiert.

RIPA-Zelllysis-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1% Triton x-100 (v/v), 0,1% Na-DOC (v/v)
Zusätze zur Zelllyse für Western Blot:	+ 2 mM Na ₃ VO ₄ + 4,4 µg/ml PMSF

Tabelle 16: Zusammensetzung RIPA-Puffer

3.10.2 Proteinkonzentrationsmessung

Um die Proteinkonzentration der Proben einander anzugleichen, wurde im Anschluss an die Zelllyse ein BCA-Assay zur Quantifizierung der totalen Proteinmenge der Proben durchgeführt. Dazu wurde das Pierce™ BCA (Bicinchoninic acid) Protein Assay Kit von Thermo Scientific verwendet. Neben einer Serumalbumin-Standardverdünnungsreihe, welche nach Angaben des Herstellers zubereitet wurde, wurden je 5 µl der vorher im Verhältnis von 1:100 verdünnten Proben in Triplikaten in *Wells* einer 96-*well*-Platte mit durchsichtigem Boden pipettiert. Die BCA Lösung B und BCA Lösung A wurden in einem Verhältnis von 1:50 vermischt und je 150 µl pro *Well* hinzugegeben. Nach einer 15-sekündigen Vermengung der Reagenzien bei 300 rpm auf einem Schüttler wurde die Platte für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die in den Reagenzien befindliche Bicinchononsäure reagierte währenddessen durch Chelatbildung mit in der Biuret-Reaktion durch die Proteine im alkalischen Medium freigesetzten Kupfer-Kationen in einer Farbreaktion lila. Die daraufhin bei 560 nm mittels Mithras LB 940 Microplate Reader gemessene Absorption wurde in Relation zu den Absorptionen der Protein-Standardverdünnungsreihe gesetzt.

Wenn die Lysate als Proben für Western Blot weiterverwendet werden sollten, erfolgte eine Normalisation der Konzentrationen durch entsprechende Verdünnung mit RNasefreiem ddH₂O. Nach Aufbereitung der Proben mit 2X bzw. 5X Lämmli+ DTT (Dithiothreitol) konnten die Proben bei -20°C gelagert werden oder zur Denaturierung 5 Minuten bei 95°C aufgekocht, 1 Minute bei 14000 rpm herunterzentrifugiert und direkt aufs Westerngel geladen werden. Das im Lämmli-Puffer enthaltene DTT spaltet als Reduktionsmittel Disulfidbrücken im Protein, so dass tertiäre Faltstrukturen aufgelöst werden. Das Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) verleiht den Proteinen unabhängig von ihrer eigenen Ladung eine negative Gesamtladung.

2X Lämmli-Puffer	100 mM Tris, 20% Glycerol (v/v), 4% SDS (w/v), Bromphenolblau
-------------------------	---

	+ 100 mM DTT
5X Lämmli-puffer	250 mM Tris, 50% Glycerol (v/v), 10% SDS (w/v), Bromphenolblau + 100 mM DTT

Tabelle 17: Zusammensetzung Lämmli-puffer

3.10.3 SDS Polyacrylamid Gel Elektrophorese und Immunoblotting

Mittels SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blot lassen sich Proteine ladungsunabhängig ihrer Größe nach elektrophoretisch auftrennen und durch Antikörperfärbung auf einer Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran sichtbar machen. Zur Herstellung der Gele wurden 6 ml Trennpuffer mit 10% bzw. 15% Polyacrylamidgehalt in eine Gelkassette gegeben und mit einer Schicht Isopropanol zur Vermeidung von Blasenbildung abgedeckt. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt und 1,7 ml Sammelpuffer mit 5% Polyacrylamidgehalt auf das Trenngel gegeben. 0,1% APS und 0,15% TEMED wurden den Puffern jeweils frisch hinzugesetzt. Das Sammelgel wurde mit einem 1 mm Kamm versehen, welcher im Gel 10 Taschen zum Laden der Proteine aussparte. Nach der Polymerisation wurden die Gele entweder direkt verwendet oder in feuchten Tüchern bei 4°C gelagert. Zur Elektrophorese wurden die Gelkassetten in XCell SureLock™ Mini-Cell Kammern, welche daraufhin mit Laufpuffer gefüllt wurden, eingesetzt. Mit einer Hamiltonpipette wurden 3 µl des Proteinmarkers PageRuler Plus in eine Tasche und die gewünschte Menge an Proteinproben in die anderen Taschen gegeben. In einer 30-minütigen Sammelphase bei 70 V sammelten sich die Proben am unteren Ende des 5%igen SDS-Sammelgels, in der darauffolgenden 90 bis 100-minütigen Trennphase bei 25 mA pro Gel teilten sich die Proteine der Größe nach im Trenngel auf.

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels Semi-Dry Verfahren an PVDF-Trägermembranen gebunden. Dazu wurden das Gel und zwei Filterpapiere kurz in Transferpuffer eingelegt und die PVDF-Membran 1 Minute in Methanol aktiviert, bevor die Proteine bei einer konstanten Spannung von 12 Volt für 1 Stunde vom Gel auf die PVDF-Membran transferiert wurden. Zum Schutz vor Austrocknung wurden Gel und Membran oberhalb und unterhalb von mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren feucht gehalten. Im Anschluss an den Transfer wurden die Membranen 1 Stunde in 5% BSA geblockt, um unspezifische Bindungsstellen der Proteine abzusättigen. Nach dreimaligem Waschen in Proteinwaschpuffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation im Primärantikörper bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde erneut dreimal in Proteinwaschpuffer gewaschen, um unspezifische Antikörperbindungen zu entfernen. Danach wurden die Membranen 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einem Meerrettichperoxidasegekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert.

Bevor die Proteine schließlich mittels ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Lösung A und B im Verhältnis 1:1 oder dem hochsensitiven Femto Substrat Kit mit einer Fusion-Solo™ Kamera detektiert werden konnten, wurden die Membranen erneut dreimal gewaschen. Alle Block- und Antikörperinkubationsschritte erfolgten in Reagenzröhrchen auf einem Roller-mixer, so dass die Lösungen sich gleichmäßig auf der Membran verteilen konnten.

Sammelgel (pH 6,8)	5% Polyacrylamid (v/v), 0,2% SDS (w/v), 250 mM Tris + 0,3% TEMED (v/v) + 0,2% APS (w/v)
---------------------------	--

Trenngel (pH 8,8)	10%/15% Polyacrylamid (v/v), 0,2% SDS (w/v), 750 mM Tris + 0,15% TEMED (v/v) + 0,1% APS (w/v)
--------------------------	--

Tabelle 18: Zusammensetzung Westerngele

Laufpuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% SDS (w/v)
Transferpuffer	188 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% SDS (w/v), 15,2% Methanol (v/v)
Proteinwaschpuffer (pH 7,5)	300 mM NaCl, 30 mM Tris, 0,3% Tween-20 (v/v)
Blockpuffer	5% BSA (w/v) in Proteinwaschpuffer
ECL (pH 8,5)	
Lösung A	100 mM Tris, 2,5 mM Luminol, 0,2 mM Coumarinsäure in Aqua dest.
Lösung B	100 mM Tris, 0,01% H ₂ O ₂ (v/v) in Aqua dest.

Tabelle 19: Westernpuffer und Lösungen

3.10.4 Immunopräzipitation für die Massenspektrometrie

Zur Identifikation des R-loop-Interaktoms in U2OS Zellen mit und ohne *Knockdown* von AATF wurden pro Kondition Zellen von je 3 Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser unter den oben beschriebenen Bedingungen geerntet und zusammengefügt. Alle Teilschritte der Immunopräzipitation (IP) wurden auf Eis oder in einem auf 4°C temperierten Raum durchgeführt. Zur Lyse wurden auf jedes Zellpellet 1200 µl des RNA-kompatiblen Zellkernlysepuffers (angelehnt an den RSB+T-Puffer von Cristini et al.¹⁰⁵) mit je 48 µl PIM (ohne EDTA) und 17,6 µl PMSF gegeben und gründlich resuspendiert, bis keine festen Zellbestandteile mehr sichtbar waren. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurden die Proben mit dem Wasserbadsonifikator Bioruptor® pico diagenode für 2 Zyklen à 30 Sekunden sonifiziert, so dass Chromatinfragmente einer Länge von ca. 200 bp entstanden. Nachdem die Lysate zum Abbau einzelsträngiger RNA 1 Stunde bei 37°C mit Ribonuklease A (0,1ng/µg genomische DNA) (AppliChem, A2760) inkubiert wurden, erfolgte ein 45-minütiger Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm, damit sich unlösliche Zellbestandteile am Boden des Reagenzgefäßes absetzten. Zuvor waren 30 µl magnetische Protein G *Dynabeads* mit 500 µl R-loop IP-Puffer und 2 µg des jeweiligen Antikörpers versetzt worden und 1 Stunde auf dem Überkopfschüttler inkubiert worden. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurden anschließend mit Hilfe eines die *Beads* bindenden Magneten der Puffer und die darin befindlichen ungebundenen Antikörper entfernt und die *Beads* für 3 Stunden mit 500 µl 0,5% BSA in sterilem PBS geblockt. Zur Entfernung des BSAs wurden die *Beads* daraufhin einmalig mit 700 µl R-loop IP-Puffer gewaschen, so dass schließlich 1000 µl Zelllysat zu den Antikörpergekoppelten *Beads* hinzugegeben werden konnten. Während einer 80-minütigen Inkubation auf dem Überkopfschüttler konnten die antikörperspezifischen Chromatinfragmente und Proteine binden. Danach wurde das überschüssige Lysat mit Hilfe des Magneten entfernt und 4 Waschschrte mit je 700 µl R-loop IP-Puffer durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrte wurde der Puffer vollständig entfernt und zügig mit der Elution zur Vorbereitung der Massenspektrometrie (MS) begonnen.

Zellkernlysepuffer	10 mM Tris-HCL (pH 7,5), 200 mM NaCl, 2,5 mM MgCl ₂ , 0,5% Triton x-100 (v/v), 0,1% SDS (w/v), 0,2% NaDOC (v/v) in Aqua dest.
---------------------------	--

R-loop IP-Puffer	10 mM Tris-HCL (pH 7,5), 200 mM NaCl, 2,5 mM MgCl ₂ , 0,5% Triton x-100 (v/v) in Aqua dest.
-------------------------	--

Tabelle 20: Zusammensetzung IP Puffer für MS

3.10.5 Vorbereitung der Proben auf die Massenspektrometrie

Im Anschluss an die IP wurden 50 µl 8 M Ureapuffer auf jedes Beadpellet gegeben, um die Antikörper, Proteine und Chromatinfragmente von den *Beads* zu lösen. Während dieses zehnmütigen Schrittes wurden die Proben in zweiminütigen Abständen auf einem Schüttler durchmischt. Zur Reduktion der Proben wurde DTT in einer Endkonzentration von 10 mM zu den Proben gegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Um später die Identifizierung der Peptide zu erleichtern, wurden außerdem, ebenfalls für 1 Stunde im Dunkeln, 50 mM IAA (Iodoacetamide) hinzugegeben, um die Cysteinreste der Peptide zu alkylieren. Der enzymatische Verdau der Proteine in Peptide erfolgte über Nacht (16 Stunden) im Dunkeln durch Zugabe von 0,1 ng Trypsin zu jeder Probe. Zuvor war die Probe vierfach mit 50 mM Ammoniumbicarbonat verdünnt worden, um mit einer Ureakonzentration < 2 mM und einem pH-Wert von ~8 optimale Bedingungen für die enzymatische Aktivität der Protease zu schaffen. DTT, IAA und Trypsin wurden zum Erreichen der gewünschten Konzentrationen ebenfalls in 50 mM Ammoniumbicarbonat verdünnt. Nach den 16 Stunden Inkubationszeit wurde zur Ansäuerung der Proben 98%ige Ameisensäure im Verhältnis 1:200 zur Probe hinzugegeben, so dass mit einer Konzentration von 0,5% Ameisensäure der pH-Wert wieder unter 3 lag und der Verdau gestoppt wurde.

Um die Reagenzien jeweils gleichmäßig zu verteilen, wurden die Proben nach jeder Zugabe eines neuen Stoffes für mehrere Sekunden auf einem Schüttler vermischt. Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -80°C.

Ureapuffer	8 M Urea, 50 mM Ammoniumbicarbonat in Aqua dest.
-------------------	--

Tabelle 21: Zusammensetzung Ureapuffer

3.10.6 Stage Tipping

Besondere Relevanz in der Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie hat die Entsalzung der Proben. Hierzu wurden die *Beads* zunächst mit Hilfe eines Magneten vom flüssigen Anteil der Probe getrennt. Die Probe wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur und 14000 rpm herunterzentrifugiert, um Überreste von Urea am Boden des Reagenzgefäßes zu sammeln und ausschließlich die Bestandteile, welche sich in Lösung befanden, fürs sogenannte Stage Tipping weiterwenden zu können.

Die verwendeten doppelschichtigen C18 Stagetips wurden mit je 25 µl Methanol equilibriert und mit 25 µl MS-Puffer B (mit organischen Lösungsmitteln) angefeuchtet. Danach erfolgten drei Waschschrte mit je 25 µl MS-Puffer A.

Um die Flüssigkeiten durch die Membranen zu leiten, wurden die Stagetips jeweils 1 Minute bei 2300 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Nachdem die Vorbereitung der stage tips abgeschlossen war, wurden je 200 µl der Proben geladen und per Zentrifugation (2 Minuten, 2500 rpm) an die Polymere der Stagetipmembranen gebunden. Nach einem weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritt mit 100 µl MS-Puffer A für 3 Minuten bei 2300 rpm wurde ein neues Reagenzgefäß verwendet, um die mit 40 µl MS-Puffer B aus den Stagetipmembranen ausgewaschenen Peptide aufzufangen. Das Lösen der Peptide von den Membranen erfolgte bei 1800 rpm für 2 Minuten.

Schließlich erfolgte ein 45-minütiger Evaporationsschritt in einem Rotations-Vakuum-Konzentrator, um zur gaschromatographischen Massenspektroskopie alle Flüssigkeit aus den Proben zu entfernen.

MS-Puffer A	0,1% Formic Acid (Ameisensäure) (v/v) in MS-grade Wasser
MS-Puffer B	80% ACN (Acetonitril) (v/v), 0,1% Ameisensäure (v/v) in MS-grade Wasser

Tabelle 22: Zusammensetzung MS-Puffer

3.10.7 Massenspektrometrie und Auswertung

Die Proben wurden in der hausinternen *Proteomics Facility* gemessen und mit den Softwares MaxQuant und Perseus bioinformatisch ausgewertet.

Zur Bestimmung von Gewicht und Ladung der Peptide wurde ein Quadrupol-Orbitrap-basiertes QExactives Plus-Massenspektrometer von Thermo Scientific verwendet¹²⁰. Die Dauer des Laufs betrug 2,5 Stunden.

Die gewonnenen Rohdateien wurden mit MaxQuant Version 1.5.5.1.¹²¹ unter den Standardeinstellungen mit einem LFQ-Algorithmus normalisiert und quantifiziert¹²². Daraufhin wurden die Daten mit dem humanen Referenzgenom ohne Isoformen (Uniprot Juni 2017) verglichen. Im Programm Perseus 1.5.5.3.¹²³ wurden *Reverse Hits*, Kontaminanten (zum Beispiel Keratine) und *Proteins identified by site* entfernt und die LFQ Werte logarithmisiert (log2). Weiterhin wurden die verschiedenen experimentellen Konditionen (Wildtypinteraktom in U2OS-Zellen (mlgG), R-loop-Interaktom unter SiCtrl (S9.6_SiCtrl) und SiAATF (S9.6_SiAATF)) miteinander verglichen und analysiert. Das R-loop-Interaktom unter SiCtrl wurde zur Plausibilitätskontrolle mit bereits veröffentlichten R-loop-Interaktomen anderer Zelllinien verglichen und es wurden nur Proteine mit einbezogen, die in 3 der 4 Proben gemessen wurden. Zur statistischen Analyse wurden der studentische T-test und *difference test* zwischen den Konditionen S9.6_SiCtrl und S9.6_SiAATF angewandt. Relevante Veränderungen der Proteinexpression im R-loop-Interaktom unter SiCtrl versus SiAATF wurden über einen P-Wert < 0,05 (-log₁₀ P-Wert > 1,3) und/oder eine log₂ *fold-change* > 0,58 (Anreicherung in SiAATF) oder < (-0,58) (Reduktion in SiAATF) definiert (Anpassung des von Borgal et al.¹²⁴ beschriebenen Protokolls). Die *Overlays* und Venn-Diagramme der verschiedenen Datensätze wurden mit InteractiVenn¹²⁵ erstellt.

Die massenspektrometrischen Rohdaten wurden in der PRIDE¹²⁶ ProteomeXchange Datenbank mit der Datensatzkennung PXD039767 hinterlegt.

Projektname: *S9.6 interactome in human U2OS cells depleted for AATF*

Nutzername: reviewer_pxd039767@ebi.ac.uk

Passwort: auf Anfrage erhältlich

3.11 Mausearbeit

Das für die *in vivo* Versuche verwendete Mausmaterial stammt von *Ercc1*^{fl/fl}; Ksp1.3/cre:pos (*Ercc1*^{fl/fl} cre tg oder *Ercc1*^{tko}) Mäusen sowie den Kontrolltieren *Ercc1*^{fl/wt}; Ksp1.3/cre:pos, *Ercc1*^{fl/fl}; Ksp1.3/cre:neg^{93,127}, welche in der hausinternen *in vivo Research Facility* unter anerkannten pathogenfreien Standards gehalten wurden. Um äußere Einflüsse auf Krankheitsverläufe und Befinden der Mäuse möglichst zu vermeiden, wurden die Mäuse konstant durch dieselben Tierpfleger versorgt und stets auf derselben Waage gewogen. Alle Experimente, die Arbeit mit Mäusen erforderten, wurden mit Genehmigungen durch das

LANUV durchgeführt.

Blutproben der Versuchstiere wurden für labordiagnostische Untersuchungen nach der Entnahme für 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und dann für 10 Minuten mit 3000 rpm herunterzentrifugiert, um Serumproben zu erhalten. Serumkreatinin und Harnstoff Spiegel wurden im Institut für Klinische Chemie der Uniklinik Köln gemessen. Nachdem die Tiere zu den angegebenen Zeitpunkten geopfert wurden, erfolgten Gewichtsmessungen und die Entnahme der Nieren. Die Organe wurden in 4%igem Formalin über Nacht bei 4°C fixiert und anschließend im Institut für Pathologie der Uniklinik Köln in Paraffin eingebettet und so zur histologischen Aufbereitung konserviert.

3.11.1 Paraffinschnittherstellung

Aus den in Paraffinblöcke eingebetteten Mäusenieren wurden mit einem Mikrotom 2-3 µm dicke Schnitte angefertigt, welche auf Objektträger aufgebracht wurden. Zur Verwendung der Schnitte zur Immunhistochemie wurden diese für einige Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und mindestens 1 Stunde bei 60°C inkubiert.

3.11.2 Immunhistochemie

Um die Schnitte zu entparaffinieren, wurden die Objektträger zunächst zweimal 5 Minuten in Xylol und dann in Ethanol in absteigenden Konzentrationen (EtOH 100% dreimal 3 Minuten (PAS) bzw. 5 Minuten (*Cleaved Caspase 3*, p16, p21), EtOH 95% zweimal 2 Minuten, EtOH 70% einmal 1 Minute) getaucht.

3.11.2.1 Antikörperfärbungen

Für die *Cleaved Caspase 3*, p16 und p21-Färbungen erfolgten nach der Entparaffinierung drei zweieinhalbminütige Waschschrte zur Rehydrierung in TBS, bevor die Objektträger für 10 Minuten bei 350W in der Mikrowelle in vorerwärmtem Citratpuffer gekocht wurden, um die Immunreaktivität des Gewebes wiederherzustellen und Antigene zu demaskieren. Nachdem die Schnitte abgekühlt waren und zwei weitere Male 2,5 Minuten in TBS gewaschen wurden, folgte eine 15-minütige Inkubation in 3%igem H₂O₂ in ≥99.9% Methanol zur Herunterregulation der endogenen Peroxidaseaktivität des Gewebes. Nach drei weiteren fünfminütigen Waschschrten, während derer ein PAP-Pen benutzt wurde, um die Schnitte zu umranden und zu markieren, erfolgten weitere Schritte, um unspezifisches Hintergrundsignal zu vermindern. Dazu wurden die Schnitte entweder (*Cleaved-Caspase 3*-Färbung) je 15 Minuten in Avidin- und Biotinlösung (Avidin/Biotin Blocking kit) oder (p16-, p21-Färbung) 30 Minuten in Maus-IgG Blocking-Reagenz (M.O.M. kit) zur Bindung endogener Mausantikörper inkubiert. Bevor und nachdem die Schnitte schließlich noch für eine Stunde in 5%igem BSA in TBS geblockt wurden, wurden sie jeweils dreimal 2,5 Minuten gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern bei 4°C über Nacht.

Am darauffolgenden Tag wurde die Temperatur der Objektträger eine Stunde auf Raumtemperatur äquilibriert und dann dreimal 2,5 Minuten in TBS gewaschen, woraufhin die 50-minütige Inkubation in Sekundärantikörper erfolgen konnte. Je nach Blocking-Methode wurde der entsprechende Biotin- oder HRP-konjugierte Sekundärantikörper verwendet. Darauffolgend wurden die Schnitte gewaschen und eine Stunde mit ABC-Reagenz inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrte wurde die Färbung dann durch ein- bis fünfminütige Inkubation bei 37°C mit DAB-Lösung visualisiert und die Objektträger für 5 Minuten in ddH₂O eingetaucht. Die Gegenfärbung der histologischen Architektur des Gewebes erfolgte durch eine zehnhsekündige Färbung mit Haematoxylin nach Meyer und einen sechsminütigen

Waschschrift unter laufendem Leitungswasser zur Ionisierung und damit Bläuung der basischen Gewebsanteile (v.a. Zellkerne).

3.11.2.2 PAS-Reaktion

Zur Durchführung der PAS-Reaktion wurden die Objektträger nach der Entparaffinierung zunächst 10 Minuten in mit Wasser auf eine Konzentration von 0,9% verdünnte Periodsäure getaucht und kurz mit ddH₂O gewaschen. Anschließend folgte die zehnmünütige Inkubation in Schiff's Reagenz. Nach einem weiteren Waschschrift in ddH₂O für eine Minute folgte die zehnmünütige Färbung mit Haematoxylin nach Meyer und ein dreimünütiger Waschschrift unter laufendem Leitungswasser zur Ionisierung der basischen Gewebsanteile. Daraufhin wurden die Objektträger schließlich noch einmal für 1 Minute in ddH₂O gewaschen.

Bei beiden Verfahren (Antikörperfärbung und PAS-Reaktion) wurden die Gewebeschnitte daraufhin in einer aufsteigenden Alkoholverdünnungsreihe (EtOH 70% einmal 1 Minute, 95% zweimal 2 Minuten, 100% dreimal 5 bzw. 3 Minuten) und Xylol dehydriert und anschließend mit Histomount unter Deckgläsern fixiert. Bevor die Schnitte mit dem Slidescanner (Leica) in den in den Abbildungen angegebenen Vergrößerungen gescannt wurden, wurden diese über Nacht bei Raumtemperatur unter dem Abzug getrocknet.

20X TBS-Puffer (pH 7,6)	305 mM Tris-HCL, 91 mM Tris-Base, 3 M NaCl in Aqua dest. (NaOH oder Citric Acid zur pH Adjustierung) (zur Verwendung auf 1X in Aqua dest. verdünnt)
10X Citratpuffer (pH 6,0)	87,4 mM Trinatriumcitratdehydrat, 12,6 mM Citric Acid Monohydrat in Aqua dest. (zur Verwendung auf 1X in Aqua dest. verdünnt)

Tabelle 23: Zusammensetzung Puffer Immunhistochemie

3.12 Arbeit mit Nukleinsäuren

3.12.1 RNA Isolierung

Aufgrund der Instabilität der RNA und der gesteigerten Aktivität von RNA abbauenden Enzymen bei Raumtemperatur wurden alle Schritte der RNA-Isolierung auf Eis oder in auf 4°C temperierten Zentrifugen unter einem Abzug durchgeführt.

Zur RNA-Isolierung aus Mäusenieren wurde je eine Viertelniere eines Versuchstiers verwendet (ca. 3 mm³). Um das Gewebe zu lysieren, so dass die RNA extrahiert werden konnte, wurde ein halbes 1,5 ml Reagenzgefäß mit Zirconia Glaskügelchen gefüllt und 0,7 ml TRIzol sowie das Gewebestück dazugegeben. Die Lyse in TRIzol erfolgte durch mechanischen Stress mit Hilfe des Precellys 24 Homogenisators (Programm 2, 5000 rpm, 1x30 Sek, 5 Sek. Pause). Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm wurde der Überstand (das Lysat) von den Glaskügelchen abgenommen und in ein neues Reagenzgefäß transferiert. Um RNA aus U2OS-Zellen zu isolieren, wurden ebenfalls 0,7 ml TRIzol genutzt. Dieses wurde, nachdem das Medium von den Zellen abgenommen wurde und ein kurzer Waschschrift mit PBS erfolgt war, direkt auf die Zellen gegeben und 5 Minuten inkubiert. Während der Inkubation wurden die Zellen bzw. das Gewebe vor allem durch das im TRIzol enthaltene Guanidiniumthiocyanat lysiert und die Ribonukleasen inaktiviert. Zur Unterstützung

der Lyse wurde auch hier mechanischer Stress ausgelöst. Dazu wurde mehrmals gründlich hoch- und hinunter pipettiert, bevor das Lysat von der Zellkulturplatte in ein 1,5 ml Reagenzgefäß transferiert wurde.

Nach der Zugabe von 140 µl Chloroform wurden sowohl die humanen Zell- als auch die Mäusenierenlysate auf einem Schüttler für 15-30 Sekunden durchmischt, 5 Minuten auf Eis inkubiert und dann nochmals vermischt. Darauf folgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm zur Phasenseparation. Von der klaren RNA-haltigen oberen Phase wurden jeweils vorsichtig 350 µl abgenommen und in ein neues Reagenzgefäß mit 350 µl Isopropanol gegeben. Die phenolhaltige magentafarbene untere Phase und die DNA-haltige mittlere Phase wurden verworfen. Zur Präzipitation wurde die RNA in Isopropanol für mindestens 2 Stunden oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Danach folgte ein zehnmütiger Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm, so dass RNA-Pellets am Boden entstanden. Der flüssige Überstand wurde vorsichtig entfernt und die Pellets wurden zweimal mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen und bei 11000 rpm für 10 Minuten wieder zu Boden zentrifugiert. Danach wurde die RNA 20 Minuten mit offenem Deckel unter dem Abzug getrocknet. Schließlich wurden die Pellets in je 20 µl nukleasefreiem Wasser aufgelöst und die RNA-Konzentration der verdünnten Isolate gemessen. An dieser Stelle bestand die Möglichkeit, die RNA-Lysate bei -80°C zwischenzulagern. Alternativ konnte direkt im Anschluss mit der reversen Transkription fortgefahren werden.

3.12.2 cDNA Synthese und quantitative *real time* PCR (qPCR) Analyse

Zur reversen Transkription der RNA in stabilere und zur qPCR geeignete cDNA wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) verwendet. Pro Reaktion wurden 1 µg RNA (auf ein Volumen von 10 µl mit nukleasefreiem Wasser verdünnt) mit je 2 µl 10X RT Puffer und 10X RT Zufallsprimern, 0,8 µl 25X dNTP-Mix (100 mM) und 1 µl reverser Transkriptase in ein qPCR Reaktionsgefäß gegeben und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurde eine zusätzliche Probe verwendet, zu der das Enzym Reverse Transkriptase nicht hinzugefügt wurde. Die Reaktion lief in einem Thermocycler unter folgenden Konditionen ab:

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25°C	37°C	85°C	4°C
Dauer	10 Minuten	120 Minuten	5 Minuten	∞
Vorgang	<i>Annealing</i>	DNA Polymerisation	Enzym Deaktivierung	Abkühlen

Tabelle 24: cDNA-Syntheseschritte

Um die entstandene 10X cDNA für die quantitative PCR verwenden zu können, wurde diese mit 180 µl nukleasefreiem Wasser auf 1X verdünnt. Auf einer 96-*well*-Reaktionsplatte wurden nun je 5 µl der verdünnten Proben in Duplikaten zu einem Mix aus SyBr Green (12,5 µl), dem entsprechenden Primer (0,15 µl) und nukleasefreiem Wasser (7,35 µl) per *Well* hinzugefügt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 25 µl in jedem *Well* befand. Neben den Primern, die zur Amplifizierung spezifischer Nukleinsäurefragmente verwendet wurden (z.B. hAQR und hAATF), wurden auch Primer für konstitutiv exprimierte Gene (hHPRT1 und hβ-Actin bzw. mHPRT1 und mβ-Actin) verwendet, deren Konzentrationen in der Kontroll- und *Knockdown*probe als Referenz für die herunterregulierten Gene genutzt wurden.

Als Negativkontrolle diente die Probe, welche ohne Reverse Transkriptase durch den Thermocycler gelaufen war und folglich keine cDNA enthalten durfte, sowie eine Probe, in welche 5 µl ddH₂O anstelle der cDNA-Probe hinzugefügt wurde.

In mehreren Zyklen erfolgte in einem Real-Time PCR System die Denaturierung, Hybridisierung und Verlängerung der DNA-Stränge mittels thermostabiler Polymerase, so dass die DNA exponentiell vervielfältigt wurde und so detektiert werden konnte.

	Temperatur	Dauer
Schritt 1		
Denaturierung	95°C	10 Minuten
Schritt 2 (40x)		
Denaturierung, <i>Annealing</i> und Extension	95°C 60°C	15 Sekunden 1 Minute
Schritt 3		
Dissoziation	95°C 60°C 95°C	15 Sekunden 15 Sekunden 15 Sekunden

Tabelle 25: Ablauf RT-qPCR

Im Programm SDS 2.4 wurden in der vom System generierten Datei zunächst die Negativkontrollen manuell kontrolliert. Dann wurde die Datei konvertiert und im RQ-Manager nach der Anpassung der Schwellenwerte als Ergebnisdatei exportiert. Daraufhin wurden im Programm DataAssist Ziel- und Kontrollgene festgelegt. Mit der doppelten delta CT Methode wurde nun der Unterschied in der Detektion und somit Expression der Zielgene (auf mRNA-Ebene) errechnet.

3.12.2.1 Oligonukleotide/qPCR Primer

Zielgen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
hAATF	5' CTTGGACACGGACAAAAGGT 3'	5' CTCCAGACCCTTCCTCATCA 5'
hAQR	5' CTTGTTCTAGAGAAGAGGATGG 3'	5' ACCAGTATAGAATTTAAGCATGTCC A 3'
hACTB	5' GGA CTTCGAGCAAGAGATGG 3'	5' AGCACTGTGTTGGCGTACAG 3'
hHPRT1	5' TGACACTGGCAAACAATGCA 3'	5' GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT 3'
mP16 INK4a	5' GGGTTTCGCCCAACGCCCGA 3'	5' TGCAGCACCACCAGCGTGTCC 3'
mIL-1A	5' TTGGTTAAATGACCTGCAACA 3'	5' GAGCGCTCACGAACAGTTG 3'
mIL-6	5' GCTACCAA ACTGGATATAATCAGG A 3'	5' CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA 3'
mIL-1B	5' TGTAATGAAAGACGGCACACC 3'	5' TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG 3'
mFoxo 4	5' CGGAGTGAAAGGGACAGTTTAG 3'	5' CCCTGTGGCTGACTTCTTATTC 3'
mTNF-α	5' TCTTCTCATTCTGCTTGTGG 3'	5' GGTCTGGGCCATAGA ACTGA 3'
mACTB	5' AAGAGCTATGAGCTGCCTGA 3'	5' TACGGATGTCAACGTCACAC 3'
mHPRT1	5' GCTGACCTGCTGGATTACAT 3'	5' TTGGGGCTGTACTGCTTAAC 3'

Tabelle 26: Übersicht Oligonukleotide/qPCR Primer

Alle Primer wurden von IDT (*Integrated DNA Technologies*) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Das Vorliegen von AATF im Kontext von R-loops

4.1.1 Methodik zur Untersuchung von R-loops

Zur Darstellung von R-loops verwendeten wir zunächst eine bereits erfolgreich für Experimente angewandte Linie humaner U2OS Zellen (zur Verfügung gestellt durch Pavel Janscak, Zürich), denn im NephroLab lagen bisher keine Erfahrungswerte zur Nutzung des direkt gegen DNA/RNA Hybride gerichteten Antikörpers S9.6 für Western Blot und Immunfluoreszenzfärbung vor. Sowohl im Western Blot (**Abbildung 6**) als auch in Immunfluoreszenzfärbungen (**Abbildung 7**) konnten wir das System der U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zelllinie validieren und bestätigen, dass die mit GFP markierte inaktive Mutante (D210N) der Ribonuklease H1 durch die Behandlung mit Doxyzyklin induziert wird. Da publizierte Daten darauf hinweisen, dass Replikationsstress die Akkumulation von R-loops induziert^{45,106}, behandelten wir die U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zellen außerdem mit Hydroxyurea, einem zytostatischen Reagenz (**Abbildung 6**). Durch das vermehrte Vorliegen von phospho H2.AX in den mit Hydroxyurea behandelten Proben konnten wir im Western Blot zeigen, dass Replikationsstress-assoziierte DNA-Schäden entstanden waren.

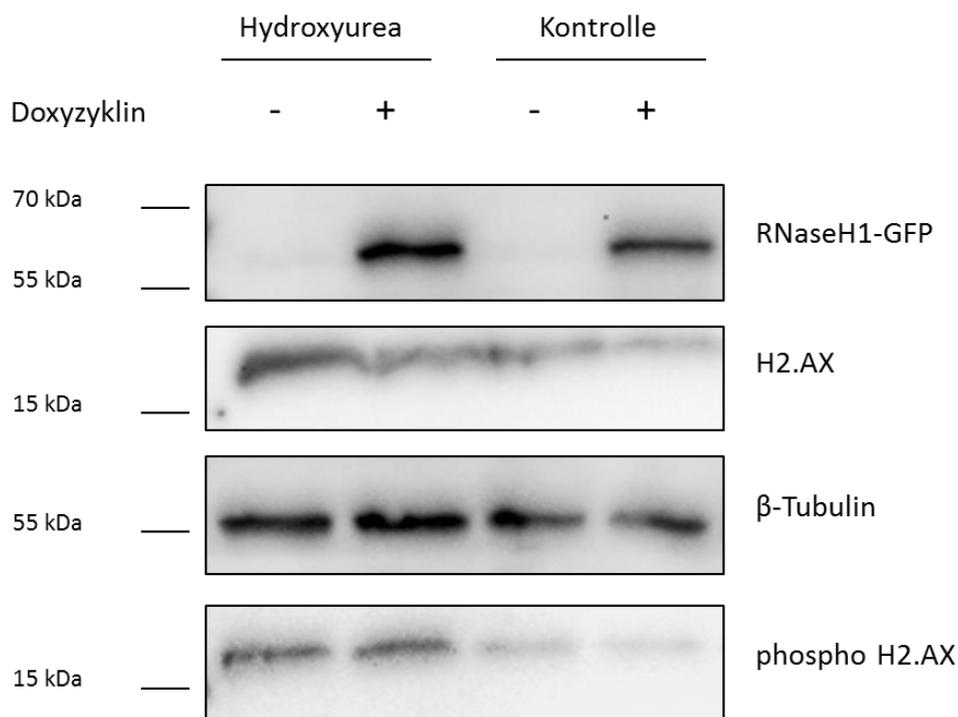


Abbildung 6: Western Blot mit Zelllysaten aus U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zellen. Hydroxyureabehandlung [10 mM] für 16 Stunden. Induktion der Mutante durch Doxyzyklin [1 ng/ml] über 24 Stunden. Antikörperfärbung mit GFP, H2.AX, β -Tubulin und phospho H2.AX. Bei den mit Doxyzyklin behandelten Zellen ist eine deutliche Bande auf der mit GFP angefärbten Membran in einer Höhe von 60 kDa (entsprechend der Größe von Ribonuklease H1 (32 kDa) mit GFP-Tag (27 kDa)) erkennbar. H2.AX und β -Tubulin wurden als Ladungskontrolle genutzt. (n=1, zur Validierung der Zelllinie)

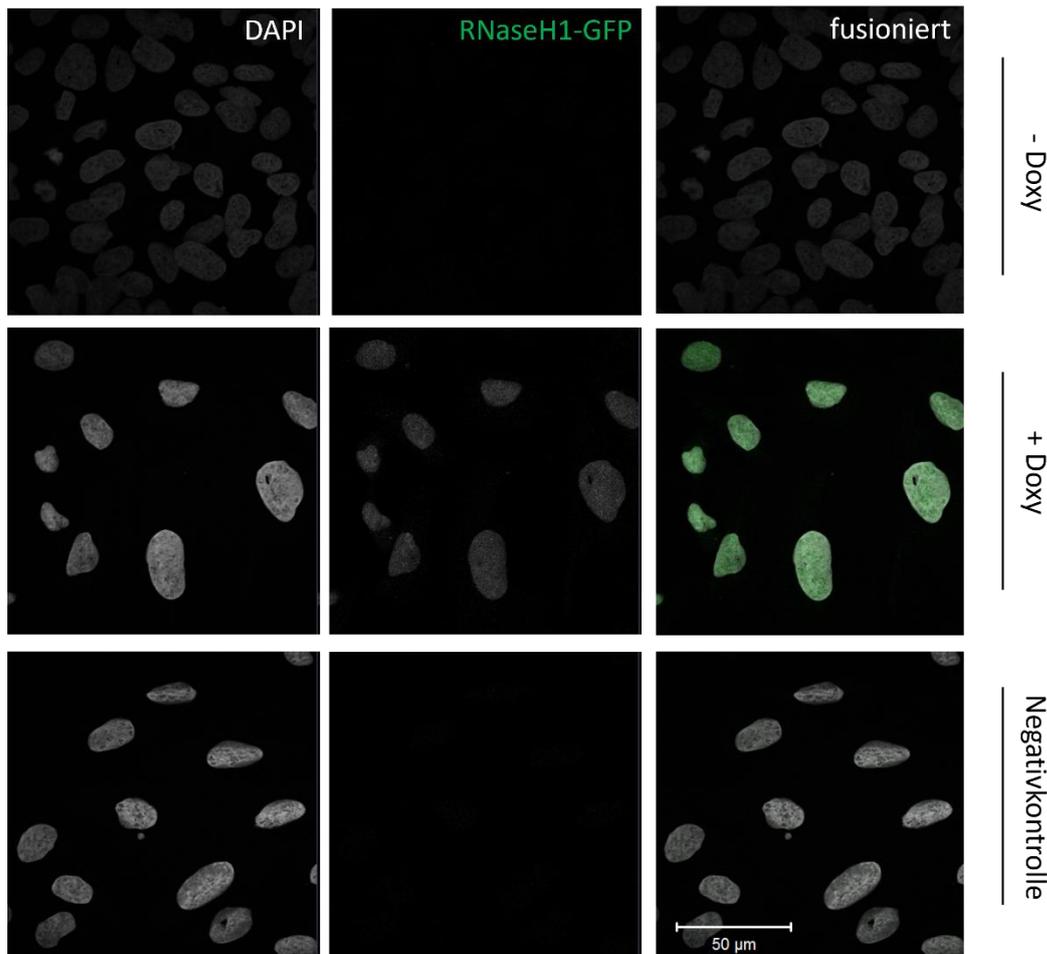


Abbildung 7: Expression und Lokalisation von RNaseH1-GFP in U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zellen. Induktion der RNaseH1 Mutante durch Doxyzyklin [1 ng/ml] über 24 Stunden. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI. In den mit Doxyzyklin behandelten Zellen ist im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen ein verstärktes Signal für die mutierte Ribonuklease H1-GFP zu sehen. Aus Visualisierungsgründen wurde die gesamte Abbildung in Kontrast (-40%) und Helligkeit (+40%) angepasst. Skalierung 50 µm. (n = 1, zur Validierung der Zelllinie)

4.1.2 Analyse des subzellulären Verteilungsmusters und Kolo-kalisation des *Apoptosis Antagonizing Transcription Factors (AATF)* neben R-loop-Komplexen

In der Vergangenheit wurde AATF, ein Regulator der zellulären Antwortkaskade auf DNA-Schädigung, mehrfach als Komponente von R-loop-Komplexen identifiziert^{45,105}.

Um die Rolle AATFs in diesem Zusammenhang weiter aufzuschlüsseln, analysierten wir die zelluläre Lokalisation von R-loops neben AATF mittels Immunfluoreszenzfärbungen verschiedener Zelllinien. Wir nutzten zunächst die U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zellen zur Darstellung von R-loops durch die mutierte Ribonuklease H1. AATF wurde zusätzlich durch in unserem Labor etablierte AATF- und Cy3-Antikörper visualisiert. Das detektierte AATF-Signal überlappten wir mit dem GFP-Signal der RNase H1 (D210N) (**Abbildung 8**).

Zur Induktion von R-loops wurde zudem ein *Knockdown* mit SiAQR durchgeführt¹⁰⁶, um zu prüfen, ob es dadurch zu einer Veränderung des Expressionsmusters von AATF kommt. Der Erfolg des AQR-*knockdowns* wird durch das Ergebnis der parallel zur Immunfluoreszenzfärbung durchgeführten quantitativen rtPCR in **Abbildung 9** abgebildet.

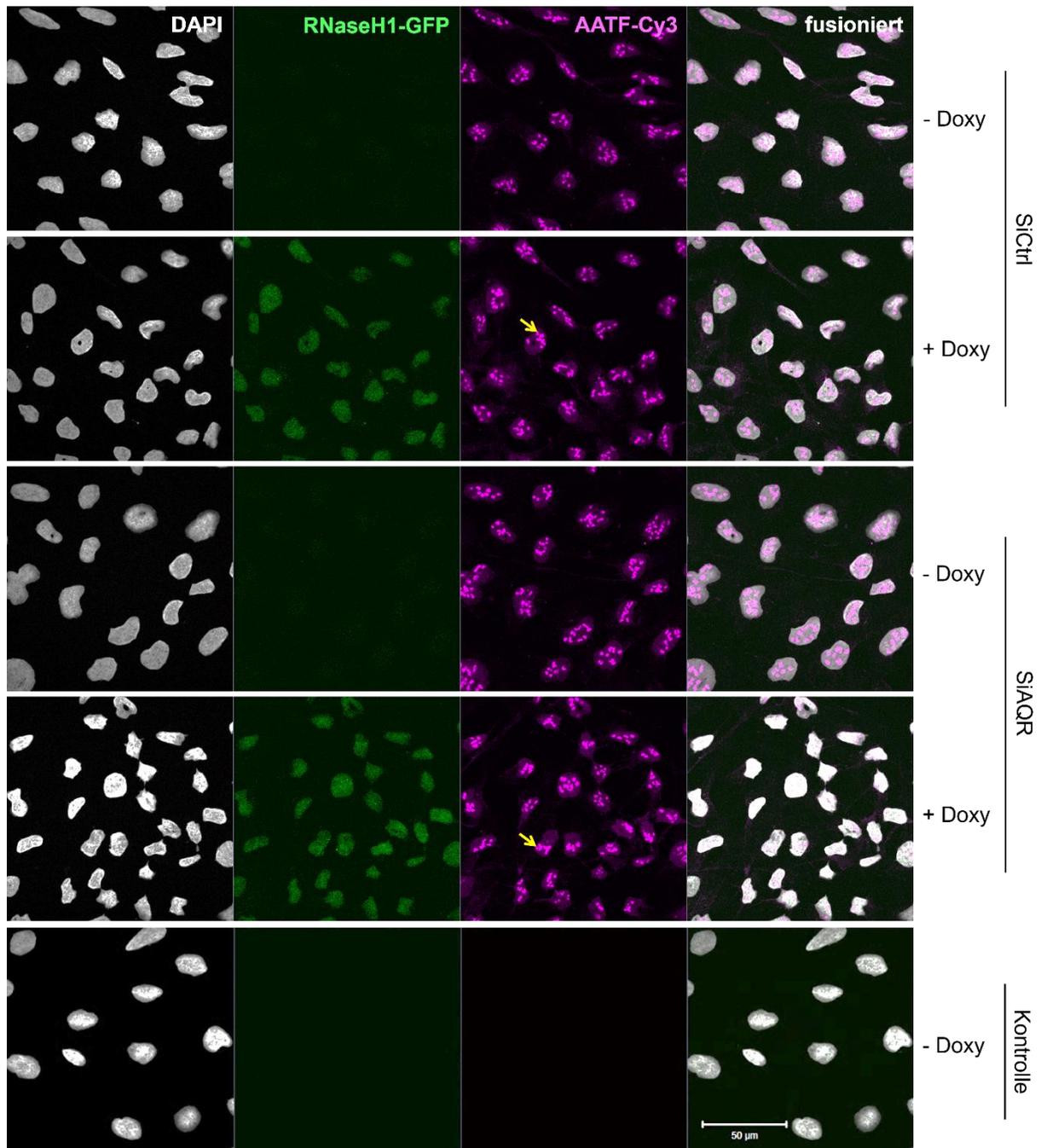


Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung von U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zellen mit und ohne R-loop Induktion durch SiAQR. 48 Stunden Inkubation mit siRNA. Antikörperfärbung mit AATF-Cy3. Gegenfärbung mit DAPI. Die gelben Pfeile zeigen beispielhaft die typische Expression von AATF in Nukleoli. Aus Visualisierungsgründen wurde die gesamte Abbildung in Kontrast (-40%) und Helligkeit (+40%) angepasst. Skalierung 50 µm. (n = 3)

Am fusionierten Immunfluoreszenzbild in **Abbildung 8** lässt sich erkennen, dass das Signal für AATF und RNase H1 (D210N) im Zellkern (mit DAPI visualisiert) überlappend vorliegt. Wie erwartet¹²⁸, wird AATF jedoch deutlich stärker in den Nukleoli exprimiert (beispielhaft mit gelben Pfeilen veranschaulicht). RNase H1 (D210N) weist ein anderes, eher homogen über den Nukleus verteiltes Expressionsmuster auf.

In den Färbungen ist außerdem erkennbar, dass das endogene GFP-Signal der RNase H1 (D210N) GFP Mutante unter SiAQR stärker ist und vermehrt R-loops vorliegen. Zudem lässt sich eine pyknotische Verformung der Zellkerne erkennen. Das AATF-Signal bleibt jedoch unverändert.

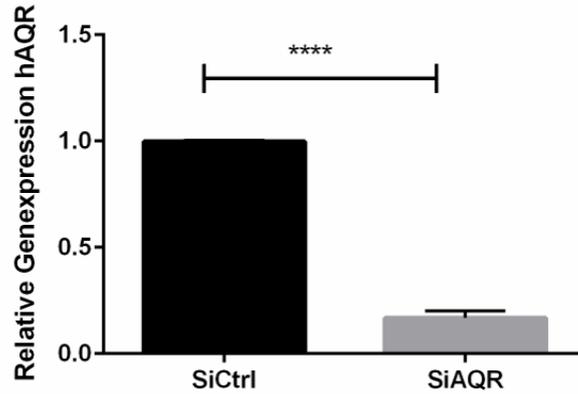
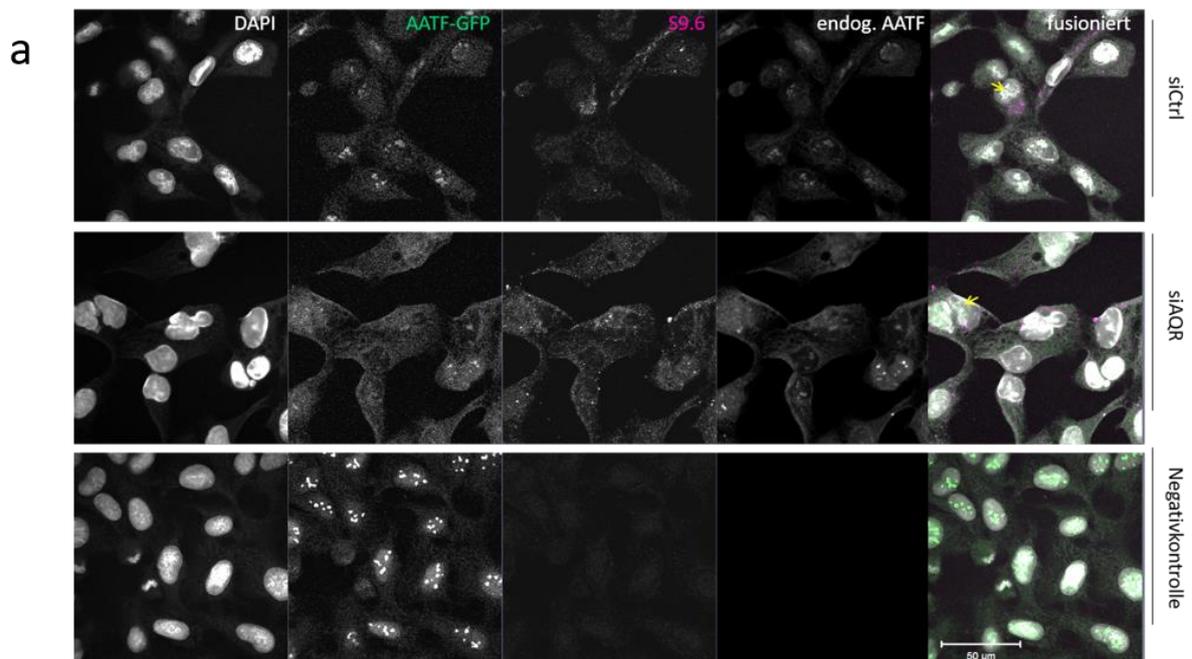


Abbildung 9: Relative Genexpression von humanem Aquarius (hAQR) in der quantitativen PCR aus U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zellen. Lipofektion mit SiCtrl und SiAQR [20 nM] über 48 Stunden. P-Wert < 0,0001 (hoch signifikant). (n=3)

Um die gewonnenen Ergebnisse zu validieren, führten wir im nächsten Schritt einen ähnlichen Versuch mit einer anderen Zelllinie, in der AATF mit einem GFP-Tag markiert ist, durch (U2OS AATF.GFP TALEN Zellen, **Abbildung 10**). Erneut wurde zur Induktion von R-loops ein *Knockdown* mit SiAQR durchgeführt.

Auch hier erfolgte parallel zur Immunfluoreszenzfärbung eine quantitative rtPCR, um die Signifikanz der Veränderung der relativen Genexpression von hAQR zu zeigen (**Abbildung 11**).

Zur Kontrolle der GFP-Markierung von AATF in der U2OS AATF.GFP TALEN Zelllinie färbten wir auch endogenes AATF an (AATF und Cy5 Antikörper, weiß).



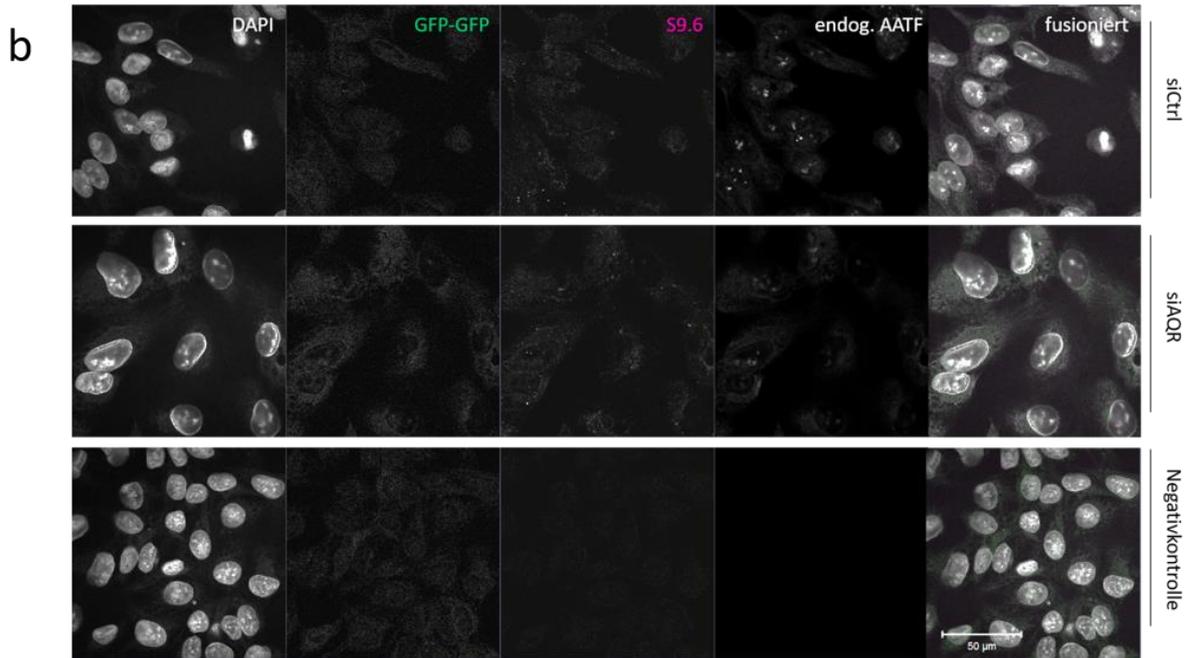


Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung von U2OS AATF.GFP TALEN Zellen (a) und U2OS GFP.GFP TALEN Zellen (b). Antikörperfärbung mit DAPI, S9.6 (Cy3, pink) und AATF (Cy5, weiß). Die gelben Pfeile im fusionierten Bild zeigen punktuelle Überlappungen des AATF- und S9.6-Signals. Zur besseren Sichtbarkeit des Immunfluoreszenzsignals sind die einzelnen Kanäle in schwarzweiß und nur das fusionierte Bild in Farbe dargestellt. Skalierung 50 µm. (n = 3)

Dabei zeigte sich, dass sich das Signal für das GFP-markierte AATF und endogenes AATF decken. Direkte Überlappungen von AATF (im fusionierten Bild AATF-GFP grün) mit R-loops, welche mit S9.6 (Cy3, pink) Antikörper angefärbt wurden (gelbe Pfeile), zeigen sich, übereinstimmend mit den Ergebnissen des vorherigen Experiments, allerdings nicht eindeutig (**Abbildung 10a**).

Als Kontrollzelllinie in diesem Experiment dienten U2OS GFP.GFP TALEN Zellen. Das Signal der AATF-Kontrollfärbung (AATF und Cy5 Antikörper, weiß) deckt sich hier schlüssigerweise nicht mit dem GFP-gekoppeltem GFP-Signal der U2OS GFP.GFP TALEN Zellen (**Abbildung 10b**). Das Verteilungsmuster von AATF änderte sich auch in den U2OS GFP/AATF.GFP TALEN Zelllinien nicht durch eine vermehrte Induktion von R-loops durch SiAQR.

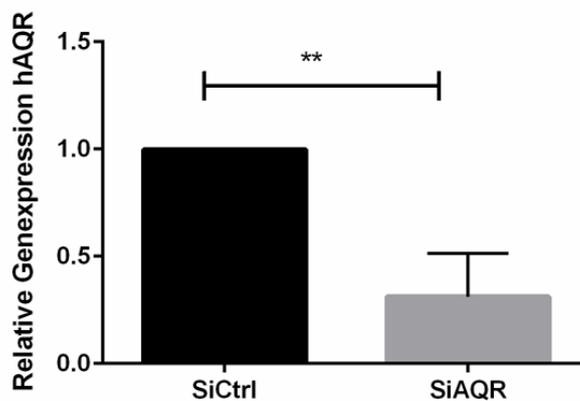


Abbildung 11: Relative Genexpression von humanem Aquarius (hAQR) in der quantitativen PCR aus U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zellen. Lipofektion mit SiCtrl und SiAQR [20 nM] über 48 Stunden. P-Wert < 0,01 (signifikant). (n=3)

4.1.3 R-loop-Interaktom in humanen U2OS Zellen (hU2OS)

In den vorherigen Experimenten wurde das Vorliegen von R-loops in humanen U2OS Zellen und von AATF in R-loop-Komplexen untersucht. Eine direkte Assoziation zwischen AATF und R-loops konnte dabei nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Weiterführend verfolgten wir einen unvoreingenommenen, breiter aufgestellten Ansatz: Mittels IP von S9.6 aus (mit SiCtrl transfizierten) hU2OS-Zellen wurden DNA/RNA-Hybrid-bindende Proteine dieser Zelllinie zur Bestimmung des R-loop-Interaktoms in hU2OS Zellen in vier voneinander unabhängigen Versuchsdurchläufen isoliert. Die Replikate dieser Kondition wurden gemeinsam mit vier Replikaten einer Negativkontrolle per Massenspektrometrie gemessen und ausgewertet. Als Negativkontrolle dienten (nicht transfizierte) Proben der hU2OS Zelllinie, in der die IP anstelle mit R-loop-spezifischem S9.6-Antikörper, mit unspezifischem mIgG-Antikörper durchgeführt wurde. Die Rohdaten der Analyse wurden in der PRIDE ProteomeXchange Datenbank mit der Datensatzkennung PXD039767 hinterlegt. In einer Hauptkomponentenanalyse zeigte sich ein eindeutiges Clustering ohne Überlappungen der Negativkontrolle (mIgG) und R-loop-Interaktom (S9.6_SiCtrl) in U2OS Zellen (gemeinsam dargestellt in der statistischen Analyse der Daten aus 4.1.3.1 in **Abbildung 14**). Als Komponenten von R-loops wurden Proteine gewertet, welche in der Kondition S9.6_SiCtrl in mindestens 3 der 4 Proben detektiert wurden. Dabei ergab sich eine Gesamtzahl von 1273 Kandidaten. Eine Auflistung befindet sich im Anhang (**Tabelle 34**).

Um die Ergebnisse auf Plausibilität zu überprüfen, verglichen wir die detektierten Proteine mit dem 2018 von Cristini et al. publizierten R-loop-Interaktom humaner HeLa Zellen¹⁰⁵. Die Analyse erfolgte technisch bedingt mit den Namen der zu den Proteinen gehörigen Gene und wird daher im Weiteren auch so benannt.

74% der bekannten R-loop-Interaktoren in HeLa Zellen konnten wir auch im hU2OS R-loop-Interaktom feststellen (**Abbildung 12**). Bei den in dieser Schnittmenge enthaltenen 344 Kandidaten handelt es sich folglich um R-loop-Interaktoren, die in mehreren menschlichen Zelllinien nachgewiesen wurden und denen damit eine gesteigerte Bedeutung zukommt.

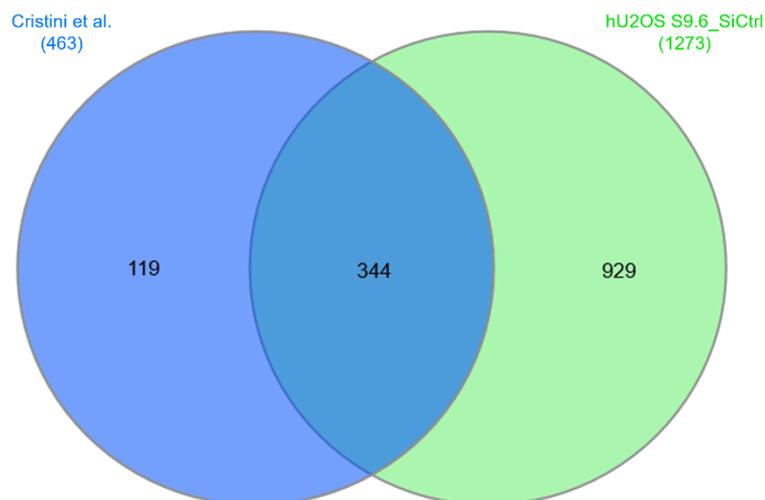


Abbildung 12: Überschneidung des R-loop-Interaktoms in HeLa Zellen nach Cristini et al.¹⁰⁵ (blau) mit dem R-loop-Interaktom humaner U2OS Zellen (grün). Schnittmenge im Venn-Diagramm: 344 Proteine (deckt 74% der von Cristini et al. veröffentlichten Interaktoren ab). Zur Analyse wurden die Genbezeichnungen der Proteine verwendet.

Eine Liste der genannten Proteine (mit zugehöriger Genbezeichnung) findet sich im Anhang (**Tabelle 35**). Interessanterweise findet sich AATF unter den in beiden Zelllinien detektierten Interaktoren.

4.1.3.1 Veränderungen des R-loop-Komplexes durch den Verlust von AATF

In der Literatur wird AATF neben seiner Rolle als p53 Effektor wiederholt als beeinflussender Faktor der Bildung von R-loops genannt^{45,96}. Da wir feststellen konnten, dass AATF auf zellulärer Ebene eine gewisse Kolo-kalisation mit R-loops und RNaseH1 zeigt (4.1.2) und im R-loop-Interaktom verschiedener menschlicher Zelllinien vorliegt (4.1.3), gingen wir der Fragestellung nach, welche Vorgänge AATF im R-loop Metabolismus auf Proteinebene steuert. Dazu ermittelten wir das R-loop-Interaktom unter dem *Knockdown* von AATF in hU2OS Zellen (hU2OS S9.6_SiAATF) in vier Replikaten und verglichen dieses mit dem R-loop-Interaktom (hU2OS S9.6_SiCtrl) aus 4.1.3.

Zuvor prüften wir den Erfolg der AATF-Suppression durch Lipofektion mit SiAATF mittels quantitativer rtPCR. Der erreichte *Knockdown* war in allen vier Replikaten verglichen zu den entsprechenden Replikaten für S9.6_SiCtrl hoch signifikant (**Abbildung 13**).

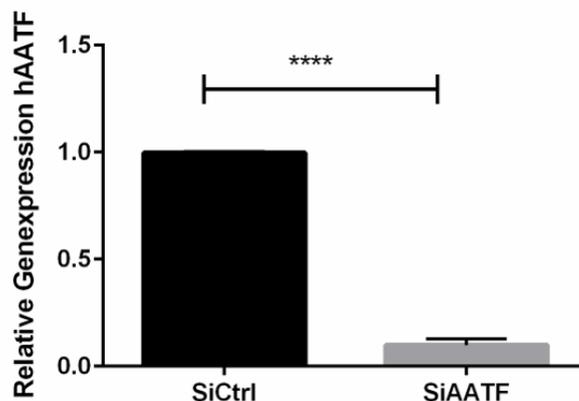


Abbildung 13: Relative Genexpression von humanem AATF (hAATF) in der quantitativen PCR aus humanen U2OS Zellen. Qualitätskontrolle der massenspektrometrisch ausgewerteten Proben zur Analyse des R-loop-Interaktoms mit und ohne AATF. Lipofektion mit SiCtrl und SiAATF [20 nM] über 48 Stunden. P-Wert < 0,0001 (hoch signifikant). (n=4)

Um die Qualität der Proben vor einer weiteren statistischen Auswertung zu beurteilen, führten wir eine Hauptkomponentenanalyse der 3 verschiedenen Konditionen durch (**Abbildung 14**). Aus dem Clustering lässt sich schließen, dass die durch die S9.6-IP erzeugten experimentellen Replikate der verschiedenen Konditionen zur Analyse geeignet sind und keine Überschneidungen mit der mIgG-Negativkontrolle (weiß) vorliegen.

Im Weiteren wurden nun zur Feststellung signifikanter Proteine der studentische t-Test und *difference test* zwischen den Konditionen S9.6_SiCtrl und S9.6_SiAATF durchgeführt. Es wurden auch hier nur Proteine in die Analyse mit einbezogen, die in mindestens 3 von 4 Replikaten der jeweiligen Kondition gemessen wurden.

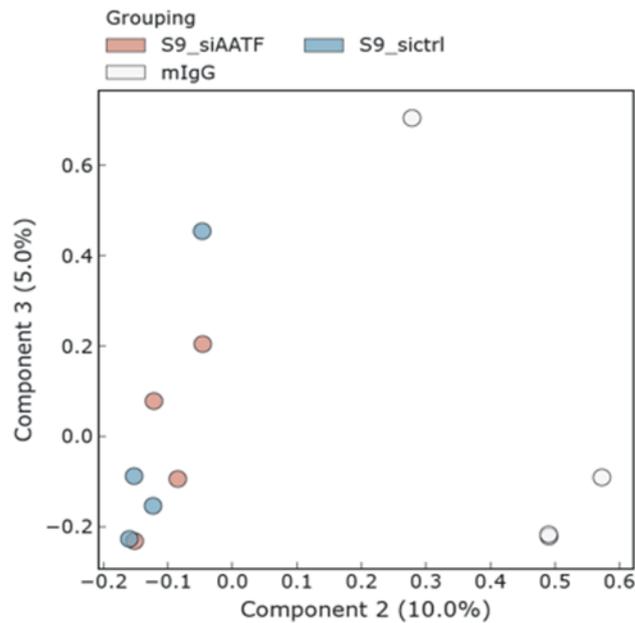


Abbildung 14: Hauptkomponentenanalyse der massenspektrometrisch gemessenen Proben S9.6_SiCtrl (blau), S9.6_SiAATF (rot) und der Kontrolle mIgG (weiß).

Abbildung 15 zeigt die proteomische Analyse der S9.6_SiAATF und S9.6_SiCtrl Proben in einem Vulkan-Plot. Blau markiert sind Proteine (Bezeichnung mit zugehörigem Gennamen) mit einem $-\log_{10}$ P-Wert $> 1,3$ im t-Test (entsprechend einem P-Wert $< 0,05$) und einer positiven oder negativen Veränderung von $\log_2(1,5) > 0,58$ oder $< (-0,58)$ im *difference test*. Die 6 markierten Kandidaten sind als Komponenten des S9.6-Komplexes in den AATF-depletierten hU2OS Zellen am signifikantesten verändert. Die Bezeichnungen der zu den Proteinen gehörigen Gene lauten NGDN, TECR, IGHV3-74, NOL10 und YWHAG. Bei dem blauen Punkt ohne namentliche Bezeichnung handelt es sich um die Komponente Ig lambda chain-V-II region MGC (*Ig lambda chain V-II region BOH*), für die kein Genname existiert.

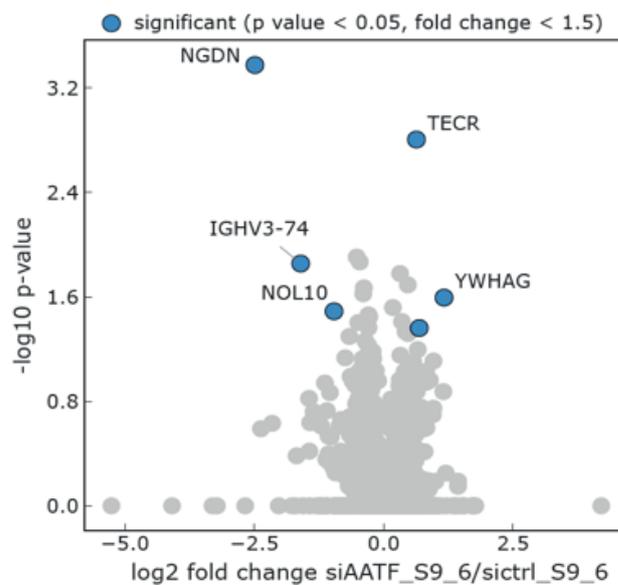


Abbildung 15: Vulkan-Plot der identifizierten signifikant veränderten Proteine. Jeder Punkt repräsentiert ein Protein. Für die markierten 6 Proteine (blau) gilt $-\log_{10}$ P-Wert $> 1,3$ und \log_2 *difference* $> 0,58$ oder $< (-0,58)$ (fold change $< 1,5$ im *difference test*): NGDN, TECR, IGHV3-74, NOL10, YWHAG und *Ig lambda chain-V-II region MGC* (ohne Genbezeichnung).

Die erhobenen Daten werden im Folgenden nochmals im Einzelnen beleuchtet, da aus biologischer Perspektive auch die Erfüllung einzelner analytischer Bedingungen ohne gemeinsame statistische Signifikanz von Relevanz sein kann:

In **Tabelle 27/28** sind daher zunächst nur die Proteine aufgelistet, welche im *difference-test* im SiAATF-R-loop-Interaktom (ohne Berücksichtigung des $-\log_{10}$ P-Werts) im Vergleich zum Kontrollinteraktom (SiCtrl-Transfektion) quantitativ verändert sind. Es werden an dieser Stelle alle Proteine genannt, die im SiAATF-R-loop-Interaktom mindestens ums 2fache angereichert oder vermindert sind.

Tabelle 27: In SiAATF im Vergleich zu SiCtrl angereichertes Protein. Definiert über Werte > 2 im *difference test*.

Proteinbezeichnung	Genbezeichnung
Neutrophil defensin 3;HP 3-56;Neutrophil defensin 2;Neutrophil defensin 1;HP 1-56;Neutrophil defensin 2	DEFA3;DEFA1

Tabelle 28: In SiAATF im Vergleich zu SiCtrl verminderte Proteine. Definiert über Werte $<(-2)$ im *difference test*.

Proteinbezeichnung	Genbezeichnung
	SON
Chromobox protein homolog 1	CBX1
Core histone macro-H2A.2;Histone H2A	H2AFY2
Drebrin	DBN1
High mobility group protein HMGI-C	HMGA2
Histone H2A type 2-B	HIST2H2AB
Histone H2B type 1-D	HIST1H2BD
Neuroguidin	NGDN
Nexilin	NEXN

Des Weiteren extrahierten wir die Proteine, welche im SiAATF-R-loop-Interaktom (unabhängig von ihrer Einstufung im *difference test*) im t-Test signifikant verändert sind (**Tabelle 29**). Es werden alle 20 Proteine aufgelistet, für die sich ein P-Wert $< 0,05$ ($-\log_{10}$ P-Wert $> 1,3$) ergibt.

Tabelle 29: Im SiAATF-R-loop-Interaktom signifikant veränderte Proteine mit $-\log_{10}$ P-Wert $> 1,3$ im t-Test.

Proteinbezeichnung	Genbezeichnung
	BCLAF1
14-3-3 protein gamma;14-3-3 protein gamma, N-terminally processed	YWHAG
Anaphase-promoting complex subunit 7	ANAPC7
ATP-binding cassette sub-family A member 13	ABCA13
Catenin beta-1	CTNNB1
Coatomer subunit zeta-1	COPZ1
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	EIF3K
Host cell factor 1;HCF N-terminal chain 1;HCF N-terminal chain 2;HCF N-terminal chain 3;HCF N-terminal chain 4;HCF N-terminal chain 5;HCF N-terminal chain 6;HCF C-terminal chain 1;HCF C-terminal chain 2;HCF C-terminal chain 3;HCF C-terminal chain 4;HCF C-terminal chain 5;HCF C-terminal chain 6	HCFC1

Ig heavy chain V-III region JON;Ig heavy chain V-III region WEA;Ig heavy chain V-III region TRO;Ig heavy chain V-III region BUT;Ig heavy chain V-III region KOL;Ig heavy chain V-III region DOB	IGHV3-74;IGHV3-21;IGHV3OR16-9;IGHV3-66;IGHV3OR16-10;IGHV3-20
Ig lambda chain V-II region MGC;Ig lambda chain V-II region BOH	
Neuroguidin	NGDN
Nucleolar protein 10	NOL10
PHD finger-like domain-containing protein 5A	PHF5A
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	PAFAH1B3
Protein unc-13 homolog D	UNC13D
Ras-related protein Rab-13	RAB13
THUMP domain-containing protein 1	THUMPD1
Thymidylate synthase	TYMS
Vacuolar protein sorting-associated protein 35	VPS35
Very-long-chain enoyl-CoA reductase	TECR

Aus biologischer Sicht kann es außerdem relevant sein, wenn Proteine jeweils nur unter einer der Konditionen im Interaktom vorliegen. Im Folgenden sind daher die ausschließlich unter einer der zwei Testkonditionen vorliegenden Proteine aufgelistet (**Tabelle 30/31**):

Tabelle 30: Ausschließlich im SiAATF-Interaktom vorliegendes Protein.

Proteinbezeichnung	Genbezeichnung
Dihydrolipoyl dehydrogenase;Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	DLD

Die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase liegt also beispielsweise nur im R-loop-Interaktom vor, wenn wenig bis kein AATF vorhanden ist. Die Proteine, die in **Tabelle 31** aufgeführt sind, finden sich nur unter der Anwesenheit von AATF, nicht jedoch nach AATF-*Knockdown* im R-loop-Interaktom. Sie lassen sich also lediglich im SiCtrl-R-loop-Interaktom nachweisen und bilden somit mögliche AATF-Interaktoren ab.

Tabelle 31: Ausschließlich im SiCtrl-R-loop-Interaktom vorliegende Proteine.

Proteinbezeichnung	Genbezeichnung
Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	SAMHD1
Dihydrofolate reductase;Dihydrofolate reductase, mitochondrial	DHFR;DHFRL1
HMG box transcription factor BBX	BBX
SEC23-interacting protein	SEC23IP
Sp110 nuclear body protein	SP110
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5	UBA5

4.1.4 R-loops und Zilien

Die Bildung von R-loops verursacht DNA-Schäden und löst damit auf zellulärer Ebene diverse, in Teilen noch unbekanntes Signalkaskaden aus. Vor kurzem wurde AATF als zentraler Modulator der Reaktion auf DNA-Schäden identifiziert. Im Mausmodell löst das Fehlen von

AATF eine Akkumulation von DNA-Doppelstrangbrüchen und dadurch auch die Bildung von R-loops aus. Zusätzlich lässt sich aber auch die Entstehung ziliärer Defekte und Phänotypen beobachten⁴⁵. Letzteres unterstreicht die Vermutung, dass Zilien in gewisser Form in die DDR involviert sind. Aus diesem Grund entschieden wir uns, die Verbindung zwischen R-loops und Zilien durch den Vergleich vorhandener Datensätze genauer zu untersuchen. Dazu verglichen wir das 2019 veröffentlichte Zilien-Referenzdatensatz (CiliaCarta)¹²⁹ mit dem von uns erstellten R-loop-Interaktom menschlicher U2OS Zellen aus 4.1.3 (**Abbildung 16**).



Abbildung 16: Überschneidung des R-loop-Interaktoms humaner U2OS Zellen S9.6_SiCtrl dieser Arbeit (grün) mit dem Zilien-Interaktom CiliaCarta 2019¹²⁹ (pink). Schnittmenge im Venn-Diagramm: 62 Komponenten

Das Venn Diagramm zeigt 62 Gene als Schnittmenge, welche in **Tabelle 32** aufgelistet sind.

Tabelle 32: Proteine der Schnittmenge aus CiliaCarta 2019¹²⁹ und hU2OS R-loop-Interaktom.

Proteinbezeichnung	Genbezeichnung
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	EFTUD2
14-3-3 protein gamma;14-3-3 protein gamma, N-terminally processed	YWHAG
14-3-3 protein theta	YWHAQ
26S protease regulatory subunit 7	PSMC2
26S protease regulatory subunit 8	PSMC5
Actin-related protein 2	ACTR2
Actin-related protein 3	ACTR3
Annexin A1;Annexin	ANXA1
ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type	PFKM
Casein kinase I isoform alpha	CSNK1A1
Catenin beta-1	CTNNB1
Clathrin heavy chain;Clathrin heavy chain 1	CLTC
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	DYNC1H1
Cytoskeleton-associated protein 5	CKAP5
Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2	NUBP2
Destrin	DSTN

Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYSL2
DnaJ homolog subfamily A member 1	DNAJA1
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1
Endoplasmin	HSP90B1
Ezrin	EZR
Filamin A	FLNA
Glycogen synthase kinase-3 beta	GSK3B
Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short;Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	GNAS
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8
Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1
Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1
Hexokinase-1	HK1
Importin-5	IPO5
Kinesin-like protein KIF2A	KIF2A
L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase	RAN
Microtubule-associated protein;Microtubule-associated protein 4	MAP4
Nuclear migration protein nudC	NUDC
Nuclear pore complex protein Nup93	NUP93
Nucleoside diphosphate kinase 7	NME7
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	DDX6
Profilin	PFN2
Pyruvate kinase PKM;Pyruvate kinase	PKM
Ran-specific GTPase-activating protein	RANBP1
RuvB-like 1	RUVBL1
RuvB-like 2	RUVBL2
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	ATP2A2
Septin-7	Sep 07
Septin-9	Sep 09
Sequestosome-1	SQSTM1
Serine/threonine-protein kinase PLK1	PLK1
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	PPP2R1A
SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	SLIRP
T-complex protein 1 subunit beta	CCT2
T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3
T-complex protein 1 subunit theta	CCT8
Transportin-1	TNPO1
Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B
Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C
Tubulin beta	TUBB
Tubulin beta-2A chain	TUBB2A
Tubulin beta-2B chain	TUBB2B
Tubulin beta-3 chain	TUBB3

Tubulin beta-4B chain	TUBB4B
Vacuolar protein sorting-associated protein 35	VPS35
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	VDAC3
WD repeat-containing protein 5	WDR5

Besonders interessierte uns schließlich, welche Kandidaten der genannten Schnittmenge zusätzlich im R-loop-Interaktom in HeLa Zellen nach Cristini et al.¹⁰⁵ vorliegen. Wir führten daher einen zusätzlichen *Overlay* der drei Datensätze durch (**Abbildung 17**) und erhielten eine Liste von 12 Kandidaten, die neben ihrer bekannten ziliären Assoziation nicht nur mit R-loops in humanen U2OS Zellen sondern auch in HeLa Zellen interagieren (**Tabelle 33**).

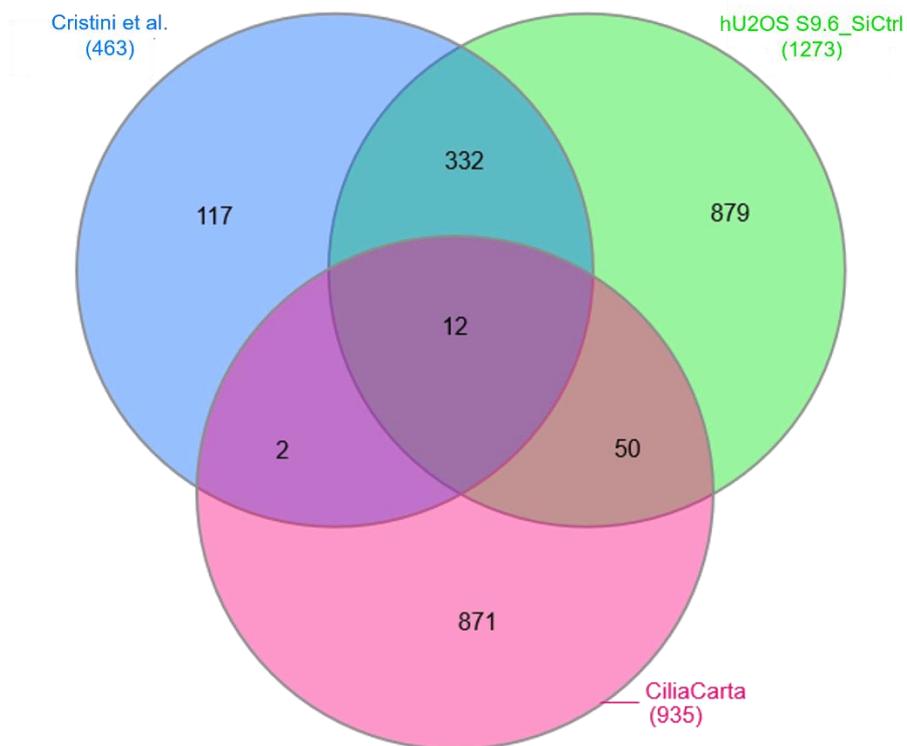


Abbildung 17: Überschneidung des R-loop-Interaktoms humaner U2OS Zellen (grün) mit dem Zilien-Interaktom CiliaCarta 2019¹²⁹ (pink) und dem R-loop-Interaktom in HeLa Zellen nach Cristini et al.¹⁰⁵ (blau). Schnittmenge im Venn-Diagramm: 12 Kandidaten

Tabelle 33: Proteine der Schnittmenge aus CiliaCarta¹²⁹ und hU2OS/HeLa¹⁰⁵ R-loop-Interaktom.

Proteinbezeichnung	Genbezeichnung
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	EFTUD2
14-3-3 protein gamma;14-3-3 protein gamma, N-terminally processed	YWHAG
Clathrin heavy chain;Clathrin heavy chain 1	CLTC
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8
Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1
Microtubule-associated protein;Microtubule-associated protein 4	MAP4
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	DDX6
RuvB-like 2	RUVBL2

Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	PPP2R1A
T-complex protein 1 subunit beta	CCT2
T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3
T-complex protein 1 subunit theta	CCT8

4.2 Die beeinträchtigte *DNA-Damage Response* in Versuchstieren mit tubulärem *Ercc1 Knockout* führt zu phänotypischen Veränderungen, Apoptose, Seneszenz und dem SASP der Nieren

4.2.1 Eingeschränkte Nierenfunktion und veränderte Gewebearchitektur in Versuchstieren mit tubulärem *Ercc1 Knockout*

Nachdem im ersten Teil des Projekts *in vitro* Versuche zur Aufdeckung relevanter Proteine und Mechanismen bei *DNA-Damage* Prozessen mit dem Schwerpunkt auf AATF durchgeführt wurden, beschäftigt sich der zweite Teil des Projekts mit *in vivo* Vorgängen in einem in der Niere *Ercc1*-defizienten Mausmodell.

Ercc1 ist ein Nukleotidexzisionsfaktor, dessen Verlust zu einer Akkumulation von DNA-Schäden führt⁸⁵. Die zwei existierenden Mausmodelle *Ercc1*^{fl/fl93} und *Ksp1.3/cre*¹²⁷ wurden miteinander gekreuzt, um Mäuse mit einem tubulusepithelspezifischen *Ercc1 Knockout* (in den Abbildungen *Ercc1*^{fl/fl} *KspCre*^{tg/wt} oder *Ercc1*^{fl/fl} *tg/wt* benannt) zu generieren.

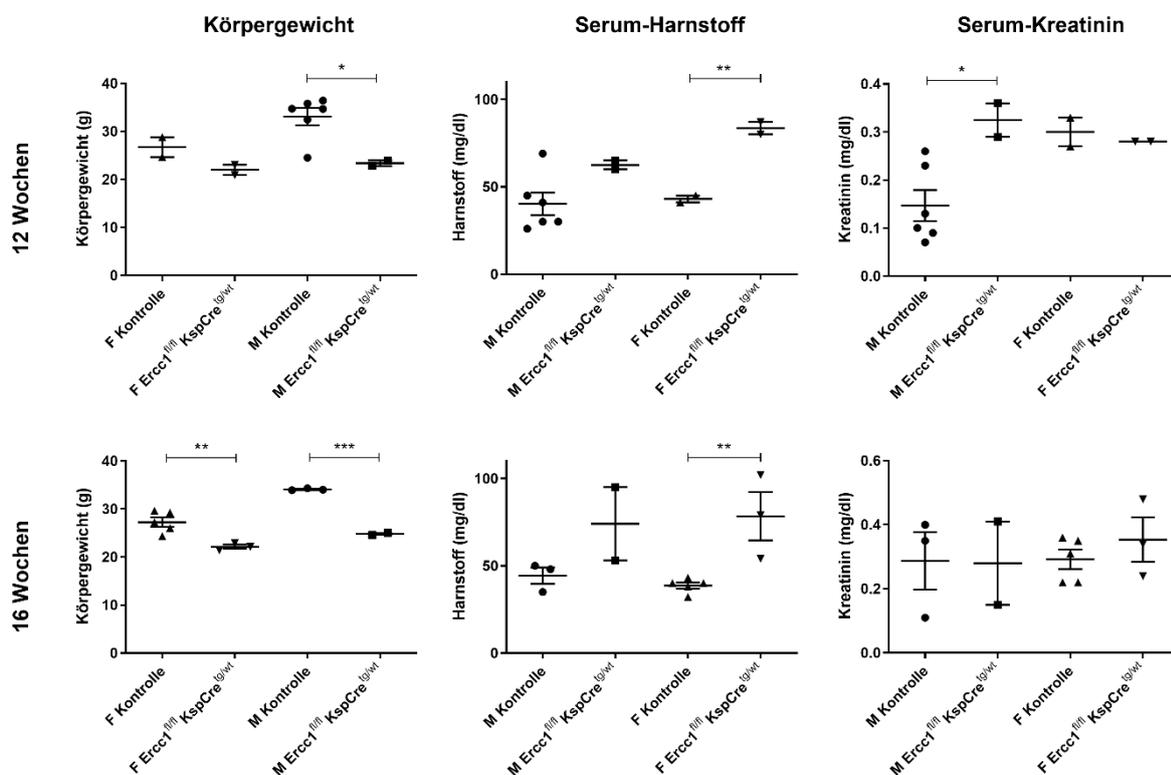


Abbildung 18: Körpergewicht, Serum-Harnstoff und -Kreatininwerte aus *Ercc1* fl/fl *KspCre* tg/wt Versuchstieren und Kontrollen im Alter von 12 und 16 Wochen. Geschlechtergetrennte Darstellung (M: männlich, F: weiblich). Anwendung des T-Tests zur Feststellung der Signifikanz: * P-Wert < 0,05, ** P-Wert < 0,01, *** P-Wert < 0,001

Ein geringeres Körpergewicht und der Anstieg der Retentionsparameter Harnstoff und Kreatinin im Serum im Alter von 12 und 16 Wochen im Vergleich zu Kontrolltieren (**Abbildung 18**) erlauben bereits einen Rückschluss auf nephrodegenerative Vorgänge in den Versuchstieren.

Histologisch ähnelt der Phänotyp der tubulär *Erc1*-defizienten Mäuse dem durch Fibrose gekennzeichneten, renalen Phänotyp der Erkrankung NPH. Dies zeigt eine in **Abbildung 19** dargestellte PAS-Färbung histologischer Schnitte aus den Nieren der Versuchstiere.

Erste Gewebeveränderungen sind dabei ab dem Alter von 16 Wochen erkennbar. Jüngere Mäuse zeigen noch keine histopathologischen Veränderungen des Gewebes.

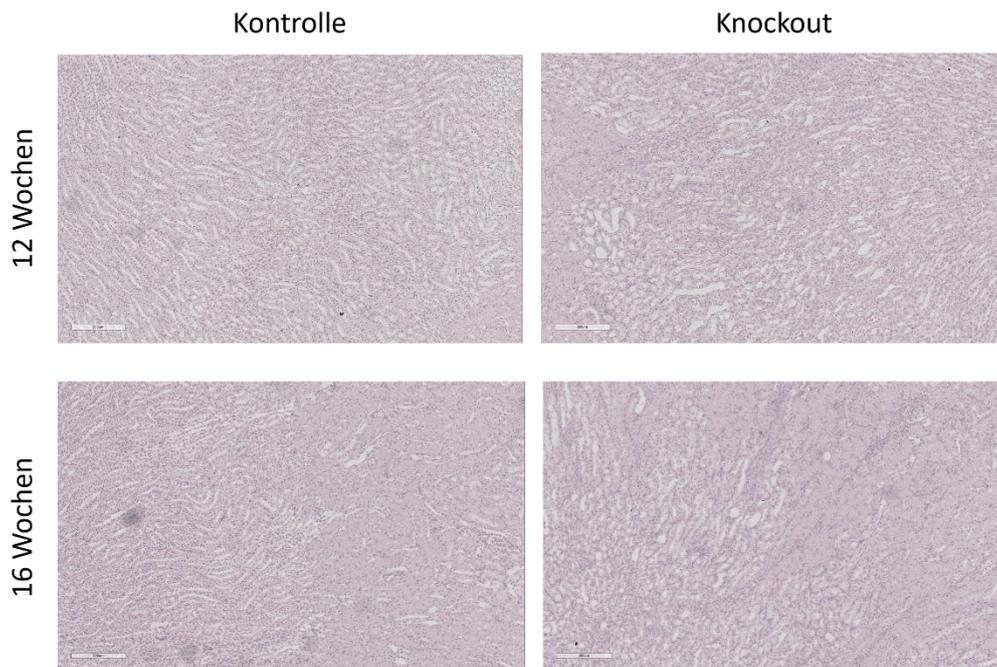


Abbildung 19: PAS-Färbung histologischer Schnitte aus *Erc1 fl/fl KspCre tg/wt* Mäusenieren und Kontrollen. Maßstabskala 200 μ m. Alter: 12 und 16 Wochen. Kontrolltiere: *Erc1 fl/wt*; *Ksp1.3/cre:pos* oder *Erc1 fl/fl*; *Ksp1.3/cre:neg*.

4.2.2 Expression Seneszenz-assoziiierter Gene in der Niere von Versuchstieren mit tubulärem *Erc1 Knockout*

Unpublizierte Vordaten dieses Mausmodells weisen auf die Bedeutung von DNA-Schäden, Seneszenz und Apoptose im Kontext der Fibrogenese hin. Das Ziel der folgenden Versuchsreihe war es also nun, die Seneszenz-assoziierte Sekretion verschiedener Zytokine und Proteine (p21 und p16⁵⁸, TNF- α , IL-6 und IL-1a⁴, IL-1b und Foxo4⁴⁹), sowie Apoptosevorgänge im tubulär *Erc1*-defizienten Mausmodell genauer und zusätzlich auch zu einem früheren Zeitpunkt zu untersuchen.

Zur quantitativen Bestimmung der Zytokinsekretion und Expression verschiedener Zellzyklusinhibitoren in den Mäusenieren mit tubulärem *Erc1 Knockout* wurde eine qPCR durchgeführt, in der die Menge an für den SASP typischen Proteinen im Vergleich zur Expression dieser in Kontrolltieren bestimmt wurde (**Abbildung 20**).

Die Abbildung zeigt die Expression der Zyklin-abhängigen Kinaseinhibitoren p21 und p16 sowie TNF- α , IL-6, IL-1a, IL-1b und Foxo4 als bekannte Kandidaten des SASP in der Niere der tubulär *Erc1*-defizienten Versuchstiere im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrolltieren. Im Alter von 8 Wochen (**Abbildung 20a**) ist vor allem die vermehrte Expression von p21 und IL-6 hoch signifikant. Doch auch die Expression von TNF- α und IL-1a ist erhöht. Im Alter von 12

Wochen (**Abbildung 20b**) fällt vor allem eine gesteigerte p16 Expression auf. Auch p21, TNF- α und IL-1a sind noch signifikant erhöht, IL-6 hingegen nicht mehr. In den Nieren der 16 Wochen alten Mäuse (**Abbildung 20c**) findet sich ausschließlich für p16 noch eine signifikante Erhöhung im Versuchstier, alle anderen Marker sind nicht mehr relevant erhöht. Für IL-1b und Foxo4 liegt zu keinem der analysierten Zeitpunkte eine statistisch signifikante Veränderung vor.

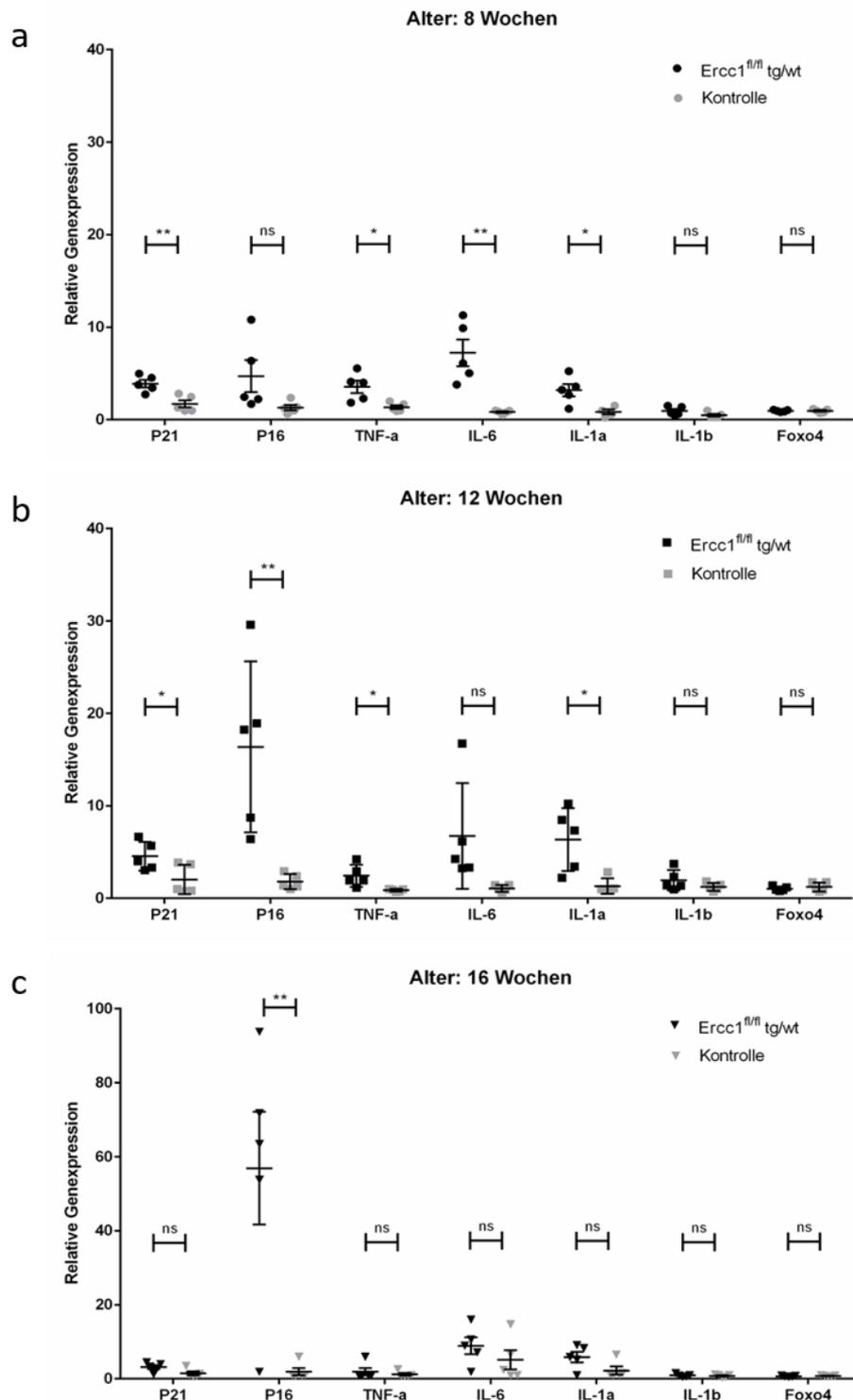


Abbildung 20: Relative Genexpression Seneszenz-assoziiierter Marker in der Niere 8 (a), 12 (b) und 16 (c) Wochen alter Mäuse. Quantitative rtPCR. Darstellung von je 5 Kontroll- und 5 *Ercc1 fl/fl tg/wt* Versuchstieren im Alter von 8, 12 und 16 Wochen. Anwendung des T-Tests zur Feststellung der Signifikanz. * P-Wert < 0,05; ** P-Wert < 0,01; ns = nicht signifikant.

4.2.3 Expression Seneszenz-assoziiierter Proteine in histologischen Schnitten von Mäusenieren mit tubulusepithelspezifischem *Ercc1 Knockout*

Nachdem wir die Erhöhung mehrerer Seneszenzmarker auf mRNA-Ebene festgestellt hatten, setzten wir uns das Ziel, diese Veränderungen auch auf Proteinebene nachzuweisen. Dazu führten wir immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten mit Antikörpern gegen die klassischen Seneszenzmarker p16 und p21 durch (**Abbildung 21**). Die Paraffinschnitte stammen aus zwei Versuchstiermieren mit tubulärem *Ercc1 Knockout* (*Ercc1^{fl/fl} KspCre^{tg/wt}*) und zwei Kontrolltiermieren (*Ercc1^{fl/wt}; Ksp1.3/cre:pos* oder *Ercc1^{fl/fl}; Ksp1.3/cre:neg*).

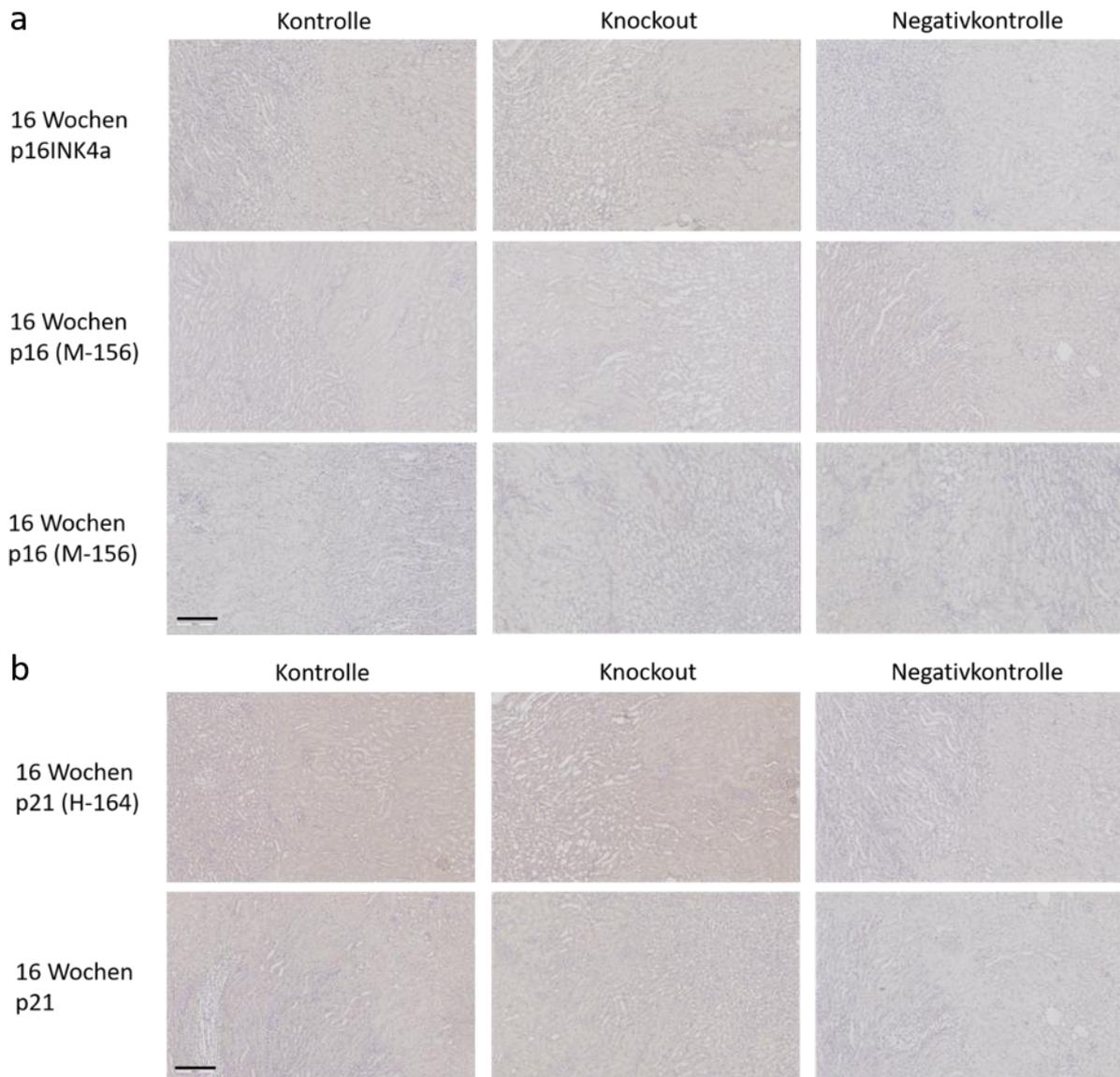


Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung für p16 (a) und p21 (b) von *Ercc1 fl/fl KspCre tg/wt* Mäusenieren und Kontrollen. Maßstabskala 200 μ m. Kontrolltiere: *Ercc1 fl/wt; Ksp1.3/cre:pos* oder *Ercc1 fl/fl; Ksp1.3/cre:neg*. Alter: 16 Wochen. (a) Obere Reihe: p16INK4a (Ab54210), männliche Tiere. Mittlere Reihe: p16 (M-156) (Sc-1207), männliche Tiere. Untere Reihe: p16 (M-156) (Sc-1207), weibliche Tiere. Polymerblockingverfahren. (b) Obere Reihe: p21 (H-164) (Sc-756), männliche Tiere. Untere Reihe: p21 (Sc-817), weibliche Tiere. Avidin/Biotin-Blockingverfahren.

Die Färbung der in **Abbildung 21a** dargestellten Paraffinschnitte 16 Wochen alter Mäusenieren mit dem p16 Antikörper von Abcam (ab54210) ergab weder in Mark noch in Rinde ein verstärktes Signal für seneszente Zellen in den *Knockout*tieren. Wir ergänzten den

Versuch daher mit einem anderen p16-Antikörper des Herstellers Santa Cruz (Sc-1207) und, nachdem dies auch nicht zum Erfolg führte, mit Schnitten aus zwei weiteren Versuchstieren. Ebenso zeigt die Färbung für p21 in 16 Wochen alten Mäusenieren mit tubulärem *Ercc1 Knockout* (**Abbildung 21b**) kein signifikantes Signal im Vergleich zu Kontrolltieren. Auch hier wurden zwei unterschiedliche Antikörper angewandt (Sc-817 und Sc-756 der Firma Santa Cruz).

4.2.4 Detektion apoptotischer Zellen in histologischen Schnitten von Mäusenieren mit tubulusepithelspezifischem *Ercc1 Knockout*

In der Literatur finden sich uneinheitliche Hinweise auf vorherrschende Formen des Zelltods bei nephrodegenerativen Prozessen. Um systematisch vorzugehen, entschieden wir uns, die durch lokale *Ercc1*-Ausschaltung fibrotisch veränderten Mäusenieren zunächst auf das Vorkommen apoptotischer Zellen zu untersuchen. Dazu nutzten wir einen *Cleaved Caspase 3*-Antikörper (CellSignaling 9661) als Marker⁴⁹ und evaluierten in Mäusenieren drei verschiedener Altersgruppen, inwiefern Caspase 3-abhängiger Zelltod stattfindet.

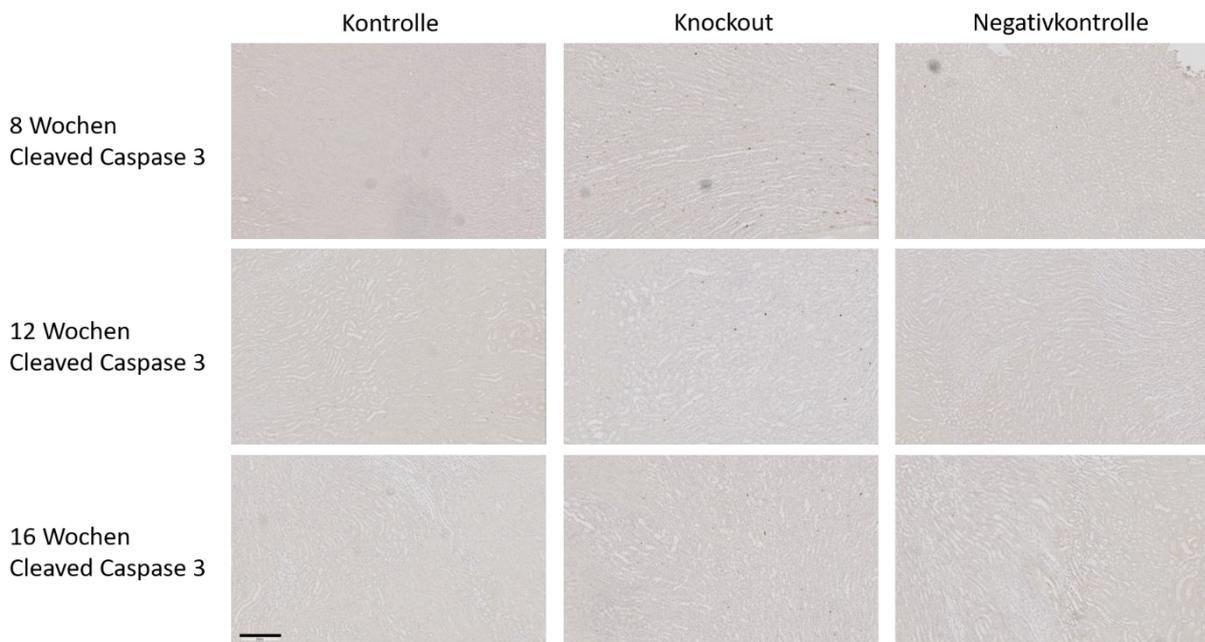


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung von Mäusenieren aus tubulär *Ercc1*-defizienten Versuchstieren und Kontrollen mit *Cleaved Caspase 3* (CellSignaling 9661). Maßstabskala 200 μm . Kontrolltiere: *Ercc1*^{fl/wt}; Ksp1.3/cre:pos oder *Ercc1*^{fl/fl}; Ksp1.3/cre:neg. Geschlecht der 8 Wochen alten Tiere: Versuchstier männlich, Kontrolle weiblich; Geschlecht der 12 Wochen alten Tiere: männlich; Geschlecht der 16 Wochen alten Tiere: weiblich. (n = 5)

In den Paraffinschnitten in **Abbildung 22** zeigen sich in den Versuchstieren mit tubulärem *Ercc1 Knockout* deutlich über den Schnitt verteilte braun gefärbte Zellen, welche in den Kontrolltieren nicht zu finden sind. Die *Cleaved Caspase 3* positiven Zellen liegen entlang der Tubuli. In Rinde und Glomeruli finden sich keine positiven Zellen. Besonders stark ist das Signal im Alter von 8 Wochen, wo sich zahlreiche braun gefärbte Zellen im Präparat finden. Mit 12 und 16 Wochen nimmt die Zahl der positiven Zellen zwar ab, eine deutliche Differenz zu den Kontrolltieren ist jedoch immer noch sichtbar.

5 Diskussion

Ziel dieser Dissertation war es, zur Aufdeckung molekularer Mechanismen hinter der Pathogenese degenerativer Nierenerkrankungen und fehlerbehafteter DNA-Reparaturmechanismen *in vitro* und *in vivo* beizutragen. Ein Schwerpunkt lag auf der Untersuchung der Verbindung zwischen R-loops und AATF. Ein bekanntes R-loop bindendes Enzym, die mutierte Ribonuklease H1 (D210N), fusioniert mit GFP, zeigte in Kollokalisationsexperimenten eine geringe Übereinstimmung mit AATF, darauf hinweisend, dass Ribonuklease H1 wahrscheinlich kein direkter Interaktor von AATF ist. Auch eine direkte Färbung von R-loops ergab keine exklusive Überlappung mit AATF in U2OS Zellen. Viele andere relevante Interaktoren von R-loops konnten jedoch anhand des veränderten R-loop-Interaktoms in U2OS-Zellen unter AATF-Verlust identifiziert werden. Im Rahmen der erweiterten Interaktomanalyse wurden auch Zilien-assoziierte Kandidaten als R-loop-Interaktoren aufgedeckt und im Kontext der renalen Fibrogenese beleuchtet.

Des Weiteren konnten durch die *in vivo* Analyse eines *Ercc1*-defizienten Mausmodells Kernvorgänge der Fibrogenese detaillierter aufgeschlüsselt werden. Der Verlust des *DNA-Damage* Reparaturproteins *Ercc1* führte bei den Versuchstieren zu einer eingeschränkten Nierenfunktion, einer Gedeihstörung und einem fibrotischen Gewebeumbau der Niere, der unter anderem typisch für die NPH ist. Eine seneszenzassoziierte Zytokinproduktion konnte in diesem Modell auf mRNA-, jedoch nicht auf Proteinebene, nachgewiesen werden. Auch Apoptose ließ sich immunhistologisch nachweisen.

Im Folgenden werden Ausschnitte der gewonnenen Ergebnisse ausgeführt und vor dem Hintergrund bereits bestehender Daten diskutiert.

5.1 Die Rolle AATFs in der Regulation von R-loops und *DNA-Damage*: Interaktionen und neue Perspektiven

Viele Regelkreisläufe zur Einstellung der zellulären R-loop Balance sind noch ungeklärt, so dass sich daraus ein spannendes Forschungsfeld ergibt. Jain et al. identifizierten AATF erstmals als interessanten Kandidaten im R-loop Netzwerk und beschreiben dessen protektive Wirkung gegenüber R-loop-induzierter DNA-Schädigung⁴⁵. Die Bedeutung von AATF in R-loop-Regulationsprozessen wurde durch die Studie des HeLa-R-loop-Interaktoms von Cristini et al. untermauert¹⁰⁵ und in dieser Arbeit durch den Nachweis von AATF im R-loop-Interaktom humaner U2OS Zellen bestätigt (4.1.3). Um ein besseres Verständnis der Funktion AATFs in der Regulation von R-loops und DNA-Schäden zu erlangen, wurde im Rahmen dieses Promotionsprojektes die subzelluläre Lokalisation von AATF neben R-loops untersucht (4.1.2). Dabei wurde zunächst die R-loop bindenden Mutante Ribonuklease H1 (D210N) eingesetzt, um damit auch ein mögliches Zusammenwirken des Enzyms Ribonuklease H mit AATF zu untersuchen.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen die GFP-markierte RNase H1-Mutante vorwiegend im Zellkern, wo sie ein sternenhimmelartiges punktförmiges Muster bildet, das auf R-loops hindeutet. Auch AATF findet sich hauptsächlich im Zellkern, wobei konzentriertes AATF-Signal, übereinstimmend mit Literaturangaben, vor allem in den Nukleoli sichtbar ist¹²⁸. Im fusionierten Bild lässt sich eine partielle Überlappung mit dem RNase H1-Signal erkennen, jedoch keine exklusive Kollokalisierung, was ein direktes Zusammenspiel AATFs und der mutierten Ribonuklease H1 (D210N) unwahrscheinlich macht.

Es bleibt dennoch möglich, dass AATF und (vor allem Wildtyp-)RNase H indirekt zusammenwirken, da beide die Akkumulation von R-loops verhindern: RNase H durch den

Abbau des RNA-Strangs in den Hybriden, AATF durch andere noch nicht vollständig verstandene Mechanismen^{45,110}. Weiterführende Versuche wie eine IP von GFP-gebundener RNase H oder AATF zur Identifikation direkter Bindungspartner könnten zur genaueren Aufschlüsselung der Interaktion beitragen.

Bisher bekannte R-loop bindende Proteine wie Helikasen haben unter anderem die Funktion, die DNA-Struktur zu verändern^{111,130}. Um die DNA-Struktur und somit die Bildung von R-loops zu beeinflussen, existieren aber auch andere Möglichkeiten, zu denen die Verpackung der DNA mittels Histonen gehört. Es existieren Hinweise darauf, dass AATF an dieser epigenetischen Regulation der Chromatinstruktur beteiligt ist, denn es interagiert zum Beispiel mit Untereinheiten einer Histon Acetyltransferase^{131,132}. So wäre ein Vorkommen AATFs in der Gegenwart von R-loops auch im Rahmen der DNA-Strukturorganisation denkbar.

Grundsätzlich ist es auch denkbar, dass es sich bei der AATF-R-loop-Interaktion um einen dynamischen Prozess handelt und das fluoreszenzmikroskopische Overlay, das lediglich eine Momentaufnahme darstellt, einen Zeitpunkt abbildet, an dem AATF nicht vermehrt an R-loops bindet.

Zusätzlich wurde in dem beschriebenen Experiment durch einen AQR-*Knockdown* mit siRNAs darauf abgezielt, die Induktion von DNA/RNA Hybridstrukturen zu verstärken, der Hypothese folgend, dass ein erhöhtes Level an R-loop-induzierten DNA-Schäden zu einer Veränderung des Verteilungsmusters von AATF führt. Entgegen unserer Erwartungen blieb der R-loop-Bildung verstärkende Effekt gering, und trotz erfolgreichen *Knockdowns* durch SiAQR ließ sich keine zusätzliche Deckung der AATF- und Ribonuklease H1 (D210N)-Verteilungsmuster feststellen. Die Vermutung, dass die Überexpression der RNase H1 in der T-REX™ Linie die vorliegende Menge an R-loops in der Kontrolle bereits überschätzt, liegt nahe. Dieser mögliche sogenannte dominant negative Effekt kann dadurch entstehen, dass die Fehlfunktion der mutierten RNase H1 in den Doxozyklin-behandelten Zellen die endogene Wildtyp-RNase H1 außer Kraft setzt und es schon in den SiControl Proben zu einer Akkumulation von R-Loops kommt und somit zusätzliche Effekte durch SiAQR minimal bleiben.

Aus diesem Grund verifizierten wir die Ergebnisse mit U2OS AATF.GFP TALEN Zellen, in denen R-loops direkt mit S9.6 Antikörper angefärbt wurden. Dieser Versuch widerlegte unsere Annahme, denn auch die erhobenen Daten der U2OS TALEN Zelllinie lassen schlussfolgern, dass es nicht zu einer exklusiven Kolokalisation kommt und ein erhöhtes Level an R-loop-induzierten DNA-Schäden nicht zu einem sichtbar veränderten Verteilungs- und Expressionsmuster von AATF führt.

Mögliche Limitationen der Aussagekraft liegen in diesem Experiment durch die schwierige Darstellung von R-loops via S9.6 Antikörper mittels einfacher Mikroskopie vor. Eine Wiederholung der Kolokalisationsstudie mit anschließender Betrachtung der Strukturen via STED-Mikroskopie wäre daher ein vielversprechender weiterführender Ansatz. Da R-loop Strukturen sehr klein sind, kann eine deutlich höhere mikroskopische Auflösung exakter aufdecken, ob es zu einer wahren Kolokalisation von AATF und R-loops kommt. Erst kürzlich veröffentlichten Prendergast et al. hochauflösende Aufnahmen von R-loops und einzelnen DNA-Strängen mittels eines Axiovert 200 M Mikroskops (Carl Zeiss) mit AxioCam MR3 Kamera (Carl Zeiss) und eines Dragonfly 500 Mikroskops mit iXon Kamera (Andor)². Eine Wiederholung des Experiments mittels dieser Technik ist also Erfolg versprechend.

5.2 Aufdeckung neuer und bereits bekannter R-loop assoziierter Proteinkomponenten in humanen U2OS Zellen

Die Aufrechterhaltung einer physiologischen Balance an R-loops in der Zelle ist essenziell, um das Genom vor Schäden zu schützen^{9,133}. Dazu braucht es molekulare Regulationsmechanismen, die die Bildung von R-loops fördern oder verhindern können. An Hefen durchgeführte genetische Screenings konnten bereits vereinzelt an der R-loop-Regulation beteiligte Proteine enthüllen¹³⁴. Erste R-loop-Interaktome in humanen Zellen wurden jedoch erst in den letzten Jahren publiziert^{105,135,136}. Dabei wurden bereits einige ausgewählte Interaktoren und ihr Einfluss auf die R-loop Biologie in HEK293T-, HeLa- Zellen und humanen B-Zellextrakten analysiert.

Auch mit dieser Arbeit konnte durch eine massenspektrometrische Analyse der an S9.6 gebundenen Proteine in humanen U2OS Zellen ein validierter Datensatz generiert werden, der einen Ausgangspunkt für weitere Studien über R-loop-*Signaling* in menschlichen Zellen bietet. Das R-loop-Interaktom in U2OS Zellen (4.1.3) weist eine 74%ige Übereinstimmung mit dem R-loop-Interaktom von Cristini et al. in HeLa Zellen auf¹⁰⁵, und mit vielen in der Schnittmenge vorliegenden Proteinen konnten bereits bekannte, ins R-loop-Netzwerk verwickelte Faktoren wie SRSF1, Topoisomerase 1, PARP1, SAFB2, WHSC1 und DHX9 als direkte Interaktoren bestätigt werden. Wie bereits angenommen, liegt auch AATF in der Schnittmenge beider Datensätze vor. Vor dem Hintergrund, dass das Fehlen von AATF zur R-loop Akkumulation in Zellen führt⁴⁵, bekräftigt dies die Hypothese, dass AATF als R-loop-Regulator fungiert.

5.3 Veränderungen des R-loop-Komplexes durch den Verlust von AATF

Die Interaktion zwischen AATF und R-Loops bleibt ein komplexes Forschungsfeld, das weiterer intensiver Untersuchungen bedarf. Zur Aufklärung der genauen Mechanismen und Funktionen dieser Interaktion wurde in dieser Arbeit daher ein zweites R-loop-Interaktom in hU2OS-Zellen erstellt, in denen die AATF-Expression durch siRNAs herunterreguliert wurde. Mittels dieses Interaktoms wurden Veränderungen in der Proteinexpression im Vergleich zum Kontrollinteraktom analysiert, die durch den Verlust von AATF hervorgerufen wurden. Dabei konnten die 6 Kandidaten NGDN, NOL10, TECR, YWHAG, IGHV3-74 und IGLV2-8 (Ig lamda chain-V-II region MGC) als in ihrer quantitativen Expression signifikant verändert identifiziert und mittels eines Vulkan-Plots dargestellt werden (4.1.3.1). Einige dieser Proteine und weitere im Interaktom veränderte Kandidaten werden im Folgenden genauer beleuchtet:

Zunächst auffallend ist eine signifikante Verminderung der Proteine NGDN (Neuroguidin) und NOL10 (Nucleolar Protein 10) unter AATF-*Knockdown*. Dies leuchtet ein, denn AATF bildet einen nukleolären Proteinkomplex mit diesen beiden Kandidaten^{128,137}. Der AATF-NGDN-NOL10-Komplex (ANN-Komplex) ist an den nukleolären Schritten der Biosynthese der 40S-Untereinheit der Ribosomen beteiligt. Alle drei Komplexmitglieder sind außerdem für die Reifung der 18S rRNA erforderlich. Über NGDN ist zudem bekannt, dass es im Rahmen der DDR an Zentromeren akkumuliert¹³⁸. Dass dieses Protein die höchste Signifikanz in dem durchgeführten Interaktomvergleich aufweist, spricht dafür, dass es fast ausschließlich in AATF-gebundener Form vorliegt und ein zentraler Spieler AATF-assoziierter Prozesse in der R-loop Biologie ist. Denkbar ist eine Assoziation des gesamten ANN-Komplexes mit R-loops. Eine Fehlorganisation der Ribosomen und Zentromere durch eine Dysregulation des ANN-Komplexes könnte ein Grund der gesteigerten R-loop-Entstehung unter AATF-Verlust sein.

Ein weiterer Top-Kandidat der durchgeführten Analyse ist YWHAG (auch bekannt als 14-3-3 gamma). Proteine der 14-3-3-Familie sind zwar bisher noch nicht als AATF-Interaktoren bekannt, mit ihrer möglichen Funktion im Zusammenhang mit AATF im R-loop-Interaktom lohnt es sich jedoch genauer zu befassen.

Eine Überexpression 14-3-3 gammas führt laut Literatur zu verminderter Zellproliferation und verstärkter Apoptose¹³⁹. Andersherum scheint aber auch vermehrte Apoptose, wie hier durch den Verlust von AATF, den 14-3-3 Metabolismus an R-loops zu beeinflussen. Möglich wäre eine konkurrierende oder unterstützende Rolle 14-3-3 gammas und AATFs im programmierten Zelltod.

Das Protein 14-3-3 ist jedoch nicht nur an der Apoptose-Modulation, sondern auch an vielen Signalwegen wie dem TAZ/Hippo-¹⁴⁰ und dem Wnt-vermittelten β -Catenin-Signaling¹⁴¹ beteiligt. Auch die Catenin- β -1-Expression zeigte sich in unserer Interaktomanalyse verändert, was auf eine Interaktion mit AATF oder eine Beteiligung AATFs an diesem Signalweg hinweist. Sowohl der Wnt- als auch der TAZ/Hippo-Signalweg spielen interessanterweise in der Pathogenese der NPH eine Rolle. 14-3-3 konkurriert zum Beispiel mit dem NPH-Protein NPHP9 um die TAZ-Bindungsstelle und reguliert somit seine nukleäre Freisetzung als Transkriptionsfaktor.

Auch an der EMT, welche in der Entstehung von Fibrose diskutiert wird, ist 14-3-3 beteiligt. Es ist ein direktes Ziel EMT-regulierender microRNAs und eine *Down*-Regulation YWHAGs induziert EMT-Phänotypen^{142,143}. Dies leitet zu der Frage über, ob auch AATF an der EMT-Regulation beteiligt ist und ob R-loops über die Verbindung zu 14-3-3 gamma in der Pathogenese von Fibrose-assoziierten Prozessen wie bei Ziliopathien eine konkrete Rolle spielen. Hierbei handelt es sich um einen interessanten Ansatz für zukünftige Untersuchungen.

Weiterhin fanden sich zahlreiche Histon-assoziierte Proteine im hU2OS-R-loop-Interaktom. Darunter waren einige unter dem Verlust von AATF signifikant verändert, was die Hypothese unterstreicht, dass AATF an der epigenetischen Regulation der Chromatinstruktur beteiligt ist. Auch zur genregulatorischen Rolle von R-loops im Rahmen der Chromatinmodulation wurden in den vergangenen Jahren bereits Daten erhoben¹⁴⁴. Ferner konnten bereits Cristini et al. in ihrem R-loop-Interaktom in HeLa Zellen Chromatin-assoziierte Proteine feststellen¹⁰⁵. Diese waren verglichen zum mRNA-Interaktom in HeLa-Zellen im R-loop Interaktom überrepräsentiert¹⁰⁵.

R-loops können durch ihre besondere räumliche Struktur die Bindung von Proteinen wie Transkriptionsfaktoren an die DNA verhindern oder auch die Nukleosomenbildung erschweren¹⁴⁵. Da es sich bei AATF um einen kotranskriptionellen Faktor handelt, liegt ein AATF-R-loop Zusammenspiel im Bereich der Genexpressionsregulation und DNA-Strukturorganisation nahe. Als mögliche beteiligte Kandidaten an dieser Interaktion konnten in dieser Arbeit die Chromatin- oder Histon-assoziierten Proteine HMGA2 (*High mobility group protein HMGI-C*), CBX1 (*Chromobox protein homolog 1*), MacroH2A.2 Histon, Histon H2A Typ 2-B und H2B Typ 1-D identifiziert werden, welche unter AATF-Verlust im R-loop-Interaktom erniedrigt waren. Unter dem *Knockdown* von AATF scheint es also zu einem Verlust von Histonen und Chromatin-bindenden Proteinen an R-loops zu kommen.

5.4 R-loops in ziliären und zentrosomalen Signalwegen

Frühere Arbeiten aus unserem Labor haben gezeigt, dass AATF als ziliäres und zentrosomales Protein an der Entstehung eines NPH-ähnlichen Phänotyps mit schwerer Tubulusatrophie, interstitieller Fibrose und Zystenbildung beteiligt ist⁴⁵. AATF könnte damit, da

es nun als R-loop-Interaktor detektiert wurde, eine wesentliche Schlüsselverbindung zwischen R-loops und Ziliopathien darstellen. Nachdem im R-loop-Interaktom unter Verlust von AATF zudem ziliensassoziierte Proteine wie YWHAG (14-3-3 gamma) auffielen, entstand die Hypothese, dass Zilien die DDR modulieren. Es erschien daher besonders spannend, das Zilieninteraktom CiliaCarta¹²⁹ mit dem R-loop-Interaktom menschlicher U2OS Zellen zu vergleichen, um so auf mögliche Verbindungen zwischen R-loops und ziliären Prozessen zu stoßen. AATF wird nicht im Zilien-Referenzgenom (CiliaCarta)¹²⁹ aufgeführt und kommt daher nicht in der Schnittmenge der Proteine im R-loop Interaktom menschlicher U2OS Zellen und der CiliaCarta¹²⁹ vor (4.1.4). Allerdings konnten 62 andere Proteine identifiziert werden, unter denen sich interessanterweise einige bereits in der Ziliopathieforschung bekannte Kandidaten finden. YWHAG lag sogar in einem dreifachen *Overlay* vor, in welchem das R-loop-Interaktom dieser Arbeit, das R-loop-Interaktom in HeLa-Zellen nach Cristini et al.¹⁰⁵ und die CiliaCarta¹²⁹ berücksichtigt wurden.

Neben YWHAG (14-3-3 gamma) ließ sich auch YWHAQ (14-3-3 theta) in der Schnittmenge des hU2OS-R-loop-Interaktoms und des Zilieninteraktoms nachweisen. YWHAQ ist ebenfalls an der Regulation des Wnt-vermittelten β -Catenin-*Signalings*, der Zielgenetranskription sowie der Apoptosemodulation beteiligt. In einer Analyse renal-tubulärer Exosomen-Proteine und ihrem Effekt auf Fibroblasten bei diabetischer Nephropathie konnte YWHAQ außerdem im Signalnetzwerk Fibrose-fördernder Exosomen nachgewiesen werden¹⁴⁶.

Des Weiteren wurde Filamin A (FLNA) als interessanter Kandidat des *Overlays* der zwei Datensätze identifiziert. Dieses Protein spielt ebenfalls eine Rolle in der kanonischen Wnt-Signalübertragung und der Ziliogenese¹⁴⁷. FLNA ist als DNA-Reparaturprotein außerdem an der DDR beteiligt, indem es mit dem Tumorsuppressorgen BRCA1 interagiert¹⁴⁸, das DNA-Reparaturprotein RAD51 zu Doppelstrangbrüchen rekrutiert und die homologe Rekombination ermöglicht^{66,149,150}. Es scheint zudem ein Schlüsselprotein in der Pathogenese der autosomal dominanten polyzystischen Lebererkrankung (ADPLD) zu sein. Wechselwirkungen FLNAs mit PLD-assoziierten Proteinkomplexen werden mit zystogenen Prozessen in Verbindung gebracht¹⁵¹. Interessant wären zukünftige Untersuchungen zur Rolle FLNAs bei zystogenen Prozessen der Niere im Rahmen von Ziliopathien.

Ferner brachte der R-loop-Interaktor HUWE1 weitere Hinweise auf die Funktion von R-loops während der Fibrogenese bei Nierenerkrankungen. HUWE1 ist eine Ubiquitin-Ligase, welche an der Ubiquitinierung und dem Abbau geschädigter Zielproteine beteiligt ist. Sie reguliert über noch nicht gänzlich erforschte Prozesse die Expression von EGFR und vermindert damit die Entstehung tubulointerstitieller Fibrose im Rahmen von Nierenschädigungen¹⁵². Auch für HUWE1 konnten bereits Interaktionen mit dem Wnt-Catenin- β Signalweg gezeigt werden. Die Ubiquitin-Ligase ist dabei an einer negativen Feedback-Schleife beteiligt¹⁵³.

Die Aufdeckung der Polo-ähnlichen Kinase PLK1 im *Overlay* des Zilien-R-loop-Interaktoms ist besonders vor dem Hintergrund der NPH sehr spannend. PLK1 ist vorwiegend zentrosomal lokalisiert und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass PLK1 Nephrozystin-1 (NPHP1), eines der NPH-Proteine, phosphoryliert und dass die beiden Proteine in der Übergangszone primärer Zilien koloalisieren. Es wird eine Beteiligung PLK1s an der Ziliodynamik und der Pathogenese der NPH vermutet¹⁵⁴. Außerdem ist PLK1 bedeutend für die DNA-Schadensreparatur und Wiederherstellung des G2-Checkpoints¹⁵⁵. Im Zuge der DDR kann PLK1 zum Beispiel den ATR/CHK1-Weg inaktivieren¹⁵⁶. Diverse teils gegenteilige Funktionen

des Enzyms werden über ein komplexes Navigationsnetzwerk aus Phosphorylierungen gesteuert und reguliert¹⁵⁷.

Auch die *RuvB Like AAA ATPase 1* (RUVBL1) lag in der Schnittmenge der R-loop- und Zilien-Interaktome. RUVBL1 ist für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des tubulären Nierenepithels entscheidend, denn die ATPase unterstützt den Aufbau von Ziliarproteinkomplexen im Zytoplasma. Eine Deletion von *Ruvbl-1* in tubulären Epithelzellen von Mäusen führt zu einem Nierenversagen mit tubulären Dilatationen und einem Mangel an Flimmerzellen¹⁵⁸. Eine Suche nach *DNA-Damage*-Vorgängen in diesem dem NPH-Phänotyp ähnelnden Mausmodell könnte ein spannender Anknüpfungspunkt zukünftiger Untersuchungen sein.

Die Betrachtung dieser Kandidaten, welche gleichzeitig mit R-loops interagieren und im Zilienmetabolismus eine Rolle spielen, liefert neue und vielversprechende Ansätze zum Verständnis der Fibrogenese und der Zystenformation bei Ziliopathien. Es ergeben sich Hinweise darauf, dass Zilien an der DDR beteiligt sind und R-loops möglicherweise ziliäre Signalwege wie die Wnt-Signalübertragung regulieren. Dies sollte nun in weiteren Experimenten untersucht werden.

Da es sich bei humanen U2OS Zellen nicht um eine Standardzelllinie zur Untersuchung ziliärer Prozesse handelt, wäre es spannend, das R-loop-Zilien-Interaktom in murinen IMCD Zellen oder menschlichen Zelllinien zu untersuchen, welche mit zilienbesetzten Nierenepithelzellen vergleichbar sind. Damit könnten die Ergebnisse dieser Arbeit noch besser im Kontext von Nephropathien und *Wnt-Signaling* interpretiert werden.

Nachdem neuste Studien auch Verbindungen zwischen *Ercc1* und R-loops aufzeigen konnten^{97,98}, wäre es als Weiterführung dieser Arbeit zudem sehr interessant zu erforschen, inwieweit sich der R-loop Phänotyp auch in unserem tubulär *Ercc1*-defizienten Mausmodell für Fibrogenese bei NPH detektieren lässt.

5.5 Der Zusammenhang zwischen *DNA-Damage* Reparaturdefekten und Nierenfibrose

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, ein besseres Verständnis dafür zu erlangen, warum sich Fibrose im Rahmen der NPH findet. Dazu wurde untersucht, wie *DNA-Damage* Reparaturdefekte unter dem Ausschluss systemischer Effekte zu Nierenfibrose führen. Konkret wurde untersucht, ob und wie weit Seneszenz und Apoptose dabei zur Entstehung des Phänotyps von Mäusen mit tubulärem *Ercc1 Knockout*, welcher durch das Fehlen des DDR-Enzyms *Ercc1* in Tubuluszellen eine renale Fibrose zeigt, beitragen.

Der geringere Anstieg des Körpergewichts der Versuchstiere im Vergleich zu Kontrolltieren und die über den Versuchszeitraum ansteigenden Retentionsparameter Kreatinin und Harnstoff (4.2.1) weisen deutlich auf nephrodegenerative Prozesse hin. Ab dem Alter von 16 Wochen ist das Nierengewebe zunehmend fibrotisch durchsetzt. Interessant ist nun also, welche Prozesse stattfinden, bevor sich dieser Phänotyp zeigt. Die quantitative PCR aus Mäusenierenlysaten für Seneszenzmarker dieser Arbeit brachte dabei eindeutige Resultate (4.2.2). Verschiedene Seneszenz-assoziierte Gene wurden zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten der Mäuse signifikant stärker exprimiert. Vor allem in frühen Stadien (im Alter von 8 Wochen), in denen das Gewebe bislang noch nicht fibrotisch durchsetzt ist, weisen signifikant erhöhte Spiegel von IL-6 und P21 und auch von TNF- α und IL-1 α auf eine zelluläre Seneszenz der Niere hin. Im Verlauf weniger Wochen steigt auch die Expression

P16s sehr stark an, wohingegen die P21-, IL-1a- und TNF- α -Spiegel sukzessiv wieder sinken. IL-6 wird sogar bereits im Alter von 12 Wochen nicht mehr vermehrt exprimiert. Die SASP-assoziierten Gene IL-1b und Foxo4 scheinen in diesem Setting zunächst eher eine untergeordnete Rolle zu spielen, denn sie sind in keiner der untersuchten Altersstufen signifikant verändert. Möglich wäre aber auch eine Erhöhung dieser Marker zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt, welcher in diesem Experiment nicht abgebildet wird.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die zeitpunktabhängige Variabilität der Ergebnisse der durchgeführten qPCR auf eine starke Dynamik der biologischen Geschehnisse während der Fibrogenese und Seneszenzentstehung *in vivo* hinweist.

In der Literatur findet sich bisher kein einheitliches Bild zum Zusammenhang zwischen Seneszenz, Fibrose, und inwiefern weitere Vorgänge wie Inflammation und regulierter Zelltod parallel oder zeitlich versetzt zum Fibrosegeschehen stattfinden. In den Untersuchungen dieser Arbeit kristallisierte sich heraus, dass zu Beginn des Prozesses im Ercc1-defizienten Mausmodell Seneszenz-*Signaling* im Vordergrund steht, während nachfolgend eher andere Mechanismen in Kraft treten. P16 nimmt dabei möglicherweise eine Sonderrolle ein.

In histologischen Gewebeschnitten der Ercc1-defizienten Mäusenierern gelang der Nachweis der SASP-Proteine nicht (4.2.3). Bei der P16-Färbung ist dies am ehesten auf technische Limitationen zurückzuführen, denn die qPCR der korrespondierenden und teils identischen Versuchstiere zeigt eindeutige Erhöhungen dieses Zytokins zum analysierten Zeitpunkt. In den P21-Färbungen wäre auch das weit vorangeschrittene Alter (16 Wochen) und Krankheitsstadium der Mäuse, aus denen die Proben gewonnen wurden, als Ursache des fehlenden Signals denkbar. Zu bedenken gilt auch, dass die Proteinlevel eine andere Dynamik aufweisen könnten als die Genexpression. In weiterführenden Experimenten könnten Schnitte von 12 Wochen alten Versuchstieren auf P21 untersucht werden und komplexere Seneszenzassays und immunhistochemische Untersuchungen mit anderen Antikörpern angewendet werden, um Details über das Seneszenz-*Signaling* im tubulär Ercc1-defizienten Mausmodell weiter aufzuschlüsseln.

Bereits in mehreren Studien zu renaler Fibrose in Mäusen konnte eine Assoziation zwischen hochregulierter SASP-mRNA Expression und epithelialer Apoptose gezeigt werden^{159,160}. Auch diese Arbeit beschäftigte sich daher nicht nur mit Seneszenz, sondern auch mit Apoptose bei renaler Fibrose. Dabei konnte am Ercc1-defizienten Mausmodell gesteigerte *Cleaved Caspase 3*-Aktivität in peritubulären Zellen der Nieren nachgewiesen werden. Überraschenderweise ist dieser Apoptosemarker parallel zu den in der qPCR analysierten SASP-Zytokinen vornehmlich in früheren Krankheitsstadien der Mäuse (im Alter von 8 Wochen) nachweisbar. Im Verlauf nimmt das zelluläre Signal für *Cleaved Caspase 3* in histologischen Färbungen ab. Dies zeigt, dass auch Apoptose eher in der frühen Phase der Entstehung renaler Fibrose von Relevanz ist. Um diese Theorie zu untermauern, sollten weitergehende Untersuchungen zur Expression von Apoptosefaktoren wie Bax und Bcl-2 in den Nierenlysaten der tubulär Ercc1-defizienten Mäuse zu den verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden.

Inzwischen liegen zunehmend Daten dazu vor, dass auch andere Signalwege des regulierten Zelltods eine Rolle bei Gewebeumbauprozessen in der Niere spielen⁵⁰. Diese im Gegensatz zur Apoptose teils proinflammatorischen Vorgänge als Fortführung dieser Arbeit im Ercc1-defizienten Mausmodell zu untersuchen, könnte spannende Erkenntnisse über Prozesse in späteren Stadien der Pathogenese der Fibrose liefern.

Es konnte beispielsweise bereits gezeigt werden, dass synchronisierte, regulierte Nekrose durch Nekroptose und Ferroptose zum Fortschreiten akuter in chronische Nierenschäden

führen⁵⁰. Der Zelltod einer tubulären Nierenepithelzelle führt durch die Freisetzung von NADPH zu verminderter antioxidativer Kapazität der Nachbarzellen, was wellenartige Ferroptoseprozesse in der unmittelbaren Umgebung wahrscheinlicher macht^{51,54}. Verschiedene Therapiestrategien, die unter anderem durch das Verhindern einer Eisenakkumulation auf eine Inhibition von Ferroptose abzielen, zeigen im Tiermodell Anzeichen einer Linderung der Fibrogenese⁵². Durch das Aufdecken von Ferroptose in unserem Mausmodell würde ferner also auch die Untersuchung neuer *Rescue*-Verfahren und Therapiestrategien in Frage kommen.

Bei Nekroptose triggert die Inflamationsreaktion auf freie Zellbestandteile die Aktivierung des erworbenen Immunsystems, was wiederum zur EMT durch Myofibroblasten beiträgt⁵⁰. Es wäre spannend zu untersuchen, ob und zu welchem Zeitpunkt Nekroptose auch in unserem Ercc1-Mausmodell eine Rolle spielt. Methodisch könnte dazu die während des Nekroptosevorgangs durch RIPK-3 phosphorylierte MLKL (*Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase*) in Immunhistochemie und Immunfluoreszenz-Untersuchungen analysiert werden¹⁶¹. In Hinblick auf therapeutische Optionen wäre es weiterführend interessant den Effekt von Nekroptoseinhibitoren zu untersuchen. Denn spannenderweise kam es in einem ebenfalls durch Fibrose geprägten Mausmodell durch eine Behandlung mit dem Nekroptoseinhibitor Nekrostatin-1 zur Abschwächung inflammatorischer Prozesse, interstitieller Fibrose und Nierenversagen¹⁶².

Zuletzt gilt es zukünftig auch Hinweisen auf Pyroptose, einer Form des proinflammatorischen programmierten Zelltods, nachzugehen. Auch bei dieser Art des durch Bildung eines Inflammasoms und Aktivierung verschiedener Caspasen gekennzeichneten Zelltods bestehen bereits Verknüpfungen zur renalen Fibrogenese^{163,164}. Es kommt dabei zur kontrollierten Zelllyse, die zur Entzündung des umliegenden Gewebes führt, was wiederum eine Ausgangssituation für die Myofibroblastenaktivierung darstellt. Die Untersuchung des Ercc1-Mausmodells auf das Vorkommen pyroptosetypischer Interleukine oder erhöhtem GSDMD (Gasdermin D) könnte weitere Signalwege in der Pathogenese degenerativer Nierenerkrankungen aufdecken.

5.6 Potenzielle Therapieansätze bei CKD, Ziliopathien und renaler Fibrose

Trotz eines immensen medizinischen Fortschritts in den letzten Jahrzehnten existieren bis heute keine für den Menschen zugelassenen Therapeutika, die chronische Nierenschädigungen und Fibrose heilen können. Die Ergebnisse dieser Arbeit suggerieren, dass DNA-Schäden, zum Beispiel durch die Bildung und Akkumulation von R-loops, sowie verschiedene DNA-Reparaturmechanismen entscheidend zu der Pathogenese fibrotischer Nierenerkrankungen beitragen. Auf dem Weg zur irreversiblen fibrotischen Umwandlung des Gewebes gibt es diverse *Outcome*-relevante Teilprozesse. Eine medikamentöse oder interventionelle Beeinflussung oder gar eine Durchbrechung dieser Vorgänge birgt neue Optionen in der Therapie fibrotischer und degenerativer Nierenerkrankungen.

Einige Publikationen der letzten Jahre liefern bereits erste Grundideen und Ergebnisse dieses Forschungsbereiches. Eine Erhöhung des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺)-Spiegels kann sich beispielsweise positiv auf den unerwünschten Prozess der Fibrogenese auswirken, denn ein suffizienter zellulärer Energiestoffwechsel ist für die Reparatur von DNA-Schäden unabdingbar. Die Behandlung mit Nicotinamidmononukleotid, einer Vorstufe des NAD⁺, konnte außerdem die DNA-Schädigung proximaler Tubuluszellen und die anschließende zelluläre Seneszenz signifikant reduzieren¹⁶⁵. Auch Sirtuin 1 (SIRT1), eine NAD⁺-abhängige Histon-Deacetylase, zeigt vielversprechende nephroprotektive Eigenschaften¹⁶⁶. Durch die

Inhibition TNF- α -abhängiger Transaktivierung von NF- κ B kann SIRT1 die TNF- α -induzierte Zytokinproduktion in Fibroblasten und die Expression mehrerer proinflammatorischer Gene verhindern¹⁶⁷. Durch Deacetylierung von p53 kann SIRT1 außerdem zu verminderter zellulärer Seneszenz und Apoptose nach DNA-Schäden und oxidativem Stress beitragen¹⁶⁸.

Besonders hinsichtlich spezifischer Therapien der NPH und verwandter Ziliopathien konnten kürzlich erste Erfolge erzielt werden: Die Behandlung mit Prostaglandin E2-Rezeptor Agonisten konnte *in vitro* und in Tiermodellen Ziliogenesedefekte beheben und damit die Ausprägung des fibrosegeprägten NPHP1-Phänotyps mildern²⁵. Beim Joubert-Syndrom, bei dem es durch Mutationen im CEP290-Gen zur abnormen Verlängerung primärer Zilien kommt, konnten Ramsbottom et al.¹⁶⁹ durch Antisense-Oligonukleotid (ASO)-induziertes, verändertes Spleißen das Überspringen des betroffenen Exons herbeiführen. Das entstehende Protein gelangt wieder in die ziliäre Transitionszone und die Zilien erreichen wieder ihre ursprüngliche Länge. Im Mausmodell konnte die systemische Behandlung mit ASO bereits etabliert werden und den zystischen renalen Phänotyp der Erkrankung mildern, was ein spannendes neues Therapiefeld auch im Bereich der anderen monogenetischen Ziliopathien eröffnet¹⁶⁹.

Auch nichtmedikamentöse Ansätze in der Therapie der CKD zeigen erste Erfolge: Für die häufigste renale Ziliopathie, die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD), konnte vor kurzem in einer ersten Patientenkohorte gezeigt werden, dass eine Anpassung der Ernährung (intermediäre ketogene Diät) den Krankheitsprogress in Form des Zystenwachstums möglicherweise verlangsamen kann^{170,171}. In verschiedenen Tiermodellen konnten auch Erfolge hinsichtlich degenerativer und krankheitsbedingter Gewebeeränderungen erzielt werden. Eine allgemeine Kalorienrestriktion zeigte dabei positive Effekte auf den fibrotischen Gewebeumbau^{172,173}. In dem DNA-Reparatur-defizienten Mausmodell *Ercc1^{Δ/-}* vermindert eine Kalorienrestriktion von 30% die für diesen Phänotyp typischen, vorzeitigen Alterungserscheinungen durch die Akkumulation von DNA-Defekten. Sogar in wildtypischen Tieren kann eine diätische Restriktion (DR) die Entstehung endogener DNA-Schäden vermindern¹⁷⁴. Die in diesem *Ercc1*-defizienten Mausmodell stattfindende vorzeitige Alterung spiegelt sich auf Genomebene aufgrund der stochastisch auftretenden Läsionen vor allem in langen Genen wider. Als Folge tritt eine Transkriptionsblockade ein und es kommt zur Akkumulation von DNA-Schäden und vorzeitigem Zellsterben. Durch eine Kalorienrestriktion kommt es zur deutlichen Verlangsamung dieses Prozesses, was sich unter anderem an der geringeren Anzahl an γ H2AX-DNA-Schadensfoci im Gewebe dieser Tiere zeigt. DR steigert die Stressresistenz, verbessert die antioxidative Abwehr und verändert den Insulinmetabolismus und andere hormonelle Signalwege, indem Glykolyse, oxidative Phosphorylierung, Pentosephosphatzyklus und mitochondriale Funktionen beeinflusst werden. Zudem kommt es zu verminderter Apoptose durch die Suppression der Transkription von p53 und zu einer verringerten Expression der Seneszenzparameter P16, P21 und IL-6. Weiterhin konnte auch eine Verschiebung von proinflammatorischen hin zu entzündungshemmenden Zytokinen unter DR beobachtet werden. Interessanterweise spielen im Mechanismus hinter diesen Vorgängen erneut die durch ihren NAD⁺-Bedarf eng mit der Ernährung und dem Stoffwechsel verbundenen Sirtuine eine zentrale Rolle. Ihre Expression wird unter DR vermehrt induziert und es bedarf dazu keiner externen Zufuhr von NAD oder SIRT1. Die verschiedenen unter DR vermehrt freigesetzten Enzyme der Sirtuinfamilie haben durch ihre unter anderem genomstabilisierenden Eigenschaften positive Effekte auf Stoffwechsel, Gesundheit und Lebensspanne¹⁷⁵.

Ernährungsmaßnahmen als nicht-medikamentöse Therapieansätze in der Behandlung chronischer Nierenerkrankungen bergen aufgrund ihrer einfachen und nebenwirkungsarmen

Durchführbarkeit vor allem für junge (zum Beispiel an NPH erkrankte) Patientinnen und Patienten, die aufgrund später Zulassungsverfahren und häufigem Ausschluss von pharmazeutischen Studien oft erst spät von neuen Therapien profitieren können, neue Chancen.

Diese zahlreichen, auf neuen Erkenntnissen basierenden Therapieansätze räumen der weiteren Aufschlüsselung der Mechanismen der Nierendegeneration bei Ziliopathien und anderen fibrotischen Nierenerkrankungen eine bedeutende Rolle ein. Vor allem der Bereich der Optimierung von DNA-Reparaturprozessen und die Vermeidung von DNA-Schäden und ihrer zahlreichen Konsequenzen im Kontext nephrodegenerativer Erkrankungen bietet ein vielversprechendes Potenzial für die Entwicklung zukünftiger CKD-Therapieansätze.

6 Literaturverzeichnis

1. Kishi S, Brooks CR, Taguchi K, et al. Proximal tubule ATR regulates DNA repair to prevent maladaptive renal injury responses. *J Clin Invest* 2019; **129**(11): 4797-816.
2. Prendergast L, McClurg UL, Hristova R, et al. Resolution of R-loops by INO80 promotes DNA replication and maintains cancer cell proliferation and viability. *Nature Communications* 2020; **11**(1): 4534.
3. Schupp N, Stopper H, Heidland A. DNA Damage in Chronic Kidney Disease: Evaluation of Clinical Biomarkers. *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**: 3592042.
4. Wang WJ, Cai GY, Chen XM. Cellular senescence, senescence-associated secretory phenotype, and chronic kidney disease. *Oncotarget* 2017; **8**(38): 64520-33.
5. Corredor Z, Stoyanova E, Rodríguez-Ribera L, et al. Genomic damage as a biomarker of chronic kidney disease status. *Environ Mol Mutagen* 2015; **56**(3): 301-12.
6. Corredor Z, da Silva Filho MI, Rodríguez-Ribera L, et al. Loci associated with genomic damage levels in chronic kidney disease patients and controls. *Mutat Res* 2020; **852**: 503167.
7. Gandhi G, Mehta T, Contractor P, Tung G. Genotoxic damage in end-stage renal disease. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2018; **835**: 1-10.
8. Aguilera A, García-Muse T. R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Mol Cell* 2012; **46**(2): 115-24.
9. Skourti-Stathaki K, Proudfoot NJ. A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Genes & development* 2014; **28**(13): 1384-96.
10. Costantino L, Koshland D. The Yin and Yang of R-loop biology. *Current opinion in cell biology* 2015; **34**: 39-45.
11. Hegazy YA, Fernando CM, Tran EJ. The balancing act of R-loop biology: The good, the bad, and the ugly. *The Journal of biological chemistry* 2020; **295**(4): 905-13.
12. Ricksten SE, Bragadottir G, Redfors B. Renal oxygenation in clinical acute kidney injury. *Critical care (London, England)* 2013; **17**(2): 221.
13. Deutsche Gesellschaft für Nephrologie. Aufbau und Funktion der Nieren. 2020. <https://www.dgfn.eu/film-aufbau-und-funktion-der-nieren.html>.
14. Wallace MA. Anatomy and physiology of the kidney. *AORN journal* 1998; **68**(5): 800, 3-16, 19-20; quiz 21-4.
15. Bikbov B, Purcell CA, Levey AS, et al. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* 2020; **395**(10225): 709-33.
16. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *Jama* 2007; **298**(17): 2038-47.
17. Cockwell P, Fisher L-A. The global burden of chronic kidney disease. *The Lancet* 2020; **395**(10225): 662-4.
18. Michishita R, Matsuda T, Kawakami S, et al. Hypertension and hyperglycemia and the combination thereof enhances the incidence of chronic kidney disease (CKD) in middle-aged and older males. *Clinical and Experimental Hypertension* 2017; **39**(7): 645-54.
19. Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N. Ciliopathies. *The New England journal of medicine* 2011; **364**(16): 1533-43.
20. Stokman MF, Saunier S, Benmerah A. Renal Ciliopathies: Sorting Out Therapeutic Approaches for Nephronophthisis. *Front Cell Dev Biol* 2021; **9**: 653138.
21. Gerdes JM, Davis EE, Katsanis N. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* 2009; **137**(1): 32-45.
22. Wolf MTF. Nephronophthisis and related syndromes. *Curr Opin Pediatr* 2015; **27**(2): 201-11.
23. Braun DA, Hildebrandt F. Ciliopathies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2017; **9**(3).
24. Luo F, Tao Y-H. Nephronophthisis: A review of genotype-phenotype correlation. *Nephrology (Carlton)* 2018; **23**(10): 904-11.
25. Garcia H, Serafin AS, Silbermann F, et al. Agonists of prostaglandin E(2) receptors as potential first in class treatment for nephronophthisis and related ciliopathies. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America* 2022; **119**(18): e2115960119.
26. Devlin LA, Ramsbottom SA, Overman LM, et al. Embryonic and foetal expression patterns of the ciliopathy gene CEP164. *PloS one* 2020; **15**(1): e0221914-e.
 27. Schmitt R, Melk A. Molecular mechanisms of renal aging. *Kidney Int* 2017; **92**(3): 569-79.
 28. Schmitt R, Melk A. New insights on molecular mechanisms of renal aging. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2012; **12**(11): 2892-900.
 29. Sun YB, Qu X, Caruana G, Li J. The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis. *Differentiation; research in biological diversity* 2016; **92**(3): 102-7.
 30. Simonson MS. Phenotypic transitions and fibrosis in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2007; **71**(9): 846-54.
 31. Falke LL, Gholizadeh S, Goldschmeding R, Kok RJ, Nguyen TQ. Diverse origins of the myofibroblast-implications for kidney fibrosis. *Nature reviews Nephrology* 2015; **11**(4): 233-44.
 32. Ito Y, Aten J, Bende RJ, et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 1998; **53**(4): 853-61.
 33. Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**(1): 1-12.
 34. Han SJ, Jung JK, Im SS, et al. Deficiency of primary cilia in kidney epithelial cells induces epithelial to mesenchymal transition. *Biochemical and biophysical research communications* 2018; **496**(2): 450-4.
 35. Germino GG. Linking cilia to Wnts. *Nature genetics* 2005; **37**(5): 455-7.
 36. Simons M, Gloy J, Ganner A, et al. Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nature genetics* 2005; **37**(5): 537-43.
 37. Huangfu D, Anderson KV. Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; **102**(32): 11325-30.
 38. Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S. Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line. *Science translational medicine* 2013; **5**(167): 167sr1.
 39. Portilla D. Apoptosis, fibrosis and senescence. *Nephron Clinical practice* 2014; **127**(1-4): 65-9.
 40. Nakad R, Schumacher B. DNA Damage Response and Immune Defense: Links and Mechanisms. *Front Genet* 2016; **7**: 147.
 41. Chen PH, Tseng WH, Chi JT. The Intersection of DNA Damage Response and Ferroptosis-A Rationale for Combination Therapeutics. *Biology (Basel)* 2020; **9**(8).
 42. Slaats GG, Saldivar JC, Bacal J, et al. DNA replication stress underlies renal phenotypes in CEP290-associated Joubert syndrome. *J Clin Invest* 2015; **125**(9): 3657-66.
 43. Jackson PK. Nek8 couples renal ciliopathies to DNA damage and checkpoint control. *Mol Cell* 2013; **51**(4): 407-8.
 44. Choi HJ, Lin JR, Vannier JB, et al. NEK8 links the ATR-regulated replication stress response and S phase CDK activity to renal ciliopathies. *Mol Cell* 2013; **51**(4): 423-39.
 45. Jain M, Kaiser RWJ, Bohl K, et al. Inactivation of Apoptosis Antagonizing Transcription Factor in tubular epithelial cells induces accumulation of DNA damage and nephronophthisis. *Kidney Int* 2019; **95**(4): 846-58.
 46. Chaki M, Airik R, Ghosh AK, et al. Exome capture reveals ZNF423 and CEP164 mutations, linking renal ciliopathies to DNA damage response signaling. *Cell* 2012; **150**(3): 533-48.
 47. Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck's archives of surgery* 2006; **391**(5): 499-510.
 48. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; **420**(6917): 860-7.

49. Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, et al. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* 2017; **169**(1): 132-47.e16.
50. Maremonti F, Meyer C, Linkermann A. Mechanisms and Models of Kidney Tubular Necrosis and Nephron Loss. *J Am Soc Nephrol* 2022; **33**(3): 472-86.
51. von Mässenhausen A, Tonnus W, Linkermann A. Cell Death Pathways Drive Necroinflammation during Acute Kidney Injury. *Nephron* 2018; **140**(2): 144-7.
52. Zhou Y, Zhang J, Guan Q, Tao X, Wang J, Li W. The role of ferroptosis in the development of acute and chronic kidney diseases. *J Cell Physiol* 2022.
53. Liu J, Krautzberger AM, Sui SH, et al. Cell-specific translational profiling in acute kidney injury. *J Clin Invest* 2014; **124**(3): 1242-54.
54. Belavgeni A, Meyer C, Stumpf J, Hugo C, Linkermann A. Ferroptosis and Necroptosis in the Kidney. *Cell Chem Biol* 2020; **27**(4): 448-62.
55. Clements ME, Chaber CJ, Ledbetter SR, Zuk A. Increased cellular senescence and vascular rarefaction exacerbate the progression of kidney fibrosis in aged mice following transient ischemic injury. *PLoS One* 2013; **8**(8): e70464.
56. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007; **8**(9): 729-40.
57. Li C, Xie N, Li Y, Liu C, Hou FF, Wang J. N-acetylcysteine ameliorates cisplatin-induced renal senescence and renal interstitial fibrosis through sirtuin1 activation and p53 deacetylation. *Free radical biology & medicine* 2019; **130**: 512-27.
58. Okuda R, Aoshiba K, Matsushima H, Ogura T, Okudela K, Ohashi K. Cellular senescence and senescence-associated secretory phenotype: comparison of idiopathic pulmonary fibrosis, connective tissue disease-associated interstitial lung disease, and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of thoracic disease* 2019; **11**(3): 857-64.
59. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* 2007; **26**(56): 7773-9.
60. Schupp N, Heidland A, Stopper H. Genomic damage in endstage renal disease-contribution of uremic toxins. *Toxins (Basel)* 2010; **2**(10): 2340-58.
61. Hamperl S, Cimprich KA. The contribution of co-transcriptional RNA:DNA hybrid structures to DNA damage and genome instability. *DNA repair* 2014; **19**: 84-94.
62. Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine* 2009; **361**(15): 1475-85.
63. Lindahl T, Barnes DE. Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 2000; **65**: 127-33.
64. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993; **362**(6422): 709-15.
65. Reinhardt HC, Schumacher B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet* 2012; **28**(3): 128-36.
66. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009; **461**(7267): 1071-8.
67. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 2010; **40**(2): 179-204.
68. Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008; **9**(8): 616-27.
69. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature reviews Cancer* 2003; **3**(3): 155-68.
70. Huen MS, Chen J. The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell research* 2008; **18**(1): 8-16.
71. Cook PJ, Ju BG, Telese F, Wang X, Glass CK, Rosenfeld MG. Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature* 2009; **458**(7238): 591-6.
72. Xiao A, Li H, Shechter D, et al. WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature* 2009; **457**(7225): 57-62.
73. Williams AB, Schumacher B. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2016; **6**(5).

74. Iezzi S, Fanciulli M. Discovering Che-1/AATF: a new attractive target for cancer therapy. *Front Genet* 2015; **6**: 141.
75. Bruno T, De Nicola F, Iezzi S, et al. Che-1 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint. *Cancer cell* 2006; **10**(6): 473-86.
76. Höpker K, Hagmann H, Khurshid S, et al. Putting the brakes on p53-driven apoptosis. *Cell Cycle* 2012; **11**(22): 4122-8.
77. Ling XX, Liu JX, Yun L, et al. Poly(ADP-ribosyl)ation of Apoptosis Antagonizing Transcription Factor Involved in Hydroquinone-Induced DNA Damage Response. *Biomedical and environmental sciences : BES* 2016; **29**(1): 80-4.
78. Page G, Lödige I, Kögel D, Scheidtmann KH. AATF, a novel transcription factor that interacts with Dlk/ZIP kinase and interferes with apoptosis. *FEBS letters* 1999; **462**(1-2): 187-91.
79. Fanciulli M, Bruno T, Di Padova M, et al. Identification of a novel partner of RNA polymerase II subunit 11, Che-1, which interacts with and affects the growth suppression function of Rb. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2000; **14**(7): 904-12.
80. Sorino C, Bruno T, Desantis A, et al. Centrosomal Che-1 protein is involved in the regulation of mitosis and DNA damage response by mediating pericentrin (PCNT)-dependent Chk1 protein localization. *The Journal of biological chemistry* 2013; **288**(32): 23348-57.
81. Kaiser RWJ, Ignarski M, Van Nostrand EL, et al. A protein-RNA interaction atlas of the ribosome biogenesis factor AATF. *Scientific reports* 2019; **9**(1): 11071.
82. Kaiser RWJ, Erber J, Höpker K, Fabretti F, Müller RU. AATF/Che-1-An RNA Binding Protein at the Nexus of DNA Damage Response and Ribosome Biogenesis. *Front Oncol* 2020; **10**: 919.
83. Thomas T, Voss AK, Petrou P, Gruss P. The murine gene, Traube, is essential for the growth of preimplantation embryos. *Developmental biology* 2000; **227**(2): 324-42.
84. Kamileri I, Karakasilioti I, Garinis GA. Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends Genet* 2012; **28**(11): 566-73.
85. Faridounnia M, Folkers GE, Boelens R. Function and Interactions of ERCC1-XPF in DNA Damage Response. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2018; **23**(12).
86. Gillet LC, Schärer OD. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chemical reviews* 2006; **106**(2): 253-76.
87. Edifizi D, Schumacher B. Genome Instability in Development and Aging: Insights from Nucleotide Excision Repair in Humans, Mice, and Worms. *Biomolecules* 2015; **5**(3): 1855-69.
88. Vaezi A, Feldman CH, Niedernhofer LJ. ERCC1 and XRCC1 as biomarkers for lung and head and neck cancer. *Pharmacogenomics and personalized medicine* 2011; **4**: 47-63.
89. McWhir J, Selfridge J, Harrison DJ, Squires S, Melton DW. Mice with DNA repair gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning. *Nature genetics* 1993; **5**(3): 217-24.
90. Dolle ME, Kuiper RV, Roodbergen M, et al. Broad segmental progeroid changes in short-lived Ercc1(-/Delta7) mice. *Pathobiology of aging & age related diseases* 2011; **1**.
91. Wu H, van Thiel BS, Bautista-Niño PK, et al. Dietary restriction but not angiotensin II type 1 receptor blockade improves DNA damage-related vasodilator dysfunction in rapidly aging Ercc1(Delta-) mice. *Clinical science (London, England : 1979)* 2017; **131**(15): 1941-53.
92. Weeda G, Donker I, de Wit J, et al. Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. *Current biology : CB* 1997; **7**(6): 427-39.
93. Doig J, Anderson C, Lawrence NJ, Selfridge J, Brownstein DG, Melton DW. Mice with skin-specific DNA repair gene (Ercc1) inactivation are hypersensitive to ultraviolet irradiation-induced skin cancer and show more rapid actinic progression. *Oncogene* 2006; **25**(47): 6229-38.
94. Westerveld A, Hoeijmakers JH, van Duin M, et al. Molecular cloning of a human DNA repair gene. *Nature* 1984; **310**(5976): 425-9.
95. Chakraborty P. New insight into the biology of R-loops. *Mutat Res* 2020; **821**: 111711.

96. Bruno T, Corleone G, Catena V, et al. AATF/Che-1 localizes to paraspeckles and suppresses R-loops accumulation and interferon activation in Multiple Myeloma. *The EMBO journal* 2022; **41**(22): e109711.
97. Chatzidoukaki O, Stratigi K, Goulielmaki E, et al. R-loops trigger the release of cytoplasmic ssDNAs leading to chronic inflammation upon DNA damage. *Sci Adv* 2021; **7**(47): eabj5769.
98. Goulielmaki E, Tsekrekou M, Batsiotos N, et al. The splicing factor XAB2 interacts with ERCC1-XPF and XPG for R-loop processing. *Nat Commun* 2021; **12**(1): 3153.
99. Santos-Pereira JM, Aguilera A. R loops: new modulators of genome dynamics and function. *Nature reviews Genetics* 2015; **16**(10): 583-97.
100. Duquette ML, Handa P, Vincent JA, Taylor AF, Maizels N. Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Genes & development* 2004; **18**(13): 1618-29.
101. So CC, Martin A. DSB structure impacts DNA recombination leading to class switching and chromosomal translocations in human B cells. *PLoS genetics* 2019; **15**(4): e1008101.
102. Ginno PA, Lott PL, Christensen HC, Korf I, Chédin F. R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters. *Mol Cell* 2012; **45**(6): 814-25.
103. Ginno PA, Lim YW, Lott PL, Korf I, Chédin F. GC skew at the 5' and 3' ends of human genes links R-loop formation to epigenetic regulation and transcription termination. *Genome research* 2013; **23**(10): 1590-600.
104. Groh M, Gromak N. Out of balance: R-loops in human disease. *PLoS genetics* 2014; **10**(9): e1004630-e.
105. Cristini A, Groh M, Kristiansen MS, Gromak N. RNA/DNA Hybrid Interactome Identifies DXH9 as a Molecular Player in Transcriptional Termination and R-Loop-Associated DNA Damage. *Cell reports* 2018; **23**(6): 1891-905.
106. Sollier J, Stork CT, García-Rubio ML, Paulsen RD, Aguilera A, Cimprich KA. Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability. *Mol Cell* 2014; **56**(6): 777-85.
107. Chen Y, Huang C, Duan ZB, Chen YX, Xu CY. LncRNA NEAT1 accelerates renal fibrosis progression via targeting miR-31 and modulating RhoA/ROCK signal pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2022.
108. Schlimpert M, Lagies S, Müller B, et al. Metabolic perturbations caused by depletion of nephronophthisis factor Anks6 in mIMCD3 cells. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* 2019; **15**(5): 71.
109. Hoff S, Epting D, Falk N, et al. The nucleoside-diphosphate kinase NME3 associates with nephronophthisis proteins and is required for ciliary function during renal development. *The Journal of biological chemistry* 2018; **293**(39): 15243-55.
110. Cerritelli SM, Crouch RJ. Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *The FEBS journal* 2009; **276**(6): 1494-505.
111. Belotserkovskii BP, Tornaletti S, D'Souza AD, Hanawalt PC. R-loop generation during transcription: Formation, processing and cellular outcomes. *DNA repair* 2018; **71**: 69-81.
112. Nguyen HD, Yadav T, Giri S, Saez B, Graubert TA, Zou L. Functions of Replication Protein A as a Sensor of R Loops and a Regulator of RNaseH1. *Mol Cell* 2017; **65**(5): 832-47.e4.
113. Miglietta G, Russo M, Capranico G. G-quadruplex-R-loop interactions and the mechanism of anticancer G-quadruplex binders. *Nucleic Acids Res* 2020; **48**(21): 11942-57.
114. Yao F, Svensjo T, Winkler T, Lu M, Eriksson C, Eriksson E. Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther* 1998; **9**(13): 1939-50.
115. Hillen W, Berens C. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 1994; **48**: 345-69.
116. Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 1985; **41**(2): 521-30.

117. Nelson JA, Reynolds-Kohler C, Smith BA. Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 1987; **7**(11): 4125-9.
118. Chappidi N, Nascakova Z, Boleslavskaya B, et al. Fork Cleavage-Religation Cycle and Active Transcription Mediate Replication Restart after Fork Stalling at Co-transcriptional R-Loops. *Mol Cell* 2020; **77**(3): 528-41.e8.
119. Brown JS, Lukashchuk N, Sczaniecka-Clift M, et al. Neddylation promotes ubiquitylation and release of Ku from DNA-damage sites. *Cell reports* 2015; **11**(5): 704-14.
120. Michalski A, Damoc E, Hauschild JP, et al. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2011; **10**(9): M111.011015.
121. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology* 2008; **26**(12): 1367-72.
122. Cox J, Hein MY, Luber CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2014; **13**(9): 2513-26.
123. Cox J, Mann M. 1D and 2D annotation enrichment: a statistical method integrating quantitative proteomics with complementary high-throughput data. *BMC Bioinformatics* 2012; **13 Suppl 16**(Suppl 16): S12-S.
124. Borgal L, Rinschen MM, Dafinger C, et al. Jade-1S phosphorylation induced by CK1 α contributes to cell cycle progression. *Cell Cycle* 2016; **15**(8): 1034-45.
125. Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 2015; **16**(1): 169.
126. Perez-Riverol Y, Bai J, Bandla C, et al. The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res* 2022; **50**(D1): D543-d52.
127. Shao X, Somlo S, Igarashi P. Epithelial-specific Cre-lox recombination in the developing kidney and genitourinary tract. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2002; **13**: 1837-46.
128. Bammert L, Jonas S, Ungricht R, Kutay U. Human AATF/Che-1 forms a nucleolar protein complex with NGDN and NOL10 required for 40S ribosomal subunit synthesis. *Nucleic Acids Res* 2016; **44**(20): 9803-20.
129. van Dam TJP, Kennedy J, van der Lee R, et al. CiliaCarta: An integrated and validated compendium of ciliary genes. *PLoS One* 2019; **14**(5): e0216705.
130. Brosh RM, Jr. DNA helicases involved in DNA repair and their roles in cancer. *Nature reviews Cancer* 2013; **13**(8): 542-58.
131. Caliskan G, Baris IC, Ayaydin F, et al. Che1/AATF interacts with subunits of the histone acetyltransferase core module of SAGA complexes. *PLoS one* 2017; **12**(12): e0189193-e.
132. Zencir S, Sike A, Dobson MJ, Ayaydin F, Boros I, Topcu Z. Identification of transcriptional and phosphatase regulators as interaction partners of human ADA3, a component of histone acetyltransferase complexes. *The Biochemical journal* 2013; **450**(2): 311-20.
133. Costantino L, Koshland D. Genome-wide Map of R-Loop-Induced Damage Reveals How a Subset of R-Loops Contributes to Genomic Instability. *Mol Cell* 2018; **71**(4): 487-97.e3.
134. Chan YA, Aristizabal MJ, Lu PY, et al. Genome-wide profiling of yeast DNA:RNA hybrid prone sites with DRIP-chip. *PLoS genetics* 2014; **10**(4): e1004288.
135. Wang IX, Grunseich C, Fox J, et al. Human proteins that interact with RNA/DNA hybrids. *Genome research* 2018; **28**(9): 1405-14.
136. Nadel J, Athanasiadou R, Lemetre C, et al. RNA:DNA hybrids in the human genome have distinctive nucleotide characteristics, chromatin composition, and transcriptional relationships. *Epigenetics Chromatin* 2015; **8**: 46.
137. Piñeiro D, Stoneley M, Ramakrishna M, et al. Identification of the RNA polymerase I-RNA interactome. *Nucleic Acids Res* 2018; **46**(20): 11002-13.

138. Sihn CR, Lee YS, Jeong JS, Park K, Kim SH. CANu1, a novel nucleolar protein, accumulated on centromere in response to DNA damage. *Genes Cells* 2008; **13**(8): 787-96.
139. Shen Q, Hu X, Zhou L, Zou S, Sun LZ, Zhu X. Overexpression of the 14-3-3 γ protein in uterine leiomyoma cells results in growth retardation and increased apoptosis. *Cell Signal* 2018; **45**: 43-53.
140. Habbig S, Bartram MP, Sägmüller JG, et al. The ciliopathy disease protein NPHP9 promotes nuclear delivery and activation of the oncogenic transcriptional regulator TAZ. *Hum Mol Genet* 2012; **21**(26): 5528-38.
141. Borgal L, Habbig S, Hatzold J, et al. The ciliary protein nephrocystin-4 translocates the canonical Wnt regulator Jade-1 to the nucleus to negatively regulate β -catenin signaling. *The Journal of biological chemistry* 2012; **287**(30): 25370-80.
142. Yoo JO, Kwak SY, An HJ, Bae IH, Park MJ, Han YH. miR-181b-3p promotes epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells through Snail stabilization by directly targeting YWHAG. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1863**(7 Pt A): 1601-11.
143. Raungrut P, Wongkotsila A, Champoochana N, Lirdprapamongkol K, Svasti J, Thongsuksai P. Knockdown of 14-3-3 γ Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition and Reduces Metastatic Potential of Human Non-small Cell Lung Cancer Cells. *Anticancer Res* 2018; **38**(6): 3507-14.
144. Fazio TG. Regulation of chromatin structure and cell fate by R-loops. *Transcription* 2016; **7**(4): 121-6.
145. Chédin F. Nascent Connections: R-Loops and Chromatin Patterning. *Trends Genet* 2016; **32**(12): 828-38.
146. Wen J, Ma Z, Livingston MJ, et al. Decreased secretion and profibrotic activity of tubular exosomes in diabetic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2020; **319**(4): F664-f73.
147. Wills ES, Te Morsche RHM, van Reeuwijk J, et al. Liver cyst gene knockout in cholangiocytes inhibits cilium formation and Wnt signaling. *Hum Mol Genet* 2017; **26**(21): 4190-202.
148. Guo Y, Li M, Bai G, et al. Filamin A inhibits tumor progression through regulating BRCA1 expression in human breast cancer. *Oncol Lett* 2018; **16**(5): 6261-6.
149. Velkova A, Carvalho MA, Johnson JO, Tavtigian SV, Monteiro AN. Identification of Filamin A as a BRCA1-interacting protein required for efficient DNA repair. *Cell Cycle* 2010; **9**(7): 1421-33.
150. Hewitt G, Carroll B, Sarallah R, et al. SQSTM1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the UPS in DNA repair. *Autophagy* 2016; **12**(10): 1917-30.
151. Wang Q, Zheng W, Wang Z, et al. Filamin-a increases the stability and plasma membrane expression of polycystin-2. *PLoS One* 2015; **10**(4): e0123018.
152. Zhu Q, Dong H, Bukhari AA, et al. HUWE1 promotes EGFR ubiquitination and degradation to protect against renal tubulointerstitial fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2020; **34**(3): 4591-601.
153. de Groot RE, Ganji RS, Bernatik O, et al. Huwe1-mediated ubiquitylation of dishevelled defines a negative feedback loop in the Wnt signaling pathway. *Sci Signal* 2014; **7**(317): ra26.
154. Seeger-Nukpezah T, Liebau MC, Höpker K, et al. The centrosomal kinase Plk1 localizes to the transition zone of primary cilia and induces phosphorylation of nephrocystin-1. *PLoS One* 2012; **7**(6): e38838.
155. Li W, Wang HY, Zhao X, et al. A methylation-phosphorylation switch determines Plk1 kinase activity and function in DNA damage repair. *Sci Adv* 2019; **5**(3): eaau7566.
156. van Vugt MA, Gardino AK, Linding R, et al. A mitotic phosphorylation feedback network connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to inactivate the G(2)/M DNA damage checkpoint. *PLoS Biol* 2010; **8**(1): e1000287.
157. Reinhardt HC, Yaffe MB. Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. *Nature reviews Molecular cell biology* 2013; **14**(9): 563-80.
158. Dafinger C, Rinschen MM, Borgal L, et al. Targeted deletion of the AAA-ATPase Ruvbl1 in mice disrupts ciliary integrity and causes renal disease and hydrocephalus. *Experimental & molecular medicine* 2018; **50**(6): 1-17.

159. Sulistiyowati I, Yunus J, Sari DCR, Arfian N. Upregulation of p16, Bax and Bcl-2 mRNA Expression Associated with Epithelial Apoptosis and Myofibroblast Proliferation in Kidney Fibrosis Model in Mice. *Malays J Med Sci* 2020; **27**(2): 37-44.
160. Huang F, Wang Q, Guo F, et al. FoxO1-mediated inhibition of STAT1 alleviates tubulointerstitial fibrosis and tubule apoptosis in diabetic kidney disease. *EBioMedicine* 2019; **48**: 491-504.
161. Tonnus W, Meyer C, Paliege A, et al. The pathological features of regulated necrosis. *J Pathol* 2019; **247**(5): 697-707.
162. Huang M, Zhu S, Huang H, et al. Integrin-Linked Kinase Deficiency in Collecting Duct Principal Cell Promotes Necroptosis of Principal Cell and Contributes to Kidney Inflammation and Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2019; **30**(11): 2073-90.
163. Song Z, Gong Q, Guo J. Pyroptosis: Mechanisms and Links with Fibrosis. *Cells* 2021; **10**(12).
164. Zhang KJ, Wu Q, Jiang SM, et al. Pyroptosis: A New Frontier in Kidney Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2021; **2021**: 6686617.
165. Jia Y, Kang X, Tan L, et al. Nicotinamide Mononucleotide Attenuates Renal Interstitial Fibrosis After AKI by Suppressing Tubular DNA Damage and Senescence. *Front Physiol* 2021; **12**: 649547.
166. Yan J, Wang J, He JC, Zhong Y. Sirtuin 1 in Chronic Kidney Disease and Therapeutic Potential of Targeting Sirtuin 1. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022; **13**: 917773.
167. Zhu X, Liu Q, Wang M, et al. Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF- α induced inflammation in fibroblasts. *PLoS One* 2011; **6**(11): e27081.
168. Langley E, Pearson M, Faretta M, et al. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *The EMBO journal* 2002; **21**(10): 2383-96.
169. Ramsbottom SA, Molinari E, Srivastava S, et al. Targeted exon skipping of a CEP290 mutation rescues Joubert syndrome phenotypes in vitro and in a murine model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2018; **115**(49): 12489-94.
170. Torres JA, Kruger SL, Broderick C, et al. Ketosis Ameliorates Renal Cyst Growth in Polycystic Kidney Disease. *Cell Metabolism* 2019; **30**(6): 1007-23.e5.
171. Carney EF. Ketosis slows the progression of PKD. *Nature reviews Nephrology* 2020; **16**(1): 1.
172. Rojas-Morales P, León-Contreras JC, Aparicio-Trejo OE, et al. Fasting reduces oxidative stress, mitochondrial dysfunction and fibrosis induced by renal ischemia-reperfusion injury. *Free radical biology & medicine* 2019; **135**: 60-7.
173. Liu JR, Cai GY, Ning YC, et al. Caloric restriction alleviates aging-related fibrosis of kidney through downregulation of miR-21 in extracellular vesicles. *Aging (Albany NY)* 2020; **12**(18): 18052-72.
174. Vermeij WP, Dolle ME, Reiling E, et al. Restricted diet delays accelerated ageing and genomic stress in DNA-repair-deficient mice. *Nature* 2016; **537**(7620): 427-31.
175. Green CL, Lamming DW, Fontana L. Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. *Nature reviews Molecular cell biology* 2022; **23**(1): 56-73.

7 Anhang

7.1 Ergänzende Tabellen

Tabelle 34 (Anhang): DNA/RNA Hybrid Interaktom in hU2OS Zellen (S9.6_SiCtrl). In mindestens 3 von 4 Replikaten detektierte Kandidaten. Aus Übersichtlichkeitsgründen sind die zugehörigen Genbezeichnungen der jeweiligen Proteine aufgeführt.

AASDHPPT; AATF; ABCA13; ABCC3; ABCE1; ABCF1; ABCF2; ABCF3; ABHD14B; ACACA; ACADM; ACAT1; ACIN1; ACLY; ACOT7; ACSL3; ACSL4; ACTB; ACTC1,ACTA1,ACTG2,ACTA2; ACTN4; ACTR2; ACTR3; ADAR; ADNP; ADRM1; AFG3L2; AGPS; AHCTF1; AHCY; AHCYL1,AHCYL2; AHNAK; AHTSA1; AIMP1; AIMP2; ALDH18A1; ALDH1B1; ALDH2; ALDH7A1; ALDH9A1; ALDOA; ALYREF; ANAPC7; ANKRD17; ANLN; ANXA1; ANXA11; ANXA2,ANXA2P2; ANXA5; ANXA6; ANXA7; AP2B1; AP2M1; AP3B1; AP3D1; APEX1; APOBEC3B; ARCN1; ARF1,ARF3; ARGLU1; ARHGAP1; ARHGDI; ARHGEF2; ARID2; ARL6IP4; ASNS; ATAD2; ATAD3A; ATIC; ATL2; ATP1A1; ATP2A2; ATP2B1,ATP2B2,ATP2B3,ATP2B4; ATP5A1; ATP5B; ATP5C1; ATP5L; ATP5O; ATP6V1A; ATP6V1B2; ATXN2L; AUP1; AURKAIP1; BAZ1B; BAZ2A; BBX; BCKDK; BCLAF1; BCLAF1; BLM; BLVRA; BLVRB; BMS1; BOP1; BRAT1; BRD7; BRIX1; BTF3; BUB3; BUD31; C11orf57; C11orf98; C14orf166; C3orf17; C7orf50; CACTIN; CACYBP; CAD; CALR; CAMK2G,CAMK2B; CAND1; CANX; CAP1; CAPRIN1; CAPZA1; CARM1; CAT; CBR1; CBX3; CBX5; CCAR2; CCDC124; CCDC137; CCDC47; CCDC59; CCDC86; CCT2; CCT3; CCT4; CCT5; CCT6A; CCT7; CCT8; CD3EAP; CDC20; CDC5L; CDK1,CDC2; CDK11A,CDK11B,CDC2L1; CDK12; CDK2; CDK4; CDK6; CEBPZ; CETN1,CETN2; CFL1; CHD1L; CHD4; CHORDC1; CHTOP; CIAO1; CIRH1A; CKAP2L; CKAP4; CKAP5; CLIC1; CLIC4; CLPX; CLTC; CMSS1; CNN3; COASY; COIL; COL1A2; COLGALT1; COPA; COPB1; COPB2; COPE; COPG1; COPZ1; CORO1C; CORO7-PAM16,CORO7; CPSF1; CPSF2; CPSF6; CPSF7; CRNKL1; CSDE1; CSE1L; CSNK1A1; CSNK2A1,CSNK2A3; CSNK2A2; CSNK2B,CSNK2B-LY6G5B-1181,CSNK2B-LY6G5B--991; CTBP2; CTCF; CTNNB1; CTNNB1L; CTPS1; CUL4A; CWC22; CXorf67; CYB5R1; CYC1; CYFIP1,CYFIP2; CYR61; DARS; DCAF13; DCD; DCTN1,DKFZp686E0752; DDB1; DDOST; DDX1; DDX10; DDX17; DDX18; DDX19A,DDX19B; DDX20; DDX21; DDX23; DDX24; DDX27; DDX31; DDX39A; DDX39B; DDX3X,DDX3Y; DDX42; DDX46; DDX47; DDX5; DDX50; DDX52; DDX54; DDX56; DDX6; DEK; DHFR,DHFRL1; DHRS2; DHX15; DHX29; DHX30; DHX33; DHX36; DHX37; DHX57; DHX9; DIAPH1; DICER1; DIEXF; DIMT1; DKC1; DNAJA1; DNAJA2; DNAJC10; DNAJC2; DNM1; DNM1L; DNTTIP2; DPM1; DPYSL2; DPYSL3; DRG1; DSC1; DSG1; DSP; DSTN; DTYMK; DUSP12; DYNC1H1; DYNLL2,DYNLL1; EBNA1BP2; EDF1; EEF1A1,EEF1A1P5; EEF1A2; EEF1B2; EEF1D; EEF1G; EEF2; EFTUD2; EHD1,EHD3; EHD4; EIF2A; EIF2AK2; EIF2B1; EIF2B2; EIF2B3; EIF2B4; EIF2B5; EIF2S1; EIF2S2; EIF2S3,EIF2S3L; EIF3A; EIF3B; EIF3C,EIF3CL; EIF3D; EIF3E; EIF3F; EIF3G; EIF3H; EIF3I; EIF3K; EIF3L; EIF3M; EIF4A1; EIF4A3; EIF4G1; EIF4G2; EIF5A,EIF5AL1,EIF5A2; EIF5B; EIF6; ELAVL1; ELMSAN1; EMG1; ENO1; ENY2; EPB41L2; EPB41L3; EPHA2; EPRS; ERAL1; ERGIC2; ERH; ERLIN2; ESF1; ESYT1; ETF1; ETFA; ETFB; EXOSC10; EXOSC3; EZR; FADS2; FAF2; FAM111A; FAM120A; FAM65A; FAM91A1; FAM98A; FAM98B; FARSA; FARSB; FASN; FAU; FBL; FBXO22; FCF1; FDXR; FEN1; FGD6; FHOD1; FKBP4; FLII; FLNA; FLNB; FLNC; FSCN1; FTSJ3; FXR1; FXR2; G3BP1; G3BP2; G6PD; GADD45GIP1; GALE; GANAB; GAPDH; GAR1; GART; GATAD2A; GBE1; GCN1L1; GDI2; GEMIN4; GEMIN5; GFPT1; GIPC1; GLS; GLTSCR2; GLYR1; GMPPA; GMPPB; GMPS; GNAI2; GNAI3; GNAS; GNB2; GNB2L1; GNL1; GNL2; GNL3; GPATCH4; GPATCH8; GRHRP; GRN; GRSF1; GRWD1; GSDMD; GSK3B; GSPT2,GSPT1; GSTP1; GTF3C1; GTF3C3; GTPBP4; H1F0; H1FX; H2AFV,H2AFZ; H2AFX; H2AFY; H3F3B,H3F3A; HADHA; HADHB; HAT1; HBS1L; HCFC1; HDAC1; HDLBP; HEATR1; HINT1; HIP1R; HIST1H1A; HIST1H1C; HIST1H1E,HIST1H1D; HIST1H2AJ,HIST1H2AH,H2AFJ,HIST1H2AG,HIST1H2AD; HIST1H2BJ; HIST1H2BM; HIST1H3A,HIST3H3,H3F3C; HIST1H4A; HIST2H2BE; HIST2H3PS2; HK1; HK2; HMGA1; HMGB1; HMGNA4; HNRNPA0; HNRNPA1,HNRNPA1L2; HNRNPA2B1; HNRNPA3;

HNRNPAB; HNRNPC; HNRNPD; HNRNPDL; HNRNPF; HNRNPH1; HNRNPH2; HNRNPH3; HNRNPK; HNRNPL; HNRNPM; HNRNPR; HNRNPU; HNRNPUL1; HNRNPUL2,HNRNPUL2-BSCL2; HP1BP3; HSD17B10; HSD17B4; HSP90AA1; HSP90AB1; HSP90AB2P; HSP90B1; HSPA14; HSPA1B,HSPA1A; HSPA5; HSPA6,HSPA7; HSPA8; HSPA9; HSPB1; HSPD1; HSPE1,HSPE1-MOB4; HSPH1; HUWE1; HYOU1; IARS; IARS2; ICT1; IDH3A; IDH3B; IFRD1; IFRD2; IGF2BP2; IGHV2-26; IGHV3-74,IGHV3-21,IGHV3OR16-9,IGHV3-66,IGHV3OR16-10,IGHV3-20; IGKC; IGKV A18,IGKV2D-29,IGKV2D-26; IGKV2-40,IGKV2D-28; IGKV2D-24; IGLL5,IGLC1; ILF2; ILF3; ILK; IMMT; IMP3; IMP4; IMPDH2; IPO4; IPO5; IPO7; IPO9; IQGAP1; ISG20L2; JUP; KARS; KDM2A; KHDRBS1; KIAA0020; KIF20A; KIF23; KIF2A; KIF2C; KIF4A,KIF4B; KIFC1; KMT2A; KNOP1; KPNA1; KPNA2; KPNA3; KPNA6; KPNB1; KPRP; KRI1; KRR1; KRT18; KRT2; L1RE1; LAP3; LARP1; LARP4; LARP7; LARS; LBR; LDHA; LDHB; LEPRE1; LGALS1; LIMA1; LLPH; LMAN1; LMNA; LMNB1; LONP1; LRPPRC; LRRC40; LSG1; LSM14B; LUC7L; LUC7L2; LUC7L3; LYAR; MAGEA1; MAGEA4; MAGEB2; MAGED2; MAGOHB; MAGT1; MAK16; MAP1S; MAP2K1; MAP2K3; MAP4; MAP7D1; MAPK1; MAPK3; MARS; MAT2A; MATR3; MBOAT7; MCM2; MCM3; MCM4; MCM5; MCM6; MCM7; MDC1; MDH2; MEPCE; METAP1; METTL2A,METTL2B; MISP; MKI67; MOV10; MPHOSPH10; MRM1; MRPL13; MRPL14; MRPL15; MRPL16; MRPL18; MRPL19; MRPL2; MRPL20; MRPL21; MRPL22; MRPL24; MRPL27; MRPL28; MRPL3; MRPL30; MRPL32; MRPL35; MRPL37; MRPL38; MRPL39; MRPL4; MRPL43; MRPL44; MRPL45; MRPL47; MRPL49; MRPL50; MRPL51; MRPL57; MRPS11; MRPS12; MRPS14; MRPS15; MRPS16; MRPS2; MRPS22; MRPS25; MRPS28; MRPS34; MRPS5; MRPS9; MRTO4; MSH2; MSH6; MSN; MTA2; MTCH2; MT-CO2; MTHFD1; MTHFD1L; MTHFD2; MTPAP; MVP; MYBBP1A; MYH9; MYL6; MYO1B; MYO1C; NAA10; NAA15; NAA50; NAMPT; NAP1L1; NAT10; NCAPD2; NCAPG; NCAPH; NCL; NCLN; NDRG3; NDUFA10; NDUFA13; NDUFA6; NDUFA9; NDUFS1; NDUFS3; NEMF; NES; NGDN; NHLRC2; NHP2; NHP2L1; NIFK; NIP7; NKRF; NLE1; NMD3; NME1-NME2,NME2,NME1,NME2P1; NME7; NMNAT1; NMT1; NNT; NO66; NOA1; NOB1; NOC2L; NOC3L; NOC4L; NOL10; NOL11; NOL12; NOL6; NOL7; NOL9; NOLC1; NOM1; NOMO1,NOMO3,NOMO2; NONO; NOP10; NOP14; NOP16; NOP2; NOP56; NOP58; NPEPPS; NPM1; NPM3; NSA2; NSDHL; NSF; NSUN2; NTMT1; NUBP2; NUDC; NUDT11,NUDT4,NUDT10; NUDT21; NUMA1; NUP107; NUP133; NUP155; NUP205; NUP85; NUP93; NUSAP1; NUTF2; NXF1; OAT; OGDH; OGFR; OLA1; OTUB1; OXSR1; P4HB; PA2G4; PABPC1; PABPC4; PAFAH1B3; PAICS; PAK1IP1; PALLD; PAPD5; PAPSS2; PARP1; PARP2; PBK; PBRM1; PCBP1; PCBP2; PCMT1; PCNA; PDCD11; PDCD6IP; PDHA1; PDHB; PDIA3; PDIA6; PDS5A; PDS5B; PELO; PES1; PFKL; PFKM; PFKP; PFN1; PFN2; PGAM1; PGAM5; PGK1; PHB; PHB2; PHF6; PHGDH; PHIP; PHRF1; PINX1; PKM; PLEC; PLEK2; PLK1; PLOD1; PLOD3; PMPCB; PNISR; PNN; PNO1; POLD1; POLD2; POLDIP3; POLR1C; POLR1E; POLR1E; POLR2A; POLR2B; POLR2C; POLR2E; POLR2H; POLR2L; POP1; PPAN-P2RY11,PPAN; PPIA; PPIB; PPIG; PPIL1; PPM1G; PPME1; PPP1CA; PPP1CB; PPP2R1A; PRDX1; PRDX3; PRDX6; PRKAA1; PRKDC; PRKRA; PRMT1; PRPF19; PRPF3; PRPF31; PRPF4; PRPF40A; PRPF4B; PRPF6; PRPF8; PRPS1; PRPSAP1; PRR11; PRRC2A; PRRC2C; PSMA3; PSMA5; PSMA7,PSMA8; PSMC1; PSMC2; PSMC3; PSMC4; PSMC5; PSMC6; PSMD1; PSMD11; PSMD12; PSMD13; PSMD14; PSMD2; PSMD3; PSMD6; PTBP1; PTGES3L-AARSD1,AARSD1; PTMA; PTMS; PTPN2; PTRF; PTRH2; PUF60; PURA; PURB; PWP1; PWP2; PYCR1; PYCR2; PYGB; PYGL,PYGM; QARS; RAB11A,RAB11B; RAB13; RAB34; RACGAP1; RAD50; RALY; RAN; RANBP1; RANBP2,RGPD8,RGPD5; RANGAP1; RARS; RBBP4; RBBP6; RBM14; RBM15; RBM19; RBM25; RBM28; RBM3; RBM34; RBM39; RBM4; RBMX; RBMX2; RCC1; RCL1; RCN2; RDH11; RECQL; REPIN1; REXO4; RFC1; RFC2; RFC3; RFC4; RFC5; RHOC,RHOA; RHOG; RIC8A; RIN1; RNMT; RNPEP; RNPS1; RP9; RPA1; RPF1; RPF2; RPL10; RPL10A; RPL11; RPL12; RPL13; RPL13A; RPL14; RPL15; RPL17,RPL17-C18orf32; RPL18; RPL18A; RPL19; RPL21; RPL22; RPL22L1; RPL23; RPL23A; RPL24; RPL26; RPL26L1; RPL27; RPL27A; RPL28; RPL29; RPL3; RPL30; RPL31; RPL32; RPL34; RPL35; RPL35A; RPL36; RPL36A,RPL36A-HNRNPH2; RPL36AL; RPL37; RPL37A; RPL38; RPL39P5,RPL39; RPL3L; RPL4; RPL5; RPL6; RPL7; RPL7A; RPL7L1; RPL8; RPL9; RPLP0; RPLP1; RPLP2; RPN1; RPN2; RPS10,RPS10-

NUDT3; RPS11; RPS12; RPS13; RPS14; RPS15; RPS15A; RPS16,ZNF90; RPS17; RPS18; RPS19; RPS2; RPS20; RPS21; RPS23; RPS24; RPS25; RPS26,RPS26P11; RPS27; RPS27A; RPS27L; RPS28; RPS29; RPS3; RPS3A; RPS4X; RPS5; RPS6; RPS7; RPS8; RPS9; RPSA; RRB1; RRP1; RRP12; RRP15; RRP1B; RRP8; RRP9; RRS1; RSB1; RSB1L; RSL1D1; RSL24D1; RSR2; RTCB; RUVBL1; RUVBL2; S100A11; SACM1L; SAFB; SAFB2; SAMHD1; SAP18; SART1; SART3; SBSN; SCAF1; SCFD1; SDAD1; SEC23B; SEC23IP; SEC24C; SEC61A1; SERBP1; SEPTIN7; SEPTIN9; SERPINH1; SET,SETSIP; SF3A2; SF3A3; SF3B1; SF3B3; SFN; SFPQ; SFXN1; SFXN3; SHMT2; SKIV2L2; SLC25A10; SLC25A13; SLC25A22,SLC25A18; SLC25A3; SLC25A5; SLC25A6,SLC25A4; SLC2A1; SLC35F6; SLC3A2; SLC7A5; SLIRP; SLTM; SMARCA4; SMARCA5; SMARCC1; SMARCD2; SMC1A; SMC2; SMC3; SMC4; SMCHD1; SMN1,SMN2; SMU1; SND1; SNIP1; SNRNP200; SNRNP40,DKFZp434D199; SNRNP70; SNRPA1; SNRPD1; SNRPD2; SNRPD3; SNRPE; SNRPF; SNRPG,SNRPGP15; SNRPN,SNRPB; SNW1; SNX2; SNX6; SOD1; SON; SP110; SPATA5; SPATS2; SPATS2L; SPCS2; SPTBN1; SQSTM1; SREK1; SREK1IP1; SRM; SRP14; SRP19; SRP68; SRP72; SRPK1; SRPK2; SRPR; SRPRB; SRRM1; SRRM2; SRRT; SRSF1; SRSF10; SRSF11; SRSF2; SRSF3; SRSF4; SRSF5; SRSF6; SRSF7; SRSF9; SSB; SSBP1; SSR4; SSRP1; ST13,ST13P4; STAT1; STAT3; STAU1; STAU2; STIP1; STMN1; STRAP; STT3B; SUB1; SUCLA2; SUCLG1; SUPT16H; SURF6; SYNCRIP; TAF15; TAF9,AK6; TAGLN2; TALDO1; TARDBP; TARS; TBL3; TCEB1; TCERG1; TCF25; TCOF1; TCP1; TECR; TEX10; TGM2; THRAP3; TIGAR; TIMM44; TIMM50; TJP2; TK1; TKT; TLN1; TMA16; TMED10; TMEM263; TMEM33; TNPO1; TOE1; TOP1; TOP2A; TOP2B; TPI1; TPM3,DKFZp686J1372; TRA2A; TRA2B; TRAP1; TRIM25; TRIM28; TRIP12; TRIP13; TRMT112; TRMT5; TSR1; TSTA3; TTLL12; TTN; TUBA1B; TUBA1C; TUBA3C,TUBA3E; TUBB; TUBB2A; TUBB2B; TUBB3; TUBB4B; TUBB6; TUBB8; TUBG2,TUBG1; TUFM; TXN; TYMS; U2AF1; U2AF2; U2SURP; UAP1; UBA1; UBA5; UBA52; UBA6; UBE2O; UBR4; UBTf; UGDH; UHRF1; UMPS; UNC13D; UNC45A; UPF1; UPP1; UQCRC1; UQCRC2; UQCRC2; USO1; USP10; USP14; USP16; USP36; USP39; USP42; USP7; UTP11L; UTP14A; UTP15; UTP18; UTP20; UTP23; UTP3; UTP6; VARS; VCP; VDAC1; VDAC2; VDAC3; VIM; VPRBP; VPS35; WBSCR22; WDR1; WDR12; WDR3; WDR36; WDR43; WDR46; WDR5; WDR55; WDR74; WDR75; WDR82; WHSC1; XAGE1A; XP32; XPC; XPO1; XPO5; XRCC5; XRCC6; XRN2; YARS; YARS2; YBX1; YBX3; YES1; YTHDC1; YTHDF1,YTHDF3; YTHDF2; YWHAB; YWHAG; YWHAH; YWHAQ; YWHAZ; ZAK,pk; ZBTB11; ZC3H11A; ZC3H13; ZC3H18; ZC3HAV1; ZCCHC17; ZCCHC3; ZCCHC7; ZFP91-CNTF,ZFP91; ZFR; ZFX,ZFY; ZNF22; ZNF280C; ZNF316; ZNF326; ZNF346; ZNF384; ZNF512; ZNF593; ZNF622; ZNF638; ZNF771; ZNF800; ZRANB2; ohne Gen-Bezeichnung: P0DOY3; P01709.

Tabelle 35 (Anhang): Auflistung der 344 Proteine (anhand der zugehörigen Genbezeichnung aufgeführt), die sowohl im HeLa⁻¹⁰⁵ als auch im hU2OS R-loop-Interaktom vorliegen

AATF	DDX24	FXR1	KMT2A
ABCF1	DDX27	G3BP2	KNOP1
ACIN1	DDX31	GAR1	KPNB1
ADAR	DDX39A	GLTSCR2	KRI1
AHCTF1	DDX39B	GNAI3	KRR1
ALDOA	DDX3X;DDX3Y	GNB2L1	LARP1
ALYREF	DDX46	GNL2	LARS
AP2M1	DDX47	GNL3	LBR
ARGLU1	DDX5	GPATCH4	LLPH
ASNS	DDX50	GRWD1	LUC7L3
BAZ1B	DDX52	GTPBP4	LYAR
BAZ2A	DDX54	H1F0	MAK16
BMS1	DDX56	H1FX	MAP4
BRD7	DDX6	H2AFY	MATR3
BRIX1	DEK	HEATR1	MCM3
BUB3	DHX15	HIST1H4A	MCM5
C14orf166	DHX30	HNRNPA0	MEPCE
C7orf50	DHX36	HNRNPA1;HNR NPA1L2	MKI67
CBX3	DHX9	HNRNPA2B1	MOV10
CBX5	DKC1	HNRNPA3	MPHOSPH10
CCDC137	DNTTIP2	HNRNPAB	MRT04
CCDC59	EBNA1BP2	HNRNPC	MYBBP1A
CCDC86	EEF1A1;EEF1A 1P5	HNRNPD	MYH9
CCT2	EEF1G	HNRNPF	MYO1C
CCT3	EEF2	HNRNPH1	NAT10
CCT4	EFTUD2	HNRNPH2	NCL
CCT6A	EIF2AK2	HNRNPH3	NGDN
CCT8	EIF2S1	HNRNPK	NHP2
CDC5L	EIF2S3;EIF2S3L	HNRNPL	NHP2L1
CEBPZ	EIF3D	HNRNPM	NKRF
CFL1	EIF3F	HNRNPR	NLE1
CHTOP	EIF3I	HNRNPU	NO66
CIRH1A	EIF4A3	HNRNPUL1	NOC3L
CLIC4	EIF5B	HP1BP3	NOC4L
CLTC	EIF6	HSP90AB1	NOL10
COIL	ELAVL1	HSP90AB2P	NOL11
CRNKL1	EMG1	HSPA8	NOL12
CTCF	ENO1	ILF2	NOL6
DCAF13	ERH	ILF3	NOL7
DDB1	FAM98A	IMP3	NOLC1
DDX1	FBL	IMP4	NONO
DDX17	FCF1	ISG20L2	NOP10
DDX18	FKBP4	KIAA0020	NOP16
DDX21	FTSJ3	KIF23	NOP2
DDX23			NOP56

NOP58	RBM15	SON	VARS
NPM1	RBM25	SP110	VDAC2
NPM3	RBM28	SRP14	VIM
NSA2	RBM34	SRP72	WDR12
NUMA1	RBM39	SRPK1	WDR3
NXF1	RBMX	SRPK2	WDR36
PA2G4	RBMX2	SRRM1	WDR43
PABPC1	RCL1	SRRM2	WDR46
PABPC4	REXO4	SRSF1	WDR55
PAFAH1B3	RNPS1	SRSF10	WDR74
PAK1IP1	RPF1	SRSF11	WDR75
PAPD5	RPF2	SRSF4	WHSC1
PARP1	RRP1	SRSF5	XRN2
PARP2	RRP12	SRSF6	YBX1
PCBP1	RRP15	SRSF7	YBX3
PCNA	RRP1B	SRSF9	YTHDC1
PDCD11	RRP8	SSRP1	YWHAG
PES1	RRP9	STAU1	ZC3H11A
PFN1	RRS1	STAU2	ZC3HAV1
PGAM5	RSBN1	STRAP	ZCCHC17
PGK1	RSL1D1	SUPT16H	ZFR
PHGDH	RSL24D1	SURF6	ZNF280C
PHIP	RUVBL2	SYNCRIP	ZNF326
PINX1	SAFB	TAF15	ZNF512
PLEC	SAFB2	TARDBP	ZNF593
POP1	SART1	TBL3	ZNF800
PPIA	SART3	TCOF1	
PPIG	SCAF1	TCP1	
PPP1CB	SERBP1	THRAP3	
PPP2R1A	SFPQ	TOP1	
PRDX1	SKIV2L2	TOP2A	
PRDX6	SLC25A5	TRA2A	
PRKDC	SLTM	TRA2B	
PRPF19	SMARCA5	TSR1	
PRPF3	SND1	U2AF1	
PRPF4	SNIP1	U2AF2	
PRPF40A	SNRNP200	U2SURP	
PRPF4B	SNRNP40;DKFZ	UHRF1	
PRPF8	p434D199	UPF1	
PSMC3	SNRNP70	USP10	
PTBP1	SNRPA1	USP36	
PWP1	SNRPD1	UTP11L	
PWP2	SNRPD2	UTP14A	
RALY	SNRPD3	UTP15	
RARS	SNRPE	UTP18	
RBBP6	SNRPF	UTP23	
RBM14	SNW1	UTP6	

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PAS-Färbung humaner Nierenbiopsie mit Quer- und Longitudinalanschnitten verschiedener Nierentubuli.	15
Abbildung 2: Modell zur Skizzierung der an <i>DNA-Damage Response</i> (DDR) und Fibrogenese beteiligten Vorgänge.	16
Abbildung 3: DNA-Läsionen und korrespondierende DNA-Reparatur- und Instandhaltungssysteme.	21
Abbildung 4: Nukleotidexzisionsreparatur - GG-NER und TC-NER Signalweg.	22
Abbildung 5: Skizzierung der Entstehung von DNA/RNA-Hybridstrukturen und Doppelstrangbrüchen im Zusammenhang mit der Transkription.	24
Abbildung 6: Western Blot mit Zelllysaten aus U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zellen.	49
Abbildung 7: Expression und Lokalisation von RNaseH1-GFP in U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zellen.	50
Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung von U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zellen mit und ohne R-loop Induktion durch SiAQR.	51
Abbildung 9: Relative Genexpression von humanem Aquarius (hAQR) in der quantitativen PCR aus U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zellen.	52
Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung von U2OS AATF.GFP TALEN Zellen (a) und U2OS GFP.GFP TALEN Zellen (b).	53
Abbildung 11: Relative Genexpression von humanem Aquarius (hAQR) in der quantitativen PCR aus U2OS TREX RNase H1 (D210N) GFP Zellen.	53
Abbildung 12: Überschneidung des R-loop-Interaktoms in HeLa Zellen nach Cristini et al. ¹⁰⁵ (blau) mit dem R-loop-Interaktom humaner U2OS Zellen (grün). Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Abbildung 13: Relative Genexpression von humanem AATF (hAATF) in der quantitativen PCR aus humanen U2OS Zellen.	55
Abbildung 14: Hauptkomponentenanalyse der massenspektrometrisch gemessenen Proben S9.6_SiCtrl (blau), S9.6_SiAATF (rot) und der Kontrolle mIgG (weiß).	56
Abbildung 15: Vulkan-Plot der identifizierten signifikant veränderten Proteine.	56
Abbildung 16: Überschneidung des R-loop-Interaktoms humaner U2OS Zellen S9.6_SiCtrl dieser Arbeit (grün) mit dem Zilien-Interaktom CiliaCarta 2019 ¹²⁹ (pink).	59
Abbildung 17: Überschneidung des R-loop-Interaktoms humaner U2OS Zellen (grün) mit dem Zilien-Interaktom CiliaCarta 2019 ¹²⁹ (pink) und dem R-loop-Interaktom in HeLa Zellen nach Cristini et al. ¹⁰⁵ (blau).	61
Abbildung 18: Körpergewicht, Serum-Harnstoff und -Kreatininwerte aus <i>Ercc1</i> fl/fl KspCre tg/wt Versuchstieren und Kontrollen im Alter von 12 und 16 Wochen.	62
Abbildung 19: PAS-Färbung histologischer Schnitte aus <i>Ercc1</i> fl/fl KspCre tg/wt Mäusenieren und Kontrollen.	63

Abbildung 20: Relative Genexpression Seneszenz-assoziiertes Marker in der Niere 8 (a), 12 (b) und 16 (c) Wochen alter Mäuse. 64

Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung für p16 (a) und p21 (b) von *Ercc1 fl/fl KspCre tg/wt* Mäusenieren und Kontrollen. 65

Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung von Mäusenieren aus tubulär *Ercc1*-defizienten Versuchstieren und Kontrollen mit *Cleaved Caspase 3* 66

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 2: Ausstattung/Laborgeräte	31
Tabelle 3: Softwares und Programme	31
Tabelle 4: Chemikalien/Reagenzien und Lösungen	33
Tabelle 5: Kits/Assays	34
Tabelle 6: Primäre Antikörper	35
Tabelle 7: Sekundäre Antikörper	35
Tabelle 8: Antikörperverdünnung	35
Tabelle 9: Zusammensetzung PBS-Puffer	36
Tabelle 10: Zelllinien	36
Tabelle 11: Zellkulturmedien	36
Tabelle 12: Einfriermedien	37
Tabelle 13: siRNA Sequenzen	38
Tabelle 14: Zusammensetzung IF-Puffer	39
Tabelle 15: Zusammensetzung RNaseA-Puffer	39
Tabelle 16: Zusammensetzung RIPA-Puffer	40
Tabelle 17: Zusammensetzung Lämmli-Puffer	41
Tabelle 18: Zusammensetzung Westerngele	42
Tabelle 19: Westernpuffer und Lösungen	42
Tabelle 20: Zusammensetzung IP Puffer für MS	43
Tabelle 21: Zusammensetzung Ureapuffer	43
Tabelle 22: Zusammensetzung MS-Puffer	44
Tabelle 23: Zusammensetzung Puffer Immunhistochemie	46
Tabelle 24: cDNA-Syntheseschritte	47
Tabelle 25: Ablauf RT-qPCR	48
Tabelle 26: Übersicht Oligonukleotide/qPCR Primer	48
Tabelle 27: In SiAATF im Vergleich zu SiCtrl angereichertes Protein.	57

Tabelle 28: In SiAATF im Vergleich zu SiCtrl verminderte Proteine.	57
Tabelle 29: Im SiAATF-R-loop-Interaktom signifikant veränderte Proteine mit $-\log_{10}$ P-Wert > 1,3 im t-Test.	57
Tabelle 30: Ausschließlich im SiAATF-Interaktom vorliegendes Protein.	58
Tabelle 31: Ausschließlich im SiCtrl-R-loop-Interaktom vorliegende Proteine.	58
Tabelle 32: Proteine der Schnittmenge aus CiliaCarta 2019 ¹²⁹ und hU2OS R-loop-Interaktom.	59
Tabelle 33: Proteine der Schnittmenge aus CiliaCarta ¹²⁹ und hU2OS/HeLa ¹⁰⁵ R-loop-Interaktom.	61
Tabelle 34 (Anhang): DNA/RNA Hybrid Interaktom in hU2OS Zellen (S9.6_SiCtrl).	85
Tabelle 35 (Anhang): Auflistung der Proteine (anhand der zugehörigen Genbezeichnung aufgeführt), die sowohl im HeLa- ¹⁰⁵ als auch im hU2OS R-loop-Interaktom vorliegen	88