

5 Diskussion

5.1 Bewertung der verschiedenen Methoden zur Erkennung genetischer Veränderungen

Vier verschiedene Methoden zur Suche genetischer Veränderungen im *DNA-Ligase IV-Gen* wurden in dieser Arbeit angewandt: DHPLC, Sequenzierung, RFLP-Analyse und SSCP-Analyse.

5.1.1 DHPLC (WAVE™)

Die *DHPLC* wird zur Suche sowohl bekannter als auch unbekannter Mutationen und Polymorphismen angewandt. Wie in 4.1 beschrieben ist eine vorherige Etablierung der Laufbedingungen erforderlich. Je nach Schmelzprofil des DNA-Fragments ist im Allgemeinen eine Analyse bei mehreren Temperaturen erforderlich (siehe Tabelle 2). Ist auch mit homozygoten Veränderungen zu rechnen, so sind zusätzlich Läufe nach vorherigem Mischen mit Wildtyp-DNA erforderlich. Die Sensitivität der DHPLC wird von verschiedenen Autoren mit 91-100% angegeben, die Spezifität mit über 99%.⁷⁷⁻⁸² Damit ist diese Methode der SSCP-Analyse überlegen.

Wolford et al. berichten, dass mittels DHPLC bereits ein Allelanteil von unter 5% erkennbar ist, bei der Sequenzierung hingegen gelingt dies erst bei über 10%.⁸³ Dies deckt sich mit Berichten von Jones, Sampson et al., dass durch DHPLC bei Personen mit somatischem Mosaik Veränderungen festgestellt werden konnten, die aufgrund ihres geringen Allelanteils bei der Sequenzierung nicht sichtbar waren. Dies könnte für die Tumordiagnostik bedeutsam sein, da auch in Tumorgewebe häufig mutierte Allele zu einem geringen Anteil vorkommen und es außerdem zur Kontamination mit gesunden Zellen kommen kann.⁸⁴

Da jedoch bei der DHPLC die Basenfolge nicht direkt ermittelt wird, sondern lediglich eine veränderte Bindung der DNA an die Chromatographiesäule bei Vorliegen einer Heterozygotie, ist es möglich, dass bestimmte DNA-Veränderungen nicht oder nicht sicher erkannt werden können. Während der Polymorphismus in Abschnitt 6 der *DNA-Ligase IV-Gens* zuverlässig und deutlich erkennbar war, waren die Ergebnisse in Abschnitt 1a unbefriedigend. In mehreren Läufen war es möglich, Proben mit den

Polymorphismen A3V und T9I sowohl von WT-Proben als auch voneinander zu unterscheiden, jedoch waren diese Ergebnisse nicht zuverlässig reproduzierbar. Selbst bei Verwendung desselben PCR-Produktes mit bekanntem Polymorphismus waren die Ergebnisse unter identischen Bedingungen teilweise unterschiedlich und eine Unterscheidung zwischen WT und Polymorphismus nicht immer sicher möglich. Um das Übersehen von DNA-Veränderungen möglichst auszuschließen, war es erforderlich, alle Proben im Abschnitt 1a sowie sehr viele nur gering auffällige Proben auch in anderen Abschnitten zusätzlich zu sequenzieren, was den Arbeitsaufwand stark erhöhte und damit einen wesentlichen Vorteil der DHPLC gegenüber anderen Methoden verringerte. Da sich die Bedingungen nicht weiter optimieren ließen, wurde schließlich die Sequenzierung der DHPLC vorgezogen.

Wenn sich Bedingungen etablieren lassen, unter denen bestimmte DNA-Veränderungen wiederholt sicher erkennbar sind, so ist die DHPLC eine gute Methode, um schnell und mit geringem Arbeitsaufwand eine große Zahl an DNA-Proben auf diese Veränderungen hin zu untersuchen. Offensichtlich gibt es jedoch auch Veränderungen, die durch die DHPLC grundsätzlich nicht oder nicht sicher erkennbar sind. Auch wenn in einem DNA-Abschnitt *verschiedene* Mutationen oder Polymorphismen in großer Zahl vorkommen und diese zwar vom Wildtyp, nicht aber untereinander unterscheidbar sind, ist diese Methode wenig geeignet, da dann zahlreiche Proben zusätzlich sequenziert werden müssen. In diesem Fall wäre es schneller und einfacher, von vorneherein alle Proben zu sequenzieren. Einige Schwierigkeiten bei den hier untersuchten Proben ergaben sich möglicherweise aus der Tatsache, dass die beiden hier vorkommenden Polymorphismen sehr dicht beieinander liegen, was eine sichere Unterscheidung erschweren kann.

Schließlich muss berücksichtigt werden, dass für die Analyse bei vier verschiedenen Temperaturen mit und ohne vorheriges Mischen mit WT-DNA und ggf. die anschließende Sequenzierung zahlreicher Proben viel DNA erforderlich ist, die teilweise jedoch nur in geringer Menge zur Verfügung steht.

5.1.2 Sequenzierung

Die *Sequenzierung* ist die exakteste Methode zur Suche nach Mutationen oder Polymorphismen, da hier die Basenfolge direkt bestimmt wird. Daher sind hier im Gegensatz zur DHPLC keine Nachuntersuchungen auffälliger Proben erforderlich.

Durch die Verfügbarkeit immer leistungsfähigerer Sequenzierautomaten und eine zunehmende Automatisierung ist die Sequenzierung zudem einfacher und schneller geworden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Sequenzierung bezüglich Sensitivität, Materialverbrauch und, je nach Bedingungen, auch Arbeitsaufwand den anderen genannten Verfahren überlegen ist.

5.1.3 RFLP-Analyse

Die *RFLP-Analyse* kann nur zur Suche bestimmter vorher bekannter Schnittstellen für Restriktionsenzyme angewandt werden. Sie ist daher zur Untersuchung auf unbekannte DNA-Veränderungen nicht geeignet. Sind genetische Veränderungen bekannt, die zur Neuentstehung oder zum Verlust solcher Schnittstellen führen, so ist die RFLP-Analyse ein einfaches, sicheres und schnelles Verfahren, das die Untersuchung zahlreicher Proben in kurzer Zeit erlaubt. Da die häufigste in dieser Arbeit gefundene DNA-Veränderung, der Polymorphismus T9I, jedoch eine solche Schnittstelle weder schafft noch zerstört, war diese Methode für die vorliegende Arbeit nicht geeignet.

5.1.4 SSCP-Analyse

Die *SSCP-Analyse* erlaubt die Suche auch nach unbekanntem Mutationen und Polymorphismen. Da die Änderung der Sekundärstruktur durch verschiedene DNA-Veränderungen unterschiedlich ist, kann nicht vorhergesagt werden, ob eine bestimmte Veränderung durch diese Methode erkennbar ist und welche Bedingungen ggf. erforderlich sind. Für eine bekannte Veränderung können die optimalen Bedingungen mit Hilfe einer Positivkontrolle etabliert werden. Bei der Suche nach unbekanntem Mutationen und Polymorphismen ist es jedoch erforderlich, die Analyse unter verschiedenen Bedingungen durchzuführen, was Zeit- und Arbeitsaufwand sowie die Kosten dieser Methode erhöht. Auch dann sind jedoch nicht alle Veränderungen mit diesem Verfahren erkennbar. Die Angaben über die Sensitivität der SSCP-Analyse sind sehr unterschiedlich und hängen nicht nur von der jeweiligen DNA-Veränderung, sondern auch von der Länge des untersuchten DNA-Fragments ab. Nach Auswertung verschiedener Untersuchungen kommen Hayashi und Yandell zu dem Ergebnis, dass bei einer Fragmentlänge unter 200 Basenpaaren mit einer Sensitivität von über 90% zu rechnen ist und diese bei Fragmentlängen von 300-350 Basenpaaren noch bei über

80% liegt.⁸⁵ Proben, die für beide Polymorphismen heterozygot waren, waren auch hier eindeutig von WT-Proben unterscheidbar. Da der Polymorphismus T9I jedoch auch bei Verwendung verschiedener Gelkonzentrationen, Lauftemperaturen und Laufzeiten nicht sicher nachgewiesen werden konnte, war diese Methode für diese Arbeit ebenfalls nicht verwendbar.

5.2 DNA-Ligase IV und Leukämogenese

5.2.1 Polymorphismus in Abschnitt 6

Der in Abschnitt 6 gefundene Polymorphismus führt, wie bereits erwähnt, nicht zu einem Aminosäureaustausch. Die AS Asparaginsäure in Position 568 bleibt erhalten, wobei dieser Polymorphismus in der Literatur gemäß der Annahme des 67 AS kürzeren Proteins teilweise nach wie vor als D501D angegeben wird.⁸⁶

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben kam dieser Polymorphismus bei ALL- und Kontrollproben nahezu gleichhäufig vor. Dennoch ist auch dieser Basenaustausch eventuell mit einer Veränderung des Krebsrisikos verbunden: So ist bei Frauen, die diesen Polymorphismus aufweisen, deutlich seltener Brustkrebs in der Familie aufgetreten als bei Frauen mit WT-Sequenz. Liegt jedoch eine positive Familienanamnese vor, so ist das Brustkrebsrisiko bei Trägerinnen dieses Basenaustausches signifikant höher als bei Vorhandensein der WT-Sequenz (Odds Ratio 2,35 vs. 1,37).⁸⁷ Nach der Diagnose von Brustkrebs haben Patientinnen, die für diesen Polymorphismus homozygot sind, ein vierfach höheres Todesrisiko als Patientinnen mit WT-Sequenz. In heterozygoter Form verändert dieser Austausch das Risiko hingegen kaum.⁸⁶

Funktionelle Untersuchungen zu diesem Polymorphismus liegen nicht vor. Da er nicht zu einem AS-Austausch führt, ist ein direkter Einfluss auf die Funktion unwahrscheinlich. Möglich ist dagegen, dass dieser Polymorphismus mit anderen Risikofaktoren gekoppelt auftritt. Die Ungleichverteilung der Polymorphismen in den Abschnitten 1a und 6 bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben ist jedoch statistisch nicht signifikant. Eine Kopplung des Polymorphismus in Abschnitt 6 an eines der beiden Allele in Abschnitt 1a als potentiellem Risikofaktor lässt sich somit zumindest in dieser Arbeit nicht nachweisen.

5.2.2 Verteilung und Herkunft der Polymorphismen in Abschnitt 1a. Einfluss auf das Leukämierisiko

In der vorliegenden Arbeit wurden die DNA-Proben von 107 Kindern mit Ersterkrankung einer ALL sowie von 104 Kontrollpersonen auf Mutationen und Polymorphismen im Gen für DNA-Ligase IV untersucht. Ziel war es vor allem zu klären, ob solche Veränderungen einen Risikofaktor für die Entstehung der ALL im Kindesalter darstellen. Die beiden einzigen bei den ALL-Proben gefundenen und zu einem Aminosäureaustausch führenden Veränderungen, die Polymorphismen A3V und T9I, kamen jedoch bei Kindern mit ALL nicht häufiger vor als in der Kontrollgruppe. Daraus muss geschlossen werden, dass diese Veränderungen das Risiko einer ALL-Entstehung im Kindesalter entgegen der ursprünglichen Hypothese nicht erhöhen. Andere Veränderungen im *DNA-Ligase IV-Gen* sind ggf. selten.

Für 12 der 22 ALL-Proben mit nachgewiesenem Polymorphismus im Abschnitt 1a (54,5%) standen Kontrollproben mit einem Blastenanteil unter 2% zur Verfügung. In diesen Proben fand sich stets der gleiche Polymorphismus wie im blastenreichen Material. Dies und das häufige Vorkommen in der Kontrollgruppe legen den Schluss nahe, dass es sich bei diesen Polymorphismen um Keimbahnveränderungen handelt.

Das signifikant seltenere Auftreten dieser Polymorphismen bei Kindern mit ALL ($p < 0,025$) wirft die Frage auf, ob diese eine protektive Wirkung haben können. Dies mag angesichts der wichtigen Rolle der DNA-Reparatur für die Erhaltung der genomischen Stabilität und des großen Anteils von NHEJ an der Doppelstrangbruchreparatur überraschen.

5.2.3 Möglicher Einfluss der Polymorphismen A3V und T9I auf die Funktion

Der erste bekannte Defekt im NHEJ beim Menschen wurde 1999 bei einem 14jährigen ALL-Patienten mit erhöhter Strahlensensibilität gefunden und durch die Mutation R278H (homozygot) im *Ligase IV-Gen* ausgelöst. Diese Mutation liegt im katalytischen Zentrum des Enzyms und führt zu einer deutlich verringerten Aktivität in Reparaturassays. Die Expression des Proteins wird durch diese Mutation jedoch nicht wesentlich beeinträchtigt.⁶³

Die Basenaustausche A3V und T9I wurden erstmals 2001 bei einem neunjährigen Patienten mit Ligase IV-Syndrom beschrieben. Diese traten hier zusammen mit R278H

auf. Auch hier waren alle Austausch homozygot.⁶⁷ Der Patient zeigte bei Geburt eine Mikrozephalie, die im Alter von neun Jahren jedoch nicht mehr vorhanden war. Ferner bestanden neben einer globalen Entwicklungsverzögerung eine Panzytopenie, extensive Plantarwarzen und ein als „vogelartig“ beschriebenes Gesicht.⁶⁷

Die Bindung der Ligase IV an XRCC4 wurde in vitro weder durch die beiden Polymorphismen noch durch die Mutation R278H alleine oder in Kombination beeinträchtigt.^{63, 67} Auch die Expression wird offensichtlich nicht beeinträchtigt: Western-Blot- und Immunfluoreszenzuntersuchungen an der Zelllinie des genannten Patienten zeigten eine normale, überwiegend nukleäre Konzentration der Ligase.⁶⁷ Bezüglich der Auswirkung der verschiedenen Basenaustausche auf die Funktion sind die Ergebnisse von In-vitro-Versuchen mit rekombinantem Protein zum Teil uneinheitlich: Die Mutation R278H führte zu einer erheblichen Verringerung der Adenylierung der Ligase auf etwa 5% im Vergleich mit WT-Protein. Die beiden Polymorphismen alleine reduzierten diese Reaktion auf ca. die Hälfte. Traten alle drei Veränderungen gemeinsam auf, war keine Adenylierung mehr nachweisbar.⁷³ Die enzymatische Aktivität wurde durch die Mutation R278H alleine auf etwa 5-10% verringert und war bei Vorhandensein aller drei Veränderungen zunächst nicht mehr nachweisbar.^{67, 73} Tests mit größerer Sensitivität zeigten schließlich eine Restaktivität der Ligase IV von ca. 1%.⁷³ O'Discroll et al. berichteten, dass die beiden Polymorphismen alleine die Funktion der Ligase IV nicht beeinträchtigen.⁶⁷ In einer neueren Untersuchung von Girard et al. zeigte sich jedoch eine Verringerung der Aktivität um den Faktor 2-3.⁷³

Außer bei dem genannten Ligase IV-Patienten wurden die Polymorphismen A3V und T9I einzeln und kombiniert auch bei Gesunden und Patienten mit verschiedenen anderen Erkrankungen gefunden:⁷² In einer in Großbritannien durchgeführten Untersuchung entsprach die Wildtypfrequenz in der Kontrollgruppe (n = 220) weitgehend der in dieser Arbeit gefundenen Häufigkeit (67,3% vs. 65,4%). Signifikant seltener hingegen war das Auftreten der Polymorphismen bei Patienten mit Multiplem Myelom (25,2% bei Patienten vs. 32,7% in der Kontrollgruppe), was auch hier die Frage nach einer protektiven Wirkung aufwirft. Bei Patienten mit ALL (n = 70) oder Lymphomen (n = 364) hingegen war die Häufigkeit der Polymorphismen in dieser Untersuchung nicht signifikant verändert.⁷² Das Alter der ALL-Patienten ist in dieser Publikation nicht angegeben. Es muss angenommen werden, dass es sich um Erwachsene handelt. Nähere Angaben hierzu fehlen leider. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass das Multiple Myelom aus Zellen hervorgeht, die die V(D)J-

Rekombination sowie Antikörperklassenwechsel bereits vollzogen haben. Sollten diese Funktionen durch die beiden Polymorphismen eingeschränkt werden, so stünden dadurch weniger Zellen zu Verfügung, aus denen sich ein Multiples Myelom entwickeln kann.⁷³ Bei Kindern kommt das Multiple Myelom nicht vor.

In einer weiteren Studie wurde kürzlich festgestellt, dass das gleichzeitige Vorliegen der Polymorphismen A3V und T9I mit einem signifikant verringerten Risiko für das Auftreten von Basalzellkarzinomen der Haut assoziiert ist.⁸⁸

Sowohl die Funktion des N-terminalen Abschnittes der DNA-Ligase IV als auch die genaue Auswirkung der beiden Polymorphismen auf diese Funktion sind bisher nicht sicher bekannt. Sicher ist, dass dieser Bereich eine wesentliche Rolle bei der DSB-Reparatur hat, da das um diesen Abschnitt verkürzte Protein inaktiv ist,⁶⁶ und dass die genannten Basenaustausche Einfluss auf diese Funktion haben.

Auch wenn dieser Abschnitt an der katalytischen Reaktion nicht selbst beteiligt sein sollte, könnte die Funktion des Proteins in vivo durch Veränderungen in diesem Bereich beeinträchtigt werden. Der Austausch der Aminosäuren Alanin und Threonin durch Valin bzw. Isoleucin erhöht durch jeweils zwei zusätzliche (CH)₂-Gruppen und den Wegfall der Hydroxylgruppe des Threonin voraussichtlich die hydrophoben Eigenschaften dieser Region. Berechnungen zufolge wird hierdurch die Tertiärstruktur des Proteins beeinflusst, was Auswirkungen auf die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen des NHEJ oder anderer zellulärer Prozesse haben könnte.^{67, 72}

Wodurch dies die Folgen der Mutation R278H verstärken könnte und weshalb den Polymorphismen A3V und T9I alleine eventuell eine protektive Wirkung bezüglich des Multiplen Myeloms sowie der ALL im Kindesalter zukommt, bleibt jedoch unklar.

5.2.4 Bedeutung des NHEJ für die genomische Stabilität

Die große Bedeutung effizienter DNA-Reparatur und der Anteil des NHEJ daran wurden bereits in Kapitel 1 dargestellt. Die genaue Rolle dieses Reparaturweges bei der Erhaltung der genomischen Stabilität unter verschiedenen Bedingungen wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert:

Entstehung von Leserasterverschiebungen durch NHEJ

Wie bereits dargelegt, erfolgt die Verbindung der Bruchenden beim NHEJ vorrangig im Bereich kurzer Mikrohomologien, was, wie auch Schädigungen im Bereich des Bruches, eine vorherige Prozessierung der DNA-Enden erforderlich macht. Da die dabei entfernten Nukleotide nicht ersetzt werden können, kommt es hierbei zum DNA-Verlust, was unter anderem zu Leserasterverschiebungen führen kann. So verringert die gezielte Ausschaltung der Gene für Ku70 oder *Ligase IV* in haploiden Hefen die Häufigkeit replikationsunabhängiger Leserasterverschiebungen um 50%. Vor allem wenn hierbei Tumorsuppressor- oder Onkogene betroffen sind, könnte diese zur Krebsentstehung beitragen.⁸⁹ So weisen z. B. 5-15% der p53-Mutationen einige Zeichen auf, die auf NHEJ hinweisen.¹⁷ Angesichts der großen Bedeutung von p53 für die Zellzykluskontrolle und den Erhalt der genomischen Stabilität könnte unpräzises NHEJ so zur malignen Transformation beitragen.

Da der Mensch auch über die Möglichkeit der fehlerfreien homologen Rekombination verfügt, stellt sich die Frage, warum ein fehlerhafter und potentiell gefährlicher Reparaturweg wie das NHEJ überhaupt erforderlich ist. Eine mögliche Erklärung bietet der hohe Anteil repetitiver DNA-Sequenzen im menschlichen Genom (bis zu 40%). Bei der HR bestünde hier außerhalb der späten S-, der G2- und der M-Phase die Gefahr, dass es zum Strangaustausch nicht nur mit dem Schwesterchromatid, sondern auch mit homologen Abschnitten nichthomologer Chromosomen kommt. Dies könnte zu Translokationen führen und damit seinerseits zur Krebsentstehung beitragen.¹⁷

Entstehung von Rearrangements durch verschiedene Varianten des NHEJ

Offensichtlich gibt es neben dem beschriebenen Mechanismus noch mindestens eine weitere Variante des NHEJ. Diese arbeitet langsamer und ist von der *Ligase IV*, KU 80 und der DNA-PK_{cs} unabhängig. Sie stellt möglicherweise einen evolutionär älteren Reparaturweg dar. Zur Unterscheidung wird dieser Weg als B-NHEJ („backup“) bezeichnet, die schnellere Variante dagegen als D-NHEJ („dependent“ bezüglich der DNA-PK).^{57, 90, 91}

Da häufig mehrere Doppelstrangbrüche (DSBs) gleichzeitig in einer Zelle vorliegen und kurze Mikrohomologien zwischen zahlreichen DNA-Abschnitten im gesamten Genom bestehen können, kann NHEJ auch zur Ligation von Bruchenden verschiedener DSBs führen. NHEJ kann dadurch selbst zur Entstehung von Translokationen beitragen. Es stellt sich somit die Frage, ob NHEJ die genetische Stabilität eher gefährdet als sichert.

Offensichtlich hängt das Auftreten von Rekombinationen wie Translokationen und Inversionen durch NHEJ erheblich von den Bedingungen ab, unter denen die DNA-Reparatur erfolgt:

Nach akuter γ -Bestrahlung mit 80Gy (23Gy/min) zeigten humane Fibroblasten ohne Beeinträchtigung des NHEJ nach 24 Stunden eine fast vollständige DSB-Reparatur. Jedoch kam es bei etwa 50% der Reparaturereignisse zu Rearrangements. Humane Fibroblasten mit der Mutation R278H im *Ligase IV*-Gen (180BR) hingegen zeigten zwar eine inkomplette DSB-Reparatur, die Häufigkeit von Rearrangements war jedoch wesentlich geringer. Hamsterzelllinien mit Defekten in den Genen für DNA-PK_{cs} oder KU80 verhalten sich hier ähnlich wie 180BR-Zellen.⁹⁰

Bei γ -Bestrahlung mit deutlich geringerer Dosisrate hingegen (80Gy über 14 Tage) wiesen WT-Zellen bei insgesamt vollständiger DSB-Reparatur keine Rearrangements auf. Bei 180BR-Zellen dagegen lag ihr Anteil bei 10%, wobei die DSB-Reparatur insgesamt ebenfalls vollständig war.⁹⁰

Korrekte und fehlerhafte Reparatur folgen einer unterschiedlichen Kinetik: Bei WT-Zellen ist die korrekte Verbindung der Bruchenden nach akuter Bestrahlung nach ein bis zwei Stunden abgeschlossen, während der Reparaturprozess insgesamt nach ca. 16 Stunden beendet ist. Die fehlerhafte Reparatur erfolgt also deutlich langsamer. Bei den 180BR-Zellen sind sowohl die korrekte als auch die fehlerhafte Ligation nach etwa 24 Stunden abgeschlossen. Sie erfolgt hier offensichtlich durch das genannte B-NHEJ.⁹⁰

Der Mechanismus des B-NHEJ ist noch weitgehend unbekannt. Durch die langsamere Kinetik liegen jedoch zeitgleich mehr freie DNA-Enden vor, was die Gefahr einer illegitimen Verbindung erhöht.⁹¹ Außerdem besitzt der Komplex aus *Ligase IV* und XRCC4 die Fähigkeit, DNA-Enden unabhängig von der Ligation vor einem Abbau durch die T7 Exonuklease zu schützen.⁹² Wie weit dies auch in vivo eine Rolle spielt, ist bisher noch unklar. Das Fehlen dieses Schutzfaktors könnte aber zu der höheren Fehlerrate des B-NHEJ beitragen. Nach akuter hochdosierter Bestrahlung kommt es zu einer größeren Zahl gleichzeitig bestehender Doppelstrangbrüche in räumlicher Nähe zueinander. Dies könnte die hohe Rate fehlerhafter Kombinationen durch NHEJ erklären, da so zeitgleich mehr Bruchenden und auch prozessierte Einzelstrangenden als potentielle Kombinationspartner zur Verfügung stehen.

Unbekannt ist auch, ob es sich bei der langsamen Variante des NHEJ überhaupt um einen einheitlichen Reparaturweg handelt. Die ähnliche Kinetik spricht dafür, dass die

langsame und fehlerhafte Ligation bei WT-Zellen nach Bestrahlung mit hoher Dosisrate und die Reparatur bei 180BR-Zellen einen identischen Mechanismus haben. Unklar ist jedoch, warum der Anteil an fehlerhaften Reparaturereignissen in beiden Fällen so unterschiedlich ist. Auch ist unverständlich, weshalb WT-Zellen, die über intakte *Ligase IV* und DNA-PK verfügen, auf einen langsameren und fehlerhafteren Weg zurückgreifen sollten. Würden korrekte und fehlerhafte Reparatur zeitgleich erfolgen, so wäre es denkbar, dass nach Erreichen der Kapazitätsgrenze des klassischen NHEJ ein Ersatzweg beschritten werden müsste, wobei möglicherweise *Ligase IV* oder DNA-PK als limitierender Faktor wirken könnten. Der langsamere und weniger korrekte Mechanismus setzt aber offensichtlich erst ein, wenn der D-Weg bereits abgeschlossen ist, beide Faktoren also nicht mehr aktiv sind.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das NHEJ mit seiner schnellen Komponente (D-NHEJ) bei γ -Bestrahlung mit niedriger Dosisrate einen effektiven Schutz vor Rearrangements darstellt, bei akuter hochdosierter γ -Bestrahlung jedoch über eine langsamere, noch wenig bekannte Variante selbst in erheblichem Umfang zur Bildung von Rearrangements führen kann. Ob dieser Mechanismus mit dem B-NHEJ identisch ist, ist noch unklar.

Eine akute γ -Bestrahlung mit 80Gy entspricht sicherlich nicht physiologischen Bedingungen. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Entstehung von Rekombinationen durch α -Strahlung zumindest in weiten Bereichen dosisunabhängig ist.^{93, 94} Da ein erheblicher Anteil der natürlichen Strahlenbelastung des Menschen durch den α -Zerfall von Radon und seiner Tochternuklide zustande kommt,⁹⁰ könnte es so auch unter natürlichen Bedingungen zu einem gehäuften Auftreten NHEJ-vermittelter Rearrangements kommen. Bei akuter hochdosierter γ -Bestrahlung und evtl. auch bei natürlicher α -Strahlung könnte daher ein Ausfall der *Ligase IV* oder eine Verringerung ihrer Aktivität die Zelle und damit den Organismus vor übermäßiger Schädigung des Genoms schützen. Da nach neueren Untersuchungen mit rekombinantem Protein die beiden Polymorphismen A3V und T9I zumindest zusammen die Aktivität der *Ligase IV* verringern,⁷³ scheint eine protektive Wirkung dieser Veränderungen denkbar.

5.2.5 NHEJ und Leukämie

Wie in Kapitel 1 dargestellt, lassen sich in ca. 80% der ALL im Kindesalter chromosomale Veränderungen in den Leukämiezellen nachweisen. Etwa die Hälfte dieser Veränderungen sind Translokationen,⁸ die zu Fusionsgenen und so zu Fusionsproteinen führen. Ihr genauer Entstehungsmechanismus ist bisher nicht geklärt.

Es mehren sich jedoch die Hinweise darauf, dass NHEJ daran beteiligt sein könnte:

Etwa 75% aller akuten Leukämien im Säuglingsalter weisen Translokationen mit Beteiligung des MLL-Gens auf, die offensichtlich bereits in utero entstehen.^{95, 96} In einer humanen lymphoblastoiden Zelllinie lassen sich sowohl durch γ -Bestrahlung mit 8 Gy als auch durch apoptoseauslösende anti-CD95-Antikörper derartige Translokationen auslösen. Die hierbei neu verbundenen DNA-Enden weisen überwiegend kurze homologe Sequenzen auf.⁹⁷ Derartige Mikrohomologien sind typisch für NHEJ. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass nach Bestrahlung bzw. Behandlung mit anti-CD95-Antikörpern DNA-PK_{cs} an das MLL-Gen gebunden ist, während dies bei unbehandelten Zellen nicht der Fall war. Schließlich führte die gezielte Inhibition der DNA-PK_{cs} durch Wortmannin zu einem verstärkten Auftreten einer apoptosespezifischen Fragmentation des MLL-Gens sowie zum Ausbleiben der zuvor beobachteten Translokationen.⁹⁷ Dies legt nahe, dass NHEJ an der Entstehung dieser Translokationen, zumindest nach potentiell apoptotisch wirkenden Einflüssen, maßgeblich beteiligt ist.

Möglicherweise führen also apoptoseauslösende Faktoren unter Beteiligung von NHEJ zu proleukämischen Translokationen in Zellen, von denen dann einige dem Untergang durch Apoptose entgehen⁹⁷ und so zum Ausgangspunkt einer Leukämie werden können.

Eine Beteiligung der *Ligase IV* an der Entstehung von MLL-Translokationen ist bisher nicht bewiesen. Wie in 5.2.5 dargelegt, gibt es auch eine *Ligase IV*-unabhängige Variante des NHEJ. Die Versuche von Rothkamm et al. zeigten jedoch auch, dass WT-Zellen ebenfalls über eine langsame und fehlerhafte Variante des NHEJ verfügen, die bei akuter hochdosierter γ -Bestrahlung zu einer großen Zahl von Rearrangements führt.⁹⁰ Hieran ist *Ligase IV* offensichtlich beteiligt, da die Mutation R278H, welche die Aktivität des Enzyms erheblich verringert, das Auftreten derartiger Rearrangements deutlich reduziert. Dies spricht dafür, dass *Ligase IV* auch an den MLL-Translokationen durch Bestrahlung oder anti-CD95-Antikörper beteiligt sein könnte. Es wäre also denkbar, dass eine Verringerung der enzymatischen Aktivität der *Ligase IV* auch die

Entstehung von Translokationen im MLL-Gen durch die genannten Faktoren verringern könnte.

Auch bei den Translokationen t(15;17) und t(12;21), die zu den Hybridgenen PML-RAR α bzw. TEL-AML1 führen, wurden zwischen den Bruchenden der beteiligten Gene häufig Mikrohomologien gefunden,^{98, 99} die auf die Beteiligung von NHEJ an der Entstehung dieser Rearrangements hinweisen.^{99, 100} Das PML-RAR α -Genrearrangement kommt vor allem bei der akuten Promyelozytenleukämie, einer Form der AML, sowie teilweise bei der CML mit Blastenkrise vor.⁸ Das TEL-AML1-Genrearrangement tritt vor allem bei der ALL im Kindesalter auf, wo es die häufigste chromosomale Translokation überhaupt darstellt.⁷

Leukämiezellen weisen sowohl bei AML als auch bei CML eine im Vergleich zu normalen hämatopoetischen Zellen erhöhte Rate an spontanen DSB und eine verstärkte NHEJ-Aktivität auf. Letztere ist mit einer größeren Rate an fehlerhaften Reparaturereignissen verbunden. Auch hier wurden Mikrohomologien im Bereich der Bruchpunkte nachgewiesen, wie sie für NHEJ typisch sind. Während die Reparaturaktivität von allen drei Komponenten der DNA-PK (Ku70, Ku80, DNA-PK_{cs}) abhängig ist, wird die fehlerhafte Reparatur offensichtlich von KU70 und KU80 vermittelt.^{101, 102} Möglicherweise kommt es durch endogen entstandene DSB in Zellen der myeloischen Leukämien zu einem verstärkten NHEJ, das dann seinerseits zur Entstehung von Translokationen führt.^{100, 102}

Eine Beteiligung der *Ligase IV* an diesen Ereignissen wurde bisher nicht nachgewiesen. Die Tatsache, dass es sich um WT-Zellen handelt und dass die DNA-PK_{cs} an diesem Reparaturweg beteiligt ist, spricht jedoch dafür, dass hier der D-Weg des NHEJ aktiv ist, an dem auch die *Ligase IV* beteiligt ist (siehe Kapitel 5.2.5). Es wäre daher möglich, dass durch eine Aktivitätsminderung der *Ligase IV* auch die Entstehung anderer Translokationen wie t(15;17) und t(12;21) verringert oder verhindert werden könnte. Wie in Kapitel 5.1.3 dargestellt, zeigen neuere Ergebnisse, dass die Polymorphismen *A3V* und *T9I* kombiniert in rekombinantem Protein die Aktivität der *Ligase IV* um den Faktor 2-3 verringern.⁷³ Ein Einfluss dieser Polymorphismen auf die Entstehung von Translokationen und die Leukämogenese wäre somit möglich. Ob diese Basenaustausche jedoch auch einzeln und in heterozygoter Form Einfluss auf die Enzymfunktion haben, ist bisher unklar.

Außer bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen gibt es offensichtlich einen weiteren Bereich, wo NHEJ zu fehlerhaften Verbindungen von DNA-Enden führen kann: Die

Telomerregion wird normalerweise durch verschiedene Faktoren wie Ku und TRF2 vor der Fusion mit anderen Telomeren geschützt. Eine Inhibierung von TRF2 dagegen führt in Fibroblasten zur Telomerfusion, die durch NHEJ vermittelt wird. Ein Bruch dieser dizentrischen Chromosome wiederum führt zu nichtreziproken Translokationen.^{103, 104}

Bei *Saccharomyces cerevisiae* kommt es durch den Verlust von Rap1, das dort dem Schutz der Telomere dient, zur Telomerfusion. Hier konnte gezeigt werden, dass die Fusion ausbleibt, wenn zentrale Faktoren des NHEJ wie Ligase IV, Ku oder MRE11 fehlen.¹⁰⁵

5.2.6 Entstehung unterschiedlicher Phänotypen durch Ausfall verschiedener Komponenten des NHEJ

Anhand von Menschen mit angeborenen Veränderungen im NHEJ, vor allem aber anhand von Tiermodellen, lassen sich verschiedene Phänotypen unterscheiden, die durch den Ausfall unterschiedlicher Faktoren des NHEJ hervorgerufen werden: Der Ausfall wesentlicher Komponenten des NHEJ wie Ku70, Ku80, DNA-PK_{cs}, XRCC4, *Ligase IV* oder Artemis führt im Tiermodell bzw. bei humanen Zelllinien immer zu einer erhöhten Strahlensensibilität der betroffenen Zellen.^{50, 106-111} In anderer Hinsicht sind die Folgen jedoch teilweise sehr unterschiedlich:

So ist die gezielte Ausschaltung des *Ligase IV-Gens* bei Mäusen spätembryonal letal und führt zu ausgedehnten Apoptosen im ZNS sowie zu gestörter V(D)J-Rekombination und einer Blockierung der Lymphopoese. Die Fibroblasten dieser Mäuse weisen eine erhöhte Strahlensensibilität auf.^{108, 112} Auch der Ausfall von XRCC4 bei Mäusen führt zum Tod der Embryonen sowie zu ausgeprägten neuronalen Apoptosen und einer Störung der Lymphogenese.¹⁰⁷

Überraschenderweise kann die Wirkung des *Ligase IV-Ausfalls* jedoch durch die Ausschaltung anderer Komponenten des NHEJ abgeschwächt werden: So sind Mäuse mit dem gleichzeitigen Ausfall von *Ligase IV* und *p53* zunächst lebensfähig, entwickeln jedoch durchweg *pro-B-Zell-Lymphome*¹¹³ sowie *Medulloblastome*.¹¹⁴ Die Lymphome treten eher auf als bei Ausfall von *p53* alleine, und in den Tumorzellen finden sich Amplifikationen von IgH und *c-myc*.¹¹³ Dies weist darauf hin, dass die beschriebenen Apoptosen und die Letalität des *Ligase IV-Ausfalls* eine *p53*-vermittelte Reaktion auf unreparierte DNA-Schäden darstellen.¹¹³ Angesichts der wichtigen Rolle von *p53* bei der Regulation von Zellzyklus und Apoptose ist es nahe liegend, dass ein Ausfall dieses

Proteins zu einer Akkumulation von DNA-Schäden führen kann, was durch den Ausfall von *Ligase IV* oder anderen Faktoren des NHEJ noch verstärkt wird.

Bei Fehlen der Tumorsuppressorproteine p16 und p19 fördert und beschleunigt der zusätzliche *Ligase IV-Ausfall* bei Mäusen die Entstehung von *Weichteilsarkomen*.¹¹⁵