

Aus dem Institut für Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neue Erkenntnisse zum Pathomechanismus des  
Nijmegen Breakage Syndroms durch die Proteomanalyse eines  
konditional nullmutanten Mausmodells

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Maria Elisabeth Melchers

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. Digweed

2. Prof. Dr. M. Schülke

3. Prof. Dr. med. M. Stuhmann-Spangenberg

Datum der Promotion: 7. November 2008

Für Nina und Konrad

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1. DNA-Schäden und die Antwort der Zelle darauf	9
1.1.1. NHEJ	9
1.1.2. Homologe Rekombination	10
1.1.3. Physiologische DNA-DSB	10
1.2. Zellzykluskontrolle	10
1.3. Nijmegen Breakage Syndrome	11
1.3.1. Genetische Grundlage	14
1.3.2. Hypomorphe Mutation als Ursache des NBS	16
1.4. Nibrin und DNA-DSB-Reparatur	17
1.5. Nibrin und Zellzykluskontrolle	18
1.6. Mausmodelle zu NBS	20
1.6.1. Maushomolog zu NBN	20
1.6.2. Nbn-Nullmutanten	20
1.6.3. Nbn-hypomorphe Mausmutanten	21
1.7. Konditionaler Knock-out von Genen	23
1.7.1. Mausmodell für NBS mit konditionalem Knockout	24
1.8. Proteomics	25
1.8.1. Das Proteom	25
1.8.2. Die Untersuchung des Proteoms mit 2D-PAGE	26
1.8.3. Erkenntnisgewinn aus einer Proteomicsstudie	26
1.9. Ziel dieser Arbeit	27
2. Material	29
2.1. DNA-Analysen	29
2.2. Proteinanalysen	30
3. Methoden	32
3.1. Mäuse	32
3.1.1. Bestrahlung	33
3.1.2. Sektion	33
3.2. DNA-Analysen	33
3.2.1. DNA-Extraktion aus Mausgewebe	33
3.2.2. Semiquantitative PCR	34
3.2.3. Auftrennung der PCR-Produkte	35
3.2.4. Auswertung der Gele	36
3.2.5. Genauigkeit der semiquantitativen PCR	37
3.2.6. Korrekturfaktor	38
3.3. 2. Proteinanalysen	42
3.3.1. 2D-Großgelelektrophorese	42
3.3.1.1. Probenaufarbeitung für 2D-Großgelelektrophorese	43
3.3.1.2. Erste Dimension	44
3.3.1.3. Zweite Dimension	46

---

3.3.2. Färbungen	46
3.3.2.1. Analytische Silberfärbung	47
3.3.2.2. Präparative Silberfärbung	47
3.3.2.3. Kolloidale Commassie-G250-Färbung	47
3.3.3. Trocknung	48
3.3.4. Spoterkennung	48
3.3.5. Spotidentifikation mit Massenspektrometrie	48
3.3.5.1. In-Gel-Trypsinverdau	49
3.3.5.2. MALDI-TOF	49
3.3.5.3. ESI	50
3.3.5.4. Datenbankanalysen	50
4. Ergebnisse	51
4.1. DNA-Analysen	51
4.1.1. Effizienz der Exon6-Deletion in unterschiedlichen Organen	51
4.1.2. Überleben homozygot Nbn-nullmutanter Zellen in verschiedenen Organen	52
4.1.3. Kinetik	54
4.1.3.1. Leber	54
4.1.3.2. Thymus	56
4.1.3.3. Milz	57
4.1.4. Backgroundrekombination	58
4.2. Proteomuntersuchung	60
4.2.1. Untersuchung des Proteoms der Leber unbestrahlter Mäuse	60
4.2.2. Vergleich des Leberproteoms aus Mäusen nach Bestrahlung	61
4.2.3. Sequenzierung der Spots	64
4.2.4. Einteilung der veränderten Proteine in funktionelle Gruppen	64
4.2.5. Reaktion der Nbn-heterozygoten Mäuse	66
4.2.6. Reaktion der Nbn-nullmutanten Mäuse	67
4.3. Zusammenfassung	68
5. Diskussion	76
5.1. Die Effizienz plpC-induzierter Exon6-Deletion variiert in verschiedenen Geweben	76
5.2. Überleben Nbn-nullmutanter Zellen variiert in verschiedenen Geweben	77
5.2.1. Überleben nullmutanter Zellen in nichtproliferativen Organen	78
5.2.2. Überleben nullmutanter Zellen in proliferativen Organe	78
5.2.3. Knochenmark	79
5.2.4. Thymus	81
5.2.5. Milz	84
5.2.6. Gehirn	86
5.2.7. Testes	87
5.3. Untersuchung des Proteoms Nbn-nullmutanter Zellen	88
5.3.1. Grenzen einer Proteomicsstudie	88
5.3.2. Untersuchung von unbestrahltem Lebergewebe	89
5.3.3. Untersuchung von Lebergewebe nach Bestrahlung	90
5.3.4. Stoffwechselproteine	91

---

5.3.5. Stressproteine	92
5.3.6. Oxidativer Stress	92
5.3.7. Ataxia teleangiectasia und oxidativer Stress	94
5.3.8. Nibrin und oxidativer Stress	96
5.3.8.1. Die Hypomorphe NBN-Mutation und oxidativer Stress	96
5.3.8.2. Der Einfluss des oxidativen Stresses auf die klinische Variabilität des Nijmegen Breakage Syndrome	97
5.3.9. DNA-Reparaturproteine	97
5.4. Ausblick	98
6. Literaturverzeichnis	101
Danksagung	107
Erklärung	109

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Geschwisterpaar mit Nijmegen Breakage Syndrome	13
Abbildung 1.2	Schema des NBN-Gens	15
Abbildung 1.3	Nbn-Allele für konditionalen Knockout	24
Abbildung 3.1	In dieser Arbeit verwendete Mäuse	32
Abbildung 3.2	Bindungsstellen der Primer für semiquantitative PCR	34
Abbildung 3.3	Beispiel für semiquantitative PCR	36
Abbildung 3.4	PCR mit Standard-DNAs bekannter Mischungsverhältnisse	37
Abbildung 3.5	Korrekturfaktor für semiquantitative PCR	39
Abbildung 3.6	Versuchsaufbau der 2D-Großgelelektrophorese	42
Abbildung 4.1	Nbn-Exon6-Deletion in verschiedenen Organen	52
Abbildung 4.2	Aufbau des Kinetikversuches	54
Abbildung 4.3	Kinetik der Exon6-Deletion in Lebergewebe	55
Abbildung 4.4	Kinetik der Exon6-Deletion in Thymusgewebe	56
Abbildung 4.5	Kinetik der Exon6-Deletion in Milzgewebe	58
Abbildung 4.6	Backgroundrekombination	59
Abbildung 4.7	2D-Großgel mit veränderten Spots in unbestrahlter Leber	61
Abbildung 4.8	Schema zur Auswertung der 2D-Gele nach Bestrahlung	62
Abbildung 4.9	Beispiel für verschiedene Spotveränderungen	64
Abbildung 4.10	Spotveränderungen in verschiedenen funktionellen Gruppen	66
Abbildung 4.11	2D-Großgel mit veränderten Spots nach Bestrahlung	69

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	PCR-Produkte	34
Tabelle 3.2	Genauigkeit der semiquantitativen PCR	37
Tabelle 3.3	Beispiel für semiquantitative PCR mit Korrekturfaktor	38
Tabelle 4.1	Veränderte Spots und identifizierte Proteine	70
Tabelle 5.1	Vergleich der Nbn-Nullmutation mit AT- und NBS-Patienten	95

## Zusammenfassung

Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur sind Schlüsselfunktionen, um die Integrität von Zellen und Organismen dauerhaft zu erhalten. Das Nijmegen Breakage Syndrome, verursacht durch eine Mutation im Nibrin, ist ein Beispiel für die weit reichenden Folgen, die eine Beeinträchtigung dieser Funktionen mit sich bringt.

Während eine Nullmutation für Nibrin in Mäusen embryonal letal ist, sind menschliche NBS Patienten lebensfähig, da sie alle Träger einer hypomorphen Mutation sind, bei der sie ein 70kDa-Nibrinfragment exprimieren. Es wurde gezeigt, dass dieses Fragment Teilfunktionen Nibrins kompensiert und das Zellüberleben sichert. Um welche Funktionen es sich dabei im Einzelnen handelt, ist jedoch bisher noch nicht vollständig geklärt.

Um die embryonale Letalität eines vollständigen Funktionsverlustes Nibrins zu umgehen, wurde in dieser Arbeit ein Mausmodell mit konditionalem Knockout für Nibrin in adulten Mäusen mit Hilfe des loxP/Cre-Rekombinasesystems verwendet.

Das Überleben nibrindefizienter Zellen in vivo wurde mit Hilfe einer semiquantitativen PCR in verschiedenen Organen bestimmt. In nichtproliferativen Organen war das Überleben der Zellen durch einen Nibrinverlust nicht beeinträchtigt. Nullmutante Zellen proliferativer Organe überlebten hingegen nicht oder wurden durch nibrinkompetente Zellen ersetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass Nibrin eine entscheidende Funktion bei der Zellteilung hat, nicht jedoch in ruhenden Zellen. Dies korreliert mit den klinischen Symptomen von NBS-Patienten, bei denen Leitsymptome wie Immundefizienz, Lymphome und Infertilität ebenfalls in proliferativen Organen auftreten.

Um weitere, bisher unbekannte Funktionen Nibrins zu entdecken, führten wir außerdem eine Proteomanalyse mittels 2D-PAGE in Lebergewebe durch, wobei das Proteinmuster von Nbn-nullmutanten und heterozygoten Mäusen verglichen wurde. Zunächst untersuchten wir unbestrahlte Mäuse, wo keine signifikanten Unterschiede der Proteinmuster gefunden werden konnten. Danach setzten wir die Mäuse durch

ionisierende Strahlen unter Stress, woraufhin deutliche Veränderungen des Proteoms in nullmutanten Mäusen gefunden werden konnten. Insgesamt wurden 266 unterschiedlich exprimierte Proteine gefunden, was den ausgeprägten zellulären Stress in nullmutanten Mäusen deutlich macht.

Besonders interessant war die hohe Anzahl an Proteinen, die mit oxidativem Stress in Zusammenhang stehen, was erstmals eine Funktion Nibrins bei der Entfernung freier Sauerstoffradikale nahe legt. Nibrin wurde bisher nicht mit der Regulation des oxidativen Stresses assoziiert. Interessanterweise konnte bei ATM, das bei Ataxia teleangiectasia (AT) mutierte Protein, bereits vor längerer Zeit eine Rolle bei der ROS-Regulation gezeigt werden. Jedoch sind auch hier die genauen pathophysiologischen Mechanismen noch nicht ausreichend geklärt.

Nibrin und ATM agieren in denselben *Pathways* der Zellzykluskontrolle und aktivieren sich dabei auch gegenseitig. Folglich haben AT- und NBS-Patienten sehr ähnliche Merkmale, zeigen aber auch Unterschiede. Möglicherweise kommen die klinischen Variationen zwischen den beiden Syndromen durch die erhaltene ROS-Regulation durch das p70 Fragment bei NBS-Patienten zustande. Der individuelle ROS-Level wird durch viele verschiedene endogene und exogene Faktoren bestimmt. So basiert die klinische Variabilität zwischen NBS-Patienten unter Umständen auch auf unterschiedlich hohen ROS-Levels und ROS-regulierende Gene sind somit Kandidaten für NBS-modifizierende Gene.

Die Daten dieser Studie weisen daraufhin, dass die Funktion Nibrins bei der Regulation des oxidativen Stresses ein wichtiger Faktor in der Pathogenese des NBS ist. Außerdem scheinen Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur und Regulation des oxidativen Stresses deutlich enger verknüpft zu sein, als bisher angenommen und dieses Phänomen sollte weiter untersucht werden.

## Abstract

Cell cycle control and DNA repair are pivotal cell functions for longterm integrity of cells and organisms. Nijmegen Breakage Syndrome, caused by a mutation in nibrin, is an example of the extensive consequences that a disturbance of these key functions causes.

While a null mutation for nibrin in mice is embryonically lethal, NBS patients are viable. This is due to a hypomorphic mutation where patients express a truncated 70kDa protein. It has been shown that this p70 fragment partially restores nibrin's functions, although the functions that sustain cell survival are not fully understood yet.

To circumvent embryonic lethality after complete nibrin loss, we used a conditional knockout mouse model where a null mutation for nibrin was induced in adult mice using the loxP/cre-recombinase system.

Survival of null mutant cells in vivo was then investigated in different tissues by semi-quantitative PCR. Cell survival in nonproliferative tissues was not affected by the absence of nibrin. Proliferating cells however, did not survive without nibrin and were replaced by nibrin-competent cells. These findings show an essential function of nibrin for cell proliferation that is not required in resting cells. This is in accordance with the clinical symptoms of NBS patients where most problems such as immunodeficiency, lymphomas and infertility arise in proliferative tissues.

To further elucidate the functions of nibrin we used a proteomic approach with 2D-PAGE of liver proteins comparing protein patterns from null mutant and heterozygous mice. Firstly we looked at unirradiated mice, where there was essentially no difference in the protein expression pattern. This again indicates that nibrin has no crucial function in untreated resting cells. Secondly we put the mice under stress using ionizing radiation. Protein expression patterns were altered significantly compared to controls. About 180 proteins were differently expressed altogether indicating the severe stress in these null mutant mice.

Particularly interesting was the increased number of proteins related to oxidative stress indicating, for the first time, a role for nibrin in ROS removal. Nibrin has not previously been described to be involved in the cellular response to oxidative stress. Interestingly ATM, the protein mutated in Ataxia teleangiectasia (AT), has been associated to oxidative stress before, although the precise functions still remain unknown.

Nibrin and ATM operate in the same pathways of cell cycle control and activate each other. Consequently AT and NBS patients share many features but also show differences. Possibly differences between the two syndromes may be attributed to the remaining function of the p70 fragment in ROS removal. The individual ROS-Level is determined by many different endogenous and exogenous factors. Thus the interindividual differences in symptoms of NBS patients may be attributed to differing oxidative stress levels. ROS-regulating genes may therefore be candidate genes for modifying the clinical course in NBS patients.

The data from this study certainly suggest that Nibrin's function in ROS-regulation plays an important role in the pathogenesis of NBS and it seems that cell cycle control, DNA repair and ROS-regulation are much more closely connected than assumed so far. Further evidence for this should be obtained.

## 1. Einleitung

### 1.1. DNA-Schäden und die Antwort der Zelle darauf

Zellen sind permanent exogenen und endogenen Noxen ausgesetzt, die sie schädigen und unter anderem zu Veränderungen an der DNA führen. Dadurch entstehen täglich bis zu einer Million DNA-Schäden pro Zelle, die deren Funktion in unterschiedlich starkem Ausmaß beeinträchtigen [1]. Besonders gravierend für die Zelle sind DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB), die vor allem durch ionisierende Strahlung und mutagene Substanzen wie Radiomimetika entstehen. Sie aktivieren in gesunden Zellen eine Kaskade von zellulären Vorgängen, die als DNA-Schadensantwort (DNA damage response) bezeichnet wird. Sie beinhaltet das Erkennen des DNA-DSB durch Sensoren, das Weiterleiten des Schadenssignals durch Transduktoren und schließlich die Umsetzung durch Effektoren [2]. Bei letzteren unterscheidet man *Gatekeeper* und *Caretaker*. *Gatekeeper* sorgen für eine Arretierung des Zellzyklus [3]. Diese kann vorübergehend sein, um Zeit für DNA-Reparatur zu gewinnen, oder endgültig, falls der Schaden irreparabel ist, und die Zelle in Seneszenz oder Apoptose geleitet wird. *Caretaker* führen die Reparatur der DSB aus. Diese erfolgt hauptsächlich über zwei Mechanismen: die nichthomologe Endverknüpfung (NHEJ = *non-homologous end joining*) und die homologe Rekombination (HR = *homologous recombination*) [4, 5].

#### 1.1.1. NHEJ

NHEJ findet in der Zelle vor allem dann statt, wenn noch keine Replikation der entsprechenden DNA-Sequenz stattgefunden hat. Es beruht auf der direkten Verknüpfung der beiden durch den Bruch freigewordenen DNA-Enden ohne Verwendung einer Matrize. Hierbei kommt es zwangsläufig zu Mutationen, da an der Bruchstelle Sequenzverluste entstehen, die durch diesen Mechanismus nicht korrigiert werden. Dies hat aber nur selten schwerwiegende Folgen, da über 97% der DNA nichtkodierende Sequenzen sind.

Hauptmediator des NHEJ ist ein Komplex aus DNA-PKcs und dem Ku-Komplex. Der Ku-Komplex erkennt freie DSB-Enden und lagert sich an diese an. Dies rekrutiert DNA-PKcs und Artemis, eine Endo- und Exonuklease, die die Enden zusammenhält. Der

Ligase IV/XRCC4-Komplex verknüpft die beiden Enden dann endgültig [5, 6].

### 1.1.2. Homologe Rekombination

Für die homologe Rekombination benötigt die Zelle eine identische oder fast identische Kopie der beschädigten DNA, meist die Schwesterchromatide, weshalb sie vor allem gegen Ende und nach der DNA-Synthese angewendet wird. An den Bruchenden werden zunächst 3'-Überhänge produziert. Diese Einzelstränge wandern mit Hilfe von Rad51 in die intakte homologe Doppelhelix. Dort wird die geschädigte Sequenz mit Hilfe der homologen Sequenz als Matrize repliziert und die ursprünglichen Enden werden anschließend wieder verknüpft [5].

### 1.1.3. Physiologische DNA-DSB

DNA-DSB treten auch physiologisch im Körper auf. Bei der Differenzierung von B- und T-Zellen werden für die Umlagerung der Immunglobulin- und T-Zellrezeptorgene DSB induziert, ebenso beim Immunglobulinklassenwechsel von aktivierten B-Zellen. Beides geschieht durch NHEJ [7]. Beim Crossing over in der Meiose, die der HR sehr ähnlich ist, muss die DNA zum Strangaustausch ebenfalls gebrochen und wieder zusammengefügt werden [1]. Den Doppelstrangbruchenden sehr ähnlich sind außerdem die Telomere, die Chromosomenenden. Ihre Aufrechterhaltung ist entscheidend für den Alterungsprozess der Zelle [8].

## 1.2. Zellzykluskontrolle

Um eine regelrechte Zellteilung und kontrolliertes Wachstum zu sichern, durchlaufen Zellen einen Zellzyklus, der in mehreren, klar abgegrenzten Phasen abläuft. Dabei werden das Genom repliziert, die Zellkomponenten verdoppelt und beides präzise auf zwei Tochterzellen verteilt. Die Kontrolle des Zellzyklus ist auch wichtiger Teil der DNA-DSB-Antwort. Die Zelle muss in der Lage sein den Zellzyklus anzuhalten, bis DNA-Schäden repariert sind, um so deren Vererbung zu verhindern. Irreparabel geschädigte Zellen dürfen sich nicht weiter teilen und müssen in Seneszenz oder Apoptose gehen.

Der Zellzyklus unterteilt sich in die Mitose und die Interphase. Die Interphase gliedert sich wiederum in die G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>-Phase. In der postmitotischen G<sub>1</sub>-Phase wächst die Zelle und ergänzt ihre durch die Teilung reduzierten Zellbestandteile. In dieser Phase ist

die Zelle stoffwechselaktiv. Nichtproliferierende Zellen verbleiben in einer speziellen G<sub>1</sub>-Phase, der G<sub>0</sub>-Phase. In der S-Phase wird die DNA für die nächste Zellteilung repliziert. In der G<sub>2</sub>-Phase bereitet sich die Zelle auf die Mitose vor. In der Mitose findet schließlich die Teilung der Zelle statt, woraufhin ein neuer Zyklus beginnt [1].

Ein fehlerfreier Ablauf dieser Vorgänge ist von hoher Bedeutung, da Fehler zu unkontrolliertem Wachstum und Veränderungen im Erbgut führen können und dies Zellschäden und Tumorentstehung begünstigt. Daher gibt es in jeder dieser Phasen *Checkpoints*, die die Integrität der DNA kontrollieren und überprüfen, ob sie bereit ist, in die nächste Phase überzugehen. Ist dies nicht der Fall, arretiert die Zelle in ihrem Zyklus, um so Zeit für die Reparatur zu gewinnen. Neben vielen anderen Kriterien wird besonders die Integrität der DNA kontrolliert. Hierfür sind vor allem drei *Checkpoints* von Bedeutung.

1. Der *G1/S-Checkpoint* verhindert, dass die Zelle in die Synthesephase übergeht, wenn DNA-Schäden vorliegen. Über zwei *Pathways* kann es hier zu einem Arrest kommen. Der erste, ATM/Chk2/CDC25A-vermittelt, hält den Zellzyklus schnell, allerdings nur transient an. Der zweite, ATM/p53/p21-vermittelt, kann den Zellzyklus langfristig arretieren.
2. Der *Intra-S-Phase-Checkpoint* stoppt die DNA-Synthese, wenn DNA-Schäden vorliegen. Drei parallele Wege modulieren diesen *Checkpoint*, können jedoch nur zu einem transienten Arrest führen und die Zelle nicht endgültig in ihrem Zyklus anhalten.
3. Der *G2/M-Checkpoint* verhindert einen Eintritt in die Mitose mit DNA-Schäden. Der Zellzyklusarrest kann wiederum über zwei *Pathways* vermittelt werden: einen schnellen, transienten Weg und einen langsamen, jedoch lang anhaltenden Weg [1].

### **1.3. Nijmegen Breakage Syndrome**

Defekte in diesem umfangreichen Netzwerk aus Kontroll- und Reparaturmechanismen können schwerwiegende Folgen für Zellen und Organismen haben. Ein Beispiel dafür ist das Nijmegen Breakage Syndrome (NBS), eine sehr seltene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Betroffene weisen Defekte im oben beschriebenen System auf,

was sich in einer Vielzahl unterschiedlicher Symptome äußert [9].

Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrome fallen phänotypisch vor allem durch ihre außergewöhnliche Gesichtsmorphologie auf (siehe Abb.1.1). Sie ist gekennzeichnet durch ein fliehendes Kinn, eine flache Stirn und ein prominent wirkendes Mittelgesicht. Verstärkt wird dieser Eindruck noch durch eine ausgeprägte Mikrozephalie und Minderwuchs, der sich allerdings häufig erst nach der Geburt im frühen Kindesalter manifestiert und vor allem auf einem eingeschränkten Rumpfwachstum beruht. Häufig wird es von Hauterscheinungen wie "Café au lait"-Flecken und Vitiligo begleitet, seltener treten kutane Teleangiektasien und Pigmentflecken der Retina auf [10]. In etwa der Hälfte der Fälle wurden außerdem Skelettfehlbildungen, wie Klino- (22/34) und Syndaktylien (12/36) berichtet, andere Fehlbildungen, wie Hydronephrose (4/55), Analatresie (3/55) und Hüftdysplasie (3/55) sind eher selten. Eine moderate geistige Behinderung der Kinder wird in einem Teil der Fälle berichtet und verstärkt sich mit zunehmendem Alter [10].

Auf zellulärer Ebene sind Patientenzellen durch erhöhte Chromosomenbrüchigkeit gekennzeichnet und vor der Möglichkeit des direkten Mutationsnachweises wurde dieses Kriterium zur Diagnosesicherung bei Patienten herangeführt. Davon leitet sich auch der Name dieses Chromosomenbruchsyndroms - Nijmegen Breakage Syndrome - ab. DNA-Doppelstrangbrüche treten spontan, besonders aber nach ionisierender Strahlung mit einer deutlich erhöhten Frequenz auf und können nur unzureichend repariert werden. So finden sich in Patientenzelllinien häufig Chromosomenaberrationen, wie Translokationen, Deletionen und Fusionschromosomen [11-13]. Auch sind die NBS-Zellen in ihrer Zellzykluskontrolle gestört. Trotz DNA-Schäden replizieren sie ihre DNA, was als radioresistente DNA-Synthese (RDS) bezeichnet wird, und teilen sich.

Die primäre Todesursache von NBS-Patienten sind Tumorerkrankungen. Das Risiko, schon im Kindes- und Jugendalter an Krebs zu erkranken, ist drastisch erhöht [14, 15]. Dies ist sicherlich auf die erhöhte chromosomale Instabilität und den Zellzyklusdefekt zurückzuführen. 40% der Patienten entwickeln bereits bis zum 20. Lebensjahr eine maligne Tumorerkrankung. Im Vordergrund steht dabei vor allem das diffuse großzellige B-Zelllymphom, eine sehr seltene Krebserkrankung im Kindesalter, aber auch andere

Lymphome und Leukämien treten gehäuft auf [10, 16].



Abbildung 1.1 Geschwisterpaar mit Nijmegen Breakage Syndrome

Foto von zwei Geschwistern mit Nijmegen Breakage Syndrome. Vor allem das ältere Kind zeigt deutliche phänotypische Merkmale des NBS wie die Mikrozephalie, prominentes Mittelgesicht, Mikrognathie und fliehende Stirn. Bei dem jüngeren Kind sind diese Merkmale bisher kaum ausgeprägt.

Ein weiteres Charakteristikum des Nijmegen Breakage Syndrome ist die Immundefizienz der Patienten. Sie äußert sich besonders häufig durch virale Atem- und Harnwegsinfektionen, die z. T. letal verlaufen und so die zweithäufigste Todesursache für NBS-Patienten darstellen. Dabei sind die Patienten sowohl in der zellulären als auch humoralen Immunität beeinträchtigt. Der Klassenwechsel von Immunglobulinen ist defekt [17, 18]. Folglich sind die IgA und IgG-Serumspiegel bei der Mehrzahl der Patienten erniedrigt, während die IgM-Spiegel im Normbereich liegen [10, 19-21]. Die V(D)J-Rekombination, bei der es ebenfalls zu DNA-DSB kommt, scheint bei den Patienten hingegen nicht betroffen zu sein [22, 23]. Der Anteil der CD4<sup>+</sup>T-Zellen ist erniedrigt und somit auch die CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Ratio. Die T-Zellproliferation ist eingeschränkt und es treten gehäuft Translokationen zwischen den Chromosomen 7 und 14 auf, den Orten der T-Zellrezeptorgene [20].

Die NBS-Patientinnen sind aufgrund einer Ovariendysgenese mit fehlender Oogenese häufig infertil. Diskutiert wird ein Defekt in der Meiose. Männliche Patienten hingegen produzieren Spermien, haben jedoch eine verzögerte Pubertät.

### Heterozygotie

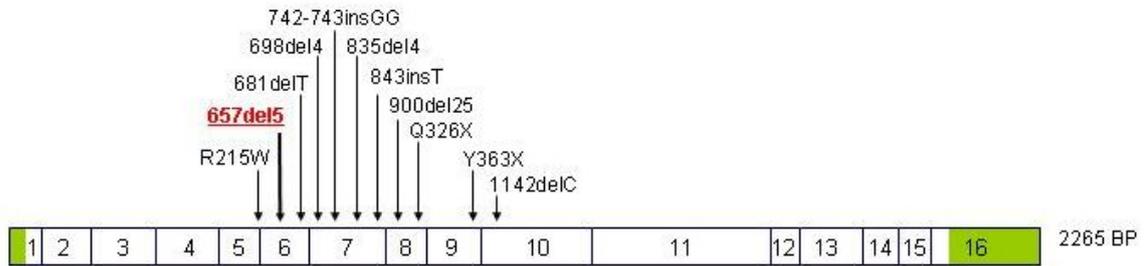
Heterozygote Mutationsträger sind phänotypisch unauffällig. In heterozygoten Zellkulturen ist jedoch die genomische Instabilität leicht aber nicht signifikant erhöht [24]. Auch ist das Risiko, an Krebs zu erkranken für Heterozygote im Vergleich zur Normalbevölkerung leicht erhöht [15, 25, 26]. In mehreren Studien wurde untersucht, ob das NBN-Gen in Tumorgewebe gehäuft mutiert ist. In der Mehrzahl der Tumoren konnte keine erhöhte Mutationsrate des zweiten NBN-Gens festgestellt werden. Im Gegensatz dazu stehen zwei Studien, die in lymphoblastoider Leukämie, Ovarial- und Brustkrebs gehäuft Mutationen im NBS1-Gen gefunden haben, die aber selten zu einem vollständigen Funktionsausfall Nibrins führten [27, 28]. Insgesamt weisen die Ergebnisse auf eine Haploinsuffizienz Nibrins als Ursache für die Tumorentwicklung in heterozygoten Merkmalsträgern hin [29].

#### 1.3.1. Genetische Grundlage

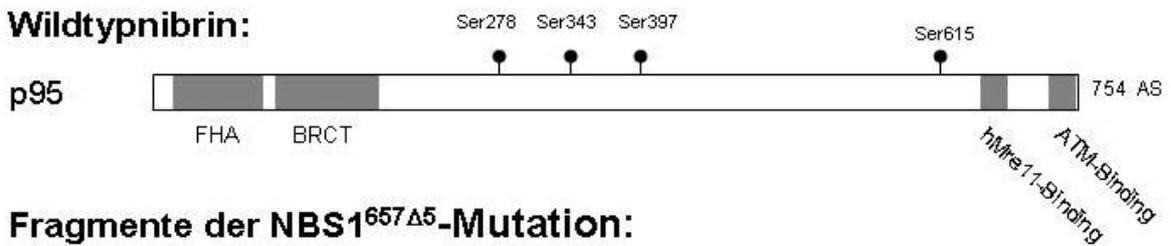
Ursächlich für das Nijmegen Breakage Syndrome ist eine Mutation im NBN-Gen. Es wurde 1997 von Saar et al. [30] durch Kopplungsanalysen in betroffenen Familien auf Chromosom 8q21 kartiert und kurz darauf von zwei unabhängigen Gruppen identifiziert und analysiert [31, 32]. Das NBN-Gen enthält 16 Exons und ist ca. 50KBP groß. Durch alternative Polyadenylierung entstehen zwei mRNA-Transkripte von 2,4KBP und 4,4KBP Länge, die gleichmäßig exprimiert werden. Lediglich in Testes und Ovarien wird das 2,4KBP-Transkript vermehrt exprimiert, was auf eine Rolle in der Meiose hindeuten könnte [31-33].

Das Produkt des NBN-Gens, Nibrin, auch p95 und Nbs1 genannt, besteht aus 754 Aminosäuren und hat ein errechnetes Molekulargewicht von 85kDa [31, 33]. Zusammen mit Mre11 und Rad50 bildet es einen Komplex, den MRN-Komplex, der eine entscheidende Rolle in der Zellzykluskontrolle, DNA-DSB-Erkennung und -Reparatur spielt.

**NBS1-Gen mit Mutationen:**



**Wildtypnibrin:**



**Fragmente der NBS1<sup>657Δ5</sup>-Mutation:**

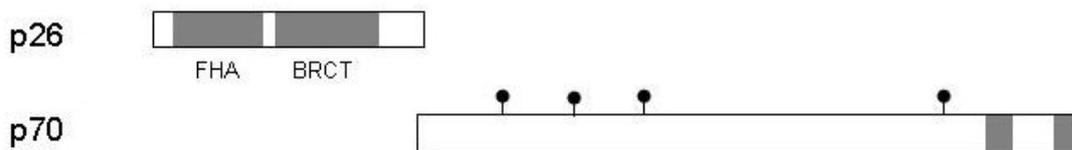


Abbildung 1.2 Schema des NBN-Gens

Das NBN-Gen mit den bisher bei NBS-Patienten identifizierten Mutationen. Die in über 90% der Patienten nachgewiesene Foundermutation ist in roter Schrift und unterstrichen. Darunter ist das Protein Nibrin mit seinen Bindungsstellen, funktionellen Regionen und Phosphorylierungsstellen dargestellt. Darunter die Proteinfragmente die in Patienten mit NBS nachgewiesen werden konnten.  
 AS: Aminosäuren, BP: Basenpaare, BRCT: breast cancer carboxy terminal, FHA: forkhead-associated, Ser: Serinrest

Nibrin wird in drei funktionelle Bereiche unterteilt: die carboxyterminale, die zentrale und die aminoternale Region. Im carboxyterminalen Bereich findet sich die Bindungsstelle für Mre-11, mit dem es einen funktionellen Komplex bildet, und eine Interaktionsstelle für ATM [34]. Im aminoternalen Bereich finden sich zwei funktionelle Regionen, die "forkhead associated"-Domäne (FHA) und die "breast-cancer-carboxy-terminal"-Domäne (BRCT). Diese werden häufig in DNA-Reparaturproteinen gefunden, ihre direkte Nähe in Nibrin scheint aber einzigartig zu sein. Sie sind für die Kernlokalisierung, Foci-Bildung und Phosphorylierung von Nibrin bei DNA-DSB entscheidend. Mutationen in diesen Regionen führen zum Verlust dieser Funktionen [35, 36]. In der zentralen Region sind mehrere Phosphorylierungsstellen lokalisiert, deren Phosphorylierung, v.a. durch ATM, wesentlich zur Aktivierung des MRN-Komplexes beiträgt [37, 38].

Nibrin wird ubiquitär und schon in der frühen Embryonalentwicklung exprimiert, besonders hoch allerdings in Organen mit einer hohen Proliferationsaktivität und einem physiologischen Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen, wie den lymphoretikulären Organen und dem Hoden [31, 39].

### 1.3.2. Hypomorphe Mutation als Ursache des NBS

In über 90% der Patienten findet sich eine 5BP-Deletion in Exon 6 ( $\text{NBS}^{657\text{del}5}$ ), eine Foundermutation, die als slawische Mutation bezeichnet wird, da sie vor allem in Polen und Tschechien endemisch vorkommt. Die Heterozygotenfrequenz der  $\text{NBS}^{657\text{del}5}$ -Mutation liegt in dieser Region bei etwa 1/177 [40]. Auch die anderen bisher bekannten Mutationen finden sich allesamt in unmittelbarer Nähe der Foundermutation zwischen Nukleotid 657 und 1142 und liegen somit in der zentralen Region des NBN-Gens [31]. Die N-terminale und C-terminale Region sind bisher nie betroffen, was für eine Bedeutsamkeit dieser Regionen spricht. Das NBN-Gen mit den verschiedenen bekannten Mutationen ist in Abb. 1.2 dargestellt.

Alle bekannten Mutationen gehen mit einer Sequenzverschiebung unterhalb der Mutation einher, und so kann bei den Patienten erwartungsgemäß kein vollständiges Nibrin nachgewiesen werden. Stattdessen wird ein verkürztes N-terminales 26kDa-Fragment gebildet. Überraschenderweise konnte aus lymphoblastoiden Zellen von  $\text{NBS}^{657\text{del}5}$ -Patienten auch ein C-terminales 70kDa-Fragment isoliert werden. Zustande kommt dieses durch einen alternativen Translationsstart oberhalb der Mutation, der durch die 5bp-Deletion ins Leseraster gerückt wird (siehe Abb. 1.2) [41]. Es wird allerdings in deutlich niedrigeren Konzentrationen als das vollständige Wildtypnibrin exprimiert. In diesem Fragment sind sowohl die Phosphorylierungsstellen der Zentralregion, als auch die Bindungsstellen für ATM und Mre11 erhalten. Folglich bildet auch das Fragment einen Komplex mit Mre11 und Rad50 und kann so einen Teil der Funktionen Nibrins kompensieren [36, 42]. Es fehlen allerdings die N-terminale FHA- und BRCT-Domäne, die Voraussetzung für die Bildung von Nibrinfoci an Stellen von DNA-Schäden sind [43]. Diese Fähigkeit geht in NBS-Zellen verloren, genau wie die Phosphorylierung und somit Aktivierung von Nibrin durch ATM [35].

Ähnliche Fragmente konnten auch für zwei weitere Mutationen nachgewiesen werden [41, 44], und es ist sehr wahrscheinlich, dass solche hypomorphen Mutationen mit Expression eines Nibrinfragments Voraussetzung für das Überleben der Patienten sind. So sind nullmutante Mäuse, die kein Nibrinfragment bilden, nicht lebensfähig, was die überlebenswichtige Funktion Nibrins verdeutlicht [45, 46]. Wurde hingegen in nullmutanten Zellkulturen oder nullmutanten Mäusen das NBS<sup>657del5</sup>-Allel eingebracht und das p70-Fragment exprimiert, so überlebten sowohl Zellen als auch Mäuse [36, 42].

Obwohl der Großteil der NBS-Patienten die gleiche NBS<sup>657Del5</sup>-Mutation trägt, zeigen sie eine überraschend hohe Variabilität in der klinischen Ausprägung [10]. Diese begründet sich wahrscheinlich ebenfalls in der Teilkompensation durch die hypomorphe Mutation, allerdings in individuell unterschiedlichem Maße. So wird das p70-Fragment in verschiedenen Patientenzelllinien in unterschiedlich hohen Konzentrationen exprimiert, und zumindest für das Krebsrisiko konnte eine Korrelation mit der Menge des p70-Fragments gezeigt werden [47]. Ähnliches gilt sicher auch für andere Symptome des NBS, wahrscheinlich gibt es aber auch noch andere, den NBS-Phänotyp modifizierende Gene.

Sicher ist, dass Teilfunktionen Nibrins in Patienten durch das exprimierte Fragment kompensiert werden. Welche dies im Detail sind, ist noch nicht ausreichend geklärt. Aufschlussreich wäre hierfür sicherlich ein Modell mit einer Nullmutation für NBN, das einen vollständigen Funktionsverlust herbeiführt und somit den vollen Funktionsumfang Nibrins enthüllen könnte.

#### **1.4. Nibrin und DNA-DSB-Reparatur**

NBS-Patienten haben eine starke Radiosensitivität und DNA-DSB werden nach Bestrahlung deutlich schlechter repariert. So liegt es auf der Hand, dass Nibrin eine Rolle bei der Reparatur dieser Schäden spielt. Die genaue Funktion Nibrins im Netzwerk der DNA-DSB-Antwort ist noch nicht endgültig geklärt. Sicher weiß man, dass es als Komplex mit Mre11 und Rad50 agiert. Nibrin selbst besitzt keine Fähigkeit zur DNA-Bindung und -Prozessierung. Allerdings bindet es mit seinen FHA/BRCT-Domänen an  $\gamma$ H2AX, ein wesentlicher Sensor für DNA-DSB. Nibrin und im Folgenden auch Mre11 und Rad50 werden so an DNA-Bruchstellen rekrutiert und bilden dort Foci,

die mikroskopisch nachgewiesen werden können [48]. Mre11 und Rad50 sind normalerweise im Zytoplasma verteilt und können ohne Nibrin nicht an DNA-DSB akkumulieren. Mre11 besitzt mehrere biochemische Eigenschaften, die für die DSB-Reparatur benötigt werden: es ist 3'-5'-Doppelstrangexonuklease, Einzelstrangendonuklease und DNA-Helikase, und ist an der Prozessierung der Bruchenden beteiligt. Rad50 bildet eine „V-ähnliche“ Struktur, die mit ihren beiden Armen die Bruchenden bindet. Auch begrenzt es die Nukleotiddegradation durch Mre11. Der MRN-Komplex bildet so einen so genannte *sticky ball*, der die Chromosomenfragmente zusammenhält und ein günstiges Milieu für die Wiederverknüpfung der Enden durch weitere Reparaturproteine bildet [6]. Nibrin spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von DNA-DSB und stabilisiert diese in Zusammenarbeit mit Mre11 und Rad50.

In Hefe ist der Komplex aus Mre11, Rad50 und Xrs2 (funktionelles Ortholog zu Nibrin) sowohl an der nichthomologen Endverknüpfung als auch an der homologen Rekombination beteiligt [49-51]. Über die Beteiligung Nibrins an diesen beiden Reparaturmechanismen in höheren Lebewesen ist die Datenlage umfangreich, uneinheitlich und bedarf weiterer Klärung.

Während in Patienten die V(D)J-Rekombination keine Auffälligkeiten zeigt, ist der Immunglobulinklassenwechsel in der Mehrzahl beeinträchtigt [10, 23]. Beides geschieht durch NHEJ. Nibrin-defiziente DT40 Hühnerzellen zeigten nach Bestrahlung keine Beeinträchtigung des NHEJ, jedoch deutlich verminderte HR [52].

### **1.5. Nibrin und Zellzykluskontrolle**

Zellen von NBS-Patienten haben deutliche Defekte in der Zellzykluskontrolle. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass Nibrin nicht nur ein früher Sensor von DNA-DBS ist, sondern auch wesentlich für die Rekrutierung und Aktivierung von Proteinen der Zellzykluskontrolle verantwortlich ist. Insbesondere ATM wird durch Nibrin zu DSB geholt und aktiviert [53]. ATM wiederum steht am Anfang der Signalkaskaden der wichtigsten *Checkpoints* in der G1-, S-, und G2/M-Phase. Die genauen Einzelheiten, wie Nibrin an den verschiedenen *Checkpoints* wirkt, sind auch hier noch nicht vollständig geklärt und die Daten sind zum Teil uneinheitlich.

Am auffälligsten ist der Intra-S-Phase-*Checkpoint*defekt, der sich in einer radioresistenten DNA-Synthese zeigt. Drei *Pathways* modulieren diesen *Checkpoint*, an deren Anfang jeweils das Protein ATM steht. Durch das Fehlen Nibrins kann ATM nicht aktiviert werden, was einen Defekt dieser *Checkpoints* erklären könnte. Außerdem ist Nibrin in allen drei *Pathways* an der Aktivierung weiterer Proteine beteiligt. Beim ersten *Pathway* über ATM-CHK2-CDC25A-CDK2 wirkt es an der Phosphorylierung von CHK2 mit [54], im zweiten ATM-SMC1-vermittelten *Pathway* sorgt es für die SMC1-Aktivierung [55]. Der dritte geht über ATM und FANCD2, die wiederum beide von Nibrin aktiviert werden [56].

Die Funktion Nibrins beim G1-*Checkpoint* ist deutlich unklarer. In NBS-Fibroblasten konnte bei niedrigen Strahlungsdosen ein *Checkpoint*defekt gezeigt werden, der aber bei hohen Dosen nicht mehr nachzuweisen war. Dies wird darauf zurückgeführt, dass bei einer geringen Strahlendosis aufgrund des Nibrindefekts keine ATM-Aktivierung stattfindet. Durch eine hohe Dosis hingegen wird der ATM-*Downstream*mediator ATR direkt und nibrinunabhängig aktiviert, was zum Zellzyklusarrest führt [57]. Die Expression von p53 und p21, die zu einem Zellzyklusarrest in G1 führt, war in mehreren Studien an Patientenzellen verringert oder verlangsamt [55, 57, 58], in zwei Patientenzelllinien und in Fibroblasten aus einem NBS-Mausmodell war der G1-Arrest jedoch normal [59, 60].

Die Ergebnisse zur Rolle Nibrins am G2-*Checkpoint* sind ebenfalls nicht einheitlich. Einige Studien mit hypomorphen Mutationen des NBN-Gens zeigen einen Eintritt in die Mitose trotz DNA-Schäden [61, 62], also einen Defekt dieses *Checkpoints*, während in EBV-transformierten B-Zellen aus Patienten kein Defekt festgestellt werden konnte. In einigen Zellkulturen konnte sogar ein verlängerter G2-Arrest festgestellt werden. In zwei Untersuchungen an NBN-nullmutanten Zellen konnte der G2-Defekt aufgrund des vollständigen Funktionsausfalls von Nibrin allerdings gesichert werden [42, 59]. Eventuell begründen sich die zuvor diskrepanten Ergebnisse in der partiellen und variablen Kompensation des Nibrinfragments, die durch die Nullmutation nicht mehr gegeben ist.

## 1.6. Mausmodelle zu NBS

Besonders gut lässt sich die Funktion von Genen anhand von Knockout-Modellen untersuchen. Von den Phänotypen, die durch den entsprechenden Genknockout hervorgerufen werden, können Rückschlüsse auf die eigentlichen Funktionen des Gens gezogen werden. Solche Knockouts können zum einen in Zellen durchgeführt werden, was allerdings nur Rückschlüsse auf die Funktionen einzelner Zellen zulässt. Zum anderen können aber auch ganze Organismen mit einem solchen Genknockout hergestellt werden, was in vivo Untersuchungen des Gendefekts ermöglicht. Unter Säugetieren sind Mäuse besonders gut geeignet. Auch für das NBN-Gen wurden schon mehrere Versuche eines Knockouts unternommen.

### 1.6.1. Maushomolog zu NBN

Voraussetzung zur Herstellung einer Knockoutmaus für das NBS ist das Vorkommen eines homologen Gens in der Maus. Homologe Gene zu NBN finden sich in fast allen eukaryotischen Zellen. In der Maus kartierten 1999 Vissinga et al. das entsprechende Gen "Nbn" auf Mauschromosom 4A. Es ist 70,2% homolog zum menschlichen NBN und hat aminoterminal ebenfalls eine FHA- und eine BRCT-Domäne, die mit 84,4% und 89,5% Homologie besonders stark konserviert sind. Auch die Mre11- und ATM-Bindungsstelle sind erhalten. In Mäusen konnte bisher nur ein mRNA-Transkript von 2,5KBP nachgewiesen werden. Das Nbn-Produkt wird in der Maus, ähnlich wie beim Menschen, ubiquitär und schon in der frühen Embryonalphase exprimiert [63].

### 1.6.2. Nbn-Nullmutanten

Den ersten Versuch einer NBS-Nullmutation in Mäusen stellten 2001 Zhu et al [45] vor. Die 2KBP-Deletion, die den Nbn-Promoter, Exon1 und einen Teil von Intron1 umfasst, bewirkt einen kompletten Knockout des Nbn-Gens. Leider wurde unter 312 Mäusen keine homozygot Nbn-defiziente Maus geboren. Obwohl zu Beginn der Embryonalentwicklung, wie nach Mendel zu erwarten, etwa ein Viertel der Embryonen homozygot nullmutant waren, konnten an Tag 7,5 keine Nullmutanten mehr nachgewiesen werden, was ein Absterben der Embryonen in der frühen Embryonalentwicklung nahe legt. Histologische Untersuchungen von Embryonen in den ersten Tagen zeigten eine ausgeprägte Wachstumsretardierung und unorganisiertes Wachstum der inneren Zellmasse, was für eine Aufgabe Nibrins bei der Zellproliferation

spricht. Heterozygote Mäuse waren klinisch unauffällig. Auch zeigten sie weder bis zum Alter von 14 Monaten spontan, noch zwei Monate nach Bestrahlung ein erhöhtes Krebsrisiko.

Dumon-Jones et al. [46] erzeugten durch Insertion eines Neomycinresistenzgens in Exon 6 des Nbn-Gens eine Nullmutation, deren Homozygotie wie bei Zhu et al. embryonal letal war. Die zunächst regelrecht entwickelten heterozygoten Tiere zeigten jedoch eine deutlich erhöhte Tumorinzidenz, die durch Exposition mit  $\gamma$ -Strahlen noch dramatisch gesteigert werden konnte. Das Spektrum der Tumore war breit und umfasste die Mehrzahl der Organe, im Gegensatz zu menschlichen NBS-Patienten, die hauptsächlich lymphoretikuläre Entartungen entwickeln. Die untersuchten Tumorzellen der heterozygoten Tiere zeigten weiterhin alle einen heterozygoten Genotyp für Nbn. Die Tumorgenese ist daher wie bei heterozygoten Menschen wohl nicht auf einen Verlust der Heterozygotie als vielmehr auf eine Haploinsuffizienz zurückzuführen.

Ähnliches zeigt sich auch bei Mäusen, in denen für die anderen Komponenten des MRN-Komplexes Nullmutationen induziert wurden. Sowohl Mre11- als auch Rad50-defiziente Mäuse sterben im frühen Embryonalstadium ab [64, 65], was eine überlebenswichtige Funktion des gesamten MRN-Komplexes impliziert. Ein Verlust von ATM, dem engen *Up*- und *Downstream*mediator Nibrins, in Mäusen ist hingegen nicht letal und ATM-defiziente Mäuse sind dem menschlichen Syndrome der Ataxia teleangiectasia phänotypisch sehr ähnlich [66].

### 1.6.3. Nbn-hypomorphe Mausmutanten

Die ersten lebensfähigen Nbn-Mausmutanten tragen - wie die erkrankten Menschen - hypomorphe Mutationen. Im ersten Modell [59] wird durch eine Deletion von Exon 4 und 5 die BRCT-Region zerstört. Die Maus bildet ähnlich den menschlichen Patienten durch einen alternativen Translationsstart ein 80kDa-Nibrinfragment. Auf zellulärer Ebene zeigen die Tiere die NBS-typischen Merkmale, wie erhöhte Radiosensitivität, S-Phase*checkpoint*defekt mit radioresistenter DNA-Synthese, fehlende Foci-Bildung nach DNA-DSBs und einen G2/M-*Checkpoint*defekt mit ungehemmter Mitose trotz DNA-Schäden. Jedoch weisen die Mäuse nicht die NBS-typische Immundefizienz, Ovariendysgenese und Prädisposition für maligne Tumoren auf. Erst eine

Kreuzzüchtung dieser Mutante mit einer p53-defizienten Mutante zeigt eine deutlich erhöhte Tumorinzidenz. Eine Kombination dieser Nbn-Mutation mit einem ATM-Knockout erweist sich als embryonal letal.

Auch Kang et al. [67] induzierten durch einen Knockout von Exon 2 und 3 eine hypomorphe Mutante, die ein 75kDa-Nibrinfragment exprimiert, allerdings in deutlich geringeren Konzentrationen als das funktionelle Nibrin bei Wildtypen. Auch diese Mäuse sind wachstumsretardiert und haben *Checkpoint*defekte nach Bestrahlung, wie radioresistente DNA-Synthese, allerdings zeigen die Versuche hier eine erhöhte Akkumulation der Zellen in G2 statt einer fehlenden Mitosehemmung. Die Tiere weisen außerdem weitere, bei Williams et al. nicht gefundene NBS-Symptome auf: Sie sind immundefizient und haben eine gestörte Lymphozytenentwicklung, die Weibchen sind infertil aufgrund degenerierter Ovarien, wohingegen die Spermatogenese normal ist. Die Inzidenz lymphatischer Tumore ist hier deutlich erhöht, jedoch dominieren in diesen Mäusen Thymome.

In einem dritten hypomorphen Mausmodell wurde das murine Nbn-Gen zerstört und durch das menschliche NBN-Gen mit der NBS<sup>657del5</sup>-Foundermutation ersetzt [36]. Die Tiere exprimieren ebenfalls das hypomorphe p70-Nibrinfragment und kommen in ihren Symptomen den menschlichen Patienten am nächsten. Sie zeigen erhöhte Chromosomenbrüchigkeit, eine Immundefizienz mit einer Störung der T-Zelldifferenzierung, erhöhtes Krebsrisiko und Ovariendysgenese. Wurde das Nbn-Gens durch menschliche NBN-Gene mit Mutationen in verschiedenen funktionellen Domänen ersetzt, konnten die Funktionen dieser Regionen weiter spezifiziert werden. So wird die FHA-Domäne primär für die Foci-Bildung an Stellen von DNA-DSB gebraucht und Tiere mit einem Funktionsverlust dieser Domäne zeigten vor allem Defekte in der DNA-Reparatur (T-Zellreifung und Ovariendysgenese), während die Zellzyklusdefekte milder waren. Mäuse mit einer Mutation in der Mre11-Interaktionsstelle waren hingegen nicht lebensfähig, was die überlebenswichtige Funktion dieser Region zeigt.

Die drei Mausmodelle von Williams, Kang und Difilippantonio sind eine gute Möglichkeit, um das Nijmegen Breakage Syndrome als hypomorphe Mutation, wie sie beim Menschen vorkommt, zu untersuchen. Leider besteht jedoch eine Diskrepanz

zwischen den Ergebnissen der beiden Modelle. Dies begründet sich unter Umständen in der unterschiedlichen Lokalisation der Mutation und somit unterschiedlicher Nibrinfragmente. Außerdem können diese Modelle keinen Aufschluss über den vollen Funktionsumfang Nibrins geben, da die exprimierten Fragmente offensichtlich auch hier einen Teil der Aufgaben kompensieren.

Wünschenswert wäre also ein Mausmodell mit vollständigem Knockout des NBN-Gens, bei dem die embryonale Letalität jedoch umgangen wird. Es könnte weitere Erkenntnisse über die Funktion von Nibrin eröffnen. In dieser Arbeit wird daher ein Mausmodell untersucht, bei dem eine Nullmutation des Nbn-Gens erst nach der Geburt induziert wird.

### **1.7. Konditionaler Knock-out von Genen**

Eine Möglichkeit, die embryonale Letalität von Mutationen zu umgehen, ist die Herstellung von Tieren mit konditionalem Knockout, bei denen das Zielgen erst nach der Geburt durch einen externen Stimulus ausgeschaltet wird. Ein solches Mausmodell stellten Kuhn et al. 1996 vor [68]. Sie verwendeten hierfür das Cre/loxP-Rekombinationssystem (Cre = cyclisation recombination, loxP = locus of crossing over P1), wobei Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines Mx1-abhängigen Promoters (Mx1 = Myxovirus resistance 1) exprimiert wird. Das Zielgen oder ein Abschnitt dessen wird von zwei so genannten loxP-sites (recombinase recognition sites) flankiert (floxed). Das Enzym Cre-Rekombinase erkennt diese loxP-sites und rekombiniert an den loxP-sites unter Herausschneiden eines Zirkels, der den zu deletierenden Genabschnitt enthält.

Mx1, in gesunden Mäusen nicht exprimiert, ist Teil der viralen Abwehr, und seine Expression kann durch Gabe von Interferon oder synthetischer Doppelstrang-RNA (pIpC), die eine endogene Interferonproduktion induziert, in fast allen Zellen aktiviert werden [69]. Sein Promoter eignet sich daher gut zur gezielten Induktion der Cre-Rekombinaseexpression. In Tieren mit gefloxtem Zielgen und dem Mx1-cre-Transgen kann somit zu jedem beliebigen Zeitpunkt durch die Gabe von Interferon oder pIpC der Knockout des Zielgens induziert werden.

1.7.1. Mausmodell für NBS mit konditionalem Knockout

Nach diesem Prinzip stellten Demuth et al. eine Maus mit konditionalem Knockout für das Nijmegen Breakage Syndrome her [42]. In embryonalen Stammzellen wurde Exon6, dessen Knockout eine Nullmutation verursacht [46], von loxP-Sites flankiert und konnte folglich durch Cre-Rekombinase deletiert werden. Sowohl ES-Zellklone mit einem geflochten ( $Nbn^{wt/lox6}$ ) als auch mit einem deletierten Allel ( $Nbn^{wt/\Delta6}$ ) wurden in C57BL/6-Blastozysten mikroinjiziert und die Chimäre mit 129/Sv-Mäusen gekreuzt.

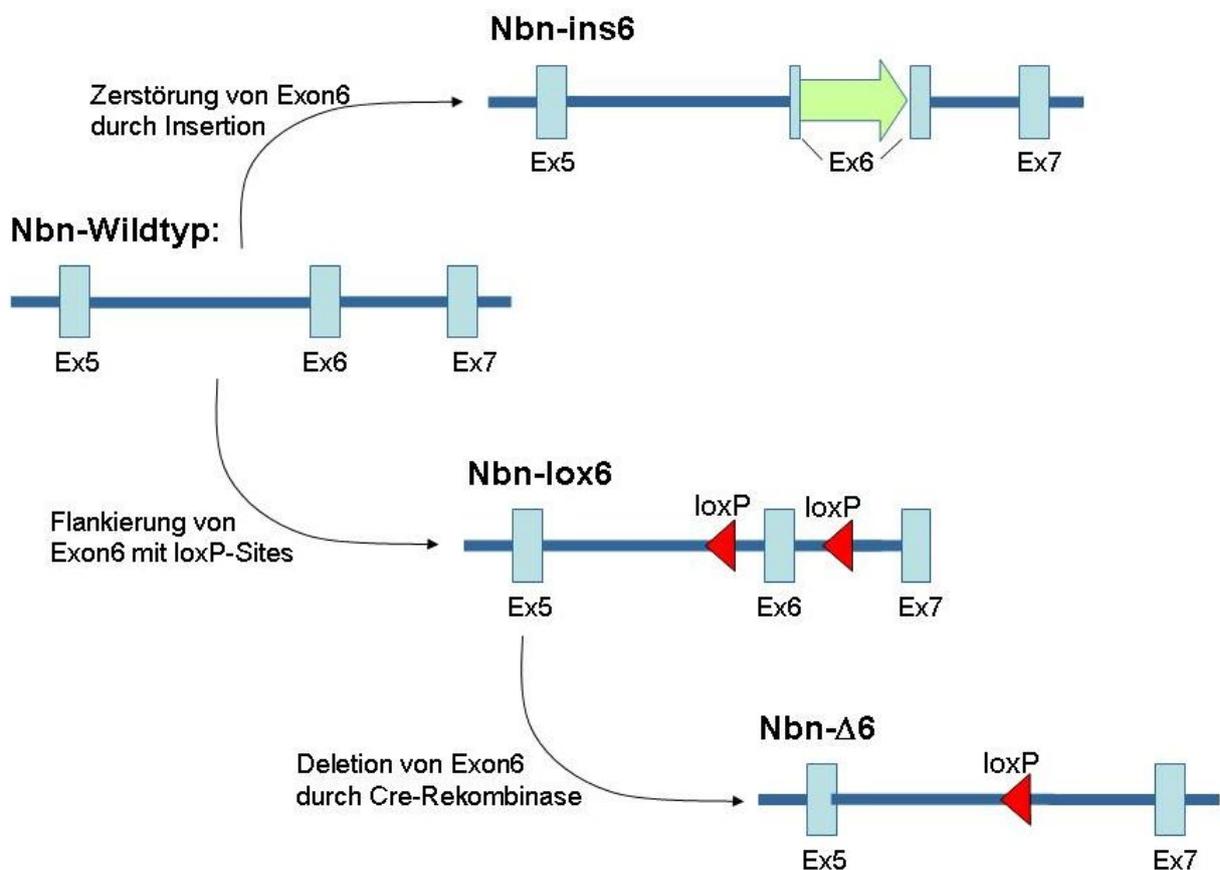


Abbildung 1.3 Nbn-Allele für konditionales Knockout

Diagramm der unterschiedlichen Nbn-Allele, die für das Mausmodell mit konditionalem Nbn-Knockout verwendet wurden. Nbn-Wildtyp und Nbn-lox6 sind voll funktionsfähige Allele. Sowohl durch eine Insertion im Exon 6 als auch durch eine Exon6-Deletion entsteht eine Nullmutation mit vollständigem Funktionsverlust Nibrins.

Bei Kreuzungsversuchen mit  $Nbn^{wt/\Delta6}$ -Tieren wurden nur homozygot gesunde  $Nbn^{wt/wt}$ -Mäuse und heterozygote  $Nbn^{wt/\Delta6}$ , jedoch keine  $Nbn^{\Delta6/\Delta6}$  geboren. Das  $Nbn^{\Delta6}$ -Allel scheint also ebenfalls eine Nullmutation zu sein. Bestätigend hierzu konnte auch im

Western Blot kein Nibrinfragment nachgewiesen werden [42]. Tiere mit  $Nbn^{lox6/lox6}$ -Genotyp sind lebensfähig und zeigen keine NBS-typischen Symptome.

Zur in vivo-Deletion des geflochtenen Allels wurden  $Nbn^{lox6}$ -alleltragende Mäuse mit transgenen Mx1-Cre-Mäusen gekreuzt, die, wie oben beschrieben, Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Mx1-Promotors exprimieren. Durch Gabe von plpC kann das geflochte Allel in diesen Tieren deletiert und die Nullmutation zu einem beliebigen Zeitpunkt induziert werden.

Anhand dieses Mausmodells können erstmals die Folgen einer Nullmutation für Nibrin in vivo untersucht werden, und so sollen neue Erkenntnisse über die Antwort auf DNA-Schäden und die Zellzykluskontrolle gewonnen werden.

## 1.8. Proteomics

Das Netzwerk der Proteine, die an der Antwort der Zelle auf DNA-Schäden beteiligt sind, ist sehr komplex und bisher nur unzureichend entschlüsselt. Sowohl die agierenden Proteine als auch die *Pathways*, über die sie zusammenwirken, sind noch nicht vollständig identifiziert. Auch die Rolle Nibrins in diesem Netzwerk ist bisher nur teilweise geklärt. Eine Möglichkeit zur umfassenden Untersuchung der Expression von Proteinen bietet die breit angelegte Untersuchung des Proteoms durch 2D-Gelelektrophorese, die im Folgenden kurz erläutert werden soll.

### 1.8.1. Das Proteom

Das Proteom beinhaltet die Gesamtheit aller Proteine eines Lebewesens, Gewebes, Zelle oder Zellkompartiments. Der Begriff entstand in Anlehnung an den Begriff Genom, das die Gesamtheit der Gene beschreibt. Im Gegensatz zum relativ statischen Genom verändert sich das Proteom allerdings ständig je nach Expressionslevel der einzelnen Gene. Hinzu kommen posttranskriptionale und posttranslatorische Modifikationen wie mRNA-Splicing, Phosphorylierung oder Glycosylierung von Aminosäuren. Das menschliche Proteom wird auf 20 000 bis 30 000 unterschiedliche Proteine, nach posttranslatorischen Modifikationen sogar auf 500 000 bis 1 000 000 geschätzt [70].

Das aktuelle Proteom einer Zelle wird zum einen natürlich durch das Genom bestimmt.

Welche Gene aber wirklich exprimiert und wie diese modifiziert werden, unterliegt komplexen Regulationsprozessen, die durch vielfältige interne und externe Stimuli wie Alter, Geschlecht, Nahrung, Krankheit, Medikamente u.v.m. beeinflusst werden.

### 1.8.2. Die Untersuchung des Proteoms mit 2D-PAGE

Die zentrale und derzeit umfassendste Methode zur Untersuchung des Proteoms ist die 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE). Hier werden Proteine anhand von zwei unterschiedlichen Eigenschaften in zwei Dimensionen aufgetrennt: in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (Isoelektrische Fokussierung), in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (SDS-PAGE). Das Auflösungsvermögen der 2D-Gelelektrophorese durch diese beiden Trennsysteme ist außerordentlich hoch und kann mehr als 10 000 Proteinspezies betragen [71].

Zu beachten ist allerdings, dass das Proteom, wie bereits beschrieben, keine statische Größe ist und die Methode der 2D-Gelelektrophorese zwar sehr sensitiv, jedoch nicht immer spezifisch ist. Trotz der hohen Variabilität des Proteoms zeigen Proteomicsstudien eine hohe Reproduzierbarkeit, wenn externe und interne Störfaktoren gering gehalten werden und die Methode hochstandardisiert abläuft [72].

### 1.8.3. Erkenntnisgewinn aus einer Proteomicsstudie

Bei der 2D-Gelelektrophorese wird das gesamte Proteom von Zellen mit der höchstmöglichen Auflösung aufgetrennt. Das Ziel ist dabei nicht hypothesenbestimmt einzelne Proteine nachzuweisen, sondern das Proteom möglichst in seiner Gesamtheit darzustellen und so umfassend die Reaktionen der Zellen unter bestimmten Bedingungen zu untersuchen. Dabei ist die 2D-Gelelektrophorese stets eine qualitativ vergleichende Methode. Ihre quantitativen Aussagen sind begrenzt.

Ein gut geeignetes Objekt für Proteomicsstudien sind Genknockouts in Zellen oder Mäusen, da sie eine klar definierte Änderung der Bedingungen darstellen. So können umfassend die Reaktionen der Zelle auf den Verlust der Genfunktion untersucht werden und neue Pathomechanismen identifiziert werden.

### 1.9. Ziel dieser Arbeit

DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle gehören zu den wichtigsten Funktionen von Zellen und Organismen, um ihre Integrität über einen längeren Zeitraum zu erhalten und ihr Wachstum zu kontrollieren. Das Nijmegen Breakage Syndrome ist ein Beispiel dafür, welche weitreichenden Folgen ein Fehler in diesem komplexen Netzwerk mit sich bringt, und die Studie dieses Defekts hat schon Aufschluss über viele Details des Netzwerks gegeben.

Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrome sind allerdings Träger einer hypomorphen Mutation. Sie bilden ein Nibrinfragment, das dessen Funktionen teilweise kompensiert. Eine homozygote Nullmutation des Nbn-Gens in Mäusen ist embryonal letal. Da den Patienten durch das Fragment die lebenserhaltende Funktion Nibrins erhalten bleibt, war es bisher nicht möglich, den vollen Funktionsumfang Nibrins zu studieren. Es ist davon auszugehen, dass entscheidende Funktionen Nibrins derzeit noch unentdeckt sind.

In dieser Arbeit wird ein Mausmodell untersucht, bei dem eine Nullmutation des Nbn-Gens zu jedem Zeitpunkt künstlich induziert werden kann. So wird die embryonale Letalität der Nullmutation umgangen, was erstmals die Möglichkeit gibt, einen vollständigen Funktionsausfall Nibrins *in vivo* zu untersuchen.

Zunächst soll die Effizienz dieses konditionalen Knockouts untersucht werden. Hierzu wird in  $Nbn^{wt/lox6}$ -Mäusen eine heterozygote Nbn-Nullmutation ( $Nbn^{wt/\Delta 6}$ ) erzeugt und in verschiedenen Organen die Fraktion Exon6-deletierter Zellen mit einer semiquantitativen PCR bestimmt.

Ein vollständiger Funktionsverlust Nibrins ist in der Embryogenese letal. Hier soll nun untersucht werden, wie sich ein Fehlen Nibrins auf das Überleben der Zellen in adulten Tieren auswirkt. Es wird in heterozygoten  $Nbn^{ins6/lox6}$ -Mäusen eine homozygote Nullmutation ( $Nbn^{ins6/\Delta 6}$ ) induziert und ebenfalls die Fraktion Nbn-Exon6-deletierter Zellen bestimmt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll ein möglichst umfassender Blick auf die zellulären Folgen eines Nibrinverlustes geworfen werden. Mittels 2D-Gelelektrophorese wird das gesamte Proteom von Leberzellen Nbn-nullmutanter Mäuse dargestellt und mit dem induziert heterozygoter Kontrolltiere verglichen. Dies wird auch mit Gewebe aus zuvor bestrahlten Mäusen durchgeführt, um Besonderheiten nullmutanter Zellen im Umgang mit DNA-DSB zu identifizieren. Unterschiedlich exprimierte Proteine werden durch Massenspektrometrie identifiziert. Anhand dieser Methoden soll die zelluläre Reaktion auf einen vollständigen Funktionsverlust Nibrins umfassend analysiert und Aufschluss über neue Details der Pathogenese und möglicher Kompensationsmechanismen gegeben werden.

## 2. Material

### 2.1. DNA-Analysen

#### Chemikalien

##### *Produkt*

APS 10 (Ammoniumpersulfat)

Rotiphorese Gel A (30% Acrylamidlösung)

Rotiphorese Gel B (2% Bisacrylamidlösung)

TEMED (Tetramethylethyldiamin)

Primer: Nbs1-Intron5.F

(ATAAGACAGTCACCAC)

Nbs1-LoxPtest.F

(GCTTGGCTCAAGTAGTACTG)

Nbs1-LoxPtest.R, FAM-markiert

(CCTCCAGGAGTCACTGTATT)

##### *Hersteller*

Sigma Aldrich Chemie GmbH,  
Deisenhofen

Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe

Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe

Bio Rad Laboratories, Hercules, CA,  
USA

Thermo Hybaid, Ulm

Thermo Hybaid, Ulm

Thermo Hybaid, Ulm

#### Enzyme

##### *Produkt*

Proteinase K

Taq-Polymerase

##### *Hersteller*

Roche

Roche

#### Puffer

##### *Puffer*

10x PCR-Puffer ohne Mg

TBE 5x

Gelladepuffer Agarose-Dye

##### *Hersteller oder Zusammensetzung*

Gibco-BRL

900 mM Tris, 900 mM Borsäure,  
40 mM EDTA

20% Ficoll 400, 0,005% Xylencyanol  
FF, 0,005% Bromphenolblau 20%EDTA

**Geräte**

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Fluor Imager SI	Vistra Fluorescence
GENO VISION Biorobot M48	Qiagen, Hilden
Kammersystem	Hoefler Scientific Instruments, USA
Kühlung	Eppendorf
Photometer: Gene Quant II	Pharmacia Biotech
Probentaschenkämme	Hoefler
Thermocycler GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer
Thermocycler GeneAmp PCR System 2400	AB Applied Biosystems
Zentrifuge Labofuge 400R	Haereus Instruments, Hanau

**Kits**

<i>Kit</i>	<i>Hersteller</i>
MagAttract DNA M48 Kit	Qiagen, Hilden

**Verbrauchsmaterial:**

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
Eppendorfgefäße (0,5/1,5/2,0ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Gel-Loading Pipette Tip 0,1-10µl Bulk	Starlab GmbH, Ahrsenburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Transferpipetten, 2,5 ml steril/unsteril	Sarstedt, Nümbrecht

**2.2. Proteinanalysen****Material**

*Alle in diesem Teil der Arbeit verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Merck (Merck, Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und Serva (Serva, Heidelberg, Deutschland). Aus anderen Quellen stammende Chemikalien sind im Folgenden alphabetisch aufgeführt.*

Agarose	Biorad, Hercules, CA, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, Hercules, CA, USA
Bromphenolblau	Biorad, Hercules, CA, USA

Coomassie Brillant Blau G250	Roth, Karlsruhe
DTT	Biorad, Hercules, CA, USA
Harnstoff	Biorad, Hercules, CA, USA
Pharmalyte pH 4.0–6.5, 5.0–8.9, 6.5–9.0 und 3.5–10.0	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Sephadex-G-200 Superfine	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
TEMED	Biorad, Hercules, CA, USA
Trypsin	Roche, Mannheim, Deutschland

### Geräte

*Die in diesem Teil der Arbeit verwendeten Geräte sind im Folgenden alphabetisch aufgelistet.*

Bruker Reflex IV MALDI-TOF Massenspektrometer	Bruker, Bremen
C-18 Säule für ESI-MS (75mm Durchmesser)	LCPacking, Amsterdam, Netherland
Elektrophoresekammer 1D	Wita, Berlin
Elektrophoresekammer 2D	Desaphor VA300, Desaga, Wiesloch
EPS 3500XL Spannungsgerät	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Glaskugeln	Worf Glaskugeln GmbH, Mainz
Glasröhrchen 1D	Schott Glas, Mainz
Hamilton <sup>®</sup> -Spritzen 10 µl	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Kühlung Typ RTE-100B	Life Science International, Frankfurt
LCQ Deca ion trap mass spectrometer	Thermo Finnigan, USA
Leuchtkasten	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Manueller Gelstück-Ausstanzer	Rosemann und Sohn, Stahnsdorf
Memmert-Wärmeschrank UL 60	Th. Karow GmbH, Berlin
UMAX Mirage II DINA3 (Durchlichtscanner)	Umax, Willich
Vakuumpumpe Jet-1 Automatic	Genser Scientific Instruments, Rothenburg
Zellophan Alba-Einmachhaut	Gehring & Neidweiser GmbH & Co KG, Bielefeld

### 3. Methoden

#### 3.1. Mäuse

Für alle Experimente wurden die in der Einleitung beschriebenen Mäuse mit konditionalem Knockout verwendet, die unter Mx1-abhängiger Cre-Rekombinaseexpression das Exon 6 des Nbn-Gens deletieren. Zur Induktion von Nullmutanten wurden in dieser Arbeit heterozygote  $Nbn^{ins6/lox6}$ -Mäuse verwendet, die unter Cre-Rekombinaseexpression homozygot nullmutante  $Nbn^{ins6/\Delta 6}$ -Mäuse werden. Als Kontrollen wurden homozygot gesunde Mäuse mit  $Nbn^{wt/lox6}$  verwendet, die unter Cre-Rekombinaseexpression eine Exon6 deletieren und so induziert heterozygote  $Nbn^{wt/\Delta 6}$ -Mäuse werden. Zieltiere und Kontrollen sind in Abb. 3.1 noch einmal dargestellt.

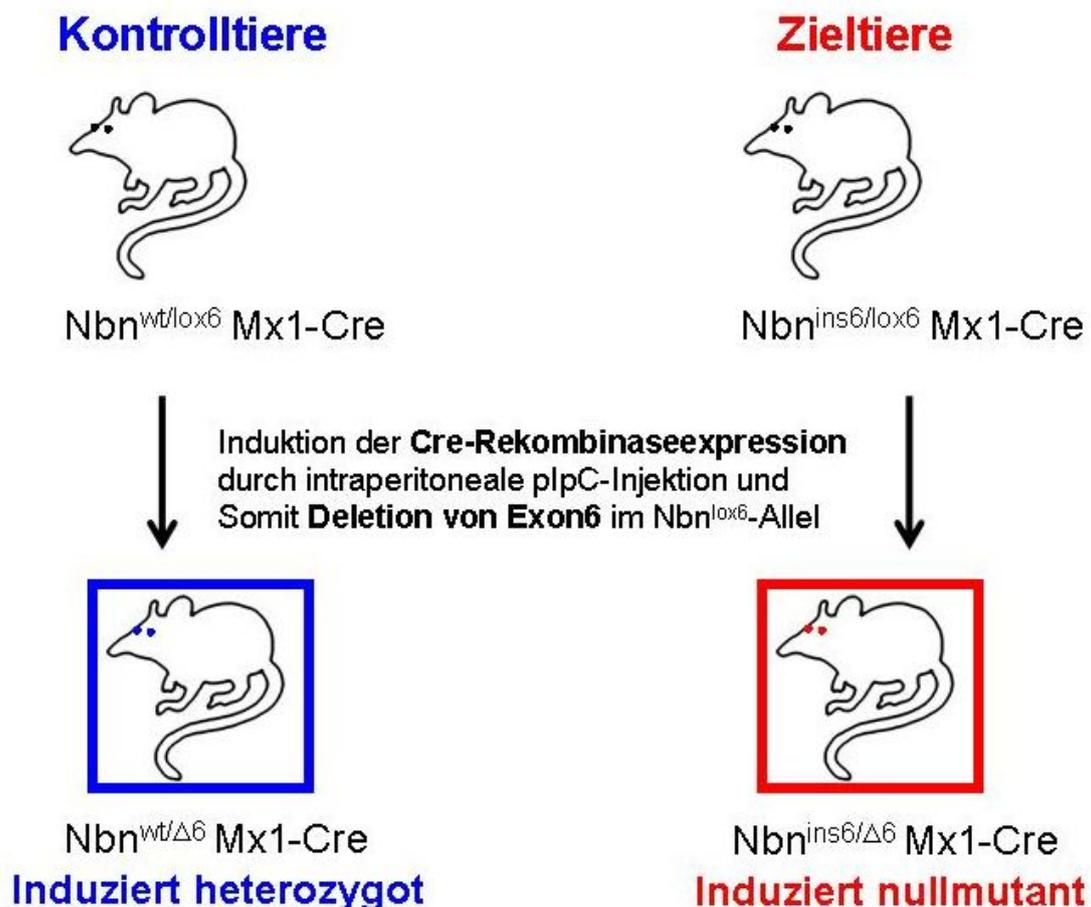


Abbildung 3.1 In dieser Arbeit verwendete Mäuse

Schematische Darstellung der Mäuse, die zur Herstellung von induziert nullmutanten Zeltieren und induziert heterozygoten Kontrollen verwendet wurden.

Die Tiere wurden keimfrei gehalten, um eine nichtinduzierte Deletion des Exon6 zu vermeiden. Die Aktivierung der Cre-Rekombinaseexpression erfolgte durch Spritzen synthetischer Doppelstrang-RNA, um eine Virusinfektion zu imitieren. Jedem Tier wurden dreimal im Abstand von jeweils zwei Tagen 200µl polyinosinic-polycytidylic acid (2mg/ml plpC, Amersham Bioscience) intraperitoneal appliziert.

#### 3.1.1. Bestrahlung

Die Mäuse wurden vor der Bestrahlung mit 100mg Ketanest/kgKG sediert. Die Mäuse wurden jeweils mit einer Gesamtdosis von 4Gy bestrahlt. Hierzu wurden ionisierende Strahlen mit 200kV und 13mA für 3,53min jeweils in Bauch- und Rückenlage appliziert.

Intraperitoneale plpC-Injektion und Bestrahlung der Mäuse wurden nach dem Tierversuchsvorhaben AZ G0084/02 vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheit und technische Sicherheit genehmigt.

#### 3.1.2. Sektion

Zur Organentnahme wurden die Tiere per Genickbruch getötet. Da für die 2D-Gelelektrophorese möglichst blutfreies Gewebe verwendet werden muss, wurde zuerst die Bauchhöhle eröffnet und die Leber über die Portalvene mit isotoner Kochsalzlösung perfundiert. Um das Gewebe zu schonen, wurde die Gallenblase in toto entfernt und die Leber umgehend auf Stickstoff eingefroren. Je nach Experiment wurden von Leber, Milz, Niere, Testes, Oberschenkelmuskel, Thymus, Lunge, Gehirn und Knochenmark 1-2mm große Gewebeproben für die semiquantitative PCR entnommen.

### 3.2. DNA-Analysen

#### 3.2.1. DNA-Extraktion aus Mausgewebe

Die Gewebeproben der verschiedenen Organe wurden in 400µl Genomlysepuffer (50mM Tris-pH 8, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1%SDS) und 20µl Proteinase K (10ng/µl H<sub>2</sub>O von Roche) über Nacht im Heizschüttelblock (Thermomixer 5436, Eppendorf) bei 37°C lysiert. 200µl dieses Lysats wurden dann im GENO VISION Biorobot M48 (Qiagen) mit einem MagAttract DNA M48 Kit (Qiagen) aufgereinigt.

Da bei der im Anschluss beschriebenen semiquantitativen PCR genaue DNA-Mengen eingesetzt werden müssen, wurde im Photometer *Gene Quant II (Pharmacia Biotech)* durch die Messung der Lichtabsorption bei 260nm die Konzentration der aufgereinigten DNAs bestimmt und von den aufgereinigten DNAs Verdünnungen mit einer Konzentration von 10ng/μl hergestellt.

### 3.2.2. Semiquantitative PCR

Die Quantifizierung der Deletionseffizienz erfolgte mit einer semiquantitativen PCR. Hierfür wurden Primer ausgewählt, die ähnlich große Produkte amplifizieren. Zwei Vorwärtsprimer sind in Intron 5 des Nbn-Gens lokalisiert, der erste, Nbs1-Intron5.F, vor der LoxP site, der zweite, Nbs1-LoxPtest.F, dahinter. Der Rückwärtsprimer, Nbs1-LoxPtest.R, ist mit FAM fluoreszenzmarkiert und bindet an eine Region in Intron 6 kurz hinter der zweiten LoxP site.

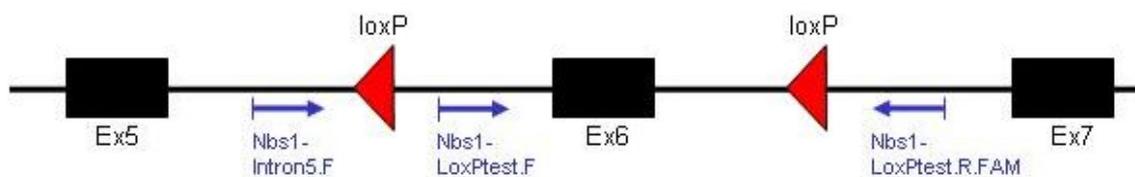


Abbildung 3.2 Bindungsstellen der Primer für semiquantitative PCR

So ergeben sich für die verschiedenen Allele die folgenden Produkte, wobei die für die Quantifizierung gemessenen Produkte fett gedruckt sind:

Tabelle 3.1 PCR-Produkte

PCR-Produkte der verschiedenen Primer. Für die Quantifizierung gemessene Produkte sind fett gedruckt.

	<b>Primer 1 &amp; 3</b>	<b>Primer 2 &amp; 3</b>
<b>Wildtype</b>	1450bp	<b>515bp</b>
<b>Exon lox6</b>	1179bp	<b>554bp</b>
<b>Exon Δ6</b>	<b>601bp</b>	Kein Produkt

Jede PCR-Probe wurde auf 25μl angesetzt. Pro DNA-Probe wurden 20μl Mastermix eingesetzt, die sich wie folgt zusammensetzte:

<b>Mastermix:</b> 10x PCR-Puffer ohne Mg (Gibco-BRL)	2,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0,75µl
dNTPs	2,0µl
Primer: 1,5µM Nbs1-Intron5.F	1,0µl
2,5µM Nbs1-LoxPtest.F	1,0µl
3,5µM Nbs1-LoxPtest.R, FAM-markiert	1,0µl
Taq-DNA-Polymerase	0,15µl
H <sub>2</sub> O	6,6µl
DNA 10ng/µl (entspricht 50ng)	5µl

Das Temperaturprofil wurde wie folgt gewählt:

Denaturierung	94°	5min	
Denaturierung	94°	30sek	} 27 Zyklen
Primerbindung	55°	1min	
DNA-Synthese	72°	1min	
DNA-Synthese	72°	7min	

Als Standardproben liefen in jeder semiquantitativen PCR DNAs mit bekannten Allelverhältnissen mit, nämlich DNAs von heterozygoten Tieren mit den Genotypen  $Nbn^{lox6/wt}$ ,  $NBN^{ox6/\Delta6}$  und  $NBN^{wt/\Delta6}$ , die keine Cre-Rekombinase exprimieren können. Die PCR-Produkte der Allele mussten in jeder Standardprobe zu gleichen Teilen nachzuweisen sein.

### 3.2.3. Auftrennung der PCR-Produkte

Die Produkte wurden auf 0,75mm-dicken, nichtdenaturierenden 12%-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Ansatz von 25ml für ein 12%iges Gel setzte sich wie folgt zusammen:

Rotiphorese A	10ml
Rotiphorese B	5ml
5x TBE	5ml
Temed	12µl
APS 10%	0,25ml

H<sub>2</sub>O                      5ml

Die Gellösung wurde zwischen zwei senkrecht stehende Glasplatten mit einem Kamm für 20 Probestaschen à 4mm Breite gegossen und polymerisierte über Nacht. Zum Probenauftrag wurden 10µl PCR-Produkt mit 2µl Agarose-Dye gemischt und vorsichtig mit Gelladepipetten aufgetragen. In einem 2-Kammersystem mit TBE-Puffer wurden die PCR-Produkte dann bei 100V und 14° über 20h aufgetrennt.

### 3.2.4. Auswertung der Gele

Die Gele wurden im "Vistra Flourescencer SI" (Amersham Life Science) mit einem 530 DF 30 Emissionsfilter gescannt und mit ImageQuANT Software (Molecular Dynamics, Version 5.2) ausgewertet. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurde das Verhältnis der drei in Tabelle 3.1 aufgeführten Produkte innerhalb einer Probe und somit die Fraktion der Zellen mit Nbn<sup>Δ6</sup>-Allel bestimmt. Mit Image Quant wurde über die Banden jeder Probe eine Spur (s. Abb. 3.3) gelegt, in der die Intensität der Banden gemessen und in einem Graph (s. Abb. 3.3) dargestellt wurde. Die Fläche eines Peaks im Verhältnis zur Gesamtfläche der drei Peaks eines Graphen gibt den relativen Anteil eines Allels an.

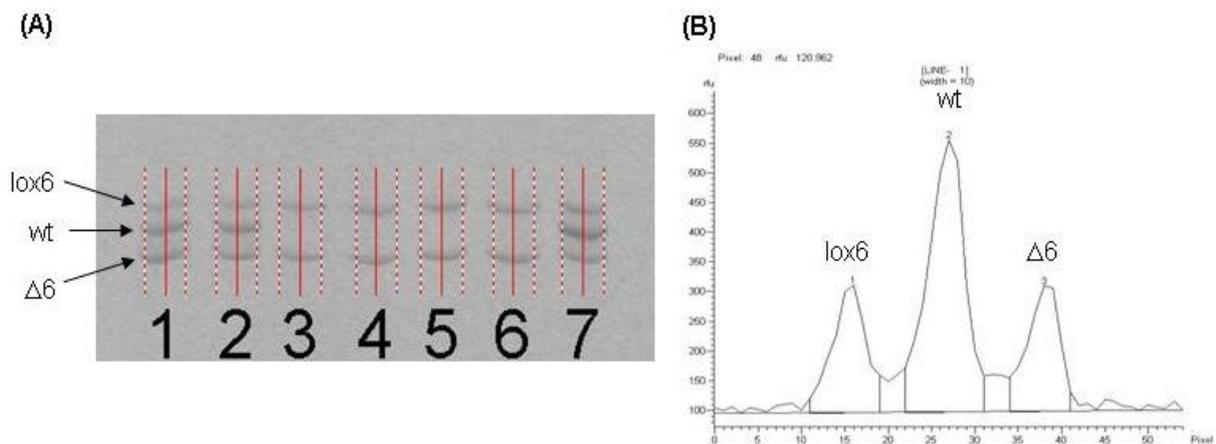


Abbildung 3.3 Beispiel für semiquantitative PCR

(A) Beispiel-Gel mit PCR-Produkten aus Milz-DNA. Die Pfeile markieren die verschiedenen Allele des Nbn-Gens. Die roten Spuren zeigen den Bereich in dem die Bandenintensität gemessen wird. (B) Beispielgraph einer Intensitätsmessung der Banden einer PCR-Probe. Die Allele, die dem jeweiligen Peak entsprechen, sind darüber angegeben. Der prozentuale Anteil eines Allels wird über die Fläche unter dem Allel-Peak im Verhältnis zur Gesamtfläche der Peaks errechnet.

### 3.2.5. Genauigkeit der semiquantitativen PCR

Die Genauigkeit der semiquantitativen PCR wurde mit künstlich hergestellten DNA-Gemischen aus  $Nbn^{wt/wt}$  und  $Nbn^{flox/flox}$  bzw.  $Nbn^{flox/del}$  und  $Nbn^{flox/flox}$  untersucht. Die bekannten Ausgangsverhältnisse der Allelgemische wurden dann mit den gemessenen PCR-Produkten verglichen, wie in den folgenden Abbildungen dargestellt ist.

Tabelle 3.2 Genauigkeit der semiquantitativen PCR

Ausgangskonzentration	10% flox	20% flox	40% flox	60% flox	80% flox	90% flox
PCR-Durchschnitt	10,05%	19,51%	37,28%	62,32%	80,15%	89,61%
Standardabweichung	4,32	5,25	6,09	6,49	5,49	4,74
Anzahl der PCRs	6	6	5	5	6	6

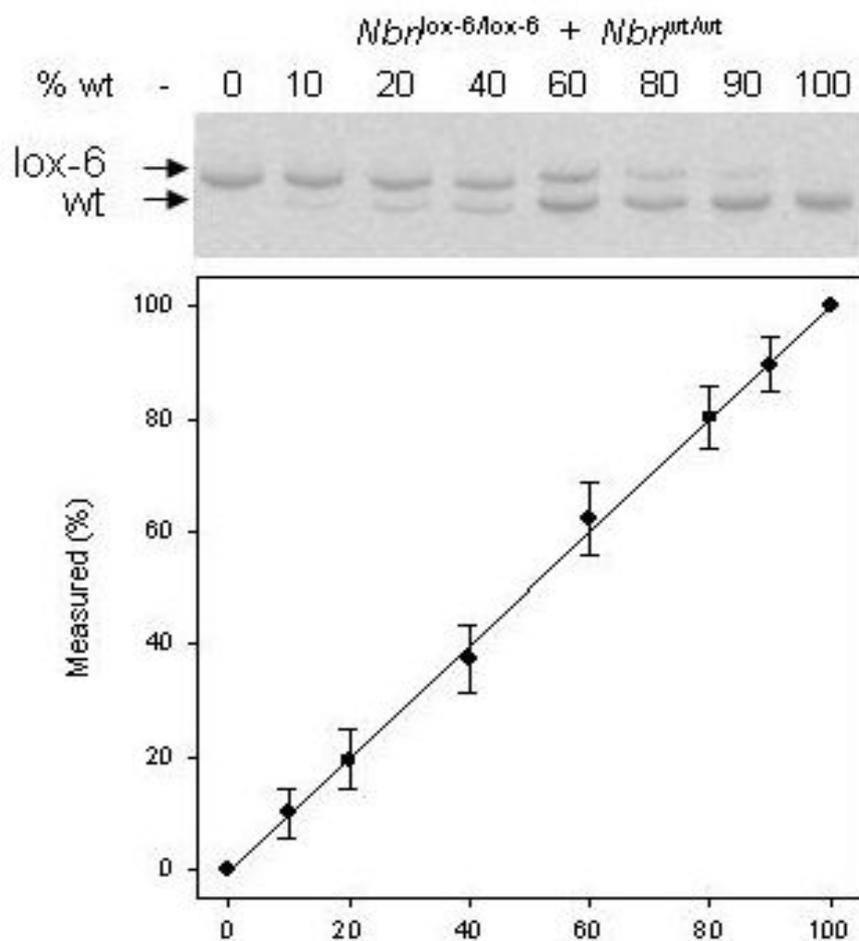


Abbildung 3.4 PCR mit Standard-DNAs bekannter Mischungsverhältnisse

### 3.2.6. Korrekturfaktor

Bei den Messungen mit der semiquantitativen PCR fielen von Versuchsreihe zu Versuchsreihe zum Teil starke Schwankungen in den Ergebnissen auf. Dabei wichen die Ergebnisse der Standard-DNAs in diesen PCRs vom erwarteten 50:50 Verhältnis deutlich ab. Die Ursachen hierfür ließen sich nicht eindeutig feststellen. Mehrere Messungen der Standard-DNAs innerhalb desselben Versuchs zeigten jedoch nur geringe Unterschiede, wie in Tabelle 3.2 anhand einer PCR mit verschiedenen bekannten Mischungsverhältnissen von lox6- und  $\Delta$ 6-DNAs exemplarisch dargestellt ist. Die Tatsache, dass der Fehler innerhalb eines Versuchs konstant bleibt, machten wir uns zunutze, um die Unterschiede durch einen Korrekturfaktor auszugleichen.

Tabelle 3.3 Beispiel für semiquantitative PCR mit Korrekturfaktor

Eine PCR mit verschiedenen Mischungsverhältnissen von lox6- und  $\Delta$ 6-DNA zeigt folgendes Ergebnis. Alle Proben wurden zur gleichen Zeit, mit demselben Mastermix und im selben Thermocycler verarbeitet. Für jede DNA wurden drei PCRs innerhalb desselben Versuchs durchgeführt. Die gemessenen Konzentrationen weichen deutlich von den Ausgangsverhältnissen ab, sind sich in ihrer Abweichung jedoch sehr ähnlich. Für  $\Delta$ P wurden Ergebnisse aus der Probe mit 50:50-Verhältnis verwendet.

<b>Ausgangskonzentration des <math>\Delta</math>6-Allels</b>	<b>0,00%</b>	<b>10,00%</b>	<b>20,00%</b>	<b>30,00%</b>	<b>40,00%</b>	<b>50,00%</b>
Probe 1 (gemessen)	0,00%	5,00%	9,86%	15,46%	20,87%	30,23%
Probe 2 (gemessen)	0,00%	5,15%	9,68%	13,55%	20,14%	26,89%
Probe 3 (gemessen)	0,00%	5,31%	8,20%	15,04%	21,96%	29,24%
<b>Gemessen (Durchschnitt)</b>	<b>0,00%</b>	<b>5,15%</b>	<b>9,25%</b>	<b>14,68%</b>	<b>20,99%</b>	<b>28,79%</b>
<b>Korrigiert (Durchschnitt)</b>	<b>0,00%</b>	<b>11,84%</b>	<b>20,13%</b>	<b>29,6%</b>	<b>39,65%</b>	<b>50%</b>

Entsprechend der Ausgangshypothese der semiquantitativen PCR sollten die gemessenen Ergebnisse direkt proportional zu ihren Ausgangswerten sein und somit eine Gerade darstellen (siehe grau gestrichelte Kurve in Abb. 3.5). Dies ist in der gezeigten Messung jedoch nicht der Fall (siehe blaue Kurven in Abb. 3.5). Der Fehler kann jedoch mit einer einzigen Messung einer Probe mit bekanntem Ausgangsverhältnis durch den Korrekturfaktor eliminiert werden (siehe rote Kurven in Abb. 3.5).

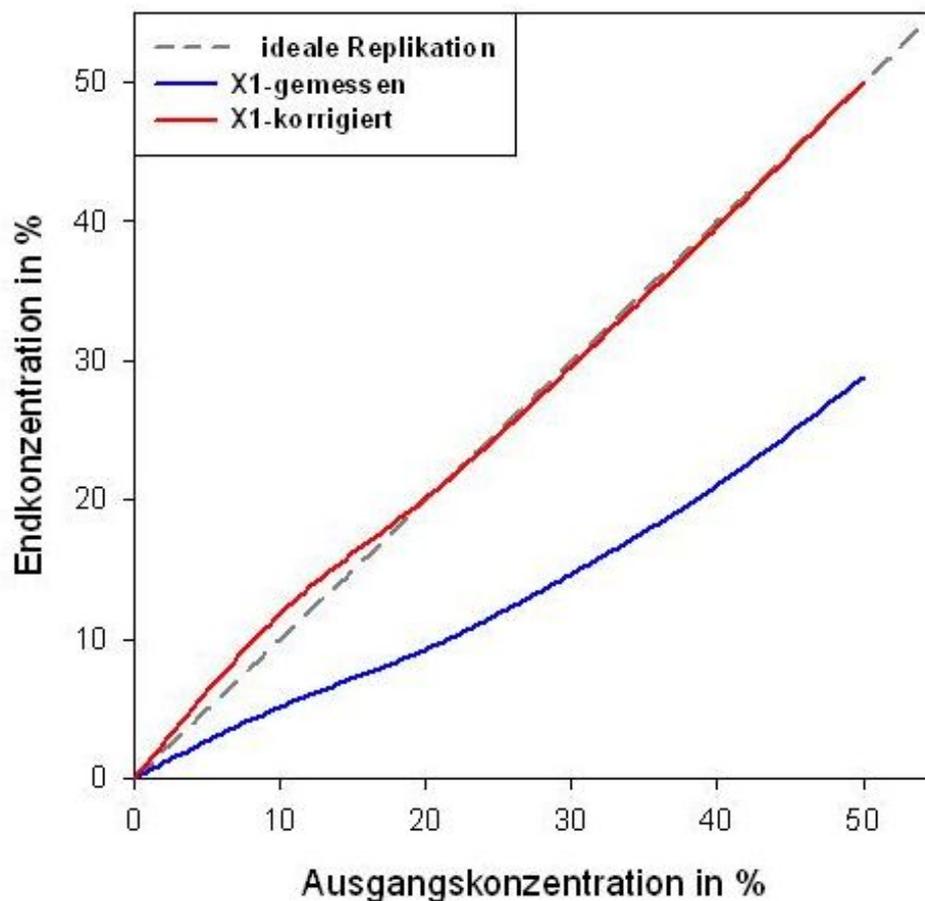


Abbildung 3.5 Korrekturfaktor für semiquantitative PCR

Beispielanwendung des Korrekturfaktors: Die Abbildung zeigt die Ergebnisse einer PCR mit ungleicher Vervielfältigung der einzelnen Produkte (blaue Kurve). Die rote Kurve zeigt die mit Hilfe des Korrekturfaktors korrigierten Werte. Die grau gestrichelte Kurve zeigt die ideale Vervielfältigungskurve, bei der die Produkte im Verhältnis ihrer Ausgangskonzentrationen amplifiziert werden. Korrigierte und ideale Ergebnisse sind deutlich angenähert.

Der Korrekturfaktor wird wie folgt hergeleitet:

Die Vervielfältigung der DNA erfolgt in unserem Experiment in genau 27 Zyklen. Wir nehmen an, nach einem PCR-Zyklus sei die Anzahl der replizierten DNA-Stränge  $\delta X$  proportional zur Anzahl der zu Beginn des Zyklus vorhandenen Stränge  $X$ . Wiederholte Vervielfältigung führt zu exponentiellem Wachstum:

$$X_G = X_A e^{27p} \quad (1)$$

mit noch unbekannter Vervielfältigungsrate  $p$  und der anfänglichen Anzahl der DNA-

Stränge  $X_A$ .  $X_G$  gibt die am Ende des Experiments gemessene Anzahl an.

Da in diesem Versuch die Anzahl der Zyklen konstant gehalten wird und außerdem keine absoluten Werte sondern das prozentuale Verhältnis betrachtet wird, wird die Anzahl der Zyklen gleich 1 gesetzt und kann so vernachlässigt werden. Es ergibt sich:

$$X_G = X_A e^P \quad (2)$$

P gibt jetzt die Vervielfältigungsrate pro 27 Zyklen an.

Wir wenden oben genannten Ansatz nun sowohl für das lox6- als auch für das  $\Delta 6$ -Allel an und kennzeichnen sie durch die Indizes 1 und 2. Wir erlauben für beide unterschiedliche Replikationsraten (denn eben diese können nach unserer Vermutung durch kleine Änderungen in der Versuchsanordnung hervorgerufen werden):

$$X_{1G} = X_{1A} e^{P_1} \quad (3)$$

$$X_{2G} = X_{2A} e^{P_2}$$

So erhalten wir für ihr Verhältnis:

$$\frac{X_{1G}}{X_{2G}} = \frac{X_{1A}}{X_{2A}} e^{P_1 - P_2} \quad (4)$$

$$\frac{X_{1G}}{X_{2G}} = \frac{X_{1A}}{X_{2A}} e^{\Delta P} \quad (5)$$

Um nun den Korrekturfaktor zu bestimmen, wird die Gleichung nach  $\Delta P$  aufgelöst:

$$e^{\Delta P} = \frac{X_{1G} X_{1A}}{X_{2G} X_{2A}} \quad (6)$$

$$\Delta P = \ln \left( \frac{X_{1G} X_{1A}}{X_{2G} X_{2A}} \right) \quad (7)$$

Für das Verhältnis der Ausgangskonzentrationen ergibt sich:

$$\frac{X_{1A}}{X_{2A}} = \frac{X_{1G}}{X_{2G}} e^{-\Delta P} \quad (8)$$

Für die prozentuale Ausgangskonzentration, die hier bestimmt werden soll, ergibt sich:

$$\frac{X_{1A}}{X_{2A}} + 1 = \frac{X_{1G}}{X_{2G}} e^{-\Delta P} + 1 \quad (9)$$

$$\frac{X_{2A}}{X_{1A} + X_{2A}} = \frac{1}{\frac{X_{1G}}{X_{2G}} e^{-\Delta P} + 1}$$

Unter der Annahme, dass die Vervielfältigungsraten P1 und P2 für das lox6- und das  $\Delta 6$ -Allel während einer Versuchsreihe für die zu untersuchenden DNA-Proben und für die Standard-DNA mit bekannter Ausgangskonzentration gleich sind, kann nun  $\Delta P$  aus den Standard-DNAs errechnet werden (hier sind  $X_{1A}/X_{2A}=1$ ,  $X_{1G}/X_{2G}$  (gemessen) bekannt). Mit diesem  $\Delta P$  können die gemessenen Werte für  $X_{1G}$  und  $X_{2G}$  korrigiert und so die Ausgangskonzentrationen der zu untersuchenden Proben bestimmt werden.

Um den Korrekturfaktor zu testen, nutzen wir den oben beschriebenen Versuch mit unterschiedlichen, aber bekannten Mischungsverhältnissen des lox6- und  $\Delta 6$ -Allels (Siehe Tab. 3.3). Als Standard-DNA nutzen wir die 50:50-Probe und wenden den daraus errechneten Korrekturfaktor auf die restlichen Proben an. Die Qualität des

Korrekturfaktors lässt sich nun anhand der Abweichung von der tatsächlichen Kurve (siehe rote Linie in Abb. 3.5). In der Tat beobachten wir eine deutlich gesteigerte Übereinstimmung.

### 3.3.2. Proteinanalysen

#### 3.3.1. 2D-Großgelelektrophorese

Bei der 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE) werden Proteine anhand von zwei unterschiedlichen Eigenschaften in zwei Dimensionen aufgetrennt: in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (Isoelektrische Fokussierung), in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (SDS-PAGE).

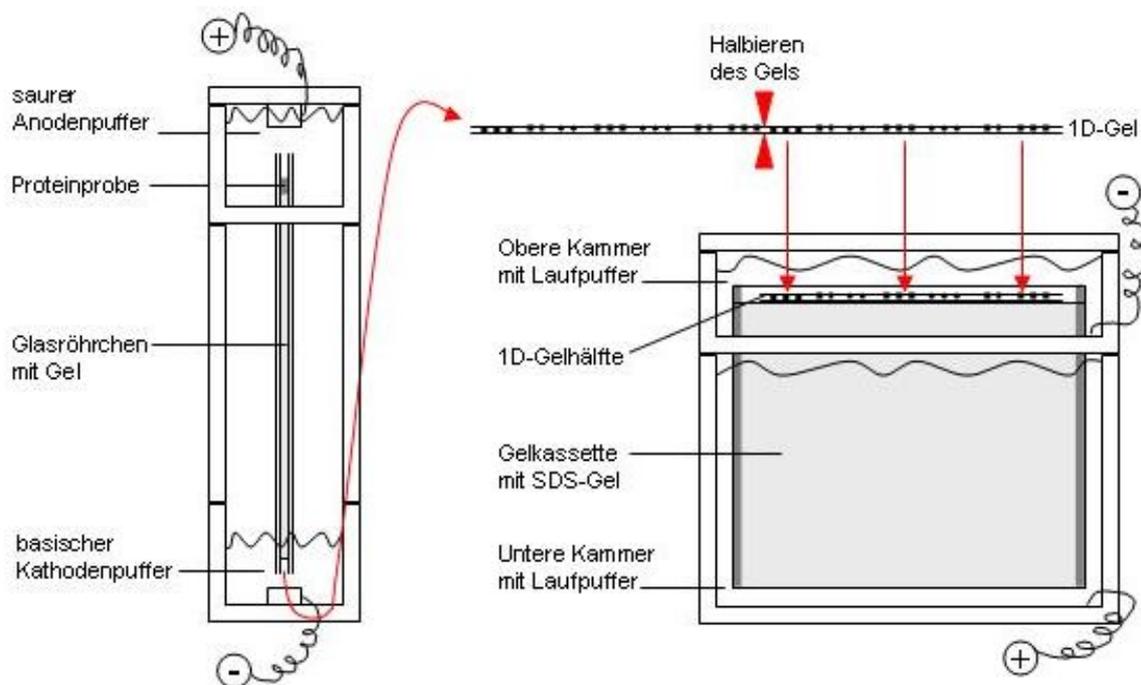


Abbildung 3.6 Versuchsaufbau der 2D-Großgelelektrophorese

Links ist die isoelektrische Fokussierung dargestellt. Das Gel befindet sich in einem Röhrchen. Am oberen Ende wird die Proteinprobe aufgetragen und das Röhrchen an beiden Enden in Puffer getaucht: oben in sauren Anodenpuffer, unten in basischen Kathodenpuffer. Zur Proteinseparation wird eine Spannung angelegt, danach das Gel ausgestoßen und halbiert (siehe Pfeil). Rechts ist die Proteinauftrennung in der zweiten Dimension dargestellt. Jede Hälfte des Gels der IEF wird auf ein SDS-Großgel aufgebracht (siehe Pfeile) und das Gel oben und unten in Puffer getaucht. Durch Anlegen einer Spannung werden die Proteine dann nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt.

Bei der isoelektrisch fokussierenden Elektrophorese wird im Gel ein pH-Gradient aufgebaut, indem ihm eine Ampholytmischung mit unterschiedlichen isoelektrischen

Punkten, hier von pH 2 bis pH 11, beigesetzt wird. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung ordnen sich diese Carrier Ampholyte nach ihrem  $pI$  an und bauen so einen pH-Gradienten auf. Die Proteine werden auf die saure Seite des Gels aufgetragen sind dort protoniert und somit stark positiv geladen. Abhängig von ihrer Ladungsdichte wandern sie im Gel, bis ihre Ladung ausgeglichen ist und fokussieren so auf ihrem proteinspezifischen isoelektrischen Punkt.

In der zweiten Dimension werden die Proteine auf einem SDS-Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Als stark anionisches und denaturierendes Detergenz gleicht SDS die Ladungs- und Strukturunterschiede der Proteine aus und sichert so die Auftrennung der Proteine nach Gewicht unabhängig von anderen Eigenschaften.

Die Methode ist sehr störanfällig und um eine hohe Reproduzierbarkeit zu erreichen, muss das Verfahren hochstandardisiert ablaufen. Die Versuche in dieser Arbeit wurden in den Laboren der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Joachim Klose und streng nach deren Protokoll durchgeführt. Dieses und die verwendeten Produkte sind detailliert in "Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome." [71] beschrieben. Die Aufarbeitung der hierfür verwendeten Leberproben wird in [73] erläutert. Hier werden die wesentlichen Punkte und eventuelle Variationen zusammengefasst.

#### 3.3.1.1. *Probenaufarbeitung für 2D-Großgelelektrophorese*

##### *Verwendete Puffer:*

Puffer P: 0,11M CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio)-propan-sulfonat)  
50mM TRIZMA Base (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)  
50mM KCl  
20% Glycerol

Proteasehemmer 1: 0,014mM Pepstatin A  
0,1M Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

Proteasehemmer 2: eine Tablette Complete (Roche Mannheim)  
2ml Puffer P ohne CHAPS

50-150mg perfundierte und gefrorene Leber wurden mit der 2,5-fachen Menge Puffer P, der 0,28-fachen Menge Hemmer 2 und der 0,07-fachen Menge Hemmer 1 in einem vorgekühlten Mörser auf Stickstoff zermahlen und das Pulver in ein Eppendorfgefäß gefüllt. Es folgte eine Ultraschallbehandlung. Dazu wurden dem Leberpulver Glaskugeln von 2,5mm Durchmesser in der 0,034-fachen Menge des Leberpulvergewichts zugegeben und in einem Ultraschallbad mit Eiswasser sechs Mal für zehn Sekunden mit Ultraschall bestrahlt und zwischendurch 50 Sekunden auf Eis gekühlt. Die Kugeln wurden nach der Ultraschallbehandlung wieder entfernt. Zum DNA-Verdau wurde anschließend Benzonase und Magnesiumchlorid (240mM in Puffer P) in der 0.0025-fachen bzw. 0,0021-fachen Menge zugefügt und 30 min bei 4°C inkubiert. Es folgte die Denaturierung mit Harnstoff und Thioharnstoff in einer Probenendkonzentration von 6,5M und 2,0M bei Raumtemperatur bis der Harnstoff vollständig gelöst war. Diesem Gemisch wurden die 0,1-fache Menge Dithiothreitol und Servalyte pH 2-4 zugegeben und die Proben bis zur 2D-Großgelelektrophorese bei -80°C gelagert.

### 3.3.1.2. Erste Dimension

Für die isoelektrische Fokussierung wurden 40cm lange Gele verwendet. Probeläufe mit 20cm langen Gelen zeigten aufgrund der hohen Proteinkonzentration des Lebergewebes eine unzureichende Auftrennung und somit zu hohe Spotdichte. Analytische Gele für die Spotdetektion hatten einen Durchmesser von 0,9mm, für präparative Gele zur massenspektrometrischen Spotidentifikation betrug er 1,5mm, da hier mehr Protein aufgetragen werden kann. Eine Seite des Gels wurde von einem 0,5cm langen, schützenden Cappel beendet.

Die Gellösungen setzen sich zusammen aus:

Komponente	Separationsgel	Cappel
Acrylamid	3,5% (w/v)	12% (w/v)
PDA	0,3% (w/v)	0,13% (w/v)
Carrier Ampholyt Mix	4% (v/v)	4% (v/v)
Harnstoff	54% (w/v) = 9M	54% (w/v) = 9M
Glyzerin	5% (w/v)	5% (w/v)
TEMED	0,06% (v/v)	0,06% (v/v)
Persulfat	0,02% (w/v)	0,02% (w/v)

Die 40cm langen Separationsgele und das 0,5cm lange Cappel wurden in Glasröhrchen

mit einer 0,9mm bzw. 1,5mm dicken Bohrung gegossen und mussten 30min bei Raumtemperatur, 1h bei 40°C und über Nacht wieder bei Raumtemperatur polymerisieren. Auf der caggelfreien Seite wurde 2mm Sephadexmischung (Sephadex, 2% Carrierampholytmischung, 70mM DTT, 9M Harnstoff) aufgetragen, was die Einwanderung der Probe in das Gel verbessert und unlösliche Probenbestandteile herausfiltert. Darüber wurde die Probe, drei zu eins mit Probenverdünner verdünnt, mit einer Hamiltonspritze aufgetragen; auf 0,9mm dicke Gele wurden 5µl aufgetragen, auf 1,5mm dicke Gele 25µl.

Die Caggelseite des Gels wurde in den basischen Kathodenpuffer gestellt, auf die Probenseite kam der saure Anodenpuffer. Die Elektrophoresepuffer wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und setzten sich wie folgt zusammen:

Anodenpuffer:        0,75M Phosphorsäure  
                              3M Harnstoff

Kathodenpuffer:    0,75M Ethylendiamin  
                              9M Harnstoff  
                              5% Glycerin

Zur IEF wurde eine Spannung angelegt; das Spannungsprofil war wie folgt aufgebaut:

100V	1h
300V	1h
1000V	23h
1500V	30min
2000V	10min

Nach Beendigung der Fokussierung wurden die Gele mit einem Nylonfaden aus den Glasröhrchen ausgestoßen, mittig halbiert, in einer Inkubationslösung (125mM TRIZMA, 40% Glycerol, 65mM DTT, 3% SDS) equilibriert und bei -80°C eingefroren.

### 3.3.1.3. Zweite Dimension

Für die SDS-PAGE wurden 15%ige Polyacrylamidgele von 28cm Länge, 23,2cm Breite und 0,75mm Dicke für analytische Gele, bzw. 1mm Dicke für präparative Gele, verwendet.

Die Gellösung setzte sich wie folgt zusammen:

Acrylamid	15%
Bisacrylamid	0,2%
TEMED	0,03%
SDS	0,1%
TRIZMA Base	375mM
TRIZMA Hydrochlorid	385mM
Persulfat	0,08%

Je eine bei Raumtemperatur aufgetaute 1D-Gelhälfte wurde vorsichtig auf eine Seite des SDS-Gels transferiert und von einer Schicht aus 1%iger Agarose in Laemmlipuffer (s.u.) in Position gehalten. Als Laufpuffer wurde Laemmlipuffer verwendet, der sich wie folgt zusammensetzte:

TRIZMA Base	0,3%
Glycin	1,44%
SDS	0,1%

Dem Anodenpuffer wurde außerdem ein Tropfen Bromphenolblau beigelegt, um das Fortschreiten der Elektrophorese verfolgen zu können. Die Elektrophorese wurde bei 15°C Kühlung mit einer Stromstärke von 65mA bei 0,75mm dicken analytischen Gelen (bzw. 130mA bei 1mm dicken präparativen Gelen) während der ersten 15 Minuten, gefolgt von 75mA (bzw. 150mA bei 1mm dicken Gelen) für 6 bis 7h bis zum Ende der Elektrophorese durchgeführt. Nach dem Lauf wurden die Gele bis zur Färbung in Fixierlösung (s.u.) aufbewahrt.

### 3.3.2. Färbungen

Zum Färben der 2D-Großgele wurden drei verschiedene Methoden verwendet. Zum

einen wurde die sehr sensitive, analytische Silberfärbung für die Auswertung der Gele eingesetzt, basierend auf dem Prinzip von Heukeshoven [74] und modifiziert nach Klose. Diese ist allerdings für die massenspektrometrische Präparation ungeeignet. Hierfür wurden eine Silberfärbung mit Modifikationen nach Giavalisco [75] und eine Coomassiefärbung angewendet.

#### 3.3.2.1. *Analytische Silberfärbung*

Die 2D-Großgele wurden direkt nach der SDS-PAGE in Fixierlösung aus 10% Essigsäure und 50% Ethanol über Nacht fixiert, anschließend in einer Lösung aus 0,5M Natriumacetat, 0,1% Natriumthiosulfat, 30% Ethanol und 0,5% Glutaraldehyd für zwei Stunden inkubiert und zweimal in Milliporewasser gewaschen, bevor sie dann in 0,1% Silbernitratlösung mit 0,01% Formalin für eine Stunde inkubierten. Die Entwicklung der Gele erfolgte nach kurzem Spülen, zuerst in Wasser, dann in 2,5% Natriumcarbonatlösung, in einer Entwicklerlösung mit 2,5% Natriumcarbonat und 0,01% Formalin für 5-10min. Sobald die Spots auf den Gelen die gewünschte Farbintensität hatten, wurde die Entwicklung mit einer 0,05M Triplex-III-Lösung mit 0,02% Thimerosal gestoppt.

#### 3.3.2.2. *Präparative Silberfärbung*

Die Gele wurden wie oben über Nacht in einer Fixierlösung aus 10% Essigsäure und 50% Ethanol fixiert und anschließend 15 Minuten in 30% Ethanol gewaschen. Die Inkubationslösung enthielt hier kein Glutaraldehyd, da dieses die Aldehydgruppen der Proteine vernetzt und eine Extraktion zur Massenspektroskopie erschwert. Inkubiert wurden die Gele hier für eine Minute in einer 0,01%igen Natriumthiosulfatlösung gefolgt von zwei einminütigen Spülungen mit Milliporewasser. Im Anschluss erfolgte die Silbernitratinkubation in einer 0,15%-Lösung für 45 Minuten. Die Entwicklung wurde wie bei der analytischen Silberfärbung durchgeführt. Zum Aufbewahren wurden sie feucht in Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

#### 3.3.2.3. *Kolloidale Commassie-G250-Färbung*

Bei der kolloidalen Commassie-G250-Färbung wurden die Gele nach der Elektrophorese in einer Lösung aus 2% Phosphorsäure und 50% Methanol über Nacht fixiert. Anschließend wurden die Gele in der Färbelösung aus 17% Ammoniumsulfat,

2% Phosphorsäure und 34% Methanol equilibriert und nach einer Stunde 0,66g Coomassie G250 pro Liter zugesetzt. In dieser Lösung verblieben die Gele etwa 5 Tage, bis sie die blaue Farbe angenommen hatten und die Lösung wässrig-klar wurde. Nach der Färbung wurden die Gele in Milliporewasser eine Stunde gewaschen und zum Aufbewahren eingeschweißt.

### 3.3.3. Trocknung

Zur Konservierung und leichteren Handhabung wurden die analytischen 2D-Gele getrocknet. Dies geschah zwischen zwei Zellophanfolien für etwa 2h bei 80°C unter Vakuum in einem zu diesem Zweck modifizierten Trockenschrank.

### 3.3.4. Spoterkennung

Die Gele wurden visuell auf einem Leuchtkasten in Paaren verglichen. Die einzelnen Spots wurden nach drei Kriterien beurteilt: vorhanden/nicht vorhanden, stärker exprimiert/schwächer exprimiert und Änderung des isoelektrischen Punktes oder Molekulargewichtes, was mit einem Shift des Spots einhergeht.

### 3.3.5. Spotidentifikation mit Massenspektrometrie

Die derzeit gängigste und auch hier verwendete Methode zur Identifikation von Proteinen ist die Peptidmassenfingerabdruckanalyse durch Massenspektrometrie. Die Proteine werden von einem proteolytischen Enzym an spezifischen Stellen in Peptidfragmente gespalten, ihre Masse bestimmt und diese gegen ein Spektrum von Massen theoretisch möglicher Peptidfragmente, die aus Datenbanken mit bekannten Proteinsequenzen errechnet werden, abgeglichen.

Das Prinzip der Massenspektroskopie beruht darauf, dass Ionen in einem magnetischen oder elektrischen Feld massenabhängig ihre Flugbahn ändern. Die zu untersuchende Probe wird im Massenspektrometer verdampft, auf verschiedene Arten ionisiert und durch einen Analysator nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis aufgetrennt und detektiert. Durch den Vergleich der Massen mit entsprechenden Daten ergibt sich ein so genannter charakteristischer Fingerabdruck (*peptide mass fingerprint*). So ist der qualitative und quantitative Nachweis von Proteinen möglich und die Auswertung wird mit Hilfe von Datenbanken und Massenspektrenbibliotheken

ermöglicht.

In dieser Arbeit wurden sowohl MALDI-TOF-MS (*matrix assistet laser dissorption/ionisation – time of flight - mass spectrometry*) als auch ESI-MS (*electronspray ionisation - mass spectrometry*) verwendet.

Die für die Massenspektrometrie gefärbten Gele werden nach der Färbung nicht getrocknet. Die relevant veränderten Spots werden manuell mit einem Ausstanzer unter Wasser herausgestochen und einzeln in Eppendorfgefäße zur weiteren Analyse gegeben. Alle anschließenden Vorgänge der Proteinidentifikation mit Hilfe der Massenspektrometrie wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Joachim Klose, Institut der Humangenetik, Charité – Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt.

#### 3.3.5.1. *In-Gel-Trypsinverdau*

Beim In-Gel-Trypsinverdau werden die Proteine zum einen aufgereinigt und so Rückstände der Gelelektrophorese und Färbung entfernt, zum anderen werden sie tryptisch verdaut, wobei das Enzym Trypsin die Proteine an spezifischen Stellen, nämlich C-terminal der Aminosäuren Arginin und Lysin, in Peptidfragmente schneidet.

Zum Entfernen von Salzen und Detergenzien werden die Spots sechs Mal abwechselnd in 100µl Azetonitril und 100µl 100mM Ammoniumbicarbonat für jeweils 10 min bei 37°C inkubiert und die Gelstücke anschließend vakuumgetrocknet. In einer Trypsinlösung aus 12,5ng/µl Trypsin in 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> werden sie dann über Nacht bei 37°C verdaut.

#### 3.3.5.2. *MALDI-TOF*

Die MALDI-TOF-Analysen wurden mit *Anchor Chip* Technologie durchgeführt. Die *Anchor Chips* haben hydrophobe Stellen (Anker) an denen die ebenfalls vergleichsweise hydrophoben Peptidanalysate akkumulieren. Hierfür wurden 1,5µl *Matrix Material 2,5-Dihydroxybenzolsäurelösung* (3,3mg/ml DHB in 90% Aceton und 0,05% Triflouracetonsäure) mit 1,5ml Probe vermischt und auf die *Anchore Plates* zur Kokristallisation gegeben. MALDI-TOF Massenspektren wurden dann mit einem Bruker Reflex IV MALDI-TOF Massenspektrometer gemessen, und zwar im Reflektormodus,

um eine möglichst hohe Massenauflösung zu erreichen. Es wurden Signale mit einem Masse/Ladungsverhältnis von 0 bis 3500 detektiert. Jedes Massenspektrum ergab sich aus der mittleren Summe von 50-100 Laserstrahlen (Stickstofflaser, 337nm). Eine interne Kalibrierung, die monoisotope Produkte des Trypsinselbstverdaus berücksichtigt, wurde bei jeder Messung durchgeführt.

#### 3.3.5.3. ESI

In dieser Arbeit wurde die *Nano-Electrospray Ionisation* in Kombination mit der *Reversed Phase High Pressure Chromatographie* (HPLC) verwendet. Vorgefertigte C-18-Säulen wurden mit 10µl der Probe befüllt. Die Auftrennung der Peptide wurde durch einen Gradienten mit 2-50% Acetonitril und 0,1% Methansäure bei einer Flussrate von 0,2µl/min durchgeführt. Nach dieser HPLC Auftrennung wurde eine Spannung von 1000 bis 1200V angelegt und die Probe so versprüht und ionisiert.

#### 3.3.5.4. Datenbankanalysen

Zur Analyse der gemessenen Peptidmassenspektren wurden Datenbanken nach korrespondierenden Proteinen durchsucht. Hierzu wurden die MS-Ergebnisse mit theoretisch errechneten Verdauprodukten aus Datenbanken (NCBI nr) mit Hilfe der Suchmaschine Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) verglichen. Vor der Mascot-Suche wurden mehrere Parameter festgelegt, wie untersuchte Spezies (Maus), verwendete Protease (Trypsin), Anzahl versäumter Trypsinspaltungen (eine), Massenabweichung (1.0 Da) und mögliche Peptidmodifikationen (z.B. Oxidation von Methionin). Ein Protein wurde als direkt identifiziert beurteilt, wenn wenigstens vier der gemessenen Peptide dem theoretischen Verdau entsprachen und die Irrtumswahrscheinlichkeit nach dem Mowse Score  $p < 0,05$  war. Unter Berücksichtigung der Spothomologie beim Gelvergleich, wurden Proteine, die in einem Gelspot gefunden wurden, auf homologe Spots anderer Gele übertragen.

## 4. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es in Mäusen eine homozygote Nullmutation des Nbn-Gens zu induzieren und deren Auswirkungen zu untersuchen. Als Zieltiere wurden hierfür  $\text{Nbn}^{\text{ins6/lox6}}$ -Mäuse verwendet. Diese hatten bereits ein nullmutantes Allel ( $\text{Nbn}^{\text{ins6}}$ ), im anderen ( $\text{Nbn}^{\text{lox6}}$ ) wurde durch Deletion von Exon6 die Nullmutation ( $\text{Nbn}^{\Delta 6}$ ) induziert. Als Kontrollen wurden  $\text{Nbn}^{\text{wt/lox6}}$ -Mäuse verwendet, bei denen durch Exon6-Deletion heterozygote Nbn-Defizienz ( $\text{Nbn}^{\text{wt}/\Delta 6}$ ) induziert wurde.

Die Beschreibung der Ergebnisse gliedert sich in zwei Teile: Der erste umfasst die Ergebnisse aus der Effizienzuntersuchung der plpC-induzierten Exon6-Deletion und das Überleben nullmutanter Zellen in verschiedenen Geweben in vivo mittels semiquantitativer PCR. Der zweite beschreibt die Ergebnisse aus der Proteomanalyse Nbn-defizienten Lebergewebes mit 2D-Großgelelektrophorese.

### 4.1. DNA-Analysen

#### 4.1.1. Effizienz der Exon6-Deletion in unterschiedlichen Organen

Davon ausgehend, dass heterozygote Zellen keinen Überlebensnachteil haben, wurde die Effizienz der Exon6-Deletion in induziert heterozygoten Mäusen untersucht. Hierzu wurde die Cre-Rekombinaseexpression und somit die Deletion des  $\text{Nbn}^{\text{lox6}}$ -Allels in Mäusen induziert, indem Kontrolltiere ( $\text{Nbn}^{\text{wt/lox6}}$ ) drei Mal im Abstand von 2 Tagen mit plpC gespritzt wurden. Am 14. Tag nach der ersten Applikation wurde DNA aus verschiedenen Organen extrahiert und mittels semiquantitativer PCR die Fraktion Exon6-deletierter Zellen bestimmt. Eine Übersicht über die Ergebnisse geben die blauen Balken in Abb.4.1.

Es zeigt sich, dass die verschiedenen Organe unterschiedlich hohe Exon6-Deletionraten haben. In Knochenmark (100% Exon6-deletierte Zellen), Thymus (98,4%) und Leber (96,8%) ist die Deletion des  $\text{Nbn}^{\text{lox6}}$ -Allels komplett oder nahezu komplett. Auch in Milz ist die Deletionseffizienz mit 76,7% Exon6-deletierter Zellen hoch, während in Niere (39,2%) und Muskel (30,1%) nur noch etwa ein Drittel der Zellen Exon6-deletiert sind. Deutlich niedriger fällt die Exon6-Deletion in Testes und Gehirn aus. Hier

sind mit 16,1% und 1,9% kaum noch Exon6-deletierte Zellen nachzuweisen.

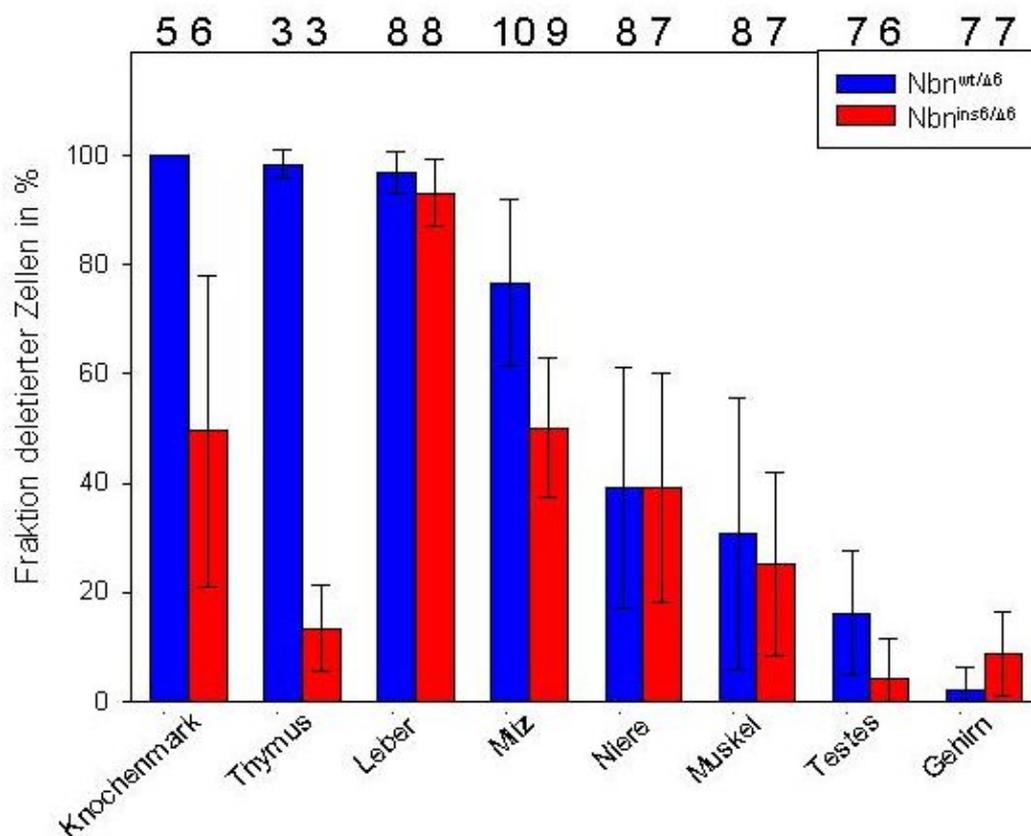


Abbildung 4.1 Nbn-Exon6-Deletion in verschiedenen Organen

Anteil deletierter Zellen in induziert nullmutanten und induziert heterozygoten Mäusen nach dreimaliger plpC-Applikation. In blau ist der Anteil Exon6-deletierter und somit heterozygoter Zellen in Kontrolltieren ( $Nbn^{wt/\Delta 6}$ ) angegeben. In rot ist der Anteil Exon6-deletierter und somit nullmutanter Zellen in induziert nullmutanten Tieren ( $Nbn^{ins6/\Delta 6}$ ) angegeben. Die Fehlerbalken geben die Varianz der Ergebnisse innerhalb eines Organs an. Die Zahl über den Balken gibt die Anzahl der jeweils untersuchten Organe an.

4.1.2. Überleben homozygot Nbn-nullmutanter Zellen in verschiedenen Organen  
 Das Überleben Nbn-nullmutanter Zellen wurde in heterozygot nullmutanten  $Nbn^{ins6/lox6}$ -Mäusen untersucht, die nach plpC-Applikation zu homozygot nullmutanten  $Nbn^{ins6/\Delta 6}$ -Mäusen mutieren. Wie in 4.1.1 wurde in den Tieren der Anteil Exon6-deletierter und somit Nbn-nullmutanter Zellen nach dreimaliger Applikation von plpC bestimmt. Um die organspezifische Deletionseffizienz zu berücksichtigen wurden diese Ergebnisse mit  $Nbn^{wt/lox6}$ -Kontrollmäusen, die zu heterozygoten  $Nbn^{ins6/\Delta 6}$ -Mäusen deletieren, verglichen. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Abb. 4.1 dargestellt.

Der Vergleich der Anteile induziert nullmutanter und induziert heterozygoter Zellen zeigt in den unterschiedlichen Organen kein homogenes Bild. Genauer betrachtet, lassen sich die Gewebe in zwei Gruppen einteilen: In einigen Organen ist die Fraktion Exon6-deletierter Zellen von induziert nullmutanten Tieren und induziert heterozygoten Kontrollen vergleichbar, in anderen Organen wiederum differiert die Deletion des Nbn<sup>lox6</sup>-Allels deutlich zwischen Zieltieren und Kontrollen.

Sehr ähnlich wie in den Kontrollen ist die Deletion des Nbn<sup>lox6</sup>-Allels in Leber, Niere und Muskel. In Leber sind mit 93,1% nullmutanter Zellen nur 3% weniger Exon6-deletiert als in den Kontrollen. In Niere sind sowohl in Zieltieren als auch Kontrollen 39% der Zellen Exon6-deletiert. In Muskel sind mit 25,2% nullmutanter Zellen etwa 5% weniger Zellen Exon6-deletiert als in den Kontrollen. Diese Ergebnisse sind statistisch nicht signifikant.

In Milz, Knochenmark und Thymus der Zieltiere ist die Fraktion Exon6-deletierter Zellen hingegen deutlich niedriger als in den Kontrollen. In Milz sind in den Zieltieren etwa 50,1% nullmutante Zellen nachzuweisen; der Unterschied zu den Kontrollen ist mit 26,7% weniger Exon6-deletierter Zellen noch recht dezent, aber hochsignifikant (T-Test:  $p=0,00074$ ). In Knochenmark sind dagegen statt der 100% Exon6-deletierten Zellen in den Kontrollen mit 49,57% nur noch die Hälfte nachweisbar (T-Test:  $p=0,00350$ ). Noch eindrucksvoller ist dieses Phänomen im Thymus, wo die Kontrollen mit 98,41% das Nbn-Exon6 ebenfalls fast vollständig deletieren, während in den Zieltieren lediglich 13,42% der Zellen Exon6-deletiert sind (T-Test:  $p=0,000057$ ). In Thymus, Milz und Knochenmark zeigt sich also ein deutlicher Unterschied in der Exon6-Deletionsrate zwischen Zieltieren und Kontrollen. Nullmutante Zellen werden in diesen Organen signifikant weniger nachgewiesen.

Testes und Gehirn lassen sich nicht eindeutig beurteilen. In Testes sind mit 4,3% nullmutanter Zellen 11,8% weniger Zellen Exon6-deletiert als in den Kontrollen. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant (T-Test  $p=0,0511$ ). Der Anteil Exon6-deletierter Zellen in Gehirn ist sowohl in Zieltieren (8,7%) als auch in den Kontrollen (2,1%) sehr gering. Das Überleben der nullmutanten Zellen lässt sich daher in diesen Organen nicht beurteilen.

### 4.1.3. Kinetik

Um das Phänomen, dass nullmutante Zellen in den verschiedenen Organen unterschiedlich gut überleben, genauer zu untersuchen, wurde das Deletionsverhalten einiger Organe im Verlauf der Zeit nach Induktion der Cre-Rekombinaseexpression untersucht. Zum einen wurde Lebergewebe, als ein Organ mit besonders hoher und sowohl in Kontrollen als auch Zieltieren konstanter Nbn-Exon6-Deletion, untersucht, zum anderen Thymusgewebe, in dem der Unterschied zwischen Zieltieren und Kontrollen am höchsten war. Außerdem wurde Milzgewebe untersucht, bei dem Ziel- und Kontrolltiere ebenfalls ein unterschiedliches Deletionsverhalten zeigen, der Unterschied jedoch nicht so ausgeprägt ist.

Die Deletion des Nbnlox6-Allel wurde induziert indem die Tiere ebenfalls drei Mal im Abstand von zwei Tagen gespritzt, und zwar an den Tagen 0, 2 und 4. In Leber, Milz und Thymus wurde zu fünf Zeitpunkten in je zwei Kontroll- und Zieltieren die Fraktion deletierter Zellen gemessen, nämlich an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 9. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 4.2 schematisch dargestellt.

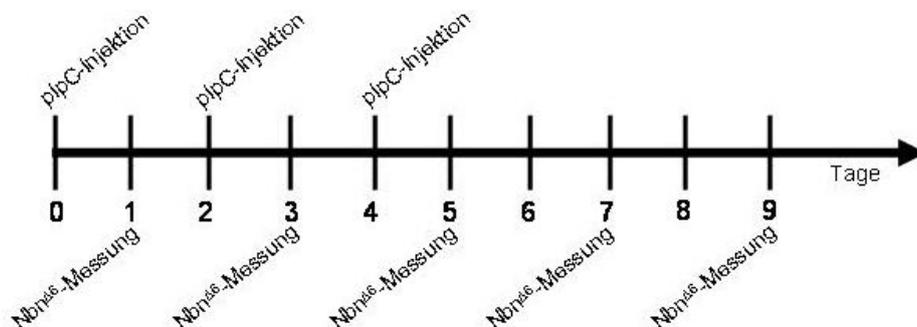


Abbildung 4.2 Aufbau des Kinetikversuches

plpC wurde an den Tagen 0, 2 und 4 injiziert. Die Fraktion der Nbn-Zellen wurde in verschiedenen Organen an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 9 gemessen.

#### 4.1.3.1. Leber

In den Kontrolltieren der Leber sind am ersten Messtag im Durchschnitt 47,62% Exon6-deletierte Zellen nachzuweisen. Die Varianz zwischen den beiden Tieren ist zu diesem Zeitpunkt mit 80% und 15,2% allerdings erheblich. Schon am zweiten Messtag, Tag 3 nach Cre-Rekombinaseinduktion, sind 88,1% der Zellen deletiert, an Tag 5 bereits 95,9%. Obwohl jetzt kein plpC mehr injiziert wird, bleiben die Deletionswerte an den

folgenden Messtagen 7 und 9 mit 90,6% und 98,8% recht stabil und hoch.

In den induziert nullmutanten Zieltieren sind schon am ersten Tag nach der ersten Cre-Rekombinaseinduktion 87,8% der Zellen homozygot nullmutant. Dies steigert sich an den folgenden Tagen nach Cre-Rekombinaseinduktion mit 92,7% an Tag 3 und 95,8% an Tag 5 nur noch wenig. Auch in den Zieltieren bleibt die Fraktion Nbn-Exon6-deletierter Zellen nach Absetzen der plpC-Injektionen mit 92,8% und 97,5% konstant hoch.

In Lebergewebe kann sowohl in Zieltieren als auch in Kontrollen schon bald nach Induktion der Cre-Rekombinaseexpression eine sehr hohe Zahl Exon6-deletierter Zellen nachgewiesen werden, die sich dann nur wenig steigert und auch nach Cre-Rekombinaseexpression anhält.

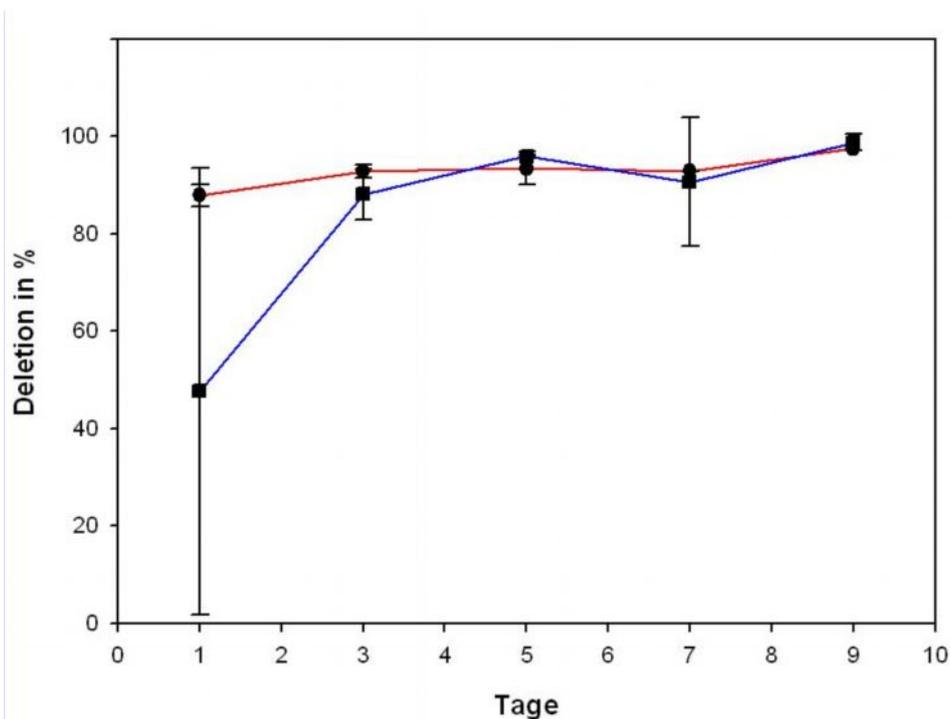


Abbildung 4.3 Kinetik der Exon6-Deletion in Lebergewebe

Zu jedem Messzeitpunkt werden je zwei Ziel- und Kontrolltiere untersucht. Die blaue Kurve gibt den Anteil deletierter und somit heterozygoter Zellen in Kontrolltieren an. Die rote Kurve gibt den Anteil deletierter und somit nullmutanter Zellen in Zieltieren an. Die Fehlerbalken geben die Varianz zum jeweiligen Messzeitpunkt an.

#### 4.1.3.2. Thymus

Im Thymusgewebe der Kontrolltiere ist der Anteil deletierter Zellen am ersten Tag nach Induktion der Cre-Rekombinaseexpression mit 19% vergleichsweise gering. In den folgenden Tagen steigert er sich aber stetig auf 41,3% an Tag 3 und 55,8% an Tag 5. Auch nach Absetzen der plpC-Injektionen erhöht sich die Fraktion deletierter Zellen auf 65,6 an Tag 7 und 79% an Tag 9.

Am ersten Tag ist auch im Thymus der Zieltiere die Deletionsrate mit 12,3% niedrig. In den beiden folgenden Tagen steigt sie aber auf 29,9% an Tag 3 und erreicht schließlich ihren Maximalwert von 70.1% an Tag 5. An den folgenden Tagen, an denen die Cre-Rekombinaseexpression nicht mehr induziert wird, zeigt sich ein deutlicher Unterschied zum Thymusgewebe der Kontrolltiere. In den Zieltieren sinkt der Anteil deletierter Zellen nun deutlich auf 49,1% an Tag 7 und schließlich 38,4% an Tag 9 ab.

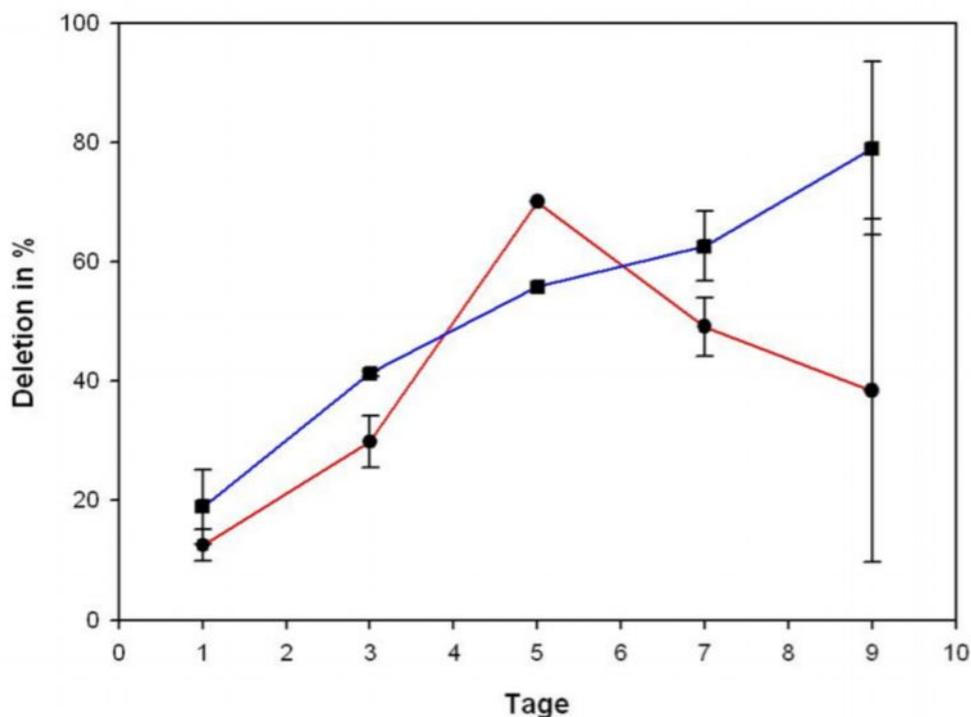


Abbildung 4.4 Kinetik der Exon6-Deletion in Thymusgewebe

Zu jedem Messzeitpunkt werden je zwei Ziel- und Kontrolltiere untersucht. Die blaue Kurve gibt den Anteil deletierter und somit heterozygoter Zellen in Kontrolltieren an. Die rote Kurve gibt den Anteil deletierter und somit nullmutanter Zellen in Zieltieren an. Die Fehlerbalken geben die Varianz zum jeweiligen Messzeitpunkt an.

Zieltiere und Kontrollen zeigen beide in den ersten Tagen mit dem kontinuierlichen Anstieg der Fraktion Nbn-Exon6-deletierter Zellen ein ähnliches Deletionsverhalten. Nachdem keine Cre-Rekombinaseexpression mehr induziert wird, unterscheiden sie sich jedoch deutlich. Während in den Kontrollzellen ein stetiger Anstieg des Anteils Exon6-deletierter Zellen nachgewiesen werden kann, sinkt dieser bei den Zieltieren deutlich ab.

#### 4.1.3.3. Milz

In Milzgewebe von Kontrolltieren sind am ersten Tag nach Induktion der Cre-Rekombinaseexpression 35,3% deletierte Zellen nachzuweisen. Dies steigert sich an den folgenden Tagen 3 und 5 nach plpC-Injektion auf 44,8% und 69,9%. Trotzdem die Cre-Rekombinaseexpression in den folgenden Tagen nicht mehr induziert wird, steigt der Anteil Exon6-deletierter Zellen der Milz weiter auf 96,9% an Tag 7, bis schließlich an Tag 9 100% der Zellen deletiert sind. Im Milzgewebe induziert nullmutanter Zieltiere sind am ersten Tag 62,1% der Zellen deletiert, deutlich mehr als in den Kontrolltieren. Am 3.Tag ist die Fraktion deletierter Zellen mit 55,3% etwas niedriger, steigt aber am 5. Tag bis auf 78,8%. Sobald allerdings in den Zieltieren keine Cre-Rekombinaseexpression mehr induziert wird, fällt sie am 7. Tag auf 47,2% ab. Am 9. Tag sind es 60,3%.

Das Deletionsverhalten der Milzzellen von Kontrolltieren ist dem der Kontrollthymuszellen sehr ähnlich. Auch in den Zieltieren lässt sich die gleiche Tendenz eines primären Anstieges der deletierten Zellen unter Cre-Rekombinase und einer Abnahme der nullmutanten Zellen sobald Cre-Rekombinaseexpression nicht mehr induziert wird.

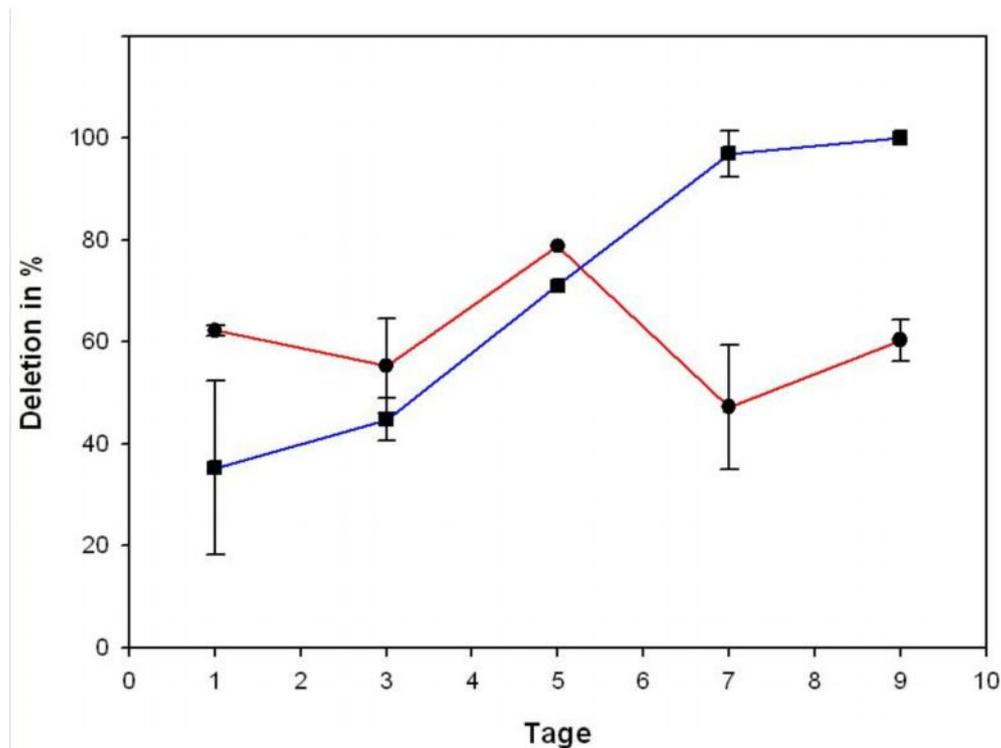


Abbildung 4.5 Kinetik der Exon6-Deletion in Milzgewebe

Zu jedem Messzeitpunkt werden je zwei Ziel- und Kontrolltiere untersucht. Die blaue Kurve gibt den Anteil deletierter und somit heterozygoter Zellen in Kontrolltieren an. Die rote Kurve gibt den Anteil deletierter und somit nullmutanter Zellen in Zieltieren an. Die Fehlerbalken geben die Varianz zum jeweiligen Messzeitpunkt an.

#### 4.1.4. Backgroundrekombination

Bei der hier verwendeten Maus soll Exon 6 des NBN-Gens nur deletiert werden, wenn die Maus mit plpC behandelt wird und so die Cre-Rekombinaseexpression über die Aktivierung des Mx1-Promoters induziert wird. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Cre-Rekombinase auch ohne gezielte Behandlung der Tiere exprimiert wird und so nichtinduzierte Exon6-Deletion stattfindet. Zur Untersuchung dieser so genannten Backgroundrekombination wurde der Anteil Exon6-deletierter Zellen in verschiedenen Organen ohne vorherige Behandlung der Mäuse mit plpC bestimmt. Hierzu wurde DNA aus den Organen von zwei Zieltiere ( $Nbn^{ins6/lox6}$ ) und zwei Kontrollen ( $Nbn^{wt/lox6}$ ) extrahiert und mit semiquantitativer PCR analysiert. In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse der verschiedenen Organe dargestellt.

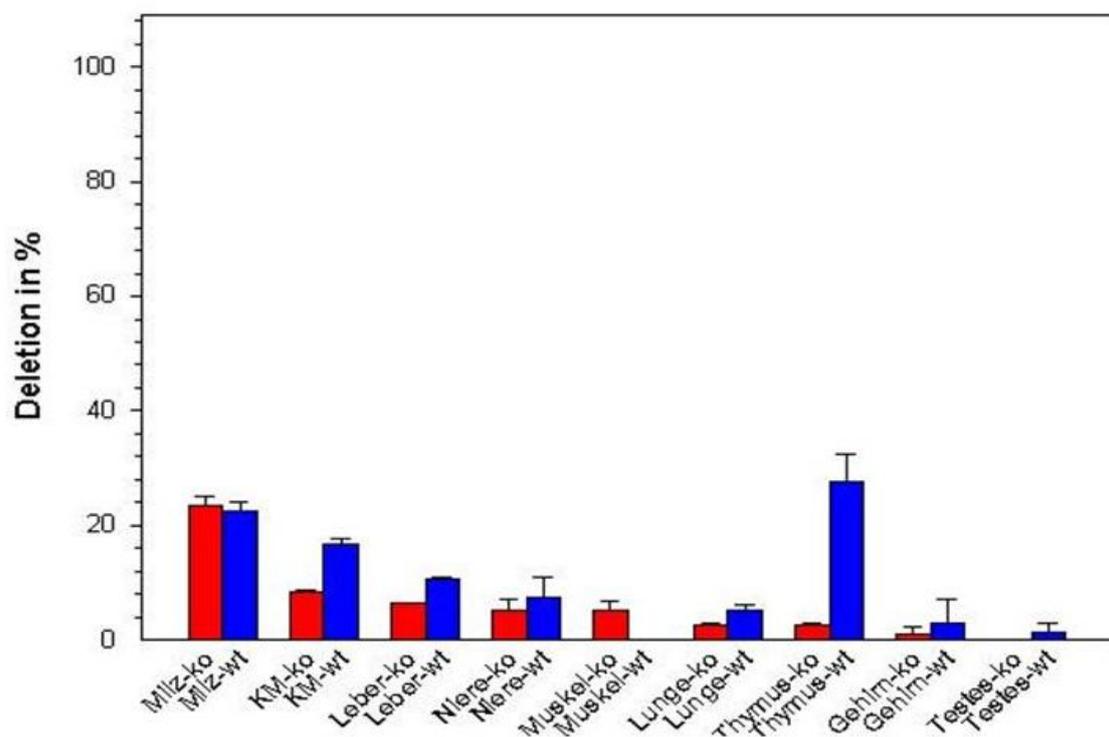


Abbildung 4.6 Backgroundrekombination

Anteil Exon6-deletierter Zellen in Zieltieren und Kontrollen ohne vorangegangene plpC-Applikation. In blau ist der Anteil deletierter und somit heterozygoter Zellen in Kontrolltieren ( $Nbn^{wt/\Delta 6}$ ) angegeben. In rot ist der Anteil deletierter und somit nullmutanter Zellen in Zieltieren ( $Nbn^{ins6/\Delta 6}$ ) angegeben. Exon6-Deletion wurde in Organen von je zwei Ziel- und Kontrolltieren untersucht. Die Fehlerbalken geben die Varianz der Ergebnisse innerhalb eines Organs an.

Im Vergleich zu den unter 4.1.1 und 4.1.2 beschriebenen Ergebnissen ist die Exon6-Deletion ohne vorherige Induktion der Cre-Rekombinase in allen Geweben deutlich niedriger. Der höchste Anteil Exon6-deletierter Zellen findet sich mit 27,8% im Thymusgewebe der Kontrolltiere, gefolgt von Milz und Knochenmark der Kontrolltiere mit 23,3% und 16,7% Exon6-deletierter Zellen. In Thymus und Knochenmark zeigt sich außerdem der schon in 4.1.2 beschriebene deutliche Unterschied der Deletionsrate in Kontroll- und Zieltiergewebe: in Thymus findet man in Zieltieren lediglich 2,6% Exon6-deletierte Zellen, 25,2% weniger als in den Kontrollen, in Knochenmark sind mit 8,2% nur etwa halb viele deletierte Zellen nachzuweisen. In Milz ist dieser Effekt nicht zu sehen. In den übrigen Organen ist der Anteil Exon6-deletierter Zellen in Kontroll- und Zieltieren der einzelnen Gewebe etwa gleich hoch und immer unter 10%.

## 4.2. Proteomuntersuchung

Um die Auswirkungen des Verlustes von Nibrin auf zellulärer Ebene genauer zu untersuchen, wurde eine Analyse des Proteoms in Nbn-defizientem Gewebe durchgeführt. Hierfür wurde Lebergewebe ausgewählt, da dieses eine sehr hohe und konstante Exon6-Deletionsrate hat. Auch ist Leber für Proteomanalysen besonders gut geeignet, da es ein sehr homogenes Gewebe mit wenigen interindividuellen Proteinunterschieden ist.

Um die Variabilität zwischen induziert nullmutanten Tieren und Kontrollen möglichst gering zu halten, haben in den folgenden Versuchen die Tiere beider Gruppen ein Nbn-Exon6-deletiertes Allel, damit mögliche Veränderungen des Proteoms, die als Reaktion auf die plpC-Injektionen entstehen, in beiden Gruppen auftreten und nicht als Folgeerscheinung der Nibrindefizienz fehlgedeutet werden. Verglichen wurde daher induziert nullmutantes Gewebe ( $\text{Nbn}^{\text{ins6}/\Delta 6}$ ) mit induziert heterozygotem Gewebe ( $\text{Nbn}^{\text{wt}/\Delta 6}$ ). Hierzu wurde in  $\text{Nbn}^{\text{ins6}/\text{lox6}}$ -Tieren und Kontrollen ( $\text{Nbn}^{\text{wt}/\text{lox6}}$ ) zwei Wochen vor Gewebeentnahme die Exon6-Deletion durch dreimalige plpC-Injektionen (s. Abb 3.1 und 4.1) induziert. Für die Proteomuntersuchungen wurden nur Tiere mit mindestens 90% Nbn-Exon6-deletierten Leberzellen verwendet.

Da die hier untersuchten Mäuse eine Kreuzung aus C57BL/6- und 129/Sv-Mäusen sind, können stammesbedingte Unterschiede des Proteoms leider nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher wurden die differentiell exprimierten Spots mit Gelen von Lebern aus C57BL/6- und 129/Sv-Mäusen verglichen. Spots, die auch in diesen Gelen differierten wurden als rassenspezifische Proteinunterschiede gewertet und nicht als Folge der Nibrindefizienz.

### 4.2.1. Untersuchung des Proteoms der Leber unbestrahlter Mäuse

Von Lebergewebe aus je drei induziert nullmutanten und drei Kontrolltieren wurden 2D-Großgele angefertigt und diese paarweise verglichen. Das Spotmuster wurde auf die Kriterien Vorhandensein, Intensitäts- und Positionsveränderungen der Spots untersucht. Berücksichtigt wurden nur Unterschiede, die in allen drei Paaren auftraten.

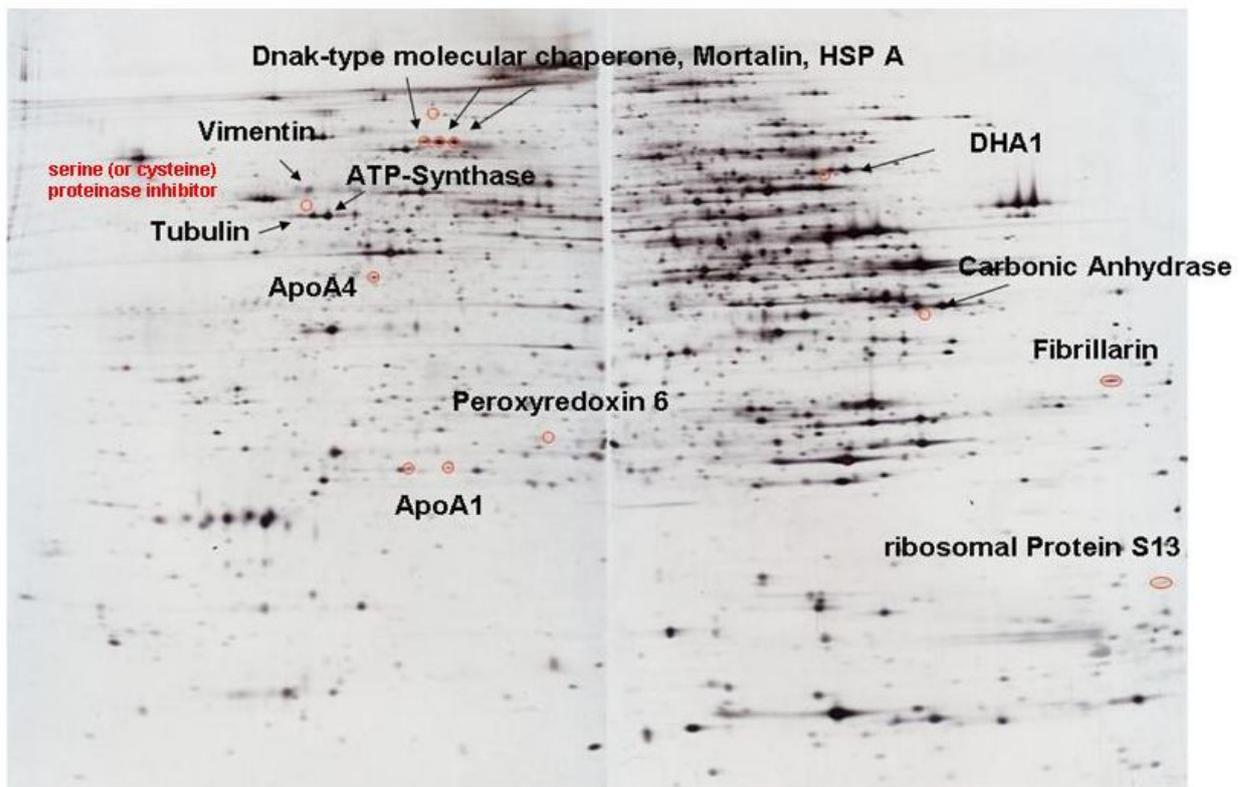


Abbildung 4.7 2D-Großgel mit veränderten Spots in unbestrahlter Leber

Im Gel sind alle differentiell exprimierten Proteinspots beim Vergleich von unbestrahlten heterozygoten und nullmutanten Mäusen eingezeichnet. Die veränderten Spots sind durch rote Kreise markiert und mit den in der Massenspektrometrie identifizierten Proteinen beschriftet. Proteine, die eher auf Rassenunterschiede zurückzuführen sind, sind in schwarzer Schrift, eher krankheitsrelevante Proteine in roter Schrift.

Insgesamt konnten beim Vergleich der Gele beider Gruppen 11 Spots als differentiell exprimiert identifiziert werden, von denen in den induziert Nullmutanten sechs stärker exprimiert waren, fünf weniger stark. Sie wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert und sind in einem Beispielgel in Abb. 4.7 eingezeichnet. Beim Vergleich mit den Gelen von C57BL/6- und 129/Sv-Mäusen zeigte sich allerdings, dass 10 dieser Proteine auch hier differentiell exprimiert sind. Diese 10 Proteine sind somit als Rassenunterschiede zu werten. Ein Protein unterscheidet sich nicht in C57BL/6- und 129/Sv-Mäusen. Dieses ist Serine (or cysteine) Proteinase Inhibitor.

#### 4.2.2. Vergleich des Leberproteoms aus Mäusen nach Bestrahlung

Ein charakteristisches Merkmal von Zellen aus NBS-Patienten ist ihre Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung. Daher wurde in dieser Arbeit auch die Reaktion

Nbn-defizienter Mäuse auf  $\gamma$ -Strahlung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung untersucht. Zieltiere und Kontrollen wurden mit 4 Gy bestrahlt und das Proteom des Lebergewebes in je zwei Zieltieren und Kontrollen nach 30 min, 2h und 24h aufgearbeitet. Um die nichtkrankheitsspezifische Variabilität des Proteoms zwischen den Mäusen noch weiter zu minimieren, wurden hier nur Mäuse, gleichen Geschlechts und Alters verwendet, nämlich 3 Monate alte Männchen.

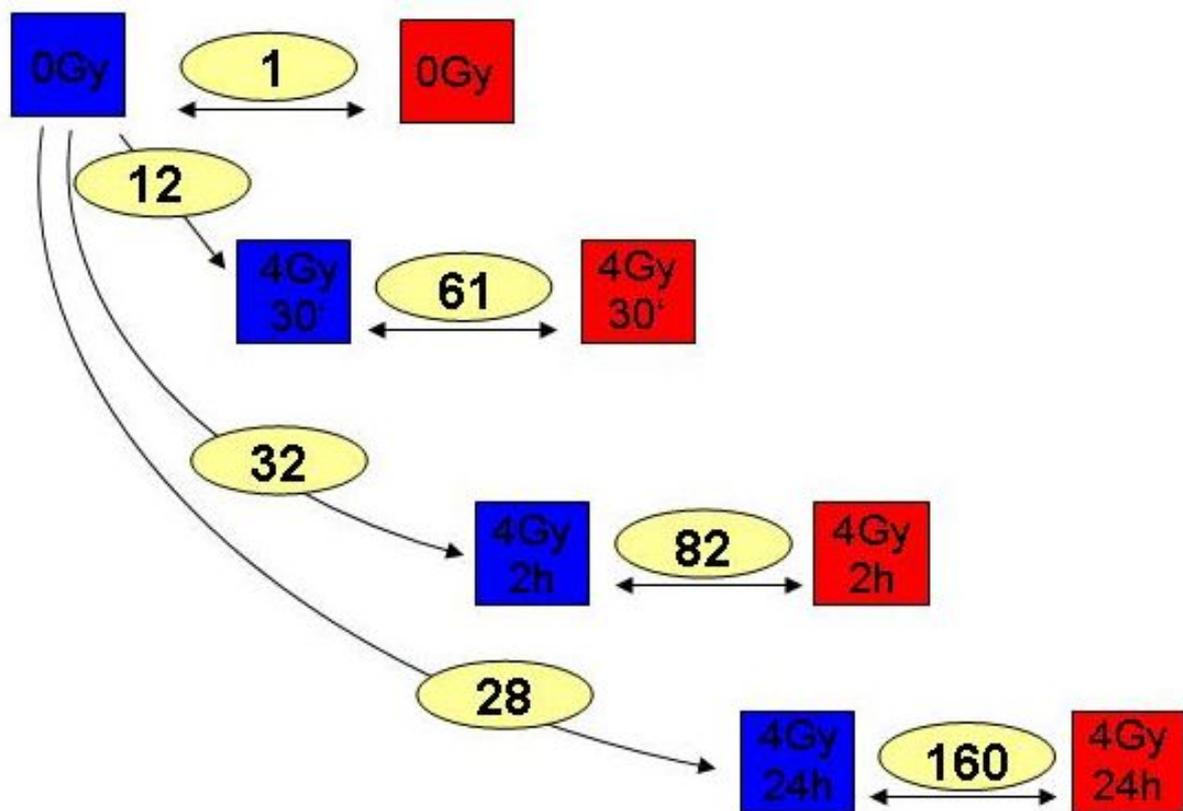


Abbildung 4.8 Schema zur Auswertung der 2D-Gele nach Bestrahlung

Rote Quadrate kennzeichnen Gele von Lebern aus induziert nullmutanten  $Nbn^{ins6/\Delta6}$ -Mäusen, blaue Quadrate Gele von Lebern aus induziert heterozygoten  $Nbn^{wt/\Delta6}$ -Kontrollmäusen. In den Quadraten ist die Bestrahlungsdosis angegeben und wie lange nach Bestrahlung das Lebergewebe aufgearbeitet wurde. Pfeile geben an, welche Gele verglichen wurden. Die Zahlen in den ovalen Feldern über den Pfeilen geben an, wie viele Spots beim Vergleich der Gele verändert waren.

Insgesamt wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten 266 (179 sauer, 67 basisch) differentielle Spots identifiziert. Ein Beispiel für Spotveränderungen ist in Abb. 4.9 dargestellt.

Zunächst wurde die Reaktion von heterozygotem Kontrollgewebe auf Bestrahlung untersucht. Dabei sind 30min nach Bestrahlung im Vergleich zu unbestrahltem Gewebe 12 Spots verändert. 2h nach Bestrahlung sind es bereits 32. Davon waren 9 Spots bereits 30min nach Bestrahlung verändert, 23 Spotveränderungen sind neu aufgetreten. 3 der nach 30min veränderten Spots haben sich nach 2h wieder zurückgebildet. Nach 24h sind im Vergleich zu unbestrahltem Gewebe nur noch 28 Spots verändert, wovon 19 Spots schon zu früheren Zeitpunkten verändert waren. 9 Spots waren bereits nach 30min und 2h und somit zu allen drei Zeitpunkten nach Bestrahlung verändert. 10 Spots zeigten erst 2h nach Bestrahlung eine Veränderung. 13 der zuvor veränderten Spots haben sich zurückgebildet und sind wieder wie in unbestrahltem Gewebe exprimiert, 8 Spotveränderungen sind neu aufgetreten. Eine Spotveränderung ist nach 30min und 24h aufgetreten, nach 2h hatte sie sich zwischenzeitlich zurückgebildet.

Das Maximum veränderter Spots findet sich in heterozygoten Mäusen also 2h nach Bestrahlung. 24h nach Bestrahlung haben sich ein großer Teil der Spotveränderungen wieder zurückgebildet und es kommen wenig neue Spotveränderungen hinzu.

Im Nbn-nullmutanten Lebergewebe sind insgesamt deutlich mehr Proteine verändert als im heterozygoten Kontrollgewebe. Verglichen wurden die homozygot Nbn-defizienten Gele der verschiedenen Zeitpunkte mit den jeweiligen heterozygoten Kontrollgelen zum selben Zeitpunkt. Bereits 30min nach Bestrahlung sind im Vergleich zum heterozygoten Gewebe 61 Proteine unterschiedlich exprimiert. Nach 2h sind 82 Proteine verändert. Im Gegensatz zu Kontrollgewebe findet sich in homozygotem Gewebe 24h nach Bestrahlung noch einmal ein deutlicher Anstieg. Hier sind mit 160 Spotveränderungen am meisten Proteine differentiell exprimiert.

Das homozygot Nbn-defiziente Lebergewebe zeigt also eine deutlich stärkere Reaktion auf Bestrahlung als das heterozygote Kontrollgewebe. Zu jedem Zeitpunkt sind deutlich mehr Proteine verändert. Auch bilden sich die Spotveränderungen in nullmutantem Gewebe nach 24h nicht wieder zurück, sondern nehmen in ihrer Zahl noch zu.

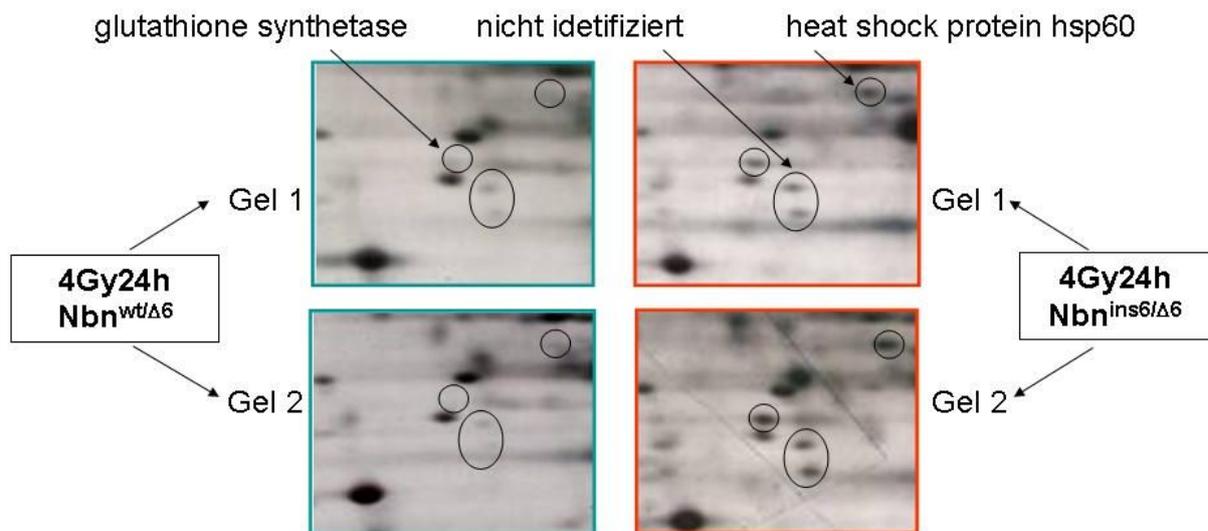


Abbildung 4.9 Beispiel für verschiedene Spotveränderungen

Verglichen wurden Gele von heterozygoten und nullmutanten Mauslebern 24h nach Bestrahlung. Vier Spots sind in diesem Fall in den nullmutanten Mäusen stärker exprimiert. In zwei davon konnten massenspektrometrisch Proteine nachgewiesen werden. In zwei wurden keine signifikanten Peptide erkannt.

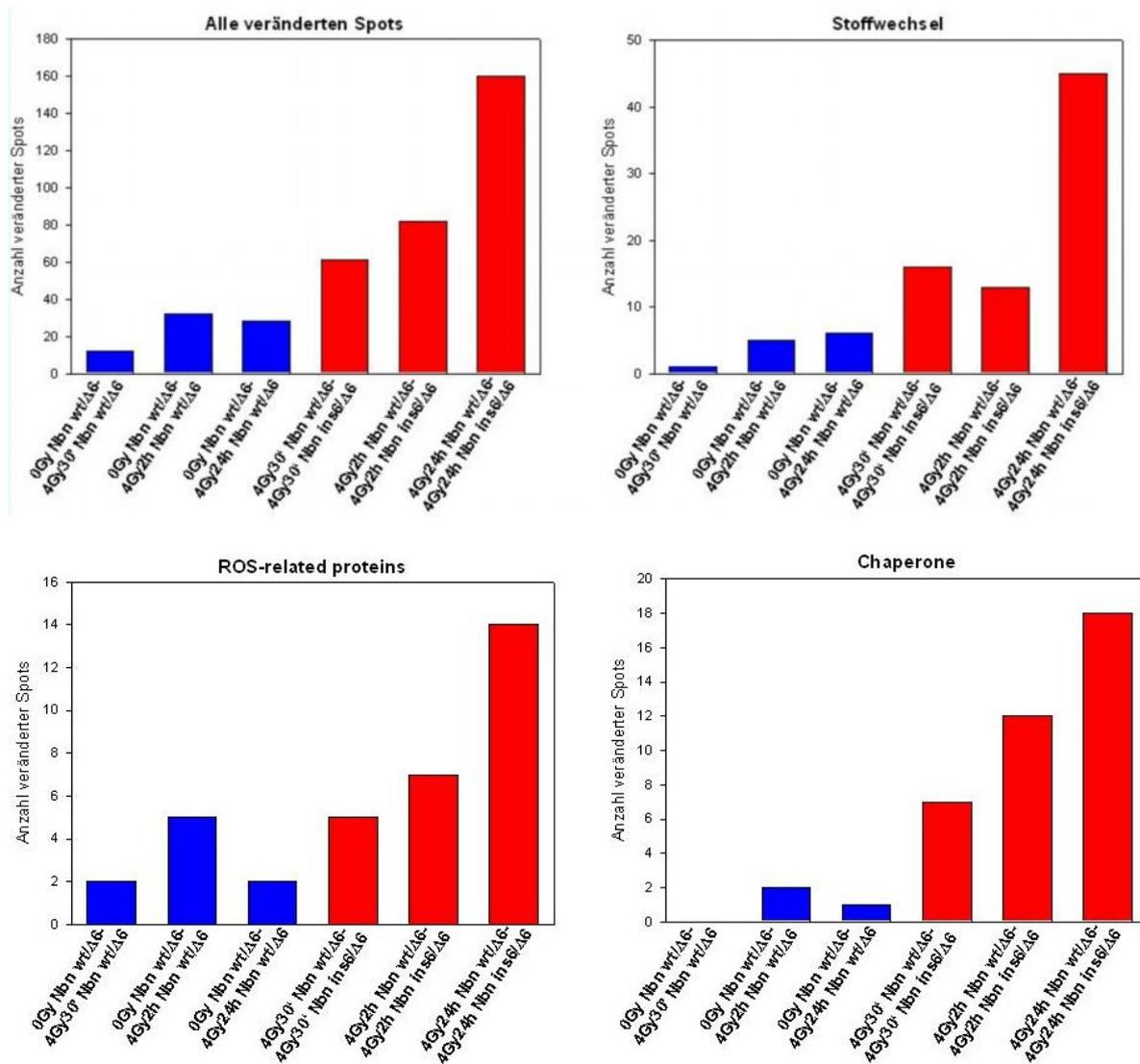
#### 4.2.3. Sequenzierung der Spots

Insgesamt wurden auf den Gelen mit analytischer Silberfärbung zu den verschiedenen Zeitpunkten 266 (179 sauer, 67 basisch) differentiell exprimierte Spots identifiziert. 209 dieser Spots konnten auf Gelen mit MS-Silberfärbung reidentifiziert und mit ESI-MS-Technik massenspektroskopisch analysiert werden. In 196 konnten signifikante Peptide identifiziert werden. Als signifikant wurden Sequenzierungsergebnisse mit einem MOWSE-Score über 90 gewertet. In 15 Spots konnten keine signifikanten Peptide erkannt werden. In 12 Spots wurden unbekannte Peptidketten oder Produkte von Genen mit unbekannter Funktion gefunden. In einem Teil der Spots wurde mehr als ein Protein identifiziert. Für die Auswertung wurde das Protein mit dem höchsten Score verwendet.

#### 4.2.4. Einteilung der veränderten Proteine in funktionelle Gruppen

Die veränderten Spots und die sequenzierten Proteine sind in Tabelle 4.1 am Ende des Ergebnisteils aufgeführt. Aufgrund der Datenmenge wurden lediglich Spots aufgeführt, in denen bei der Sequenzierung ein Protein identifiziert werden konnte. Sie wurden in funktionelle Gruppen eingeteilt. Die folgenden Abbildungen zeigen die Anzahl der

veränderten Spots in den verschiedenen Gruppen. Es wurde nur für Gruppen mit mindestens fünf veränderten Proteinen eine Graphik erstellt.



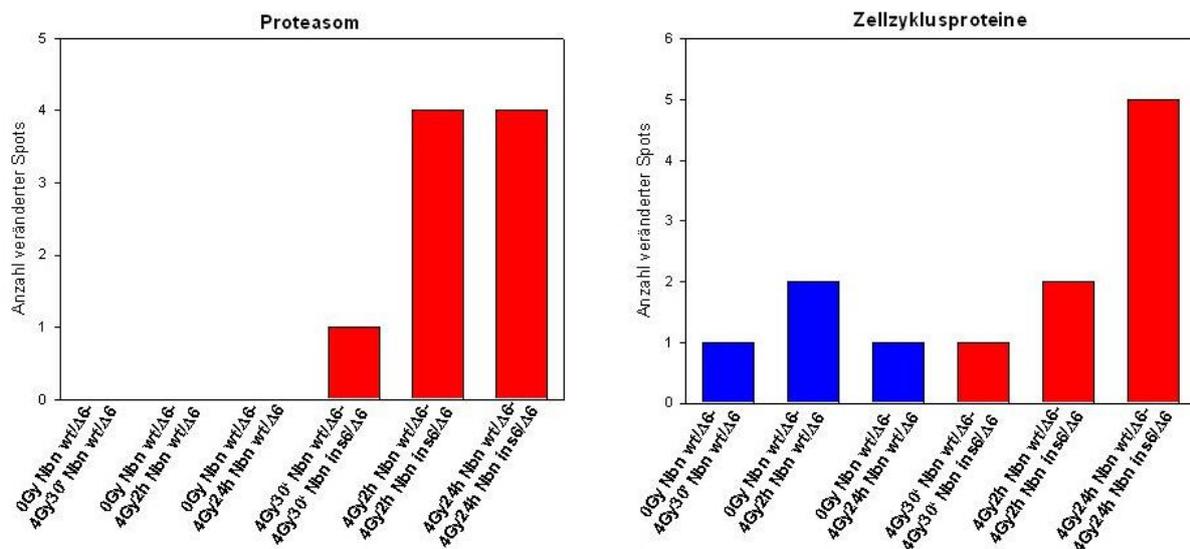


Abbildung 4.10 Spotveränderungen in verschiedenen funktionellen Gruppen

Die Graphiken zeigen die Anzahl der veränderten Spots in verschiedenen funktionellen Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung. In Blau sind veränderte Spots bei heterozygoten  $Nbn^{wt/\Delta 6}$ -Kontrollmäusen angegeben, in Rot bei nullmutanten  $Nbn^{ins6/\Delta 6}$ -Mäusen. Man beachte, dass die y-Achse in ihrer Skalierung dem maximalen Wert der jeweiligen Gruppe angepasst ist.

#### 4.2.5. Reaktion der Nbn-heterozygoten Mäuse

In Nbn-heterozygoten Mäusen konnten bei den insgesamt 41 veränderten Spots in 30 signifikante Peptide identifiziert werden. Davon waren vier unbekannte Peptide und 26 bekannte Proteine. In elf Spots konnten keine Peptide identifiziert werden.

Die größte Gruppe veränderter Proteine bilden in Nbn-heterozygoten Mäusen die Stoffwechselproteine. 30 Minuten nach Bestrahlung konnte in dieser Gruppe ein Spotunterschied gefunden werden. Nach zwei Stunden waren es bereits fünf Unterschiede, was sich nach 24h noch einmal geringfügig auf sechs Spotunterschiede steigerte. Somit zeigt sich in dieser Gruppe nicht der allgemeine Trend, dass sich die Spotveränderungen nach 24 Stunden bereits zurückbilden.

Eine weitere große Gruppe sind die Proteine in Reaktion auf oxidativen Stress. Nach 30 Minuten waren es zwei, nach zwei Stunden fünf, nach 24 Stunden bildeten sich die Veränderungen wieder auf zwei zurück.

Weitere Gruppen, in denen ein oder mehrere Proteine differentiell exprimiert werden, sind Zellzyklusproteine, Chaperone, Transkriptionsfaktoren, Proteaseinhibitoren,

Nukleotidstoffwechselproteine, Apoptose, Zelladhäsion, Selenium Binding Protein und Hormonstoffwechsel.

#### 4.2.6. Reaktion der Nbn-nullmutanten Mäuse

Die größte Gruppe der veränderten Spots bilden auch hier die Stoffwechselproteine. Kurz nach Bestrahlung (30 min) sind mit 16 noch relativ wenig Spots verändert, nach zwei Stunden sinkt die Zahl sogar noch einmal auf 13 veränderte Spots. 24h nach Bestrahlung steigt die Zahl der Spotveränderungen deutlich auf 45 an.

Gefolgt wird diese Gruppe von den Chaperonen, wobei hier vor allem Hitzeschockproteine vertreten sind. Auch hier sind die Veränderungen 30 Minuten nach Bestrahlung mit sieben Spotveränderungen recht gering, steigern sich nach zwei Stunden bereits auf zwölf und erreichen mit 19 veränderten Spots nach 24 Stunden ihr Maximum.

Eine weitere funktionelle Gruppe in der besonders viele Spotveränderungen gefunden wurden sind die oxidativen Stressproteine. 30 Minuten nach Bestrahlung konnten hier fünf veränderte Spots gefunden werden, zwei Stunden nach Bestrahlung sieben. Nach 24 Stunden steigt die Zahl auch hier deutlich auf 14 an.

Auch Veränderungen bei Proteasom-assoziierten Proteinen wurden vermehrt gefunden. Nach 30 Minuten Bestrahlung war es zunächst ein veränderter Spot, zwei und 24 Stunden nach Bestrahlung waren es jeweils vier veränderte Proteine. In heterozygoten Mäusen hingegen waren keine Proteasom-assoziierten Proteine verändert.

Außerdem wurden einige Veränderungen in Proteinen gefunden, die am Zellzyklus beteiligt sind. 30 Minuten nach Bestrahlung ist es ein Protein, zwei Stunden danach zwei. Auch in dieser Gruppe finden sich 24 Stunden nach Bestrahlung mit 5 Unterschieden die meisten Spotveränderungen.

Weitere Gruppen, in denen ein oder mehrere Proteine verändert exprimiert werden, sind Transkriptionsfaktoren, Proteaseinhibitoren, Nukleotidstoffwechselproteine, Apoptose, Zelladhäsion, Zytoskelett, Selenium Binding Protein, DNA-Strukturproteine,

Signaltransduktion, Tumorsuppressoren, Gerinnungsproteine, Immunsystem und Hormonstoffwechsel.

### **4.3. Zusammenfassung**

Die Untersuchung zur Effizienz der induzierten Nbn-Exon6-Deletion zeigt, dass diese in den verschiedenen Organen unterschiedlich erfolgreich ist. Fast vollständig ist sie in Leber, Knochenmark, Thymus und Milz, etwa die Hälfte der Zellen deletierten das Exon6 in Nieren und Muskelgewebe. In Testes und Gehirn hingegen konnte fast keine Exon6-Deletion induziert werden.

Bei der Untersuchung des Überlebens Nbn-nullmutanter Zellen ergeben sich ebenfalls Unterschiede zwischen den verschiedenen Organen. Dabei lassen sie sich in zwei Gruppen einteilen: in der einen Gruppe ist das Überleben nullmutanter Zellen nicht beeinträchtigt. Hierzu gehören Leber, Nieren und Muskel. In der anderen ist das Überleben der Nbn-nullmutanten Zellen deutlich eingeschränkt. Zu dieser Gruppe gehören Knochenmark, Thymus und Milz.

Auf Proteomebene zeigen sich in der Leber unbestrahlter Mäuse keine großen Unterschiede zwischen Nbn-heterozygoten und Nbn-nullmutanten Mäusen gibt. Nach Bestrahlung zeigen sowohl heterozygote als auch nullmutante Mäuse deutliche Veränderungen ihres Leberproteoms. Nullmutante Mäuse weisen jedoch ein Vielfaches mehr Spotveränderungen auf als heterozygote Kontrollen. Während sich die Veränderungen bei heterozygoten Mäusen 24 Stunden nach Bestrahlung zum Teil schon wieder zurückbilden, nehmen diese in nullmutanten Mäusen bis 24h nach Bestrahlung auch noch deutlich zu.

Die meisten verändert exprimierten Proteine gehören zu den Gruppen der Stoffwechselproteine, Chaperone, Proteasom, oxidative Stressproteine, Zellzyklus, Zytoskelett und Selenium Binding Protein.

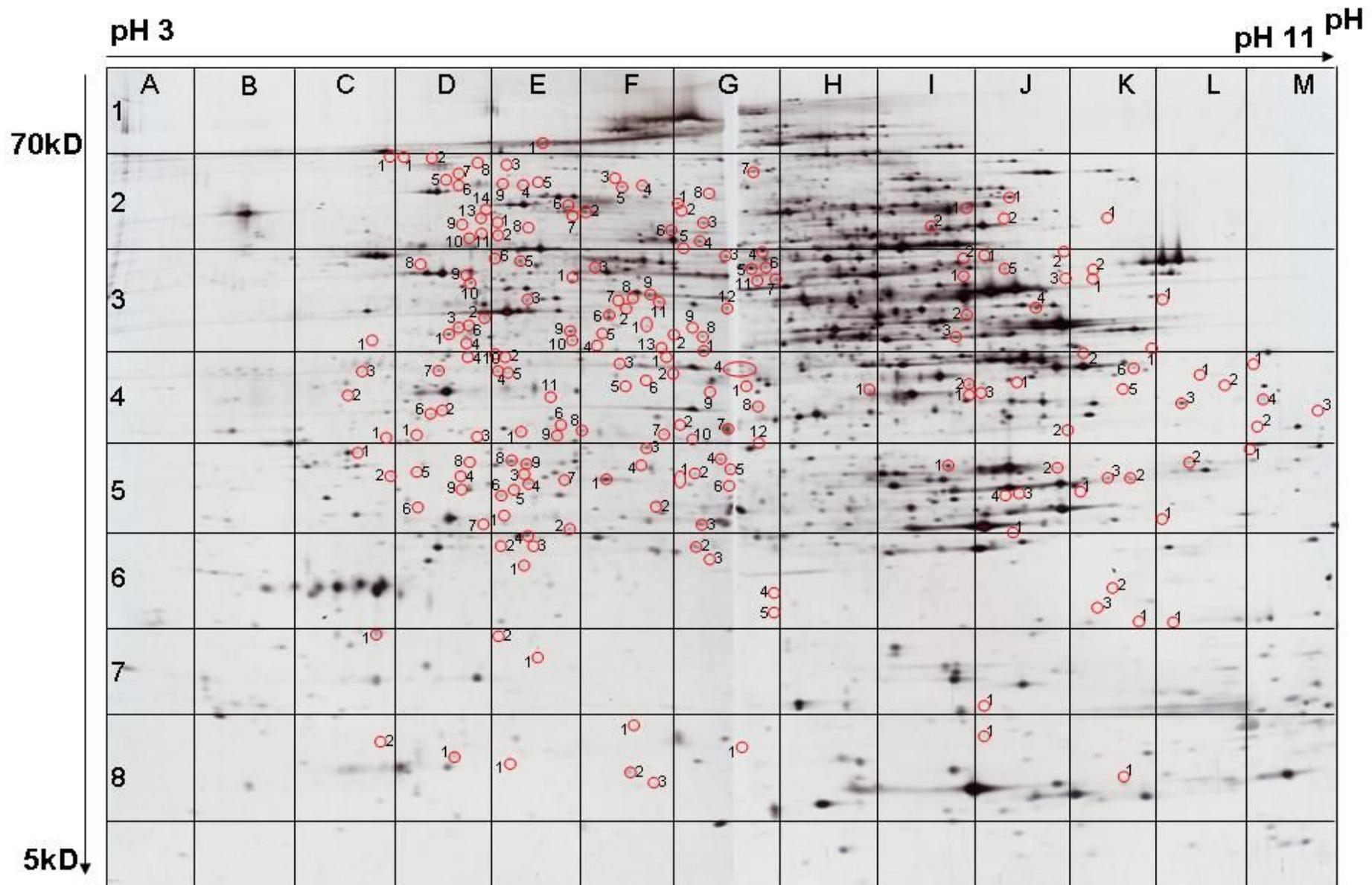


Abbildung 4.11 2D-Großgel mit veränderten Spots nach Bestrahlung

Alle veränderten Spots sind durch einen roten Kreis markiert. Über das Gel wurde ein Koordinatensystem gelegt. Die Spots sind anhand ihrer Koordinate und der Zahl neben dem Kreis benannt und mit den massenspektrometrisch identifizierten Proteinen in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Tabelle 4.1 Veränderte Spots und identifizierte Proteine

In dieser Tabelle sind alle Spotveränderungen aufgelistet, in den ein Protein identifiziert werden konnte. Das Schema nach dem die Gele verglichen wurden, ist Abb. 4.8 zu entnehmen. Über jeder Spalte ist außerdem angegeben, welche Gele verglichen wurden. + gibt eine höhere Spotintensität an, - gibt eine niedrigere Spotintensität an und 0 keine Veränderung der Spotintensität. Spotveränderungen sind rot unterlegt. Den Proteinen sind Koordinaten zugeordnet, wodurch sie auf dem Gel in Abb. 4.11 lokalisiert werden können. Spots, in denen kein Protein identifiziert werden konnte, sind nicht aufgeführt. Die Proteine sind in funktionelle Gruppen sortiert. In Klammern ist der MOWSE-Score angegeben.

	0Gy Nbn wt/Δ6- 4Gy30' Nbn wt/Δ6	0Gy Nbn wt/D6- 4Gy2h Nbn wt/Δ6	0Gy Nbn wt/Δ6- 4Gy24h Nbn wt/Δ6	0Gy Nbn wt/Δ6- 0Gy Nbn ins6/Δ6	4Gy30' Nbn wt/Δ6- 4Gy30' Nbn ins6/Δ6	4Gy2h Nbn wt/Δ6- 4Gy2h Nbn ins6/Δ6	4Gy24h Nbn wt/Δ6- 4Gy24h Nbn ins6/Δ6	
Stoffwechsel								
E7-2	0	0	0	0	+	0	+	Malate dehydrogenase (217)
D2-12	0	0	0	0	+	0	+	pyruvate carboxylase (157)
E2-1	0	0	0	0	0	0	+	pyruvate carboxylase
E3-6	0	0	0	0	0	+	+	pyruvate carboxylase (530)
I2-1	0	0	0	0	0	0	+	Pcx protein (=pyrovate carboxylase) (887)
J3-1	0	0	-	0	0	0	+	Pcx protein (=pyrovate carboxylase) (637)
G4-43	0	0	0	0	0	0	-	glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase (359)
L3-1	0	0	0	0	0	0	+	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit (236)
G6-2	0	0	0	0	0	-	-	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit (122)
D5-6	0	0	0	0	+	+	+	ATP synthase beta-subunit (230)
E4-1	0	0	0	0	+	+	+	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD <sup>+</sup> ) alpha (168)
F4-4	0	0	0	0	0	0	-	isocitrate dehydrogenase 3 (223)
E3-10	0	0	0	0	0	0	0	thioredoxin-like 2
E4-5	0	0	0	0	0	0	+	formiminotransferase cyclodeaminase (72)
E4-6	0	0	0	0	0	+	+	Ketohexokinase (83)
E5-3	0	0	0	0	+	+	+	heme-binding protein (355)
E5-4	0	0	0	0	+	0	+	guanidinoacetate methyltransferase (119)
E5-5	0	0	0	0	0	0	+	Sepiapterin reductase (466)
J7-1	0	0	0	0	0	0	+	methylmalonyl CoA epimerase (=sepiapterin reductase)
F3-6	0	0	0	0	0	0	-	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain
F4-3	0	0	0	0	0	0	+	enolase 1 (527)
F4-5	0	0	0	0	+	+	+	enolase 1 (230)

F4-6	0	0	0	0	0	0	-	transaldolase 1 (237)
F5-1	-	+	-	0	-	0	-	Ndufs3 protein (445),
G2-2	0	0	0	0	0	0	-	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (1124)
G2-8	0	0	0	0	0	0	+	sarcosine dehydrogenase (152)
G4-8	0	0	0	0	+	+	0	enoyl coenzyme A hydratase 1 (506)
J2-1	0	0	0	0	0	0	+	choline dehydrogenase (588)
J5-2	0	-	-	0	0	0	+	carbonic anhydrase 3 (498),
L4-3	0	-	-	0	0	0	0	carnitine/acylcarnitine translocase (457)
J4-3	0	0	0	0	0	0	0	similar to arylacetyl acyl-CoA N-acyltransferase (407)
J4-2	0	0	0	0	0	0	+	dihydrolipoamide S-succinyltransferase (208),
J3-5	0	0	0	0	-	0	0	betaine-homocysteine methyltransferase (392)
G2-5	0	+	0	0	0	0	-	similar to Carbamoyl-phosphate synthase
K4-6	0	0	0	0	+	0	0	urate oxidase; uricase (562)
J4-2	0	0	0	0	0	0	+	dihydrolipoamide S-succinyltransferase (208)
E2-6	0	0	0	0	0	0	-	similar to Carbamoyl-phosphate synthase(496)
F2-2	0	0	0	0	+	0	+	similar to Carbamoyl-phosphate synthase (1224)
F2-3	0	0	+	0	0	0	-	similar to Carbamoyl-phosphate synthase
F2-4	0	0	0	0	0	0	+	similar to Carbamoyl-phosphate synthase (541)
F2-5	0	0	0	0	0	0	+	similar to Carbamoyl-phosphate synthase(614)
F3-10	0	0	0	0	0	0	+	ornithine aminotransferase
F4-1	0	0	0	0	+	+	+	dihydrolipoamide branched chain transacylase E2
F8-1	0	0	0	0	0	0	+	ornithine aminotransferase (325)
G3-2	0	0	0	0	0	-	-	ornithine aminotransferase (1332),
G3-8	0	0	0	0	-	0	0	aminoacylase 1
K4-1	0	0	0	0	+	+	+	Argininosuccinate synthetase (472)
K4-4	0	+	+	0	0	0	0	glutamate oxaloacetate transaminase 2, mitochondrial (672)
F3-13	0	0	0	0	+	+	+	Aldh2 protein (580)
G3-3	0	0	0	0	0	0	-	aldehyde dehydrogenase family 7 (1228)
G3-4	0	0	0	0	0	0	-	aldehyde dehydrogenase family 7 (910)
G3-6	0	0	0	0	0	-	-	aldehyde dehydrogenase 9 (1124)
I4-1	0	0	0	0	0	0	+	aldo-keto reductase family 1 (267)
I3-3	0	0	0	0	0	0	+	aldolase 2, B isoform (504)
Chaperone/Heat Shock Protein								
C5-1	0	0	0	0	+	0	+	heat shock protein hsp60 (608)
C5-2	0	0	0	0	+	0	+	heat shock protein hsp60 (234)
D3-3	0	0	0	0	0	+	+	heat shock protein hsp60 (352)

D3-10	0	0	0	0	0	+	0	heat shock protein hsp60 (851)
D4-1	0	0	0	0	0	+	+	heat shock protein hsp60 (46),
D4-2	0	0	0	0	+	+	+	heat shock protein hsp60 (222)
F3-3	0	0	0	0	0	0	+	heat shock protein hsp60 (438)
E3-5	0	0	0	0	0	0	+	HSP60 (1211)
E2-2	0	0	0	0	0	0	+	mortalin mot-1=hsp70 (276)
I3-1	0	0	0	0	0	0	+	DnaJ-like protein 2=HSP40 (692)
G2-1	0	0	0	0	0	-	-	Similar to heat shock protein 75 (TRAP-1)(1958)
G2-3	0	0	0	0	0	0	-	HSP 75 (TRAP-1) (86)
F4-22	0	0	0	0	0	-	-	glucose regulated protein p58 (438)
F5-4	0	0	0	0	0	0	+	Glucose regulated protein p58 [Mus musculus] (541)
G4-9	0	+	0	0	+	+	-	glucose regulated protein (237)
F2-6	0	0	0	0	0	-	0	glucose regulated protein (716)
G3-11	0	0	0	0	+	0	0	DnaJ (Hsp40) homolog (106)
D3-4	0	0	0	0	+	+	+	Protein disulfide isomerase precursor (122)
D3-9	0	0	0	0	0	+	0	protein disulfide isomerase A6 (975)
G4-2	0	0	0	0	+	+	+	protein disulfide-isomerase (112)
G3-5	0	0	0	0	0	-	-	T-complex protein 1 (1938)
G5-6	0	+	+	0	0	0	-	Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor (301)
Proteasome								
D5-8	0	0	0	0	0	0	+	Atp5b, proteasome subunit alpha typ 3 (469)
E5-8	0	0	0	0	0	-	0	Proteasome subunit alpha type 3 (581)
E5-9	0	0	0	0	0	+	0	Proteasome subunit alpha type 3 (442)
G2-4	0	0	0	0	0	0	-	protease (prosome, macropain) 26S subunit (1075)
G4-10	0	0	0	0	+	+	+	26S proteasome-associated pad1 homolog (59)
G5-4	0	0	0	0	0	-	-	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 7 (366)
Proteaseinhibitoren								
D3-8	0	0	0	+	+	0	0	serine (or cysteine) proteinase inhibitor
D2-16	0	0	+	0	0	0	0	serine protease inhibitor A3K (739)
oxidativer Stress								
D5-7	0	0	0	0	+	0	+	Peroxiredoxin 6 (676)
F5-2	-	-	-	0	+	0	+	peroxiredoxin 6 (846)
F5-5	0	0	0	0	+	0	+	peroxiredoxin 6 (685),
G4-42	0	0	0	0	0	0	-	Transaldolase 1 (615)

G4-44	0	0	0	0	0	0	-	Transaldolase 1 (436)
F4-6	0	0	0	0	0	0	-	transaldolase 1 (237)
J5-1	0	0	0	0	0	0	+	manganese superoxide dismutase (144)
E6-1	0	0	0	0	+	+	+	Chain A, Glutathione S-Transferase Yfyf (Class Pi) (452)
J5-4	0	+	0	0	0	0	0	glutathione transferase (99)
K6-3	0	0	0	0	0	+	+	class kappa glutathione S-transferase (142)
D2-15	0	+	0	0	0	0	0	NADH dehydrogenase (921)
E2-9	0	-	0	0	0	+	0	NADH dehydrogenase(1411)
L4-2	0	0	0	0	0	+	-	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 9 (494)
K5-2	0	0	0	0	0	0	+	NADPH-dependent retinol dehydrogenase/reductase (556)
J3-4	0	0	0	0	0	+	+	ubiquinol cytochrome c reductase core protein 2 (1058)
G8-1	+	+	+	0	0	0	0	cytochrome c oxidase (212),
E3-3	0	0	0	0	0	+	+	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1 (727)
I3-2	0	0	0	0	0	0	+	cystathionase; cystathionine gamma-lyase (1051),
E3-1	0	0	0	+	+	+	+	glutathione synthetase (1237)
Gene Expression								
E4-4	0	0	0	0	0	0	-	eukaryotic translation initiation factor 2 (715)
E5-6	0	-	-	0	0	0	+	splicing factor 3b
E5-7	0	0	0	0	0	0	+	splicing factor 3b, subunit 2 [Mus musculus] (113)
F8-3	0	0	0	0	0	0	+	Heat Response Protein 12 (191)
K4-2	0	0	0	0	0	0	+	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1/B0 (406)
DNA-assoziert								
C4-5	0	0	0	0	0	+	0	chromatin modifying protein 5 (164)
Nukleotidsynthese/abbau								
F5-3	0	0	0	0	0	0	-	Purine nucleoside phosphorylase (841)
F3-1/1	0	0	0	0	+	+	+	bisphosphate 1,3 nucleotidase (554)
F3-1/2	0	+	0	0	0	-	0	bisphosphate 3'-nucleotidase (464)
F3-1/3	0	0	0	0	+	+	+	bisphosphate 1,3 nucleotidase (168)
Cell cycle								
D2-11	0	0	0	0	+	0	+	valosin-containing protein (125)
D4-7	0	-	0	0	0	0	0	SEC13 related gene (364)
D8-1	-	-	-	0	0	0	0	beta-galactoside binding protein (270)
E4-2	0	0	0	0	0	+	+	SGT1 (282)

F3-4	0	0	0	0	0	0	0	COP9 signalosome subunit 4 (738)
F3-7	0	0	0	0	0	0	+	SH domain Grb2 like (89)
G3-7	0	0	0	0	0	-	-	proliferation-associated 2G4 (137)
G4-41	0	0	0	0	0	0	-	acidic ribosomal phosphoprotein P0 (928)
Apoptose								
G5-5	0	0	0	0	0	+	+	SET translocation (572)
D4-5	0	-	0	0	0	+	0	EF hand domain containing 2
Tumor suppressor/rejection								
D2-7	0	0	0	0	0	-	0	tumor rejection antigen gp96 (1016)
I5-1	0	0	0	0	0	0	+	p33 RSP-1 oder Ras suppressor protein 1 (368)
Zelladhäsion								
E4-8	0	0	-	0	0	-	0	laminin receptor 1 (178)
Signaltransduktion								
J8-1	0	+	0	0	0	0	0	histidine triad protein 3 (142)
D5-5	0	0	0	0	+	+	+	Inositol-1(or 4)-monophosphatase (390)
cytoskelett								
C4-1	0	0	0	0	+	0	+	cytoskeletal gamma-actin
D3-1	0	0	-	0	+	+	+	Tropomodulin 3 (239)
G2-7	0	0	0	0	0	0	-	radixin (907)
G2-7	0	0	0	0	0	0	-	radixin (907)
D3-6	0	0	0	0	+	+	+	gamma-actin (274)
Gerinnungssystem								
E5-3	0	0	0	0	+	+	+	heme-binding protein (355)
F3-9	0	0	0	0	0	0	-	guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor 3
Major urinary								
C7-1	0	0	0	0	0	+	+	Major Urinary Protein Complex (699)
Selenium Binding Protein								
D4-3	0	0	0	0	0	+	+	Selenium binding protein 1 (124)
D5-4	0	0	0	0	0	0	+	Selenium binding protein 2 (422)

E3-9	0	0	0	0	+	0	+	Selenium binding protein 2 (1070)
E3-11	+	+	+	0	0	0	0	selenium binding protein 1(346)
F3-5	0	0	0	0	0	0	+	selenium binding protein 1 (750)
F3-2	0	0	0	0	0	+	+	selenium binding protein 2 (707)
G4-12	+	0	0	0	0	0	+	selenium binding protein 2 (609)
Hormonstoffwechsel								
J4-1	0	0	0	0	0	0	+	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase (481)
I4-2	0	+	0	0	0	0	+	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4 (270)
Immunsystem								
F8-2	0	0	0	0	0	0	-	D-dopachrome tautomerase (285)
unnamed Protein/ Riken-DNA								
D4-4	0	0	0	0	0	+	0	2810413N20Rik protein (110)
E7-1	0	0	0	0	+	0	+	RIKEN cDNA 0610040B21 (342)
F4-7	0	0	0	0	0	0	-	RIKEN cDNA 3110052N05 (255)
G3-1	0	0	0	0	0	-	-	RIKEN cDNA 1300018L09 gene (712)
G3-12	0	0	0	0	0	-	0	similar to FLJ20699 protein (551)
G5-2	0	-	-	0	+	0	0	6430559E15Rik protein (725)
G5-3	0	+	+	0	0	-	-	RIKEN cDNA 1810013B01 (484)
I2-2	0	+	+	0	0	+	0	unnamed protein product (1205)
K6-2	0	0	-	0	0	0	0	unnamed protein product (72)
K5-3	0	0	0	0	0	0	+	unnamed protein product (459)
F4-21	0	0	0	0	0	-	-	similar to KIAA1987 protein
keine eindeutige Funktion gefunden								
F4-23	0	0	0	0	0	-	-	4-coumarate--CoA ligase 3
J3-2	0	0	0	0	0	0	+	Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1) (134)

## 5. Diskussion

### 5.1. Die Effizienz plpC-induzierter Exon6-Deletion variiert in verschiedenen Geweben

Die Effizienz der plpC-induzierten Exon6-Deletion des Nbn-Gens wurde in gesunden  $Nbn^{wt/lox6}$ -Mäusen, die zu heterozygoten  $Nbn^{wt/\Delta 6}$ -Mäusen mutieren sollten, untersucht. Da Nibrindefizienz ein rezessives Merkmal ist, sind die heterozygoten Zellen phänotypisch gesund. Das applizierte plpC täuscht eine virale Infektion vor und induziert so die Produktion von Interferon in der Maus. Dieses induziert zum einen die Expression von Mx1, auch interferon-inducible protein p78 genannt, zum anderen aber auch die Expression von Cre-Rekombinase, die in diesen Mäusen ebenfalls durch den Mx1-Promoter reguliert wird. Die Cre-Rekombinase schneidet dann das zwischen loxP-Sites gelegene Exon6 aus dem Nbn-Gen heraus.

Die Exon6-Deletionsrate in  $Nbn^{wt/lox6}$ -Mäusen ist in den verschiedenen Organen unterschiedlich hoch. Vergleichbare Ergebnisse haben auch Kuhn et al [68] gefunden. Das lässt darauf schließen, dass die Interferonantwort auf die Injektion von plpC in den einzelnen Organen unterschiedlich ist.

Interferone (IFN) sind Schlüsselenzyme der Antwort des Immunsystems auf virale Infektionen. So werden sie hauptsächlich von immunkompetenten Zellen wie Lymphozyten und Makrophagen, im Prinzip aber von fast allen Zellen gebildet. Interferone werden kaum konstitutiv exprimiert, stattdessen wird ihre Synthese durch spezielle Stimuli, so auch plpC, induziert. Die Interferonproduktion steigt in den ersten beiden Tagen nach einer Virusinfektion stark an und fällt danach aber schnell wieder ab, sodass schon nach 5 Tagen kein Interferon mehr produziert wird [76]. Da sich plpC im Gegensatz zu Viren im Körper nicht vermehrt, ist nach Applikation von plpC ein noch schneller Abfall der Interferonproduktion wahrscheinlich.

plpC wurde in dieser Arbeit intraperitoneal appliziert. Dort resorbiert gelangt es ins Blut und erreicht über die Pfortader als erstes Organ die Leber. Durch diesen so genannten First-Pass-Effekt ist davon auszugehen, dass die plpC-Konzentration in der Leber am

höchsten ist und ein Teil bereits dort abgebaut wird, bevor er in den Körperkreislauf gelangt. Dies erklärt die hohe Exon6-Deletion in der Leber, die schon kurz nach plpC-Applikation nachzuweisen ist (Siehe Abb. 4.3 Leberkinetik).

Das Gehirn gehört zu den immunologisch privilegierten Organen [77], da es durch die Blut-Hirn-Schranke vom übrigen Körper isoliert ist. Durch tight junctions der Endothelschicht sind die Gefäßwände im Gehirn sehr dicht und lassen nur sehr kleine, lipidlösliche Moleküle (z.B. Alkohol) parazellulär, bzw. einige wenige Substanzen durch hochspezifische Transportsysteme hindurch. Sie dient so als Schutz vor Krankheitserregern, Toxinen und Milieuschwankungen. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass plpC und Interferon nicht ins Hirngewebe gelangen können, was die niedrige Exon6-Deletion erklärt. Auch im Blut zirkulierende Interferone können die Blut-Hirn-Schranke kaum passieren. Die geringe Exon6-Deletion verwundert daher nicht.

Ähnliches gilt sicher auch für Testes, da dieses Organ ebenfalls eine sehr dichte Blut-Gewebe-Schranke hat und zu den immunologisch privilegierten Organen gehört [77]. Die geringe Exon6-Deletion ist auch hier auf eine fehlende plpC- und Interferonexposition zurückzuführen.

Thymus, Milz und Knochenmark sind äußerst gut durchblutete Organe und können so durch plpC gut erreicht werden. Als lymphatische Organe sind sie außerdem für die Immunantwort zuständig. Eine hohe Interferonexpression infolge eines plpC-Kontaktes und somit eine hohe Cre-Rekombinaseexpression mit folgender Exon6-Deletion liegt Nahe und bestätigt sich auch in den hohen Deletionseffizienzen in unseren Versuchen. Auch ist in diesen Organen die Backgroundrecombination am höchsten, was ebenfalls nicht verwunderlich ist, da Interferon hauptsächlich von Immunzellen gebildet wird.

## **5.2. Überleben Nbn-nullmutanter Zellen variiert in verschiedenen Geweben**

Ein kompletter Funktionsausfall von Nibrin in Mäusen ist embryonal letal. Daher wurde die homozygote Nullmutation hier erst in adulten Mäusen induziert und das Überleben der nullmutanten Zellen in unterschiedlichen Geweben untersucht.

Das Überleben Nbn-nullmutanter Zellen in den verschiedenen Geweben lässt sich in

zwei Gruppen unterscheiden. In einer ist das Überleben normal, in der anderen ist das Überleben der Nibrin-defizienten Zellen deutlich verringert.

#### 5.2.1. Überleben nullmutanter Zellen in nichtproliferativen Organen

In Leber, Niere und Muskel konnte kein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen nullmutanten und heterozygoten Zellen gefunden werden, obwohl Nibrin auch in diesen Geweben eindeutig exprimiert wird [31, 39]. Diese drei Organe zeichnen sich alle durch hochdifferenzierte Zellen mit geringer Teilungsaktivität aus. Offensichtlich ist Nibrin für das Überleben ruhender Zellen nicht notwendig, zumindest nicht über einen Zeitraum von zwei Wochen.

#### 5.2.2. Überleben nullmutanter Zellen in proliferativen Organen

Ganz anders ist das Bild in den Organen Knochenmark, Thymus und Milz, die eine hohe mitotische Aktivität haben. In allen drei Organen zeigt sich eine deutliche Reduktion nullmutanter Zellen im Vergleich zu Kontrollen. Im Kinetikversuch zeigt sich, dass die Zellen zwar nach plpC-Applikation zunächst etwa im gleichen Maße das Nbn-Exon6 deletieren, die Zahl Exon6-deletierter Zellen aber stark absinkt, sobald kein plpC mehr appliziert wird. Nach zwei Wochen werden in allen drei Organen deutlich weniger nullmutante Zellen nachgewiesen.

Dass Nibrin in diesen Organen von besonderer Bedeutung ist, deutet schon das außergewöhnlich hohe Expressionslevel von Nibrin in diesen Geweben an und so wundert es nicht, dass die Zellen in ihrem Überleben eingeschränkt sind [31].

Für den Verlust der Zellen kommen prinzipiell mehrere Ursachen in Betracht. Zum einen könnten die Zellen so stark geschädigt sein, dass sie in Apoptose gehen oder sogar nekrotisch absterben. Zum anderen könnte es sein, dass sie weniger proliferieren und von nicht Exon6-deletierten Zellen überwuchert werden. Hierbei könnten sie entweder aufgrund von nicht reparierten DNA-Schäden im Zellzyklus stecken bleiben oder aufgrund der Schäden in Seneszenz gehen.

Dass die Proliferation und das Überleben Nbn-nullmutanter Zellen beeinträchtigt sind, zeigen auch Ergebnisse aus anderen Arbeiten. Aus Nbn<sup>wt/lox6</sup> und Nbn<sup>ins6/lox6</sup>-Mäusen

wurden Fibroblasten gewonnen und mit Cre-Rekombinase behandelt. Die Exon6-Deletion war in beiden Gruppen etwa 70-75%. In induziert heterozygoten Zellen blieb dies über 20 Passagen konstant, während in induziert nullmutanten Zellkulturen am Ende nur noch 6% nullmutante Zellen nachgewiesen werden konnten [42]. Wurden diese Zellen zusätzlich mit der menschlichen NBS<sup>657Δ5</sup>-Mutation transfiziert, konnte das Überleben bzw. die Proliferation nullmutanter Zellen deutlich gesteigert werden, was zeigt, dass die Expression des Nibrinfragments Teilfunktionen kompensiert.

Eine reduzierte Proliferation zeigte sich bereits in embryonalen Mausstammzellen, die ein 75kDa C-terminales Nibrinfragment produzieren. In Zellkultur proliferieren diese Zellen nach sechs Passagen nicht mehr [67]. Auch NBN-nullmutante DT40-Zellen aus Hühnern teilen sich in Zellkultur nur sehr begrenzt [52]. Ursache ist wahrscheinlich die Akkumulation von Mutationen bei jedem Zellzyklus.

Außerdem spielt Nibrin wahrscheinlich auch bei gewebespezifischen Vorgängen eine Rolle, die das Überleben und die Proliferation der Zellen beeinflussen. Die betroffenen Organe sind Teil des Immunsystems. Für das NBS ist ein Immundefekt typisch. So sind die Patienten besonders anfällig für Infektionen, was auch die zweithäufigste Todesursache ist. Ein Drittel der Patienten haben eine Agammaglobulinämie, bei den anderen ist der Defekt variabler. Häufig ist aber ein Mangel an IgG4 und IgA. Zehn Prozent der Patienten haben wiederum einen unauffälligen Immunstatus. [19, 20]

### 5.2.3. Knochenmark

Im Knochenmark werden fast alle Blutzellen des Körpers gebildet und es gehört somit zu den Organen mit äußerst hoher Proliferationsrate. Es besteht zur einen Hälfte aus rotem Knochenmark, in dem die Blutzellen gebildet werden, zu anderen Hälfte aus gelbem Knochenmark, das vor allem aus Fettgewebe besteht und weitgehend funktionslos ist.

Im Knochenmark unserer Mäuse mit induzierter Nullmutation überleben nur 50% Nbn-nullmutanter Zellen, wohingegen in Zellen der Kontrolltiere eine 100%ige Exon6-Deletion stattfindet. Da die Proliferation Nibrin-defizienter Zellen, wie bereits beschrieben, eingeschränkt ist, führt dies sicher auch in haematopoetischen und

lymphatischen Stammzellen zu einer geringeren Teilungsaktivität. Knochenmarkszellen sind in ihren Proliferationseigenschaften embryonalen Stammzellen sehr ähnlich. Diese reagieren auf einen Verlust von Nibrin äußerst empfindlich. Durch die Akkumulation von DNA-Schäden ist ihre Proliferation stark eingeschränkt oder sie sterben gänzlich ab [67]. Diese Defekte zeigen sich bereits bei Zellen mit Nbn-hypomorpher Mutation. Ein vollständiger Funktionsverlust von Nibrin hat noch deutlich gravierendere Folgen.

Außerdem findet im Knochenmark die Rekombination des V(D)J-Genlokus in B-Zellen statt und die erfolgreiche Durchführung dieser Rekombination ist eine Voraussetzung für die weitere Reifung und Proliferation von B-Zellen [78]. Hierbei werden DNA-Doppelstrangbrüche induziert, DNA-Stücke herausgeschnitten und die Enden durch nichthomologe End-zu-Endverbindung (NHEJ) wieder zusammengefügt. Ob Nibrin dabei eine Rolle spielt, wird zurzeit noch kontrovers diskutiert.

In der Hefe *S. cerevisiae* werden Mre11p, Rad50p und Xrs2p (Hefeortholog von Nibrin) für NHEJ benötigt, da Nullmutationen in jedem dieser Gene zu schweren Defekten bei der Reparatur von DNA-DSB durch NHEJ führen [79, 80]. Ob dies auch für andere Organismen gilt, ist jedoch nicht sicher. Untersuchungen an Chicken DT40-Zellen und Hefezellen der *S. pombe* konnten zumindest keine Beteiligung des MRN-Komplexes beim NHEJ nachweisen.

Auch in Säugerzellen gibt es Hinweise auf eine essentielle Rolle des MRN-Komplexes beim NHEJ. Wurde in einem zellfreien DNA-Verknüpfungssassay lediglich menschliches Ku, DNA-PKs und Ligase IV/XRCC4, die Hauptmediatoren des NHEJ, hinzugegeben, so konnte keine erfolgreiche End- zu Endverknüpfung erreicht werden. Erst durch die zusätzliche Gabe des MRN-Komplexes konnte ein normales NHEJ wiederhergestellt werden [81]

In menschlichen T-Lymphozyten konnten NBN-Foci an Stellen V(D)J-Rekombinations-induzierter DNA-DSB nachgewiesen werden, was eine Rolle des MRN-Komplexes dabei andeutet [82].

Auch wenn diese Beobachtungen eine verführerische Hypothese für die

Immundefizienz von NBS-Patienten ergeben, konnte in Patientenzellen keine Beeinträchtigung der V(D)J-Rekombination nachgewiesen werden [22, 23]. Auch in einem Mausmodell mit der menschlichen NBN<sup>657Δ5</sup>-Mutation waren im Knochenmark weder die Zahl unreifer noch reifer B-Zellen reduziert [36], was schwerwiegende Rekombinationsdefekte unwahrscheinlich macht. Die Zahl unreifer B- und T-Zellen ist in einem anderen hypomorphen Mausmodell um etwa 20% reduziert [67], was die Folgen einer gestörten V(D)J-Rekombination widerspiegeln könnte. Der Effekt ist jedoch recht gering. Die Beurteilung der Rolle Nibrins bei der V(D)J-Rekombination anhand dieser Ergebnisse ist schwierig, da es sich um hypomorphe Modelle handelt und grundlegende Funktionen von Nibrin hierbei wahrscheinlich durch das p70-Nibrinfragment kompensiert werden.

Für die Nullmutation ist die V(D)J-Rekombination noch nicht hinreichend untersucht. Zwei Mausmodellen mit B-zellspezifischem, induziertem Nbn-Knockout scheinen keine Defekte in der frühen B-Zellentwicklung zu haben. Ähnlich wie bei hypomorphen Modellen, ist aber auch hier die Beurteilung der V(D)J-Rekombination schwierig, da die Nbn-Deletion nicht komplett ist. So können auch bei reifen B-Zellen noch Nbn-positive Zellen nachgewiesen werden (ca. 15-20%). Daher kann es sein, dass die Rekombination von Nibrin vermittelt wird, dass schon vor dem Knockout synthetisiert wurde, oder dass rekombinierte Zellen zum Zeitpunkt der Rekombination noch nicht deletiert waren [17, 18].

In unserem Mausmodell gehen innerhalb von zwei Wochen nach Induktion der homozygoten Nullmutation 50% der nullmutanten Knochenmarkszellen verloren. Offensichtlich können sie lebenswichtige Reifungsprozesse wie die V(D)J-Rekombination nicht adäquat durchführen und die Zellen sterben ab oder werden von anderen, nicht Exon6-deletierten Zellen überwuchert.

#### 5.2.4. Thymus

Im Thymus, einem der primären lymphatischen Organe, reifen T-Lymphozyten heran. Hämatogene Vorläuferzellen wandern aus dem Knochenmark ein und differenzieren dort zu reifen T-Zellen. Hierzu müssen sie vor allem einen funktionsfähigen T-Zellrezeptor (TCR) exprimieren. Dieser besteht aus mehreren Untereinheiten. Die

Diversifizierung der antigenbindenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten geschieht, ähnlich der Immunglobulinkettenumlagerung, durch V(D)J-Rekombination. Die unreifen doppelt negativen T-Zellen (DN) führen zunächst die Rekombination des  $\beta$ -Genlokus durch, danach kommt es zu einer so genannten  $\beta$ -Selektion, bei der alle nicht erfolgreich rekombinierten Zellen in Apoptose gehen. Die dann doppelt positiven Zellen (DP) lagern nun die Gene des  $\alpha$ -Lokus um. Es folgt weitere Selektion, zunächst die positive Selektion, wobei nur Zellen, die an körpereigene MHC-Moleküle binden können, überleben. Bei der Negativselektion werden autoreaktive T-Zellen eliminiert. Die erfolgreich rekombinierten und selektierten Zellen sind einfach positive, CD4+- oder CD8+-T-Zellen und werden nach einigen Tagen ins Blut ausgeschwemmt [76].

Im Thymus ist der Verlust nullmutanter Zellen noch ausgeprägter als im Knochenmark. Hier können nur sehr wenige nullmutante Zellen nachgewiesen werden, während in Kontrollen fast alle Zellen Exon6-deletiert sind. Insofern stellt sich die Frage, inwieweit Nibrin für die T-Zell-spezifische Reifung im Thymus benötigt wird, oder ob die Reduktion nullmutanter Zellen auf eine fehlende Produktion unreifer T-Zellen im Knochenmark zurückzuführen ist.

Fast alle NBS-Patienten haben einen Defekt in der zellulären Immunität. Ein Großteil der Patienten zeigt eine absolute Lymphopenie, vor allem aber haben fast alle Patienten ein Ungleichgewicht in der Verteilung der Zellen der zellulären Immunantwort. CD8+-Zellen sind dabei in der Regel im Normbereich, während CD4+- und CD3+-Zellen deutlich erniedrigt sind. Die Zahl der Memory- und der NK-Zellen ist stark erhöht. Zudem zeigen T-Lymphozyten von NBS-Patienten eine verminderte Proliferation auf Wachstumsstimuli [20, 83].

In zwei hypomorphen Mausmodellen wurde ebenfalls eine dramatische Reduktion der Zahl reifer CD4+-T-Zellen gefunden [36, 67]. Statt 15% der Thymozyten waren nur noch 4% der Zellen CD4+. Die Gesamtzahl der Thymozyten war auf 30% reduziert. Auch in der Milz, Speicherort reifer T-Zellen, waren nur 8% statt 22% der Zellen CD4+ [67].

NK-Zellen sind bei NBS-Patienten erhöht. Diese sind eng mit T-Lymphozyten verwandt und gehen aus derselben Vorläuferzelle hervor, differenzieren jedoch schon im

Knochenmark. Sie agieren ebenfalls bei der Abwehr viraler Infekte und intrazellulärer Bakterien. Im Gegensatz zu T-Zellen exprimieren sie aber keinen T-Zellrezeptor und führen somit auch keine V(D)J-Rekombination und andere thymusspezifische Reifungsprozesse durch. Eventuell spiegelt die Erhöhung der NK-Zellen bei NBS-Patienten einen extrathymischen Kompensationsmechanismus des T-zellbedingten Immundefektes wider. Eine eingeschränkte Proliferation der T-Zellen als alleinige Ursache des T-Zelldefektes ist daher unwahrscheinlich, da auch NK-Zellen proliferieren müssen. Wahrscheinlicher ist, dass T-zellspezifische Reifungsprozesse wie die V(D)J-Rekombination gestört sind und dies durch eine erhöhte Zahl an NK-Zellen kompensiert wird [83].

Analysen der cytogenetischen Abnormalitäten von NBS-T-Lymphozyten zeigten eine besonders hohe Austauschrate zwischen Chromosom 7 und 14. Diese Rekombinationsstellen korrelieren mit den Genloci der  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -Ketten des T-Zellrezeptor und der schweren Kette der Immunglobuline, die bei der V(D)J-Rekombination umgelagert werden [20]; ein weiteres Indiz für die gestörte T-Zellentwicklung unter Nibrindefizienz.

Nbn-hypomorphe Mäuse entwickeln außergewöhnlich viele Thymome (5 von 32 bis 3-8 Monate alt). PCR-Analyse der Thymomzellen ergaben, dass die V(D)J-Rekombination des TCR in diesen Tiere ähnlich effizient wie in Kontrollen war, jedoch zeigten sich auch hier ungewöhnlich viele interchromosomalen Translokationen zwischen TCR- $\beta$ - und TCR- $\gamma$ -Lokus [67].

NBS-Patienten sowie hypomorphe Mäuse scheinen prinzipiell in der Lage zu sein, V(D)J-Rekombination in Thymozyten durchzuführen, da reife T-Zellen nachgewiesen werden können. Sie sind dabei aber sicherlich nicht so effizient wie gesunde Zellen, da die Zahl reifer Thymozyten reduziert ist. Die vielen Translokationen zwischen den V(D)J-Rekombinationsstellen deuten an, dass NBN für das Zusammenfügen der richtigen DNA-Stränge erforderlich ist.

Diese Ergebnisse wurden stets aus Untersuchungen der hypomorphen Mutation für NBN, bzw. Nbn, gewonnen. Sicherlich werden auch hier Teilfunktionen von Nibrin durch

das p70-Fragment kompensiert. Die Auswirkungen einer Nullmutation für Nibrin wurden in T-Zellen bisher noch nicht untersucht.

In unseren Versuchen zeigte sich ein dramatischer Verlust nullmutanter Zellen im Thymus. Wie schwerwiegend der Nbn-Knockout für die Zellen des Thymus ist, zeigt sich auch daran, dass die Zahl nullmutanter Zellen sofort nach Ende der plpC-Applikation rapide abnimmt. Inwieweit sich die Nullmutation von der hypomorphen Mutation unterscheidet, lässt sich allerdings schwer beurteilen. Hierzu wären spezifischere Versuche, eventuell auch an einem Mausmodell mit T-zellspezifischem Nbn-Knockout, aufschlussreich.

#### 5.2.5. Milz

Ein signifikant schlechteres Überleben Nbn-nullmutanter Zellen konnte auch in der Milz nachgewiesen werden. Dieses sekundäre lymphatische Organ dient vor allem als Speicherort für Lymphozyten und dem Abbau gealterter und defekter Erythrozyten. Dass Nibrin in der Milz von Bedeutung ist, deutet das außergewöhnlich hohe Expressionslevel in diesem Gewebe an [31]. Naive B-Lymphozyten wandern in die Milz, um dort durch Antigen- und T-Zellkontakt aktiviert zu werden. Daraufhin führen sie einen Ig-Klassenwechsel und somatische Hypermutationen durch und proliferieren stark (klonale Expansion). Drei Vorgänge bei denen Nibrin eine Rolle spielen könnte.

Yabukii et al konnten zeigen, dass der MRN-Komplex und insbesondere Nibrin die somatische Hypermutation, die zur weiteren Antigenspezifizierung der B-Zellen in der Milz stattfindet, beschleunigen und somit auch hier von Bedeutung sind [84]. Eine verlangsamte Hypermutation in nibrindefizienten Zellen könnte einen Selektionsnachteil dieser Zellen bedeuten und somit eine geringere Proliferation zur Folge haben.

Der Nachweis von Nibrin an Stellen der Klassenwechselrekombination, wo es zusammen mit  $\gamma$ H2AX Foci bildet, suggeriert ebenfalls eine Rolle beim Immunglobulinklassenwechsel von B-Zellen [85]. Dementsprechend sind Patienten mit NBS durch einen Mangel an IgG und IgA, aber normale IgM-Serumspiegel charakterisiert. Etwa ein Drittel der Patienten zeigt eine Agammaglobulinämie [19, 20]. In B-Zelllinien aus NBS-Patienten war die Zahl S $\mu$ -S $\alpha$ -Switch-Regionen im Vergleich zu

Kontrollen verringert, was ebenfalls eine verringerte Ig-Klassenwechselrate als Ursache haben könnte [86].

Einen IgG1- und IgG3-Mangel im Serum zeigten auch Mäuse, die Träger des menschlichen Gens mit der hypomorphen  $\text{NBN}^{657\text{del}5}$ -Mutation sind. Ein direkter Nachweis der Rolle von Nibrin beim Klassenwechsel, konnte aber nicht erbracht werden, da B-Zellen dieser Mäuse eine normale Proliferation und normale IgG1- und IgG3-Oberflächenexpression zeigten.[36]

In der Nbn-hypomorphen Maus von Kang et al. war die Gesamtzahl der B-Lymphozyten in der Milz um ca. 20% reduziert. Es konnte aber ebenfalls kein Defekt im Ig-Klassenwechsel festgestellt werden, da die mutanten Mäuse keine erniedrigten Gesamt-IgG-Serumspiegel hatten. Allerdings zeigte sich ein deutlich verringerter Serumspiegel spezifischer Antikörper nach Stimulation mit einem Antigen, was auf eine mangelhafte Aktivierung durch T-Zellen oder eingeschränkte klonale Expansion der B-Zellen hindeutet [67].

Die verschiedenen Untersuchungen zum Ig-Klassenwechsel bei hypomorpher Mutation, zeigen einen variablen Immundefekt, der nicht sicher auf einen defekten Klassenwechsel zurückgeführt werden kann.

Eindeutiger sind die Ergebnisse in zwei Mausmodellen, bei denen eine Nbn-Nullmutation in der frühen B-Zellentwicklung induziert wird. Bei Kracker et al. [17] finden in diesen B-Zellen mit vollständigem Nibrin-Knockout etwa 50% weniger Klassenwechsel statt. Das Überleben scheint kurzfristig nicht beeinträchtigt zu sein und die Zellen proliferieren zunächst normal. Allerdings zeigen 20% der Nbn-defizienten B-Zellen Chromosomenbrüche, die nicht repariert werden.

Auch in den Mäusen mit B-zellspezifischem Knockout von Reina-San-Martin [18] ist der Klassenwechsel zu IgG1 deutlich eingeschränkt. Außerdem proliferieren die Zellen hier deutlich weniger. 86% der Kontrollen haben sich nach 72h mindestens drei Mal geteilt, wohingegen nur 39% der Nbn-defizienten B-Zellen mehr als zwei Zellteilungen unterlaufen sind. Die Zellen akkumulieren in der G2/M-Phase und auch die Zahl toter

Zellen ist erhöht. Außerdem sind die Zellen genomisch sehr instabil. 76% der Metaphasen nullmutanter B-Zellen zeigen eine dramatische Ansammlung struktureller oder numerischer Chromosomendefekte, im Gegensatz zu 1% der gesunden Zellen.

Ein vollständiger Funktionsausfall von Nibrin hat für B-Zellen offensichtlich deutlich schlimmere Konsequenzen als die Nbn-hypomorphe Mutation. Die Funktion Nibrins für das Überleben, die Proliferation und den Ig-Klassenwechsels scheinen durch das p70-Fragment größtenteils erhalten zu bleiben. Schwere Defekte dieser Vorgänge treten erst bei einer Nullmutation hervor. Dies zeigt sich auch im Überleben der nullmutanten Zellen in unseren Versuchen. Unter Gabe von plpC deletieren Nbn<sup>ins6/lox6</sup>-Zellen im Milzgewebe zunächst etwa im selben Umfang, wie die Kontrollen. Sobald dieses aber nicht mehr appliziert wird, nimmt der Anteil nullmutanter Zellen rapide ab, während der Anteil Exon6-deletierter Kontrollzellen weiter steigt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Mangel an nullmutanten Zellen in der Milz auf eine mangelnde Produktion unreifer B-Zellen im Knochenmark zurückzuführen ist.

#### 5.2.6. Gehirn

NBS-Patienten sind mikrozephal und entwickeln eine zunehmende mentale Retardierung. Im Gegensatz zu den verwandten Syndromen Ataxia Telangiectasia und Ataxia Telangiectasia Like Disorder, die Mutationen im ATM- und Mre11-Gen tragen, zeigen NBS-Patienten aber keine neurologischen Symptome wie Ataxie. Dies ist wahrscheinlich ebenfalls auf eine Teilkompensation der Nibrinfunktionen durch die Expression des hypomorphe p70-Fragments zurückzuführen. Schließlich zeigen Mäuse mit einer ZNS-spezifischen Nbn-Nullmutation eine Kleinhirnhypoplasie mit Ataxie[87]. Zellen im Kleinhirn dieser Tiere zeigen eine deutlich erniedrigte Proliferation. Ruhende Zellen haben eine erhöhte Apoptoserate. Beide Beobachtungen werden auf die fünffach erhöhte DNA-DSB-Rate in Nbn-defizienten Kleinhirnzellen zurückgeführt, da dies zu einer ATM-vermittelten p53-Aktivierung führt und so den Zellzyklus arretiert oder die Zelle in die Apoptose leitet. Durch einen zusätzlichen p53-Knockout können diese Folgen der Akkumulation von DSB verhindert werden. Sowohl Kleinhirndegeneration als auch Ataxie der Mäuse sind deutlich gemildert [87].

In unserer Maus lässt sich das Überleben Nbn-nullmutanter Zellen in Hirngewebe leider

nicht beurteilen, da hier weder in Kontrollen noch Zieltieren eine Exon6-Deletion induziert werden konnte. Der geringe Prozentsatz nullmutanter Zellen kann somit nicht auf ein eingeschränktes Überleben dieser Zellen zurückgeführt werden.

#### 5.2.7. Testes

Doppelstrangbrüche entstehen auch während der Meiose beim Crossing over durch homologe Rekombination. Mre11 und XRS2, das funktionelle Hefeortholog zu Nibrin, werden beide für die meiotische Rekombination benötigt. Inwieweit Nibrin eine Rolle spielt, ist noch nicht ausreichend geklärt. Die geschlechtliche Reifung in NBS-Patienten ist beeinträchtigt. Männliche Patienten sind zwar fertil, haben aber eine verzögerte Pubertät. Patientinnen haben eine Ovariendysgenese und sind infertil.

In nibrindefizienten DT40-Hühnerzellen konnte eine deutliche Beeinträchtigung der homologen Rekombination als Reparaturmechanismus nach DSB nachgewiesen werden. Die Frequenz der homologen Rekombination ist etwa um das 100-fache reduziert, was eine Rolle Nibrins hierbei sehr wahrscheinlich macht. Die meiotische Rekombination ist der HR sehr ähnlich und eine Rolle Nibrins hierbei liegt nahe. [52].

Die Ergebnisse aus Nbn-hypomorphen Mäusen sind bezüglich der geschlechtlichen Reifung diskrepant. In einem Mausmodell waren sowohl Ovarien als auch Testes makroskopisch normal entwickelt [59]. Bei mikroskopischen Untersuchungen konnten hingegen in beiden Geschlechtern Fehler bei der meiotischen Rekombination und der Progression in der Meiose festgestellt werden [88]. Ein anderes Modell [67] zeigte eine Ovariendysgenese und fehlende Oogenese. Männliche Mausmutanten mit der menschlichen NBN<sup>657del5</sup>-Mutation, waren ähnlich wie menschliche NBS-Patienten fertil, weisen aber deutlich kleinere und teilweise degenerierte Testes auf. In Weibchen waren die Ovarien ebenfalls deutlich verkleinert und es konnte nachgewiesen werden, dass die Keimzellen im Pachytän verharren [36]. Nibrin scheint somit für die Progression der Meiose notwendig zu sein.

In der Maus dieser Arbeit lässt sich das Überleben Nbn-nullmutanter Zellen nur bedingt beurteilen, da die Deletion des Exon6 durch die plpC-induzierte Cre-Rekombinaseexpression leider wenig effizient ist. In induziert heterozygoten Mäusen

konnten nur 16,1% Exon6-deletierte Zellen nachgewiesen werden. In induziert nullmutanten Mäusen konnten jedoch nur 4,3% nullmutante Zellen nachgewiesen werden. Der Unterschied ist nicht signifikant, deutet aber auf ein beeinträchtigt Überleben nibrindefizienter Zellen hin.

### **5.3. Untersuchung des Proteoms Nbn-nullmutanter Zellen**

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Nbn-nullmutante Mäuse auf Proteomebene untersucht. Eine Proteomanalyse mit 2D-PAGE ist eine besonders breit angelegte Untersuchung. Sie weist nicht einzelne Proteine gezielt nach, sondern versucht die Gesamtheit der Proteine eines Gewebes darzustellen. So wurden in dieser Arbeit pro Gel etwa 7000 Proteine dargestellt und verglichen. Bei dem hier verwendeten Protokoll wurde im Vergleich zu anderen Proteomstudien eine sehr hohe Auflösung erreicht.

Eine so breit angelegte Untersuchung des Proteoms von nibrindefizienten Gewebe wurde bisher noch nicht geführt. Es gibt Ergebnisse auf RNA-Ebene mit Mikroarray, die jedoch wenig Aufschluss über neue Aspekte der Pathogenese des NBS ergaben [89].

Die Proteomanalyse wurde in dieser Arbeit mit Lebergewebe durchgeführt. Dieses Gewebe zeigte in induziert Nbn-nullmutanten Mäusen und induziert Nbn-heterozygoten Kontrolltieren die höchste Rate an Nbn-Exon6-Deletion, die auch über zwei Wochen konstant blieb. So wurde die Kontamination der Spotmuster durch Zellen, in denen keine Exon6-Deletion stattgefunden hat, minimiert.

#### **5.3.1. Grenzen einer Proteomicsstudie**

Auch wenn die 2D-Gelelektrophorese eine besonders umfassende Untersuchungsmethode ist, so hat sie auch methodische Grenzen. Das Spektrum der dargestellten Proteine ist von einem bestimmten Massen- und pH-Spektrum begrenzt. So werden besonders große, kleine, saure und basische Proteine nicht dargestellt oder nur unzureichend aufgetrennt.

Außerdem ist der Nachweis erst ab einer bestimmten Proteinkonzentration möglich. Die minimale Nachweiskonzentration ist je nach Färbemethode unterschiedlich. Am sensitivsten ist die analytische Silberfärbung, bei der Proteine ab 1ng nachgewiesen

werden können. Bei der MS-Silberfärbung ist die Sensitivität geringer. Daher konnten einige Proteinspots, die in der analytischen Silberfärbung Unterschiede aufwiesen, nicht massenspektroskopisch analysiert werden, da sie in den MS-silbergefärbten Gelen nicht angefärbt wurden. Dies gilt auch für die Commassie-Brilliant-Blue-Färbung, die eine noch höhere Nachweisgrenze hat. Dennoch birgt diese Färbung einen Vorteil, da sie bessere Ergebnisse liefert, wenn die Proteinspots massenspektroskopisch analysiert werden.

Dies schränkt natürlich auch die Aussagekraft dieser Proteomicsstudie ein. Gerade DNA-Reparaturproteine haben oft eine sehr große Masse. Nibrin hat beispielsweise eine Masse von 83,8kDa (läuft bei der Gelelektrophorese allerdings bei 95kDa) und ist durch diese Methode schwer nachzuweisen. Auch seine direkten Interaktionspartner Mre11 und Rad50 liegen mit 80,2kDa und 153,5kDa in einem Bereich, der nur unzureichend aufgetrennt wird. Mit der 2D-PAGE wird somit ein großer Teil des Proteoms dargestellt, man darf aber nicht erwarten, dass eine Aussage über alle Proteine der Zelle getroffen werden kann.

### 5.3.2. Untersuchung von unbestrahltem Lebergewebe

Bei der Untersuchung von unbestrahltem Lebergewebe zeigen sich kaum Unterschiede zwischen heterozygotem und Nbn-nullmutantem Gewebe. Lediglich ein Protein ist in mehreren Paaren reproduzierbar verändert. Dies ist zunächst erstaunlich, da menschliche Patienten mit NBS doch deutliche Unterschiede zu Gesunden, sowohl phänotypisch als auch auf zellulärer Ebene, aufweisen.

Wie bereits im ersten Teil der Diskussion dargestellt, ist Leber ein ruhendes Gewebe, das zwar metabolisch sehr aktiv ist, jedoch nicht proliferiert. Die Zellen überleben in diesem Gewebe wie gezeigt auch ohne Nibrin. Auch auf Proteomebene zeigen sich kaum Unterschiede. Das Fehlen von Nibrin scheint sich auf den Stoffwechsel ruhender Zellen nicht auszuwirken, oder nur so geringfügig, dass es mit dieser Methode nicht nachzuweisen ist.

Andere Ergebnisse wären sicherlich in proliferativen Organen, wie Knochenmark, Thymus und Milz zu erwarten. Auch treten in diesen Organen physiologische DNA-

Doppelstrangbrüche auf, bei denen Nibrin ebenfalls von Bedeutung ist. Diese Organe sind auf Proteomebene jedoch schwer zu untersuchen, da sie auch bei Tieren mit gleichem genetischem Hintergrund eine hohe interindividuelle Variabilität aufweisen. Hinzu kommt, dass die nullmutanten Zellen in diesen Organen sehr schlecht überleben und so bei den induziert Nbn-nullmutanten Zellen immer ein Mischbild zwischen Nbn-nullmutanten und heterozygoten Zellen dargestellt würde, was die Analyse deutlich erschwert.

### 5.3.3. Untersuchung von Lebergewebe nach Bestrahlung

Zellen von NBS-Patienten sind durch eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung charakterisiert. Daher wurden die nibrindefizienten Mäuse in dieser Arbeit durch ionisierende Strahlung zellulärem Stress ausgesetzt und das Leberproteom dieser Tiere zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung untersucht.

Die Leber wird als radioresistentes Gewebe angesehen. So findet nach Bestrahlung fast keine Apoptose statt, während in strahlensensiblen Milzgewebe vergleichsweise hohe Apoptoselevel gemessen wurden [90]. Dennoch reagiert auch Lebergewebe auf Bestrahlung. In einer Proteomuntersuchung mit 2D-PAGE waren vor allem oxidative Stressproteine, wie Cytochrome C, Gluthation S-Transferase, NADH-Dehydrogenase und Peroxiredoxin VI, hochreguliert [90].

Die Leber in adulten Tieren proliferiert unter physiologischen Bedingungen fast nicht, hat nach Schädigung jedoch ein erstaunlich hohes Regenerationspotential. So bildet sich ein Großteil des Gewebes nach Teilresektion der Leber wieder nach [91]. Die Zellen gehen aus ihrem Ruhezustand vorübergehend wieder in Proliferation über. Auch nach Bestrahlung ist ein Teil der Zellen eventuell so stark geschädigt sein, dass er ersetzt werden muss. In dieser Situation könnte sich das Fehlen von Nibrin wieder auf das Überleben dieser Zellen auswirken.

Bei unbestrahlten Mäusen gab es kaum Proteinunterschiede zwischen nullmutanten Mäusen und Kontrollen. Nach Bestrahlung ändert sich dies deutlich. Auch in Kontrollmäusen zeigen sich Proteomunterschiede nach Bestrahlung, was nach einer Bestrahlung mit 4 Gy jedoch nicht verwunderlich ist, da sicherlich auch in gesunden

Zellen Schäden entstehen, auf die die Zelle reagieren muss. In den Kontrolltieren bilden sich die Veränderungen nach 24h jedoch bereits wieder zurück, was indiziert, dass sich die Zellen erholen.

In Nbn-nullmutanten Tieren sind die Proteomveränderungen viel ausgeprägter. Auch bilden sich in diesen Tieren die Veränderungen nach 24h noch nicht wieder zurück. Die Zellen scheinen durch die Bestrahlung deutlich stärker beeinträchtigt zu sein und sich nicht so schnell zu regenerieren. Es wäre sicherlich interessant, das Leberproteom über einen längeren Zeitraum zu beobachten, um zu sehen, ob sich die Proteomveränderungen auch dort mit einer größeren Latenz zurückbilden, oder ob die Zellen dauerhaft geschädigt sind. Eine Aussage darüber kann 24 Stunden nach Bestrahlung jedoch noch nicht getroffen werden.

Es wurden Veränderungen von Proteinen verschiedener funktioneller Gruppen gefunden. Viele davon stehen nicht im direkten Zusammenhang mit bisher bekannten Funktionen Nibrins. Im Folgenden sollen einige Gruppen veränderter Proteine genauer betrachtet werden und eventuelle Ursachen für ihre Dysregulation erörtert werden.

#### 5.3.4. Stoffwechselproteine

Die Leber ist kein proliferatives Organ. Die ruhenden Zellen sind jedoch äußerst stoffwechselaktiv, da sie vielfältige metabolische und entgiftende Aufgaben haben. Wird die Zelle unter Stress gesetzt, werden der Metabolismus und die gewebespezifischen Funktionen heruntergefahren und die Zelle konzentriert sich auf die überlebenswichtigen Funktionen. Die Veränderungen des Zellmetabolismus in dieser Arbeit sind sicherlich Ausdruck des zellulären Stresses. Dabei sind sie jedoch wahrscheinlich keine direkte Reaktion der Zellen auf die Bestrahlung, sondern eher eine indirekte Folge des Stresses, dem die Zelle ausgesetzt ist.

Sowohl in den Nbn-heterozygoten Kontrollmäusen, als auch in den Nbn-nullmutanten Mäusen bilden die Stoffwechselproteine die mit Abstand größte Gruppe veränderter Proteine. In nullmutanten Mäusen ist dieses Phänomen jedoch deutlich ausgeprägter. In diesen Mäusen sind insgesamt 54 Spots verändert. Das sind mehr als fünf Mal so viele wie in Kontrollmäuse. 24h nach Bestrahlung erreichen die Veränderungen ihr

Maximum. Hier sind 49 der 54 Proteine verändert. Die Nbn-nullmutanten Zellen scheinen somit im Vergleich zu den Kontrollen nicht nur eine deutlich ausgeprägtere sondern auch eine langfristige Beeinträchtigung des Stoffwechsels zu erfahren.

#### 5.3.5. Stressproteine

Die nächsten großen Gruppen veränderter Spots beinhalten Proteine, die bei der Antwort der Zelle auf Stress eine wichtige Rolle spielen: oxidative Stressproteine, Chaperone, Hitzeschockproteine und Proteasomproteine. Insgesamt enthalten diese Gruppen 51 veränderte Proteine, die Mehrzahl ist in Nbn-nullmutanten Mäusen verändert. Dies zeigt, dass nullmutante Zellen auf den zellulären Stress, der durch die Bestrahlung erzeugt wird, deutlich stärker reagieren. Die Aufgaben der veränderten Proteine greifen zum Teil in einander und sollen im Folgenden näher diskutiert werden.

#### 5.3.6. Oxidativer Stress

Ionisierende Strahlung bewirkt auch in gesundem Gewebe zellulären Stress. Dabei schädigt sie die Zellen auf verschiedene Arten. Ein wichtiger Mechanismus ist die Entstehung freier reaktiver Sauerstoffradikale (ROS), die die Zellen unter oxidativen Stress setzen. Freie Sauerstoffradikale reagieren mit fast allen Bestandteilen der Zelle und schädigen diese. Vor allem Makromoleküle wie Proteine, Lipide und DNA werden in ihrer Struktur geschädigt [92] und gerade Proteine können so in ihrer Funktion beeinträchtigt werden.

Die Zelle kennt prinzipiell drei Möglichkeiten, um mit oxidativ geschädigten Proteinen umzugehen [93].

1. Direkte Reparatur: Zum einen versuchen zelluläre Antioxidantien freie Radikale zu neutralisieren und so mögliche Oxidationsschäden abzufangen oder Oxidationsschäden an den Proteinen direkt zu reparieren. Hauptvertreter sind hierbei Superoxiddismutase, Catalase, Glutathion-S-Transferase und Peroxiredoxin. Erst wenn es der Zelle nicht mehr möglich freie Radikale in ausreichendem Maße abzufangen, entsteht oxidativer Stress und es kommt zu strukturellen Veränderungen an Proteinen und anderen Zellstrukturen [92].
2. Stabilisation von strukturell geschädigter Proteine: Missgefaltete Proteine werden zunächst von Chaperonen wie HSP70, HSP90 und Disulfidisomerase stabilisiert.

So wird ihre Aggregation verhindert und ihre Funktion wenn möglich erhalten [94].

3. Abbau geschädigter Proteine: Können geschädigte Proteine nicht repariert und stabilisiert werden, so versucht die Zelle diese zu eliminieren. Schlüsselrolle hierbei spielt das Proteasom [93, 95].

Ist der oxidative Stress und somit die Schäden an Proteinen zu hoch, so entstehen Querverbindungen und unlösliche Aggregate aus geschädigten Proteinen, die nicht mehr abgebaut werden können. Diese sammeln sich in der Zelle an, können sie nachhaltig schädigen und so zum Zelltod führen [96].

Einige Proteine, die bei diesen Vorgängen eine Rolle spielen, waren auch bei der Proteomuntersuchung dieser Arbeit verändert.

In Nbn-heterozygoten Mäusen konnten vor allem antioxidative Proteine gefunden werden, die versuchen ROS abzufangen, damit sie gar keinen Schaden anrichten können. An et al haben bei einer Proteomuntersuchung von bestrahltem, aber sonst gesundem Lebergewebe ebenfalls eine Hochregulation antioxidativer Proteine gefunden [90, 97]. Auch einige Chaperone sind in den Nbn-heterozygoten Mäusen unterschiedlich exprimiert. Beide Proteingruppen haben ihr Maximum der Veränderung nach 2h und die Veränderungen sind nach 24h bereits rückläufig. Proteasomproteine, die einen ausgeprägten Zellschaden indizieren könnten, sind in diesen Tieren nicht verändert.

In den Nbn-nullmutanten Mäusen zeigt sich eine deutlich ausgeprägtere Stressantwort. Sowohl antioxidative Proteine als auch Chaperone sind in diesen Tieren deutlich stärker exprimiert. Auch sind in diesen Tieren Proteasomproteine verändert. Alle drei Proteingruppen erreichen nach 24h erst ihr Maximum an Veränderungen und zeigen im untersuchten Zeitraum keine Rückbildungstendenz. Somit sind in diesen Tieren nicht nur Systeme aktiviert, die freie Radikale abfangen und oxidierte Proteine stabilisieren. Die Zellen scheinen so stark geschädigt zu sein, dass auch defekte Proteine abgebaut werden müssen.

Heterozygote Mäuse scheinen mit dem entstandenen oxidativen Stress deutlich besser umgehen zu können. Das antioxidative System wird aktiviert, jedoch in geringerem Ausmaß als bei nullmutanten Mäusen und mit einer Rückbildungstendenz nach 24h. Nullmutante Mäuse zeigen eine deutlich ausgeprägtere Reaktion der antioxidativen Systeme nach Bestrahlung. Dies ist verwunderlich, da Nibrin bisher nicht mit der Reaktion auf oxidativen Stress in Zusammenhang gebracht wurde. Fraglich ist, ob durch das Fehlen von Nibrin in diesen Zellen mehr ROS entstehen, oder ob die Zelle nicht adäquat darauf reagieren kann. Vielleicht ist es auch Ausdruck der allgemeinen Stressantwort und somit keine isolierte Reaktion auf ROS sondern auf andere Zellschäden.

Bisher gibt es noch keine Daten, wie sich Nibrindefizienz auf den Umgang der Zelle mit oxidativem Stress auswirkt. Ein enger Interaktionspartner Nibrins, nämlich ATM, scheint jedoch ebenfalls in die Regulation des oxidativen Stresses involviert zu sein. Vielleicht hilft ein Blick auf die verwandte Erkrankung Ataxia teleangiectasia und deren Zusammenhang mit oxidativem Stress, um der Rolle Nibrins im Zusammenhang mit oxidativem Stress näher zu kommen.

#### 5.3.7. Ataxia teleangiectasia und oxidativer Stress

Ataxia teleangiectasia gehört wie NBS zu den Chromosomenbruchsyndromen und hat sowohl klinisch als auch auf zellulärer Ebene viele Gemeinsamkeiten mit NBS, jedoch auch einige Unterschiede, wie Tabelle 6.1 entnommen werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Funktionsverlust von ATM zu einem Defekt in der Regulation reaktiver Sauerstoffradikale führt [98, 99]. In Zellen aus AT-Patienten und ATM<sup>-/-</sup>-Mäusen ist das Level an oxidativem Stress erhöht, außerdem zeigen sich Anomalien im antioxidativen System der Zellen. Bei einigen Symptomen des AT wird davon ausgegangen, dass sie durch oxidativen Stress beeinflusst werden.

Insbesondere für die neuronale Degeneration konnte auch ein Zusammenhang mit oxidativem Stress gezeigt werden. AT-Patienten haben im Cerebellum im Vergleich zu anderen Hirnarealen sowohl deutlich erhöhte ROS-Level [100] als auch eine Dysregulation der antioxidativen Systeme [101]. Folglich ist die Degeneration der

Neuronen bei AT-Patienten auf das Cerebellum konzentriert und die Patienten zeigen eine cerebelläre Ataxie.

Tabelle 5.1 Vergleich der Nbn-Nullmutation mit AT- und NBS-Patienten

Vergleich der klinischen Merkmale von Patienten mit Ataxia teleangiectasia, Nijmegen Breakage Syndrome und Mäusen mit Nbn-Nullmutation. Aufgrund der embryonalen Letalität der Mäuse mit Nbn-Nullmutation liegen nicht zu allen Merkmalen, die Patienten zeigen, Daten vor. Nicht untersuchte bzw. nicht untersuchbare Merkmale wurden mit NU bezeichnet.

<b>Klinisches Merkmal</b>	<b>AT-Patienten</b>	<b>NBS-Patienten</b>	<b>Nbn-nullmutante Mäuse</b>
erhöhtes Krebsrisiko	+	++	NU
Strahlenempfindlichkeit	+	+	+
Immundefizienz	+	Variabel	+
Knochenmarkschwund	+	-	Wahrscheinlich
Ovariendysgenese	+	+	NU
Hyperpigmentierung	(+)	+	NU
Wachstumsretardierung	(+)	+	NU
Mikrozephalie	-	+	+
mentale Retardierung	-	+	NU
Charakteristische Fazies	-	+	NU
Ataxie	+	-	+
Cerebelläre Degeneration	+	-	+
Teleangiektasien	+	-	NU

Durch die Behandlung mit Antioxidantien konnten einige Symptome des ATM-Funktionsverlustes deutlich gemildert werden. So wird beispielsweise die Lebenserwartung von ATM-defizienten Mäusen durch kontinuierliche Gabe von Antioxidantien verdoppelt, da das Auftreten maligner Thymuslymphome verzögert ist [102]. Dies indiziert, dass die Entstehung der Lymphome teilweise durch oxidativen Stress bestimmt wird. Durch die Gabe von N-Acetylcystein lässt sich auch der Knochenmarkschwund in ATM-defizienten Mäusen verhindern [103] und die

Immundefizienz ist deutlich abgeschwächt [104, 105]. Wie genau ATM das oxidative Stresslevel der Zelle beeinflusst, ist bisher noch unklar.

Es gibt Hinweise, dass ATM direkt in dessen Regulation involviert ist: Normalerweise ist ATM im Zellkern lokalisiert. Im Kleinhirn hingegen, wo der oxidative Stress besonders hoch ist, findet sich ATM nicht wie in Zellkulturzellen größtenteils im Zellkern, sondern vor allem im Zytoplasma [106, 107], insbesondere in den Peroxisomen [108], wo viele Proteine des antioxidativen Systems lokalisiert sind.

Eine andere Theorie legt einen eher indirekten Einfluss von ATM auf das ROS-Level der Zelle nahe. Durch den Defekt in der DNA-Reparatur bei AT können DNA-DSB nicht repariert werden und persistieren in der Zelle. Dadurch werden die DNA-Reparatursysteme dauerhaft aber erfolglos aktiviert. Diese benötigen NADH und verbrauchen die Speicher dessen schnell. NADH ist aber vor allem einer der Haupt-ROS-Entgifter der Zelle [109]. Wird es für die erfolglose DNA-Reparatur verbraucht, kann es seine entscheidende Funktion in der ROS-Regulation nicht mehr erfüllen und es kommt zu oxidativem Stress in der Zelle [110].

### 5.3.8. Nibrin und oxidativer Stress

Die Ergebnisse aus der Proteomuntersuchung Nbn-nullmutanter, bestrahlter Mäuse legen erstmals nahe, dass auch Nibrin in der Regulation des oxidativen Stresses involviert ist.

#### 5.3.8.1. Die Hypomorphe NBN-Mutation und oxidativer Stress

NBS-Patienten sind wie in der Einleitung beschrieben alle Träger einer hypomorphen Mutation des Nibringens und ohne die Expression eines teilfunktionalen Nibrinfragments wären die Patienten nicht lebensfähig [42]. Welche überlebenswichtigen Funktionen dieses Fragment genau kompensiert und welche nicht, ist noch nicht ausreichend geklärt. Auffällig ist jedoch, dass bei NBS-Patienten im Vergleich zu AT gerade Symptome fehlen, die bei AT mit oxidativem Stress in Zusammenhang gebracht wurden. So zeigen NBS-Patienten keine Ataxie und cerebelläre Degeneration, keinen Knochenmarksschwund und eine mildere und variable Immundefizienz (siehe Tabelle 6.1).

In Mausmodellen mit Nbn-Nullmutation für einzelne Gewebe, wurde gezeigt, dass die Tiere bei einer vollständigen Nibrindefizienz im Gehirn eine ausgeprägte Kleinhirndegeneration und Ataxie zeigen, ähnlich wie ATM-defiziente Mäuse [87]. Auch in lymphatischen Zellen führt das Fehlen von Nibrin zu einer deutlich ausgeprägteren Immundefizienz [17] und das Überleben Nbn-nullmutanter Knochenmarkszellen ist deutlich eingeschränkt, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Diese Defekte sind in NBS-Patienten gar nicht oder deutlich schwächer ausgeprägt. Die Regulation des oxidativen Stresses ist daher unter Umständen eine entscheidende Funktion, die durch das in Patienten exprimierte p70-Nibrinfragment erhalten bleibt und so das Überleben der Patienten ermöglicht.

#### 5.3.8.2. *Der Einfluss des oxidativen Stresses auf die klinische Variabilität des Nijmegen Breakage Syndrome*

Obwohl das NBS eine monogenetisch bedingte Erkrankung ist, gibt es zum Teil Unterschiede in der Ausprägung der Symptome. Unter Umständen spielt die individuelle Belastung mit oxidativem Stress bei der Variabilität der Merkmale eine Rolle. Der Level an oxidativem Stress in der Zelle hängt von vielen unterschiedlichen Faktoren ab. Einer davon scheint Nibrin zu sein. Es ist jedoch sicherlich nicht der einzige und so werden die individuellen oxidativen Stresslevel zwischen den Patienten mit großer Wahrscheinlichkeit schwanken.

Vor allem die Schwere des Immundefektes ist bei NBS-Patienten sehr variabel. Dieser Defekt zeigt bei ATM-defizienten Mäusen eine deutliche Abhängigkeit vom oxidativen Stresslevel und kann durch die Gabe antioxidativer Substanzen abgeschwächt werden [104, 111]. Es liegt Nahe, dass die Variabilität des Immundefektes bei NBS-Patienten ebenfalls von den individuell unterschiedlichen oxidativen Stressleveln abhängt.

#### 5.3.9. DNA-Reparaturproteine

Durch Bestrahlung des Lebergewebes werden auch Schäden an der DNA verursacht, vor allem auch DNA-Doppelstrangbrüche. Um die Integrität der Zelle zu wahren, müssen diese repariert werden. Daher wäre zu erwarten, dass auch in gesunden Mäusen nach Bestrahlung die DNA-Reparaturkaskade aktiviert wird und Proteine, die bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen, verändert exprimiert sind. Nibrin spielt bei

der Reparatur von DNA-DSB eine gesicherte, jedoch noch nicht vollständig geklärte Rolle. Insofern wäre zunächst zu erwarten gewesen, dass sich bei nibrindefizienten Mäusen durch die Aktivierung alternativer *Pathways* im Vergleich zu gesunden Mäusen Unterschiede in DNA-Reparaturproteinen finden.

Weder in gesunden noch in nibrindefizienten Mäusen konnten Proteine, die im Zusammenhang mit DNA-Reparatur stehen, gefunden werden. Hierfür kommen mehrere Erklärungen in Frage. Es könnte methodische Ursachen, die unter 1.20.1 (Grenzen einer Proteomicsstudie) bereits erwähnt wurden, geben: zum einen die mangelnde Auflösung im hochmolekularen Bereich, zum anderen die quantitative Nachweisgrenze bei den verschiedenen Färbungen. DNA-Reparaturproteine haben oft eine sehr hohe Molekülmasse. Außerdem sind sie meist kernständig und somit in einem Gesamtzelllysat nur in geringen Konzentrationen enthalten. Beides erschwert die Darstellung dieser Proteine sicherlich.

Jedoch liegt auch eine andere Erklärung nahe: Nibrin ist ein unersetzliches Protein in der Zelle, was sich daran zeigt, dass eine Nullmutation für Nibrin embryonal letal ist. Die Zellen scheinen also über keine suffizienten Kompensationsmechanismen in der DNA-Reparatur zu verfügen. Wenn es keine alternativen *Pathways* gibt, ist es natürlich nicht erstaunlich, dass diese in der Untersuchung des Proteoms auch nicht gezeigt werden können. Diese Erklärung würde die zentrale Rolle Nibrins in der DNA-Reparatur noch einmal verdeutlichen.

#### **5.4. Ausblick**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nbn-nullmutante Zellen in proliferativen Organen eine deutlich eingeschränkte Überlebensrate haben, wohingegen in nichtproliferativen Organen das Überleben der nullmutanten Zellen nicht beeinträchtigt ist. Es ist jedoch nicht geklärt, wie es zum Verlust der nibrindefizienten Zellen kommt. Hierzu sollten sich Untersuchungen anschließen, die herausfinden, ob die nullmutanten Zellen absterben, durch Nekrose oder Apoptose, oder ob sie sich nicht mehr teilen, indem sie in Seneszenz gehen oder im Zellzyklus aufgrund von Schäden anhalten, und dann von gesunden Zellen überwuchert werden.

Die Proteomuntersuchung in dieser Arbeit wurde mit Lebergewebe durchgeführt, das sich für 2D-PAGE sehr gut eignet, jedoch ein nichtproliferatives Organ ist. Da gezeigt werden konnte, dass nibrindefiziente Zellen in ihrer Proliferation eingeschränkt sind, wären weitere Analysen proliferativer Organe sicherlich aufschlussreich. Aufgrund der Heterogenität proliferativer Organe sind diese aber wahrscheinlich technisch schwer durchzuführen. DNA-Reparatur- und Zellzyklusproteine, deren weitere Analyse in Bezug auf das NBS sicherlich spannend wäre, sind vorrangig im Nukleus lokalisiert. Um höhere Konzentrationen dieser Proteine zu erzielen und diese genauer untersuchen zu können, wäre es unter Umständen ebenfalls sinnvoll eine Proteomuntersuchung von Kernextrakten durchzuführen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass Nibrin einen Einfluss auf den oxidativen Stresslevel der Zelle hat. Auch bei Defekten anderer Proteine die in der DNA-Reparatur und der Zellzykluskontrolle mitwirken, wurden erhöhte Stresslevel beobachtet. Weder bei diesen Proteinen, noch bei Nibrin sind die pathophysiologischen Mechanismen hinreichend bekannt. DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und die Regulation des oxidativen Stresslevels der Zelle scheinen jedoch deutlich enger verknüpft zu sein, als bisher angenommen und weitere Untersuchungen dieser Zusammenhänge sollten unbedingt durchgeführt werden.

Interessant wären sicherlich auch Untersuchungen zur ROS-Regulation durch das p70-Nibrinfragment, das in hypomorphen Mäusen und NBS Patienten exprimiert werden. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Funktion durch das Nibrinfragment kompensiert werden könnte.

In dieser Arbeit wurden somit Hinweise auf bisher unbekannte Funktionsbereiche Nibrins aufgezeigt und somit neue Ansätze für weitere Forschung auf dem Bereich des Nijmegen Breakage Syndromes erarbeitet.

**Abkürzungsverzeichnis**

2D-PAGE	2 Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis
AT	Ataxia teleangiectasia
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
BP	basepair / Basenpaar
BRCT	breast cancer carboxy terminal
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio)-propan-sulfonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
ES	Embryonale Stammzelle
ESI	Electrospray Ionisation
FHA	Forkhead-associated
h	Stunden
HR	Homologous Recombination
KBP	Kilobasepairs/Kilobasenpaare
KG	Körpergewicht
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Dissorption/Ionisation – time of flight
MOWSE-Score	Molecular Weight Search – Score
MRN-Komplex	MRE11/Rad50/Nibrin-Komplex
MS	Massenspektrometrie
Nbn	Murines Homolog zum NBN-Gen
NBS	Nijmegen Breakage Syndrome
NBN	Nijmegen Breakage Syndrome-Gen
Nbs1	Protein kodiert durch das NBN-Gen
NHEJ	Nonhomologous End Joining
NLS	Nuclear localization signal
NTP	Nukleosidtriphosphat
PCR	Polymerase Chain Reaction
pI	isoelektrischer Punkt
pIpC	Polyinosinic-polycytidylic acid
RDS	Radioresistente DNA-Synthese
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TRIZMA	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

## 6. Literaturverzeichnis

1. Cooper, G.M., *The Cell: A Molecular Approach*. 4th ed. 2007: Sinauer Associates Incorporated.
2. Bartek, J. and J. Lukas, *DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation*. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. **19**(2): p. 238-45.
3. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers*. *Nature*, 1997. **386**(6627): p. 761, 763.
4. Helleday, T., et al., *DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment*. *DNA Repair (Amst)*, 2007. **6**(7): p. 923-35.
5. Cahill, D., B. Connor, and J.P. Carney, *Mechanisms of eukaryotic DNA double strand break repair*. *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 1958-76.
6. van Gent, D.C. and M. van der Burg, *Non-homologous end-joining, a sticky affair*. *Oncogene*, 2007. **26**(56): p. 7731-40.
7. Soulas-Sprauel, P., et al., *V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining*. *Oncogene*, 2007. **26**(56): p. 7780-91.
8. Maser, R.S. and R.A. DePinho, *Telomeres and the DNA damage response: why the fox is guarding the henhouse*. *DNA Repair (Amst)*, 2004. **3**(8-9): p. 979-88.
9. Weemaes, C.M., et al., *A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome*. *Acta Paediatr Scand*, 1981. **70**(4): p. 557-64.
10. *Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group*. *Arch Dis Child*, 2000. **82**(5): p. 400-6.
11. Antoccia, A., et al., *Chromosomal sensitivity to clastogenic agents and cell cycle perturbations in Nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines*. *Int J Radiat Biol*, 1997. **71**(1): p. 41-9.
12. Antoccia, A., et al., *Impaired p53-mediated DNA damage response, cell-cycle disturbance and chromosome aberrations in Nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines*. *Int J Radiat Biol*, 1999. **75**(5): p. 583-91.
13. Taalman, R.D., et al., *Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen Breakage Syndrome*. *Mutat Res*, 1983. **112**(1): p. 23-32.
14. Seemanova, E., et al., *Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk for lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder*. *Am J Med Genet*, 1985. **20**(4): p. 639-48.
15. Seemanova, E., *An increased risk for malignant neoplasms in heterozygotes for a syndrome of microcephaly, normal intelligence, growth retardation, remarkable facies, immunodeficiency and chromosomal instability*. *Mutat Res*, 1990. **238**(3): p. 321-4.
16. Seidemann, E., et al., *Color signals in area MT of the macaque monkey*. *Neuron*, 1999. **24**(4): p. 911-7.
17. Kracker, S., et al., *Nibrin functions in Ig class-switch recombination*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(5): p. 1584-9.
18. Reina-San-Martin, B., et al., *Genomic instability, endoreduplication, and diminished Ig class-switch recombination in B cells lacking Nbs1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(5): p. 1590-5.

19. Gregorek, H., et al., *Heterogeneity of humoral immune abnormalities in children with Nijmegen breakage syndrome: an 8-year follow-up study in a single centre*. Clin Exp Immunol, 2002. **130**(2): p. 319-24.
20. Weemaes, C.M., D.F. Smeets, and C.J. van der Burgt, *Nijmegen Breakage syndrome: a progress report*. Int J Radiat Biol, 1994. **66**(6 Suppl): p. S185-8.
21. van Engelen, B.G., et al., *Decreased immunoglobulin class switching in Nijmegen Breakage syndrome due to the DNA repair defect*. Hum Immunol, 2001. **62**(12): p. 1324-7.
22. Harfst, E., et al., *Normal V(D)J recombination in cells from patients with Nijmegen breakage syndrome*. Mol Immunol, 2000. **37**(15): p. 915-29.
23. Yeo, T.C., et al., *V(D)J rearrangement in Nijmegen breakage syndrome*. Mol Immunol, 2000. **37**(18): p. 1131-9.
24. Stumm, M., et al., *High frequency of spontaneous translocations revealed by FISH in cells from patients with the cancer-prone syndromes ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome*. Cytogenet Cell Genet, 2001. **92**(3-4): p. 186-91.
25. Steffen, J., et al., *Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland*. Int J Cancer, 2004. **111**(1): p. 67-71.
26. Seemanova, E., et al., *Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(24): p. 1875-80.
27. Varon, R., et al., *Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL)*. Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3570-2.
28. Tessitore, A., et al., *New mutations and protein variants of NBS1 are identified in cancer cell lines*. Genes Chromosomes Cancer, 2003. **36**(2): p. 198-204.
29. Demuth, I. and M. Digweed, *The clinical manifestation of a defective response to DNA double-strand breaks as exemplified by Nijmegen breakage syndrome*. Oncogene, 2007. **26**(56): p. 7792-8.
30. Saar, K., et al., *The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(3): p. 605-10.
31. Varon, R., et al., *Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome*. Cell, 1998. **93**(3): p. 467-76.
32. Matsuura, S., et al., *Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 179-81.
33. Carney, J.P., et al., *The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response*. Cell, 1998. **93**(3): p. 477-86.
34. Falck, J., J. Coates, and S.P. Jackson, *Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 605-11.
35. Cerosaletti, K.M. and P. Concannon, *Nibrin forkhead-associated domain and breast cancer C-terminal domain are both required for nuclear focus formation and phosphorylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21944-51.
36. Difilippantonio, S., et al., *Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 675-85.
37. Gatei, M., et al., *ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 115-9.
38. Wu, X., et al., *ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is*

- required in a DNA damage response.* Nature, 2000. **405**(6785): p. 477-82.
39. Wilda, M., et al., *Expression pattern of the Nijmegen breakage syndrome gene, Nbs1, during murine development.* Hum Mol Genet, 2000. **9**(12): p. 1739-44.
  40. Varon, R., et al., *Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations.* Eur J Hum Genet, 2000. **8**(11): p. 900-2.
  41. Maser, R.S., R. Zinkel, and J.H. Petrini, *An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele.* Nat Genet, 2001. **27**(4): p. 417-21.
  42. Demuth, I., et al., *An inducible null mutant murine model of Nijmegen breakage syndrome proves the essential function of NBS1 in chromosomal stability and cell viability.* Hum Mol Genet, 2004. **13**(20): p. 2385-97.
  43. Kobayashi, J., et al., *NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain.* Curr Biol, 2002. **12**(21): p. 1846-51.
  44. Tanzanella, C., et al., *Chromosome instability and nibrin protein variants in NBS heterozygotes.* Eur J Hum Genet, 2003. **11**(4): p. 297-303.
  45. Zhu, J., et al., *Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice.* Curr Biol, 2001. **11**(2): p. 105-9.
  46. Dumon-Jones, V., et al., *Nbn heterozygosity renders mice susceptible to tumor formation and ionizing radiation-induced tumorigenesis.* Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7263-9.
  47. Kruger, L., et al., *Cancer incidence in Nijmegen breakage syndrome is modulated by the amount of a variant NBS protein.* Carcinogenesis, 2006.
  48. Nelms, B.E., et al., *In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts.* Science, 1998. **280**(5363): p. 590-2.
  49. Ueno, M., et al., *Molecular characterization of the Schizosaccharomyces pombe nbs1+ gene involved in DNA repair and telomere maintenance.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(18): p. 6553-63.
  50. Boulton, S.J. and S.P. Jackson, *Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing.* Embo J, 1998. **17**(6): p. 1819-28.
  51. Lee, S.E., et al., *Saccharomyces Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage.* Cell, 1998. **94**(3): p. 399-409.
  52. Tauchi, H., et al., *Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells.* Nature, 2002. **420**(6911): p. 93-8.
  53. Lee, J.H. and T.T. Paull, *ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex.* Science, 2005. **308**(5721): p. 551-4.
  54. Zhang, Y., et al., *NBS1 knockdown by small interfering RNA increases ionizing radiation mutagenesis and telomere association in human cells.* Cancer Res, 2005. **65**(13): p. 5544-53.
  55. Yazdi, P.T., et al., *SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint.* Genes Dev, 2002. **16**(5): p. 571-82.
  56. Lim, D.S., et al., *ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway.* Nature, 2000. **404**(6778): p. 613-7.
  57. Zhao, S., et al., *Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products.* Nature, 2000. **405**(6785): p. 473-7.
  58. Girard, P.M., et al., *Nbs1 promotes ATM dependent phosphorylation events including those required for G1/S arrest.* Oncogene, 2002. **21**(27): p. 4191-9.
  59. Williams, B.R., et al., *A murine model of Nijmegen breakage syndrome.* Curr Biol,

2002. **12**(8): p. 648-53.
60. Gatei, M., et al., *Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation*. J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 14806-11.
  61. Buscemi, G., et al., *Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(15): p. 5214-22.
  62. Stiff, T., et al., *Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events*. Embo J, 2005. **24**(1): p. 199-208.
  63. Vissinga, C.S., et al., *Identification, characterization, and mapping of a mouse homolog of the gene mutated in Nijmegen breakage syndrome*. Cytogenet Cell Genet, 1999. **87**(1-2): p. 80-4.
  64. Luo, G., et al., *Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7376-81.
  65. Xiao, Y. and D.T. Weaver, *Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(15): p. 2985-91.
  66. Barlow, C., et al., *Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia*. Cell, 1996. **86**(1): p. 159-71.
  67. Kang, J., R.T. Bronson, and Y. Xu, *Targeted disruption of NBS1 reveals its roles in mouse development and DNA repair*. Embo J, 2002. **21**(6): p. 1447-55.
  68. Kuhn, R., et al., *Inducible gene targeting in mice*. Science, 1995. **269**(5229): p. 1427-9.
  69. Hug, H., et al., *Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon- and virus-inducible promoter*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(8): p. 3065-79.
  70. Swinbanks, D., *Government backs proteome proposal*. Nature, 1995. **378**(6558): p. 653.
  71. Klose, J. and U. Kobalz, *Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome*. Electrophoresis, 1995. **16**(6): p. 1034-59.
  72. Challapalli, K.K., et al., *High reproducibility of large-gel two-dimensional electrophoresis*. Electrophoresis, 2004. **25**(17): p. 3040-7.
  73. Klose, J., *Fractionated extraction of total tissue proteins from mouse and human for 2-D electrophoresis*. Methods Mol Biol, 1999. **112**: p. 67-85.
  74. Heukeshoven, J. and R. Dernick, *Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels*. Electrophoresis, 1988. **9**(1): p. 28-32.
  75. Nebrich, G., et al., *High MS-compatibility of silver nitrate-stained protein spots from 2-DE gels using ZipPlates and AnchorChips for successful protein identification*. Electrophoresis, 2007. **28**(10): p. 1607-14.
  76. Janeway, C., et al., *Immunobiology : The Immune system in health and disease*. 5 ed. 2001: Garland Publishing.
  77. Streilein, J.W., *Unraveling immune privilege*. Science, 1995. **270**(5239): p. 1158-9.
  78. Sleckman, B.P., J.R. Gorman, and F.W. Alt, *Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 459-81.
  79. Moore, J.K. and J.E. Haber, *Cell cycle and genetic requirements of two pathways*

- of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(5): p. 2164-73.
80. Clatworthy, A.E., et al., *The MRE11-RAD50-XRS2 complex, in addition to other non-homologous end-joining factors, is required for V(D)J joining in yeast*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20247-52.
81. Huang, J. and W.S. Dynan, *Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(3): p. 667-74.
82. Chen, H.T., et al., *Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX*. Science, 2000. **290**(5498): p. 1962-5.
83. Michalkiewicz, J., et al., *Abnormalities in the T and NK lymphocyte phenotype in patients with Nijmegen breakage syndrome*. Clin Exp Immunol, 2003. **134**(3): p. 482-90.
84. Yabuki, M., M.M. Fujii, and N. Maizels, *The MRE11-RAD50-NBS1 complex accelerates somatic hypermutation and gene conversion of immunoglobulin variable regions*. Nat Immunol, 2005. **6**(7): p. 730-6.
85. Petersen, S., et al., *AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching*. Nature, 2001. **414**(6864): p. 660-5.
86. Pan, Q., et al., *Alternative end joining during switch recombination in patients with ataxia-telangiectasia*. Eur J Immunol, 2002. **32**(5): p. 1300-8.
87. Frappart, P.O., et al., *An essential function for NBS1 in the prevention of ataxia and cerebellar defects*. Nat Med, 2005. **11**(5): p. 538-44.
88. Cherry, S.M., et al., *The Mre11 complex influences DNA repair, synapsis, and crossing over in murine meiosis*. Curr Biol, 2007. **17**(4): p. 373-8.
89. Jang, E.R., et al., *Analysis of ataxia-telangiectasia mutated (ATM)- and Nijmegen breakage syndrome (NBS)-regulated gene expression patterns*. J Cancer Res Clin Oncol, 2004. **130**(4): p. 225-34.
90. Park, E.C., et al., *Effect of ionizing radiation on rat tissue: proteomic and biochemical analysis*. Prep Biochem Biotechnol, 2006. **36**(1): p. 19-35.
91. Michalopoulos, G.K. and Z. Khan, *Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin*. Gastroenterology, 2005. **128**(2): p. 503-6.
92. Dean, R.T., et al., *Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation*. Biochem J, 1997. **324 ( Pt 1)**: p. 1-18.
93. Poppek, D. and T. Grune, *Proteasomal defense of oxidative protein modifications*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(1-2): p. 173-84.
94. Kregel, K.C., *Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance*. J Appl Physiol, 2002. **92**(5): p. 2177-86.
95. Grune, T., et al., *Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome*. J Biol Chem, 1995. **270**(5): p. 2344-51.
96. Groll, M., et al., *Molecular machines for protein degradation*. Chembiochem, 2005. **6**(2): p. 222-56.
97. An, J.H., J. Kim, and J. Seong, *Redox signaling by ionizing radiation in mouse liver*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1030**: p. 86-94.
98. Rotman, G. and Y. Shiloh, *The ATM gene and protein: possible roles in genome surveillance, checkpoint controls and cellular defence against oxidative stress*. Cancer Surv, 1997. **29**: p. 285-304.
99. Rotman, G. and Y. Shiloh, *Ataxia-telangiectasia: is ATM a sensor of oxidative*

- damage and stress?* Bioessays, 1997. **19**(10): p. 911-7.
100. Quick, K.L. and L.L. Dugan, *Superoxide stress identifies neurons at risk in a model of ataxia-telangiectasia*. Ann Neurol, 2001. **49**(5): p. 627-35.
  101. Kamsler, A., et al., *Increased oxidative stress in ataxia telangiectasia evidenced by alterations in redox state of brains from Atm-deficient mice*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 1849-54.
  102. Schubert, R., et al., *Cancer chemoprevention by the antioxidant tempol in Atm-deficient mice*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(16): p. 1793-802.
  103. Ito, K., et al., *Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells*. Nature, 2004. **431**(7011): p. 997-1002.
  104. Ito, K., et al., *Regulation of reactive oxygen species by Atm is essential for proper response to DNA double-strand breaks in lymphocytes*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 103-10.
  105. Bagley, J., G. Singh, and J. Iacomini, *Regulation of oxidative stress responses by ataxia-telangiectasia mutated is required for T cell proliferation*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 4757-63.
  106. Oka, A. and S. Takashima, *Expression of the ataxia-telangiectasia gene (ATM) product in human cerebellar neurons during development*. Neurosci Lett, 1998. **252**(3): p. 195-8.
  107. Barlow, C., et al., *ATM is a cytoplasmic protein in mouse brain required to prevent lysosomal accumulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 871-6.
  108. Watters, D., et al., *Localization of a portion of extranuclear ATM to peroxisomes*. J Biol Chem, 1999. **274**(48): p. 34277-82.
  109. Kirsch, M. and H. De Groot, *NAD(P)H, a directly operating antioxidant?* Faseb J, 2001. **15**(9): p. 1569-74.
  110. Barzilai, A., G. Rotman, and Y. Shiloh, *ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage*. DNA Repair (Amst), 2002. **1**(1): p. 3-25.
  111. Peter, Y., et al., *Elevated Cu/Zn-SOD exacerbates radiation sensitivity and hematopoietic abnormalities of Atm-deficient mice*. Embo J, 2001. **20**(7): p. 1538-46.

## Danksagung

Besonders herzlich möchte ich Herrn Professor Martin Digweed danken, in dessen Arbeitsgruppe und unter dessen Leitung ich diese Arbeit angefertigt habe. Die motivierenden und ergebnisorientierten Gespräche haben maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. Dr. Lars Stöckl danke ich für die intensive fachliche Betreuung und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Janina Radszewski, Gabriele Hildebrandt und Susanne Rothe danke ich für ihre unermüdliche Geduld bei der Vermittlung zahlreicher Methoden und Fragen zur technischen Durchführung dieser Arbeit. Durch die freundliche Atmosphäre dank aller Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe hat mir die Arbeit im Labor großen Spaß bereitet.

Auch danke ich der Arbeitsgruppe Klose für die Möglichkeit, die Proteinuntersuchungen in ihren Laboren und mit ihrer Unterstützung durchführen zu können. Insbesondere bedanke ich mich bei Yvonne Kläre für die präzise Einführung in die 2D-Gelelektrophorese und Gritt Nebrich für die massenspektrometrischen Analysen.

Meinen ehemaligen Mitbewohnern Martina, Lisa, Fritz und Verena danke ich für ihre Freundschaft und die kontinuierliche moralische Unterstützung. Verena danke ich insbesondere für ihre professionelle und geduldige Einführung in die Tücken der Dokumentformatierung.

Mein inniger Dank gilt insbesondere auch meinen Eltern und meinem Freund Xaver Sailer, die mich in allen Phasen dieser Arbeit liebevoll und nachdrücklich unterstützt haben und ohne deren motivierende Einstellung ich vielleicht den Mut verloren hätte.

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht bzw. vorgestellt:****Zeitschriftenartikel**

- 10/2004      Demuth, I., Frappart PO, Hildebrand G, **Melchers A**, Lobitz S, Stockl L, Varon R, Herceg Z, Sperling K, Wang ZQ, Digweed M:  
*An inducible null mutant murine model of Nijmegen breakage syndrome proves the essential function of NBS1 in chromosomal stability and cell viability.*  
Hum Mol Genet, 2004. **13**(20): p. 2385-97.

**Konferenzbeitrag**

- 10/2005      16<sup>th</sup> European Student's Conference, Berlin  
**Melchers A**, Stöckl L, Radzewski J, Sperling K, Digweed M  
*Nijmegen Breakage Syndrome - A null mutant mouse model with conditional knockout* (Oral Presentation)

## Erklärung

„Ich, Anna Maria Elisabeth Melchers, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema *„Neue Erkenntnisse zum Pathomechanismus des Nijmegen Breakage Syndrome durch die Proteomanalyse eines konditional nullmutanten Mausmodells“* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift